

УДК
ББК

Демидов С.В., Мінченко Ж.М., Гавриленко Т.І., Топчій Н.М., Новікова С.М. Антропогенетика з основами медичної генетики. – Київ: Фітосоціоцентр, 2012. – с.

У навчальному посібнику зібрані як класичні, так і сучасні дані, які стосуються медичної генетики і викладаються під час лекційних занять з різних генетичних курсів для студентів біологічних і медичних спеціальностей. Особлива увага приділяється сучасним методам генетичної діагностики спадкових хвороб, сучасним напрямкам медичної генетики, які можуть бути цікавими не тільки студентам та аспірантам, але й широкому колу читачів. Посібник розрахований, проте, перш за все для допомоги студентам пізнати основи класичних і сучасних принципів молекулярно-генетичних механізмів спадкової патології людини, познайомитися з методами, які застосовуються в медико-генетичних дослідженнях, сучасними напрямками медичної генетики та основними законами цієї генетичної науки.

Рецензенти:

УДК
ББК

ISBN

©Демидов С.В, Мінченко Ж.М., Гавриленко Т.І.,
Топчій Н. М., Новікова С.М, 2012
©Український фітосоціологічний центр, 2012

Навчальний посібник

Демидов Сергій Вікторович
Мінченко Жанна Миколаївна
Гавриленко Тетяна Іллівна
Топчій Наталія Миколаївна
Новікова Світлана Миколаївна

АНТРОПОГЕНЕТИКА З ОСНОВАМИ МЕДИЧНОЇ ГЕНЕТИКИ

Технічний редактор – І.В. Соломаха

Підписано до друку Формат 60x84 ¹/₁₆
Папір офсетний. Умовн. друк. арк. 14,5.
Умов. вид. арк. 15,3. Наклад 300 прим.

Віддруковано у друкарні Українського фітосоціологічного центру

ЗМІСТ Вступ

ЧАСТИНА 1.ГЕНЕТИКИ ЛЮДИНИ

- 1.Предмет антропогенетики та медичної генетики
 - 1.1. Історичний розвиток антропогенетики
 1. Матеріальні основи спадковості людини.
 - 2.1. Загальна характеристика нуклеїнових кислот
 - 2.2. Реплікація ДНК
 3. Типи успадкування у людини.
 4. Генетичні механізми визначення і розвитку статі.
 5. Генетичні фактори росту людини.
 6. Генетика старіння і довголіття людини.

ЧАСТИНА 2. ОСНОВИ МЕДИЧНОЇ ГЕНЕТИКИ

1. Сучасний стан та перспективи розвитку медичної генетики
 2. Методи медико-генетичного дослідження спадкової та мультифакторіальної патології.
 - 2.1 Клініко-генеалогічний метод
 - 2.2 лабораторно-генетичні методи дослідження
 - 2.3 цитогенетичні методи дослідження
 - 2.4 спеціальні біохімічні методи дослідження
 - 2.5. дерматогліфічний метод дослідження
 - 2.6. мікробіологічні методи
 - 2.7. Молекулярно-генетичні методи дослідження
 - 2.8. Близнюковий, популяційний та варіаційно-статистичний методи дослідження.
 3. Прямі та непрямі методи молекулярної діагностики.
 4. Механізми розвитку спадкових хвороб.
 5. Мітохондріальні захворювання
 - 5.1 Мітохондріальний геном.
 - 5.2 Реплікаційна сегрегація і гетероплазія.
 - 5.3 Мутації мтДНК.
 - 5.4. Загальна клініко-генетична характеристика мітохондріальних хвороб.
 - 5.5. Мітохондріопатії.
 - 5.6. Синдроми множинних делецій мітохондріальної ДНК.
 - 5.7. Делеції та дуплікації ділянок мітохондріальної ДНК
 - 5.8 Мутації в ядерної ДНК
 - 6.Захворювання, пов'язані з порушенням метаболізму молочної та піровиноградної кислот.
 - 6.1.Порушення окислення жирних кислот (дефект ядерної ДНК).
 - 6.2. Метаболічні хвороби. Механізми, діагностика.
 7. Хромосомні хвороби людини.
 - 7.1.Механізми, патогенез, діагностика.
 - 7.2. Цитогенетика хромосомних хвороб.
 - 7.3. Пренатальна діагностика вродженої та спадкової патології.
 8. Спадкова схильність і мультифакторіальна патологія
 - 8.1 Генетичний поліморфізм як основа спадкової схильності.
 - 8.2. Поліморфізм генів
 - 8.3. Генетичний паспорт людини
 9. Імуногенетика та імунопатологія.
 - 9.1. Генетичні системи крові.
 - 9.2. Гени імуноглобулінів.
 - 9.3. Молекулярна структура і функції головного комплексу гістосумісності.
 - 9.4. Лімфоцити Т і В
 - 9.5. Фактори регуляції імунної відповіді
 - 9.6. Макрофаги та фагоцити
 - 9.7. Генетичний контроль імунної відповіді та імунопатологія.
 - 9.8.Імунодефіцити
 - 9.9.Трансплантаційний імунітет
 10. Стовбурові клітини
 - 10.1 Загальна характеристика
 - 10.2 Стовбурові клітини та їх відмінні властивості

11. Онкогенетика
12. Фармакогенетика.
13. Генна інженерія і генна терапія.
14. Етичні аспекти медичної генетики.
Словник генетичних та медичних термінів.. Перелік умовних скорочень

ВСТУП

Сучасний етап розвитку теоретичної і практичної біології та медицини характеризується інтенсивним збільшенням застосування генетичних методів дослідження. Це пов'язано з накопленням знань відносно біологічних закономірностей індивідуального розвитку організму людини, зокрема, в пренатальному і постнатальному періодах в конкретних умовах реалізації генетичної програми, яку індивіди успадкували від своїх батьків через статеві клітини. Тобто, будь-які аномалії розвитку біологічної системи можна розглядати як певний результат порушення у ланках реалізації генетичної програми.

Слід зазначити, що сучасні тенденції в структурі захворюваності свідчать про зростання внеску генетичної компоненти. За даними світової статистики більше 5% немовлят мають той чи інший генетично обумовлений дефект. На сьогодні відомо вже понад 2500 нозологічних форм генетично обумовлених хвороб, які торкаються усіх органів, систем і функцій організму людини.

Сучасні погляди на етіологію і патогенез багатьох мультифакторіальних захворювань (онкогематологія, ішемічна хвороба серця, група нервово-психічних розладів, ендокринна патологія та інш.) свідчать про велике значення генетично детермінованої схильності до реалізації захворювання, урахування якої на основі генетичних маркерів сприяє не тільки ранній диференційній діагностиці патологічного процесу, але і мінімізації наслідків захворювання і навіть, профілактики виникнення.

Сучасний світогляд на загальні закономірності розвитку фізіологічного статусу індивіда свідчить про взаємодіючі механізми декількох складових, серед яких велике значення посідають саме генетично детерміновані процеси. На тлі несприятливих екзогенних чинників одна і та сама комбінація генетичних факторів може виступати як в ролі індукторів, так і протекторів розвитку патології.

Таким чином, тільки динамічне пізнання спадковості людини з позицій молекулярно-генетичних досліджень дозволить розшифрувати причини загальних та індивідуальних проявів організму на різні чинники зовнішнього середовища. У зв'язку з вищезазначеним, є очевидним велике значення генетики для теоретичної і практичної медицини і біології. Дуже важливим є оволодіння основами антропогенетики і медичної генетики широкому колу біологів і медиків для розуміння генетичних підходів під час диференціальної діагностики захворювань, їх профілактики і лікування.

Ідея даної книги полягає у тому, щоб у скороченій формі систематично викласти основи антропогенетики і медичної генетики для студентів біологів і медиків. При розробці даного посібника автори мали досить складне завдання – у порівняно невеликому об'ємі викласти всі основні положення класичної медичної генетики, сучасні уявлення про роль спадковості і загальні принципи генетичного дослідження патологічних станів.

У першому розділі представлені основні елементи загальної генетики і антропогенетики в скороченій формі, оскільки в спеціальній літературі є більш детальний розгляд структури генетичних елементів механізмів генетичних порушень.

Наступний розділ присвячено загальним генетичним закономірностям реалізації патологічного процесу: основним класам генетично обумовленої патології (хромосомні захворювання, мітохондріальні хвороби і хвороби, які пов'язані з генетичною схильністю).

В кожному підрозділі надана увага генетичним основам даної групи захворювань. Нозологічні форми розглянуті окремо. Концептуально увага зосереджена на генетичних механізмах формування даних нозологічних форм. Такий підхід обумовлений розглядом саме основ медичної генетики.

В окремому розділі представлені сучасні методичні підходи до диференційної діагностики певного кола розглянутих захворювань.

Автори мають надію, що дана книга буде корисною для студентів, викладачів, науковців біологічних дисциплін і лікарів будь-якої спеціалізації

для розуміння сучасних уявлень про роль спадкових факторів у патології людини.

ЧАСТИНА 1

ГЕНЕТИКИ ЛЮДИНИ

Розділ генетики, який вивчає явища спадковості і мінливості у людини у нормі, називається **антропогенетикою** або **генетикою людини**.

РОЗДІЛ I

ПРЕДМЕТ ГЕНЕТИКИ ЛЮДИНИ І МЕДИЧНОЇ ГЕНЕТИКИ

Предметом антропогенетики є вивчення законів успадкування, збереження, мінливості та реалізації генетичної інформації в біологічній системі, якою є людина. Шлях до пізнання основ самопідтримки і самовідновлення біологічної системи, як частини всесвіту, є непростим і кінцева відповідь не знайдена ще й досі. Але на сьогодні є вже зрозумілими хоча б перші основи побудови всього живого і ключем до такого розуміння стали результати саме генетичних досліджень 2-й половини минулого століття.

Першим з таких усвідомлених положень стало положення про спадковість. Саме у 2-й половині минулого століття спадковість відокремили від організму і перевели до рангу технологій. Наприклад, якщо взяти у людини краплину крові або слини і виділити ДНК, то це буде особина саме у вигляді спадковості. В такому вигляді спадковість можна перенести до будь-якого об'єму, до будь-якого об'єкту, що є дуже відповідальним відносно морально-етичних законів всесвіту.

Народженням генетики як науки вважається 1900 р. – початок XX ст. - підґрунтям для цього стали еволюційна теорія Дарвіна і перевідкриття законів Менделя. Внаслідок застосування в генетичних дослідженнях методів хімії,

фізики, цитології, математики і кібернетики генетика як наука набула статусу провідної галузі сучасної біології і медицини та дозволила виділити в окремі дисципліни такі наукові напрямки, як цитогенетика, молекулярна генетика, імуногенетика, біохімічна генетика, інформаційна генетика фармакогенетика, протеоміка, метаболоміка та інші. Тобто, на сьогоднішній день – це одна з найпопулярніших і перспективних наук у світі, яка має тісний зв'язок з різними галузями медицини і біології.

По суті завдяки сучасним біотехнологіям, генетичні методи дозволяють виділити генетичний матеріал індивідуальності особини і працювати з ним відокремлено від індивіду.

Спадковість – це властивість організмів повторювати з покоління у покоління подібні ознаки і забезпечувати специфічний характер індивідуального розвитку у певних умовах середовища. Завдяки спадковості батьки і нащадки мають подібний тип біосинтезу, тобто подібність у хімічному складі тканин, характер обміну речовин, фізіологічних функцій, морфологічних ознак та інших особливостях. Внаслідок цього кожний вид організмів відтворює себе з покоління у покоління.

Мінливість – це явище протилежне спадковості. Мінливість полягає у зміні спадкових задатків, а також у варіабельності їх проявів у процесі розвитку організмів при взаємодії з навколишнім середовищем.

Успадкування – це спосіб передачі спадкової інформації, який може змінюватись залежно від форми розмноження.

З генетики людини виділяється самостійний розділ - медична генетика, яка досліджує механізми розвитку і займається діагностикою та профілактикою спадкових захворювань, лікуванням хворих. Предмет її досліджень полягає у вивченні і попередженні наслідків генетичних дефектів людини.

Медична генетика – галузь генетики людини, яка вивчає залежність хвороб людини від спадкових факторів, причини їх виникнення і розробляє заходи запобігання дії мутагенних факторів на організм людини. Не існує чіткої межі між основами загальної генетики і багатьма розділами медичної генетики.

Про це говорить той факт, що Нобелівські премії з медицини та фармакології часто присуджуються, як правило, за теоретичні роботи з генетики (Т. Морган, 1933; Г. Мюллер, 1946; Г. Бидл, Є. Тейтум, 1958 і ін.).

Медична генетика вивчає характер спадкових захворювань на різних рівнях біологічної організації: молекулярному, клітинному, органному, організменному завдяки різним сучасним і класичним методам.

Спадкові захворювання, як правило, викликаються пошкодженням структури або функції, змінами кількості генів чи хромосом. Багато спадкових хвороб передаються в ряду поколінь від батьків дітям. Окремий напрямок сучасних генетичних досліджень присвячений генетиці мультифакторіальних захворювань, підґрунтя яких складає генетична схильність до патологічного процесу на основі біохімічного чи тканинного генетичного поліморфізму. Закони передачі і прояву спадкових та мультифакторіальних захворювань і вивчає медична генетика.

1.1. Історичний нарис розвитку антропогенетики

Наукова антропогенетика виникла більше 100 років тому і з тих пір пройшла складний шлях розвитку. Прості типи успадкування у людини були описані задовго до виникнення наукової генетики, тобто до 1900 року, коли були перевідкриті закони Менделя. Так, вже у 1750 р. французький лікар П. Л. Мопертюї описав характер успадкування багатопалості (полідактилії), причому його аналіз розщеплення за цією ознакою багато у чому випереджав відкриття Менделя. У 1814 р. Дж. Адамсон описав деякі типи успадкування у дітей нормальних батьків, які були у кровному родичанні.

У період 1803-1820 рр. декількі лікарі описали тип успадкування гемофілії. Швейцарський офтальмолог Горнер у 1876 р. описав успадкування кольорової сліпоти (дальтонізм). Російський професор В.М. Флоринський у своїй монографії “Усовершенствование и вырождение человеческого рода” (1866 р.) писав: “Охрана наследственности и улучшение ее возможны при

удачном подборе супругов. Брак с физиологической и гражданской точек зрения имеет целью воспроизведение потомства. Неудача этого воспроизводства во многом зависит от бестолковой женитьбы. На брак следует смотреть не как на личное удовольствие, а как на важный акт гражданской жизни, как на таинство воспроизведения рода, в котором должны быть заинтересованы не только два лица, но и все общество”.



П.Л. Мопертюї



В.М. Флоринський

Він висловився за ранні шлюби і виступав проти нерівних шлюбів, вважав, що шлюби між 50-річним і 18-річною є аномальними і призводять до негативних наслідків для поколінь. Суспільство повинне попереджати такі аномальні шлюби нарівні з важкими злочинами. В.М. Флоринський підняв багато важливих питань охорони спадкового здоров'я людини.

Як наука, антропогенетика зародилася завдяки працям Френсіса Гальтона (1822-1911). Багато вчених вважають його наряду з Г. Менделем одним з засновників наукової генетики загалом.

У 1876р. Ф. Гальтон запропонував близнюковий метод розмежування ролі успадкування і середовища у формуванні організму. Спочатку Гальтон не

проводив розмежувань між одно яйцевими і двояйцевими близнюками. Лише згодом ембріологи знайшли розходження між цими двома видами близнюків.

У 1899 р. Ф. Гальтон сформулював один із законів успадкування (закон регресії), в якому: кожне ухилення батьків від норми чи середньої величини передається нащадкам, але лише в частковому вигляді. Деяка частина відхилення при цьому успадковується (так звана регресія), інша ж частина зникає безслідно. Потім він відкрив закон успадкування у предків, вивчив деякі інші закономірності успадкування.

Зрозуміло, значення законів успадкування Ф. Гальтона не можна порівнювати зі значенням законів Г. Менделя. Закони Гальтона в кращому випадку підтверджують те, що відбувається, але істина сутність спадковості залишається незрозумілою.

Ф. Гальтон досліджував успадкування розумових здібностей, таланту у людей. Він вважав, що спеціальними генетичними заходами можна покращити людський рід. Він створив особливий напрямок в генетиці – євгеніку, визначив основну її мету – покращувати людину і людський рід.

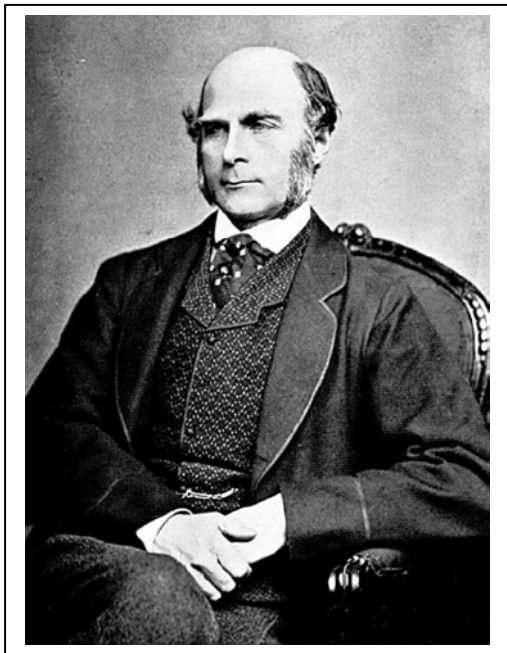
Євгеніка на перших порах захопила монополію у вивченні генетики людини, хоча іноді її прихильники необережними рекомендаціями дискредитували цю науку. Ф. Гальтон сам вважав, що нема природної рівності людей: є вищі раси і нижчі раси. До нижчої раси нібито відносяться негри, їх рівень розвитку на два ступені нижчий за рівень європейців. Самі ж сучасні європейці на два ступеня нижчі за рівень древніх афінян. Таку нерівність він пов'язував не з соціальними причинами, а з біологічними. У цьому питанні Ф. Гальтон слідував за такими расистами, як А. Гобіно і ін.

А. Гобіно (Gobineau, 1854), відомий своїм трактатом “Опыт о неравенстве человеческих рас”, який вийшов у 1854 р., є родоначальником расизму. А. Гобіно – французький граф, який цікавився антропологією. Він проповідував, що бог створив чисті і нечисті народи і доручив обраній расі білих керувати світом. У своєму чотиритомному трактаті А. Гобіно на перше місце серед європейців висунув “німецьку расу”. Проте, деякі противники наукової

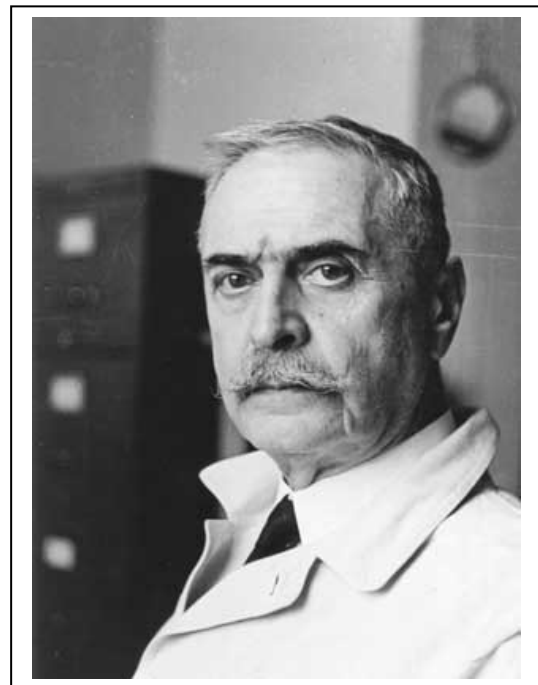
генетики пов'язували виникнення расизму як ідеологічної течії не з А.Гобіно, а з Ф. Гальтоном і Г.Менделем та іншими фундаторами генетики. Зараз всім зрозуміло, що насправді генетика свідчить про те, що спадковість основа у всіх рас і народів однакова, що всі раси і народи біологічно рівноцінні.

Ф. Гальтон запропонував метод ідентифікації людини за його відбитками пальців, тобто був родоначальником дактилоскопії і дерматогліфіки. Цей метод ідентифікації особистості був використаний англійською поліцією для розпізнання злочинців та їх жертв. Ф. Гальтон в основному займався вивченням успадкування кількісних ознак людини, які визначаються дією багатьох генів, тобто полігенно.

У 1900 році К. Ландштейнер відкрив систему груп крові АВО і цим самим поклав початок вивченню успадкування поліморфних ознак у людини. Це була перша дискретна ознака, яка нині розглядається як приклад спадкового поліморфізму.



Ф. Гальтона



К. Ландштейнер

У 1913 році було описано поліморфізм у відношенні здатності відчувати смак фенілтіосечовини. Потім були виявлені інші приклади спадкового поліморфізму, особливо за допомогою методу електрофорезу білків.

Людина стала першим об'єктом нової науки – біологічної генетики. Лондонський лікар А. Гаррод (1857 – 1936 рр.) почав розробляти проблему порушення обміну речовин у людини при спадковій хворобі алькаптонурії. На жаль, до 1940 року дослідження А. Гаррода і його висновки залишались осторонь від головного напрямку розвитку генетики людини.

Спадкове захворювання алькаптонурія обумовлено недостатністю ферменту оксидази гомогентізинової кислоти. Гомогентізинова кислота утворюється в одному з розгалужень біохімічних реакцій, пов'язаних з перетворенням амінокислоти фенілаланіна. Гомогентізинова кислота, яка накопичується в організмі, у більшій кількості виводиться з сечею. Під дією світла під час додавання лугу така сеча чорніє. Чорні плями на пелюшках дитини можуть бути свідченням симптомів алькаптонурії. Гомогентізинова кислота зв'язується з колагеном хряща і сполучної тканини. Хрящова тканина вушної раковини чорніє – це явище називається охроноз. При цьому розвивається артрит, спостерігаються подагричні болі у суглобах та інші симптоми.

Вивчаючи алькаптонурію та інші хвороби, А. Гаррод у 1908р. сформулював своє відоме положення “о врожденных дефектах обмена веществ”.

Дж. Бідл, який у 1958 р. розділив Нобелівську премію з фізіології і медицини з іншими дослідниками за власні роботи в галузі біохімічної генетики, заявив, що основа його гіпотези – “Один ген – один фермент” була насправді закладена працями А. Гаррода. Бідл сформулював гіпотезу тими ж словами, що і Гаррод.

Подальший розвиток досліджень А. Гаррода, Дж. Бідла і Є. Тейтума призвів до розпізнання механізмів дії гена, до формулювання уявлень про генетичний блок і молекулярні спадкові хвороби.

Було встановлено, що в основі молекулярних спадкових захворювань лежить генетичний блок: випадіння синтезу одного ферменту чи будь-якого іншого білка, без якого не розвивається ознака, призводить до порушення

ланцюга біохімічних реакцій. Розвиток ознаки, як виявилось, здійснюється в результаті багатоступеневого ланцюга цих реакцій. Якщо порушується одна ланка цього ланцюга, ознака не розвивається.

Також були розшифровані механізми генетичного блоку, який розвивається під час порушення обміну фенілаланіну, який через ряд етапів перетворюється на тирозин. Тирозин же надалі може перетворюватись на меланін чи гомогентизинову кислоту. Кожен етап перетворень контролюється генетично – шляхом утворення особливого ферменту. Порушення синтезу ферменту, який каталізує той чи інший етап фенілаланіна, призводить до розвитку спадкових захворювань, таких як фенілкетонурія, алькаптонурія, альбінізм. Якщо цей ген мутує, утворення фермента фенілаланінгідроксілази порушується, переривається перетворення фенілаланіна на тирозин. Фенілаланін у великих кількостях перетворюється на фенілпіровиноградну кислоту, яка негативно впливає на мозок людини. В результаті розвивається спадкове захворювання фенілкетонурія.

При генетичному блоці II порушується утворення меланіну – розвивається альбінізм, протягом генетичного блоку II розвивається алькаптонурія.

Таким чином, роботи А. Гаррода через багато років привели до створення вчення про молекулярні захворювання, які утворюють важливу групу спадкових хвороб.

З вивченням людини пов'язане виникнення ще одного розділу генетики – популяційної генетики. У 1908 р. Дж. Харді – математик з Кембріджського університету – і В. Вайнберг – лікар з Штутгарту – незалежно один від одного заклали основи популяційної генетики, сформулювавши закон під час вивчення розподілення ознак в популяції людини, який носить їх ім'я - закон Харді – Вайнберга.

Ще Г. Мендель встановив, що в організмі одна з пари контрастних ознак може домінувати над іншою (рецесивною) ознакою. Тоді, на перших етапах розвитку менделізму, деякі вважали, що частота домінантної ознаки в популяції

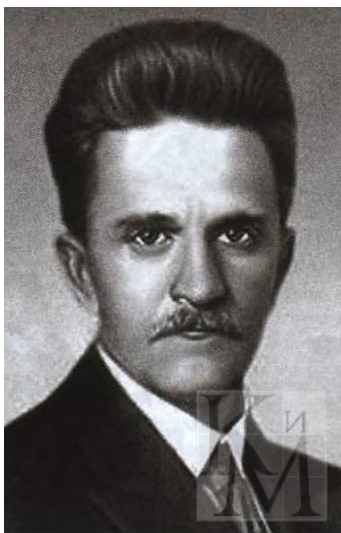
повинна витіснити рецесивну ознаку. Виникало питання: "Чому ще не всі люди короткопали?" Харді і Вайнберг проаналізували частоту поширення домінантних і рецесивних ознак і показали, що при відсутності факторів, які порушують рівновагу, частота генів і контролюючих ними ознак залишається незмінною і визначається частотою мутацій.

У 20-30 роках минулого століття ряд дослідників (Р. Фішер і Дж. Холдейн в Англії; С. Райт у США; Г. Дальберг у Швейцарії; Л. Хогбен і Ф. Бернштейн у Німеччині) внесли великий вклад у теорію генетики та еволюції, у розробку статистичних методів вивчення людини. Наприклад, їм належать методи аналізу закономірностей успадкування, розщеплення, щеплення ознак і визначення частоти мутацій.

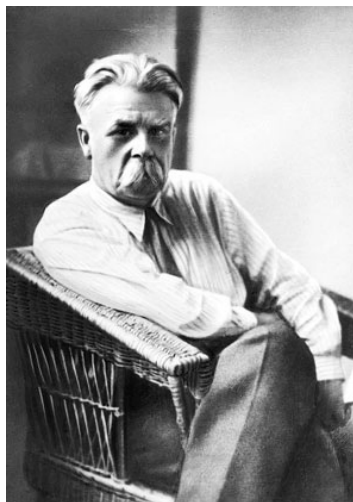
Вивчення деяких проблем антропогенетики у нашій країні широко розвернулося ще у 20-их роках минулого століття. В Інституті експериментальної біології Наркомздорів'я СРСР дослідження питань генетики людини проводилися під керівництвом М.К. Кольцова. Вивчалися такі питання, як успадкування нормальних ознак (груп крові, кольору очей і волосся), різних аномалій (глухоти, юродства), роль спадковості у розвитку ендемічного зобу. Вперше було розпочато вивчення близнюків (В.В. Кунак і його співробітники).

Великий внесок у розробку проблем загальної генетики, генетики людини і медичної генетики у ці роки внесли радянські вчені М.К. Кольцов, А.С. Серебровський, Ю.А. Філіпченко. Ці вчені вивчали передачу спадкової інформації деяких духовних рис людини, тонку будову хромосом і генів, багато займалися проблемами євгеніки.

У Ленінграді (Санкт-Петербурзі) Ю.А. Філіпченко організував Бюро з євгеніки при Академії наук. Було створено "Російське євгенічне товариство", головою якого було обрано М.К. Кольцова. В його роботі брало участь багато видатних біологів і медиків країни, у тому числі народний комісар охорони здоров'я Н.А. Семашко. Був заснований "Російський євгенічний журнал".



Ю.А. Філіпченко



М.К. Кольцов

Не дивлячись на окремі помилкові положення і рекомендації, євгеніка 20-х років минулого століття у Радянському Союзі була помірною і гуманістичною.

Особливо широкого розмаху дослідження з генетики людини в СРСР набули у 1932 році, коли був організований Медико-біологічний інститут (з 1935 р. він став називатися Медико-генетичним інститутом). Професор С.Г. Левіт, який керував Медико-генетичним інститутом у 1930-1937 рр., проводив цінні дослідження з генетики цукрового діабету. Співробітники інституту вивчали генетику виразкової хвороби, дальтонізму, схильності до гіпертонії і т.п. У ті роки радянські дослідники удосконалили методи вивчення хромосом і культивування лейкоцитів людини (А.Г. Андреас, М.С. Навашин, Г.К. Хрущов, П.І. Живаго та інші), почали вивчати хромосомний комплекс людини, упритул підійшли до відкриття ролі хромосомних аберацій у розвитку спадкових хвороб, які було зроблено у 50-их рр. минулого століття вченими Франції, США та Англії. А.Г. Андреас написав книгу “Кариология человека”.

У 1932-1937 рр. співробітники Медико-генетичного інституту досліджували велику кількість одно- і двояйцевих близнюків Москви, а також

вивчали потомство шлюбів між родичами. Цей інститут був на той час міжнародним науковим центром, з яким співпрацювали зарубіжні генетики-антифашисти (Г. Меллер, Л. Хогбен, Г. Дальберг, Дж. Хольдейн та інші).

У 1937 р. Медико-генетичний центр був закритий. Найбільший спеціаліст з генетики людини Л.С.Пенроз у 1966 р. писав: “...если бы эти лаборатории в СССР продолжали работать, то большинство из открытий по кариотипу человека, сделанные в течение последних девяти лет, могли бы появиться на двадцать лет раньше”.

У травні 1966-го, в Москві відбувся установчий з'їзд Всесоюзного товариства генетиків і селекціонерів. Саме цей з'їзд став початком відродження генетики в СРСР. Адже до 1965 року генетика вважалася в СРСР псевдонаукою і перебувала під заборобою. І хоча у 20-ті рр. і до середини 30-х рр. радянська генетична школа вважалася найсильнішою у світі, базові відкриття у цій галузі були зроблені на Заході — в 40—60-х роках ХХ століття. Саме після того, як найвидатніші радянські генетики вже були розстріляні.

«Революцію» в радянській біології у 30—60-х роках минулого століття здійснював виходець із українського селища Карлівка, що на Полтавщині, Трохим Лисенко. Він обійняв низку найвищих державних та академічних постів у СРСР. Доки тривало лисенківське «правління», Захід спантеличено спостерігав за цим воістину середньовічним погромом у науці. Пізніше у США і Європі було написано чимало книг та наукових праць про «радянське диво», яким став Трохим Денисович Лисенко.

Лисенко заперечував закони генетики Менделя і заявив, що класична генетика — це буржуазна псевдонаука. «Не можна захищати менделізм. Особливо неможливо це тепер, коли мільйони людей оволодівають такою всемогутньою теоретичною зброєю, як «Короткий курс історії Всесоюзної комуністичної партії (більшовиків)», — написав в одній зі своїх статей Лисенко. Саме «схрещення» біології з марксизмом-ленінізмом стало найвидатнішим «досягненням» Трохима Лисенка, який щиро вірив, що закони

Менделя можуть захищати лише «класові вороги» та «проповідники буржуазної ідеології».

Першими генетичними дослідженнями в системі закладів Академії наук України були роботи з каріології, зокрема, з вивчення морфології хромосом рослин. Цей напрям продовжив класичні дослідження С.Г. Навашина у період його професорської діяльності в Київському університеті (1885-1915 рр.) і розроблявся в Академії наук переважно його учнями та послідовниками (Г.А. Левітський, Л.М. Делоне, В.В. Фінн, Я.С. Модилевський, В.І. Фаворський та інші). С.Г. Навашин, обраний академіком Всеукраїнської академії наук у 1924 р., та його учні започаткували в Україні та в Росії цитогенетику. Окрім світового рівня відкриття у 1898 р. подвійного запліднення у рослин, С.Г.Навашин встановив, що всі хромосоми є двоплечими, у 1912 р. виявив супутники хромосом, а також показав, що рослини характеризуються видовою специфічністю числа і морфології хромосом, заклавши основи вчення про каріологію та її таксономічне значення; типовий для виду морфологічний комплекс хромосом з властивими йому особливостями будови назвав ідіограмою.

Учнями та послідовниками С.Г. Навашина було вивчено число хромосом, а в багатьох випадках і їхня морфологія у низки видів культурних і диких квіткових рослин та у мохів. Зокрема, Г.А. Левітський удосконалив розроблені С.Г. Навашиным техніку фіксації і забарвлення хромосом.

С.Н. Давиденко створив школу нейрогенетики. Особливої уваги заслуговують такі роботи, як “Эволюционно-генетические проблемы в невропатологии”, “Клинические лекции по нервным болезням”, “Наследственные болезни нервной системы”. Він дав класифікацію і характеристику більше як ста хворобам нервової системи, відкрив закономірності їх виникнення і протікання.

Великий внесок у загальну генетику внесли М.П. Дубінін, Д.Д. Ромашов, А.А. Малиновський, Б.П. Ефроїмсон, Н.П. Бочков, Е.Ф. Давиденкові, Л.О. Бадалян та багато інших радянських генетиків.

Великий російський фізіолог І.П. Павлов усвідомлював необхідність генетики для фізіології і медицини. В знак визнання важливої ролі генетики у фізіології у “столиці умовних рефлексів” Колтушах було споруджено пам’ятник Г. Менделю. Наступні слова І.П. Павлова можуть вважатися його заповітом: “Наши врачи должны, как азбуку, знать законы наследственности. Надо в корне уничтожить передачу поколению зачатков болезней, патологических генов”. Як і В.М. Бехтерев, осудив стерилізацію, І.П. Павлов вказав, що “борьбу за здоровье поколения нашей страны надо вести путем расширения знаний законов наследственности и через добровольный сознательный отказ брачующихся с нездоровой наследственностью от продолжения рода”. Він говорив: “Воплощение в жизнь научной истины о законах наследственности поможет избавить человечество от многих скорбей и горя”.

Новітні біотехнологічні методи досліджень забезпечили високу швидкість біології як фундаментальної науки. Виникла необхідність об’єднання окремих досягнень генетики в одну загальну картину, що обумовило розвиток нових галузей генетичних досліджень. Геноміка, протеоміка, метаболоміка, імуноміка, транскриптоміка – нові біологічні галузі, завдання яких є інтегрування інформації різних досліджень в генетиці в єдину систему. Окрім біологічних досліджень для цього застосовують цілу низку сучасних інформаційних технологій.

Загальні принципи побудови геномів та їх структурно-функціональну організацію вивчає саме **геноміка**, яка проводить сиквенування, картування, ідентифікацію функції генів і поза генних елементів.

Методи геноміки направлені на розшифровку нових закономірностей біологічної системи і процесів. Вона є основою молекулярної медицини і має велике значення для розробки сучасних методів молекулярно-генетичної діагностики та прогнозу перебігу спадкових і неспадкових хвороб.

Структурна геноміка вивчає послідовність нуклеотидів у геномах, визначає побудову генів, міжгенних ділянок і інших структурних генетичних

елементів (промоторів, енхансерів, інш.), тобто складає генетичні, фізичні і транскриптні карти організму. Завдяки реалізації приватних і державних проектів було розроблені карти геномів і розшифровані послідовності ДНК великої кількості організмів, в тому числі і сільськогосподарських рослин, хвороботворних мікроорганізмів, вірусів, деяких продуктів харчування. У 2003 році був завершений Проект по розшифровці генома людини. Завдяки тому, що генетичний код є універсальним і всі живі організми здатні розшифрувати генетичну інформацію інших організмів і здійснювати закладені в них біологічні функції, будь-який ген, ідентифікований в процесі геномного проекту, може бути використаним у інших спектрах практичних додатків.

Знання послідовностей нуклеотидів дає змогу: допомогти селекціонерам цілеспрямовано змінювати властивості рослин, переконуватись у наявності бажаних ознак не очікуючи плодів і використовувати для виділення специфічних рекомбінантних молекул і мікроорганізмів з біохімічної точки зору. Також застосовувати ідентифікацію генів, які задіяні в складних процесах, пов'язаних з певним впливом умов навколишнього середовища на цілий організм і на культуру клітин.

Функціональна геноміка. Дослідження направлені на ідентифікацію функції окремого гена і ділянки генома, їх взаємодії у клітинній системі. Це здійснюється за допомогою вивчення білкових ансамблів в різних клітинах. Дана галузь геноміки має назву *протеоміка*.

Порівняльна геноміка. Вивчає подібність в організації геномів різних організмів з метою з'ясування загальних закономірностей їх структури і функціонування.

Еволюційна геноміка пояснює шляхи еволюції геномів, походження еволюційного поліморфізму генів, роль горизонтального переносу генів, прослідкувати термін формування комплексу генів, окремих хромосом, стабільність його частин.

Медична геноміка вирішує прикладні аспекти клінічної і профілактичної медицини на основі знання геномів людини і патогенних організмів (діагностика спадкових захворювань, генотерапія, інш.).

Геном – це сукупність всіх генів в організмі, його повний хромосомний набір. Термін «геном» був запропонований Хансом Вінклером в 1920 р. для опису сукупності генів, вміщених у гаплоїдному наборі хромосом організмів одного біологічного виду. Генетична інформація в клітинах вміщується не тільки в хромосомах ядра, але і позахромосомних молекулах ДНК. У бактерій до таких ДНК відносять плазмідні і деякі помірні віруси, в клітинах еукаріот – це ДНК мітохондрій, хлоропластів, і інших органел клітини. Таким чином, під геномом організму розуміють сумарну ДНК гаплоїдного набору хромосом і кожного з позахромосомних генетичних елементів, які вміщуються в окремій клітині зародкової лінії багатоклітинного організму.

Фармакогенетика – це генетична галузь, яка вивчає реакцію різних груп людей на лікарські речовини. Відомо, що у деяких людей сульфаніламідні препарати викликають гемоліз (тобто руйнування еритроцитів з виділенням з них гемоглобіну в оточуюче середовище). Це пов'язано зі спадковою недостатністю глюкозо-6-фосфатдегідрогенази. Існує категорія людей зі спадковою хворобливою реакцією на глюкокортикоїди. Під час застосування цих препаратів в них збільшується внутрішньо очний тиск. Отже, фармакогенетика вивчає різниці впливів лікарських препаратів на геном, котрі залежать від генетичного поліморфізму ферментних систем, які беруть участь в їх метаболізмі і не торкається мутагенного ефекту цих препаратів.

Відома спадкова чутливість до дії деяких мутагенів і канцерогенів. Наприклад, люди зі збільшеною активністю арилгідрокарбонгідроксилази схильні до захворювань раком легень у випадку контакту з поліциклічними вуглеводами, які після реакції гідроксилювання під дією цього ферменту перетворюються на епоксиди, котрі мають високу канцерогенну активність.

Ці обставини слід враховувати у різних галузях людської діяльності: під час лікування хворих, на протязі професійного відбору людей, які мають справу з різними виробничими шкідниками.

Імуногенетика вважається серед інших біологічних дисциплін відносно молодою наукою. Вона зародилася на початку минулого століття, коли Ландштейнер у 1900 р. відкрив групи крові людини, відкриття яких сприяло формуванню нових напрямків фундаментальної імунології – імуногематології, трансплантології і саме класичної імуногенетики, яка об'єднала всі ці напрямки з позицій генетичної детермінованості імунологічної відповіді на дію екзогенних і ендогенних агентів, несумісних за антигенною специфічністю.

У 1930 р. Ландштейнеру була присуджена Нобелівська премія з фізіології і медицини «за відкриття груп крові людини». У Нобелівській лекції говорячи про групи крові, він зазначив: «Удивительным было то, что, когда агглютинация происходила, она была выражена так же, как уже известная реакция взаимодействия между сывороткой и клетками животных разных видов». Відкриття Ландштейнером груп крові поклало початок новим напрямкам досліджень в численних наукових галузях і дозволило досягти значних успіхів у практичній медицині.

У 1940 р. Ландштейнер та його колеги Олександр Вінер і Пилип Левін описали ще один фактор крові людини – так званий резус, або *Rh*-фактор. Був виявлений зв'язок між цим фактором і гемолітичною жовтухою новонароджених. Виявилось, що якщо у матері відсутній резус-фактор (тобто резус-фактор від'ємний), то резус-позитивний плід може бути причиною утворення у матері антитіл проти резус-фактора плода. Такі антитіла викликають гемоліз еритроцитів плода, в результаті цього гемоглобін перетворюється на білірубін, що й є причиною жовтухи у новонародженого.

Під час дослідження механізму імунних реакцій Борде звернув увагу, що для руйнування хвороботворних мікроорганізмів, крім антитіл, у сироватці крові необхідний ще один білковий компонент, який згодом одержав назву комплементу. Комплемент складається з цілого комплексу білків, кожний з

яких вмикається в комплекс «антиген-антитіло» на певній стадії імунної відповіді.

Борде показав, що комплемент зв'язується з чітко визначеними антигенами на поверхні клітини мікроорганізму. Нобелівська премія 1919 р. (медицина) за відкриття в галузі імунології, зокрема, за відкриття системи комплементу.

Після першої світової війни Борде починає вивчати взаємодію між бактеріями і бактеріофагами (вірусами, які вражають бактерії). Його експерименти зі спадковості бактеріальних клітин лізогенії (здатності викликати руйнування клітин) допомогли закласти основу успіхів в молекулярній генетиці в середині XX ст.

Перші кроки імуногенетики були присвячені вивченню еритроцитарних генетичних систем крові людини. Так були відкриті системи MN; P; Rh-Hr; потім були ідентифіковані антигени систем Lewis; Lutheran; Kell; Daffy; Kidd та інші. Ці нові дані знайшли своє відображення в інших галузях фундаментальної і прикладної науки, зокрема в антропології (була дана генетична характеристика окремим расам), в генетиці (кожна генетична система крові надала змогу дати назву новим хромосомам. Але найбільш перспективним цей напрямок став для прикладної медицини, оскільки наукові набутки склали основу впровадження в лікування хворих компонентів крові, стовбурових гемопоетичних клітин кісткового мозку і периферичної крові, діагностика і подолання імунологічних конфліктів в системі мати-плід. Як фундаментальна наука імуногенетика заявила про себе після відкриття головного комплексу гістосумісності і встановлення його ролі в генетичній підтримці імунного гомеостазу.

Перший лейкоцитарний антиген було ідентифіковано Ж.Доссе у 1952 р. і подальші дослідження дозволили вченому висловити припущення відносно того, що саме лейкоцитарні антигени є фактором, який дозволяє відрізнити особисті тканини від тканин організму іншої людини.

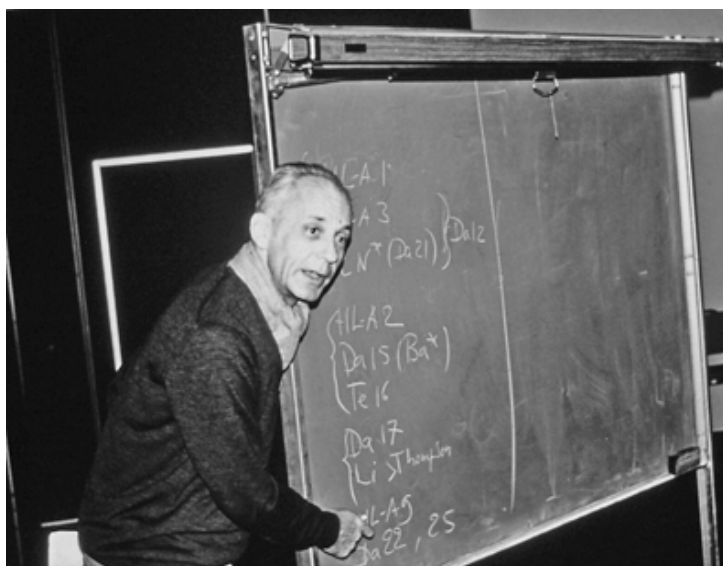


Рис. 1. - Жан Доссе (1916-2009) Обговорення будови головного комплексу гістосумісності людини на Міжнародному семінарі.

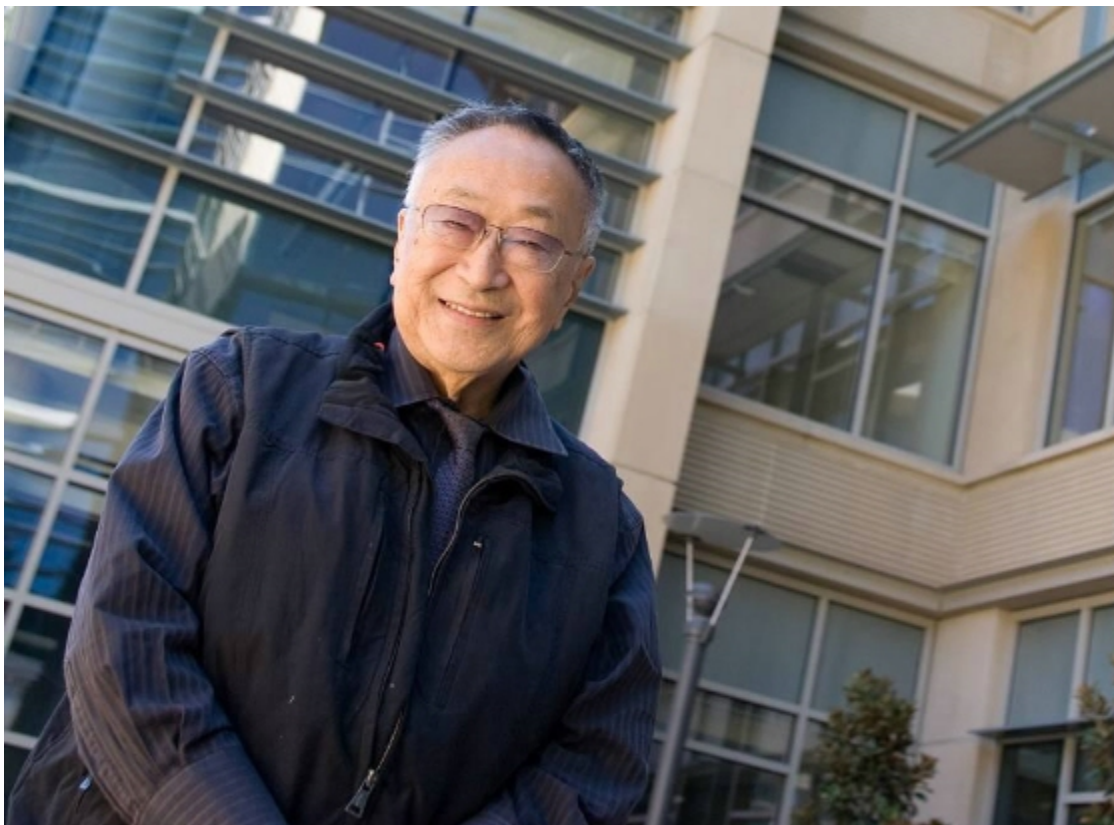
Після відкриття Доссе варіантів МАС-антигену інші дослідники отримали дані про ново виявлені антигени, які потребували свого пояснення. На робочому засіданні, організованому у 1965 р. Бернандом Амосом з метою координації дослідження гістосумісності (сумісності різних тканин, яка дозволяє успішно здійснювати операції трансплантації), Доссе припустив, що більшість цих антигенів формує частину єдиної системи у відповідності до теорії, яку запропонував Джордж Д. Снелл з його колегами в 40-х рр. Снелл тоді довів, що відторгнення тканини у мишей контролюється декількома фізично зв'язаними генами, названими **головним комплексом гістосумісності (МНС)**. Доссе припустив існування МНС у людей. Він вважав, що трансплантаційні антигени дуже різноманітні не тому, що чисельні варіантні форми (алелі) утворюються з одного набору генів. Стало зрозумілим, що, як і у мишей, у людини МНС складається з декількох генів, названих групою людських лімфоцитарних антигенів (*HLA*). Оскільки кожний ген зустрічається у вигляді великої кількості алельних форм, можливі мільйони різноманітних комбінацій антигенів системи *HLA*.

За свої багаторічні праці Доссе розділив Нобелівську премію з фізіології і медицини 1980 р. з Бенасеррафом і Снеллом «за открытия, касающиеся генетически детерминированных структур на клеточной поверхности, регулирующих иммунологические реакции». У доповіді на представлення

Джордж Клейн з Каролінського інституту підкреслив важливість досліджень трьох лауреатів, «сумевших превратить то, что сначала казалось областью основных экспериментов на инбредных мышах, понятной лишь для немногих, в стройную биологическую систему, имеющую важное значение для понимания механизмов клеточного «узнавания», иммунных ответов и отторжения трансплантата».

Імуногенетика тісно пов'язана як з імунологією, так і з генетикою. Початком розвитку клінічної імуногенетики в нашій країні можна вважати 70 роки минулого століття, коли почали активно розвиватися напрямки трансплантаційної імунології. На цей час вже існувала всесвітня наукова спільнота імуногенетиків, яку очолювали фундатори цієї галузі Ж.Доссе, Ван-Руд, Р.Чепелліні і в Америці цей напрямок очолював П.Терасакі, який створив саму техніку тканинного типування. Вже в ці роки імуногенетика відокремилась від загальної імунології в окрему фундаментальну і прикладну науку, що не розірвало тісні зв'язки між цими двома дисциплінами.

За останній час імуногенетика перетворилася на фундаментальну біологічну науку, всі розділи якої пронизують практичну і теоретичну медицину. З сучасних позицій вона розкриває механізми розвитку багатьох захворювань, а також таких загально патологічних процесів, як запалення, регенерація, проліферація, метаплазія і склероз (склерогенез).



Пауль І. Тарасаки

Питання практичної медицини: проблеми трансплантації органів і тканин, онкології і гематології, первинної і вторинної імунної недостатності, патологія вагітних і новонароджених та ряд інших задач, є стимулом для розвитку імуногенетики існує декілька визначень імуногенетики. Х. Фьюдєнберг зі співавторами у 1975 р. вважав, що імуногенетика є галуззю досліджень, в якій спадкові відмінності індивідуумів, або генетичний поліморфізм, вивчаються за допомогою імунологічних методів. Два інших автори, Клус і Джелл (1967 р.) визначають цей науковий напрямок як використання точної хімічної специфічності антисироваток для аналізу генетичних відмінностей між індивідуумами і філогенетичних взаємовідносин між видами. Найбільш узагальненим вважають визначення Р.В. Петрова (1976), згідно якого “сучасна імуногенетика вивчає закономірності успадкування антигенної специфічності і роль генетичних механізмів у здійсненні імунних реакцій”.

Слід підкреслити значення досліджень, які дозволили:

- описати чисельні закономірності головних комплексів гістосумісності у людини і миші і показати існування гомологічних систем у декількох інших видів ссавців;
- виявити генетичне різноманіття імуноглобулінів.

Ці роботи, які розпочалися як імунологічні не тільки за методами, але й за цілями забезпечили неоціненну практичну віддачу і зараз є також дуже перспективними напрямками сучасної фундаментальної генетики. Їх результати показали, зокрема, існування у вищих тварин дуже складних, виключно поліморфних імуногенетичних систем, які контролюють синтез великого різноманіття структурних і функціональних білкових гомологів. Подальше дослідження таких систем буде сприяти розвитку уявлень про організацію геному, тонку будову складних генетичних локусів і регуляцію активності генів еукаріот. У цьому розумінні важко переоцінити значення нових досягнень молекулярної імуногенетики, в наслідок яких не тільки одержані прямі докази участі двох різних генів (константного і варіабельного) у кодуванні одного поліпептидного ланцюга імуноглобуліну, але й показана під роздільність варіабельного гена на просторово віддалені один від одного генні сегменти, які поєднуються у процесі дозрівання плазматичних клітин.

Внутрішньовидова мінливість макромолекулярних біохімічних ознак чітко спадково детермінована та імунологічно виявляється у вигляді генетичних систем антигенів. Майже кожний успіх імуногенетики як у фундаментальному, так і у практичному плані у кінцевому рахунку можливий тільки в результаті виявлення нових систем антигенів – предмета та інструмента імуногенетичних досліджень. У процесі виявлення аналізу таких систем розкривається базисна імуногенетична феноменологія, яка у подальшому використовується для всього різноманіття інтерпретацій і додатків, подібно до того як це відбулося після відкриття поліморфізму головних комплексів гістосумісності імуноглобулінів.

Очікується, що імуногенетичний аналіз різних таксонів ссавців дозволить не тільки розширити і поглибити знання, які можна одержати під час дослідження людини і лабораторних тварин, але й можливо розкрити принципово нові закономірності. Очевидна також доцільність імуногенетичного вивчення видів, які є об'єктами господарської діяльності людини. В племінному тваринництві актуальними є питання застосування груп крові в генетичному аналізі та селекції сільськогосподарських тварин, аналіз еволюційної і генетико-селекційної ролі поліморфізму еритроцитарних антигенів на прикладі різних видів тварин, імуногенетична оцінка консолідації генофонду порід і стад сільськогосподарських тварин. На сьогоднішній день проводять моніторинг між- та внутрішньопородної диференціації популяцій сільськогосподарських тварин за системами груп крові та аналізують основні напрями використання груп крові для збереження генофонду тварин.

На певному етапі становлення імуногенетики виникла необхідність розробки єдиної міжнародної номенклатури антигенів HLA на основі порівняння антигенів, які були відкриті в різних лабораторіях світу. Цей етап був завершеним в 1967 році і результати були оприлюднені на Уоркшопі в Туріні. В генетичному відношенні даний етап має важливе значення ще тому, що були представлені чіткі докази того, що антигени, які відкрили в різних країнах є ідентичними і представлені в усіх популяціях світу.

Було показано, що основна генетична інформація відносно детермінації антигенів гістосумісності, вміщена в одному локусі, який розташований на одній парі аутосомних хромосом, а сам локус отримав назву Human Leukocyte A-system. Повний символ алельних специфічностей HLA комплексу, складається із 3 компонентів: об означення всієї системи; символу сублокуса; номера самого антигену.

Вирішення етапних завдань різних аспектів розвитку імуногенетики невід'ємно пов'язане з проведенням міжнародних Histocompatibility Workshops, кожний з яких мав свою мету і програму: порівняння і стандартизація методів гістотипування; офіційне затвердження номенклатури

HLA; уточнення генетичної моделі HLA; створення розділу популяційної генетики; розробка аспекту HLA і хвороби – це досить неповний перелік завдань цих міжнародних нарад.

Насьогодні втілення нових молекулярно-біологічних технологій значно розширило можливості імуногенетичних досліджень, зокрема ідентифікація специфічності алелів і окремих генів здійснюється на рівні геномної ДНК, що потребувало розробки нової номенклатури для алельних генів і підходів до співставлення серотипів і генотипів HLA. Молекулярно-генетичне гістотипування дозволило підняти на новий рівень диференційну діагностику захворювань, які певним чином пов'язані з генетичною схильністю саме до патологічного процесу, або з генетичною схильністю до розладів в імунітеті, який є патогенетичними субстратом формування конкретних захворювань. Не менш важливим є новий рівень ідентифікації генотипу донора-реципієнта під час селекції сумісних пар для алогенної трансплантації стовбурових гемопоетичних клітин крові. Нові біотехнології також сприяють відкриттю нових генів комплексу гістосумісності та визначенню місця, яке вони займають в механізмах генетичної детермінації імунного гомеостазу людини.

Таким чином, незаперечливим є той факт, що медична генетика як наука на сучасному етапі складає динамічний аспект розвитку молекулярної біології, імунології, цитології, фармакології та інших біологічних та медичних наукових дисциплін.

Питання для самоконтролю

1. Дайте визначення антропогенетиці.
2. Розкажіть про історію виникнення близнюкового методу.
3. Яким чином формувалася антропогенетика?
4. Розкажіть про дослідження Ф. Гальтона.
5. Що Вам відомо про фармако- та імуногенетику?
6. Розкажіть про порівняльну геноміку.

7. Який внесок в науку зробив А. Гобіно?
8. Що Вам відомо про наукові здобутки Ж.Доссе?
9. Назвіть сучасні актуальні питання практичної медицини.

ЛІТЕРАТУРА

1. Голда Д.М. Генетика. Історія. Відкриття. Персоналії. Терміни. – Київ: Фітосоціоцентр, 2004. – 128 с.
2. Демидов С.В., Бердишев Г.Д., Топчій Н.М., Черненко К.Д. Генетика. - – Київ: Фітосоціоцентр, 2007. – 412 с.
3. Демидов С.В., Бердишев Г.Д., Голда Д.М., Топчій Н.М. Київський університет і розвиток генетики на Україні. - – Київ: Фітосоціоцентр, 2007. – 100 с.
4. Демидов С.В., Топчій Н.М., Бердишев Г.Д., Климнюк Г.І., Гавриленко Т.І. Генетика постнатального онтогенезу. – Київ: Фітосоціоцентр, 2006. – 251 с.
5. Дубинин Н.П. Генетика – страницы истории. – Кишинёв, 1990 – 398 с.
6. Канаев И.И. Френсис Гальтон (1822-1911). – Л.: Наука, 1972. – 266 с.
7. Кунах В.А., Демидов С.В., Козерецька І.А., Топчій Н.М. Історія генетики в Україні. - Київ: Фітосоціоцентр, 2009. –140 с.
8. Маринжа Л. В.М. Флоринський – невтомний просвітянин і організатор охорони здоров'я// Здоров'я України. – 2011. – Вип.8 (261). – С. 82.
9. Романець Д. Не така генетика// Україна молода. – 2006. - № 85.
10. Day C.J.E, Shutt L.E. Auditory, ocular and facial complications of central neural block. A review of possible mechanisms// Regional Anesthesia. – 1996. - Vol. 21, N3. - P. 197-201.
11. Liu M. et al. Delayed Horner's syndrome as a complication of continuous thoracic epidural analgesia// J Cardiothrac Vasc Anesth. – 1998. - Vol. 12, N2. - P.195-196.
12. <http://uk.wikipedia.org/wiki>

13. <http://www.theepochtimes.com/n2/images/stories/large/2009/03/06/gall.jpg>
14. <http://www.megabook.ru/DescriptionImage.asp?MID=460967>
15. <http://images.yandex.ua/>

РОЗДІЛ 1.1

МАТЕРІАЛЬНІ ОСНОВИ СПАДКОВСТІ ЛЮДИНИ

У середині XX століття було досягнуто значних успіхів у вивченні високомолекулярних органічних сполук, які є структурною основою клітин усіх видів організмів. Було остаточно доведено, що саме високомолекулярні

біополімери, до яких відносяться білки та нуклеїнові кислоти, відіграють провідну роль у процесах обміну речовин. І дійсно, важливість функцій, наприклад, білків важко переоцінити: у клітинах вони, як правило, виконують ферментативну функцію; в живих системах каталізують всі реакції обміну речовин, а також виконують важливу в житті клітин механохімічну функцію. Наприклад, один з найважливіших білків - міозин, який входить до складу м'язів, разом з білком актином утворює скоротливий білковий комплекс, що перетворює хімічну енергію аденозинтрифосфату (АТФ) на механічну роботу.

Дуже важливою є структурна функція білків. У поєднанні з ліпідами вони утворюють обмежувальні мембрани клітин та ряду клітинних органел. На мембранах різних органел, а також на мембранах ендоплазматичної сітки відбуваються численні хімічні реакції, які забезпечують процеси метаболізму в клітинах. Крім того, структурні білки виконують функцію транспорту метаболітів у бік, протилежний до напрямку їхньої природної дифузії, тобто проти градієнта концентрації. У вищих організмів структурні білки можуть утворювати окремі тканини.

Є білки, здатні зв'язувати і переносити в одному напрямку одні речовини, а в протилежному - інші. Класичним прикладом такого білка є гемоглобін крові, який від легенів до клітин різних ділянок організму переносить кисень, а у зворотному напрямку - вуглекислий газ. До білків відноситься численна група ферментів, які виконують функцію міжмолекулярного перенесення груп атомів. Це трансферази та фосфотрансферази. Білки можуть виконувати й захисну функцію. Наприклад, глобулярні білки сироватки крові людини та теплокровних тварин, виступають у ролі антитіл, що здатні специфічно зв'язуватися з антитілами, котрі несуть ознаки генетичної чужерідності.

Ретельне вивчення білків показало, що у живій природі вони представлені величезною кількістю типів. Кожний вид організмів, який відрізняється від інших характерними для нього типами білків, у процесі розмноження успадковує чітку здатність відтворювати ці типи в наступних поколіннях.

Мономерами будь-яких поліпептидів, що складають основу білка, є амінокислоти. До складу білків входить 20 амінокислот. Особливістю молекул амінокислот є їхня амфотерність, яка забезпечується наявністю в кожній молекулі карбоксильної та аміної групи. Ці групи здатні вступати між собою в реакцію.

Складність хімічної структури молекул білка обумовлена не тільки великою кількістю амінокислотних залишків певної послідовності, з яких складається поліпептидний ланцюг, але й особливістю форм, яких набувають ці ланцюги, створюючи функціональні агрегати молекул. Дослідженнями Ф.Сенгера (1956) було з'ясовано, що послідовності амінокислотних залишків, сполучених пептидними зв'язками в поліпептидні ланцюги, утворюють первинну структуру білка. Ця структура є матеріальною основою формування функціональних структур білків, якими є вторинна, третинна і четвертинна структури.

А.Е.Гаррод (1908), вивчаючи діагностику фенілкетунурії у людей, дійшов висновку, що ця хвороба успадковується як рецесивна ознака внаслідок мутації відповідного гена. У гомозигот за цією ознакою розвивається розумова відсталість. Сеча цих хворих при взаємодії з повітрям темніє. Тому було зроблено висновок про те, що мутація пригнічує певну з ферментативно-метаболических реакцій хворого організму. Отже, Гаррод пов'язав залежність метаболічної активності ферменту від стану відповідного гена.

Вивчаючи закономірності метаболізму у мутантів пліснявого гриба *Neurospora crassa*, Г.У.Бідл і Е.Л.Татум (1941) встановили, що кожний ген має лише одну первинну функцію направляти синтез тільки одного ферменту. Виходячи з цього була створена теорія "один ген - один фермент", згідно з якою процеси синтезу поліпептидів послідовність шикування амінокислотних залишків у поліпептидному ланцюгу обумовлюється функцією гена. Ці висновки підтвердились у дослідженнях В. Інгрема (1957), який показав, що мутація серповидно-клітинної анемії в людини є наслідком заміщення в

поліпептидному ланцюгу мутантного гемоглобіну крові залишку глутамінової кислоти на залишок валіну.

З'ясувалось, що поліпептидний ланцюг молекули b-глобіну крові людини складається із 146 амінокислотних залишків. Заміщення у сьомій точці цього ланцюга лише одного амінокислотного залишку (глутаміну на валін) спричиняє у гомозиготних, за цією мутацією людей, формування еритроцитів не кулястої, а серповидної форми. Серповидні еритроцити не здатні забезпечувати нормальний газообмін у мутантних організмів. Діти, гомозиготні за мутантним геном серповидно-клітинної анемії, доживають лише до дворічного віку.

Таким чином, було одержано докази слушності теорії "один ген - один фермент". А це означало, що послідовність шикування амінокислотних залишків у процесі синтезу білків контролюється функцією відповідних генів. Проте накопичена інформація про функції білків не розкрила природи гена. І лише в 1944 р. О. Ейвері, К. МакЛеод і М. МакКарті, вивчаючи хімізм молекулярних процесів у явищі генетичної трансформації бактерій, знайшли, що з мертвих клітин пневмококів у живі клітини переносяться фрагменти молекул ДНК. Отже, трансформується дезоксирибонуклеїнова кислота, як носій генетичної інформації.

Висновки про те, що матеріальною субстанцією спадковості є ДНК, були переконливо підтверджені в дослідях А.Херші та М.Чейз (1952 р.) на бактеріофагах. Вони мітили білок культури бактеріофагів радіоактивним ізотопом сірки (^{35}S), а ДНК - ізотопом радіоактивного фосфору (^{32}P). За допомогою цих радіоактивних міток було встановлено, що в процесі інфікування бактерій в їхні клітини проникає лише ДНК фага, тимчасом як його білкова оболонка залишається за межами клітини. Це підтвердилось при спостереженнях за допомогою електронного мікроскопа.

2.1. Загальна характеристика нуклеїнових кислот

Накопичення генетичної інформації в органічному світі обумовлює рівень організації видів живих організмів. У плані еволюційного розвитку всі вони можуть бути поділені на дві групи - прокаріотів та еукаріотів. До перших належать організми, які не мають сформованого клітинного ядра. Тому всі матеріальні носії спадковості прокаріотів локалізуються в цитоплазмі. Прокаріотами є віруси, бактерії та синьо-зелені водорості. Організми, які мають сформоване клітинне ядро, відмежоване від цитоплазми ядерною оболонкою, відносяться до еукаріотів. Це клітини, з яких складається організм тварин, рослин та грибів

Головним об'єктом вивчення в галузі молекулярної генетики та молекулярної біології є прокаріоти й одноклітинні організми еукаріотів, а також соматичні клітини останніх. Численні дослідження показали, що переважна більшість спадкових факторів еукаріотів локалізована в ядрах їхніх клітин. При цьому матеріальними носіями спадковості як у прокаріотів, так і в еукаріотів є нуклеїнові кислоти. Ще у 1872 р. Ф.Мішер повідомив, що виявив у ядрах клітин речовину, яка має кислотні властивості, і яку він назвав нуклеїном (nucleus- ядро). Вивчення нуклеїну показало, що до його складу входить фосфорна кислота, азотисті основи у формі пуринів та піримідинів і вуглеводи. Виходячи з даних, накопичених на той час про цю речовину, Р.Альтман у 1889 р. запропонував назвати її нуклеїновою кислотою. Подальшими дослідженнями було з'ясовано, що нуклеїнова кислота, як правило, міститься в ядрах клітин усіх видів організмів. Наприкінці XIX - на початку XX ст. А.Коссель показав, що нуклеїнова кислота складається з чотирьох видів азотистих основ, фосфорної кислоти та цукру, в молекулі якого міститься п'ять атомів вуглецю.

В 20-х роках XX ст. П.Левеном та іншими вченими було встановлено, що нуклеїнова кислота представлена двома типами кислот: дезоксирибонуклеїновою (ДНК) та рибонуклеїновою (РНК). І вже в 30-х роках було з'ясовано, що до складу ДНК, крім фосфорної кислоти, входять пурини у формі аденіну і гуаніну та піримідини у формі тиміну і цитозину, а також цукор дезоксирибоза, а до складу РНК входять пурини, аденін і гуанін та піримідини,

урацил і цитозин та цукор рибоза. На рис.2.1 показані структурні формули азотистих основ, які входять до складу нуклеїнових кислот.

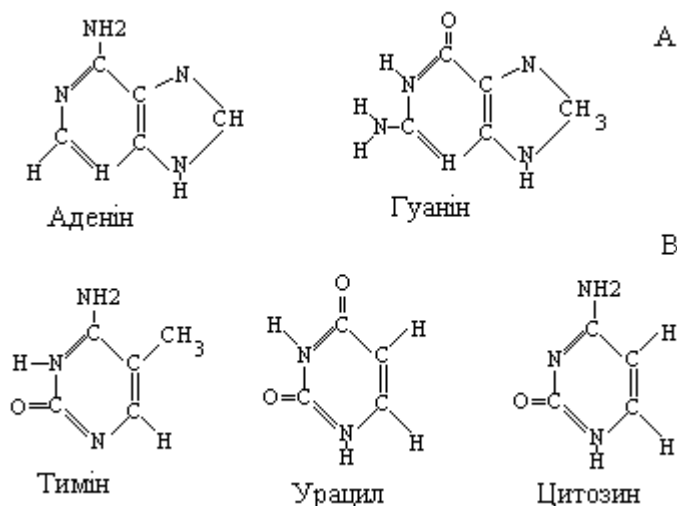


Рис.2.1. Структурні формули:

А – пуринових основ,

В – піримідинових основ.

Розшифрування структури молекули ДНК, виконане американським вірусологом Дж.Уотсоном та англійським фізиком Ф.Кріком (1953 р.), допомогло їм створити молекулярну модель цього складного полімеру. Головні риси моделі були описані Уотсоном і Кріком, коли вони дійшли висновку, що ДНК - це високомолекулярний полімер, який складається з двох полінуклеотидних ланцюгів. Мономерами кожного ланцюга є дезоксирибонуклеотиди. Розмір кожного нуклеотиду в поздовжньому вимірі молекули дорівнює 3,4 А. Ці ланцюги утворюють правозакручені спіралі, кожний виток якої містить по 10 азотистих основ. Ланцюги полімерів закручені в спіраль один навколо другого і навколо загальної осі. Послідовність атомів одного ланцюга суворо протилежна аналогічній послідовності атомів другого ланцюга, тобто, два ланцюги спіралі антипаралельні. Фосфатні групи цих ланцюгів містяться із зовнішньої сторони, а азотисті основи - всередині спіралі.

Довжина одного витка спіралі дорівнює 34 а її діаметр - 20 Å. Антипаралельні ланцюги спіралі утримуються між собою за допомогою водневих зв'язків, які утворюються між парами аденін-тимінового (А-Т) та гуанін-цитозинового (Г-Ц) дезоксирибонуклеотидів. Пари А-Т та Г-Ц є специфічними в складі подвійної спіралі, бо в нормі саме між гуаніном і

цитозином та між аденіном і тиміном у складі спіралі утворюються водневі зв'язки.

Кожний одонитковий ланцюг ДНК чи РНК утворюється із сотень тисяч мономерів, які відносяться до чотирьох типів нуклеотидів, а саме: аденіновий, гуаніновий, цитозиновий та тиміновий дезоксирибонуклеотиди ДНК або аденіновий, гуаніновий, цитозиновий та урациловий рибонуклеотиди РНК. Всі ці типи нуклеотидів чергуються вздовж ланцюга в найрізноманітніших послідовностях. Послідовність головних валентностей нитки ДНК чи РНК утворюється поперемінно ефірними зв'язками між фосфорною кислотою, що входить до складу одного нуклеотиду, і цукром дезоксирибозою або рибозою наступного нуклеотиду. Ці зв'язки утворюються атомами вуглецю молекули цукру в 3' та 5' положенні, що показано на структурних формулах рис.2.1.

Одна з важливих особливостей ДНК описується правилом еквівалентності, сутність якого полягає в тому, що в молекулах дезоксирибонуклеїнових кислот молярні відношення пуринів до піримідинів (або навпаки) дорівнюють одиниці. Це означає, що в нормі молярний вміст аденіну має дорівнювати молярному вмісту тиміну, а молярний вміст гуаніну - молярному вмісту цитозину. Ця закономірність, відкрита Е.Чаргофом в 1950 р., відіграла важливу роль у створенні дволанцюгової моделі молекули ДНК.

Спираючись на створену модель, Уотсон і Крік дійшли висновку, що оскільки вздовж молекули полімеру монотонно повторюються цукрово-фосфатні послідовності, а мінливими виявляються тільки послідовності азотистих основ (це видно з рис.2.2), то генетична інформація може бути закодована лише за допомогою послідовностей азотистих основ, які входять до складу дезоксирибонуклеотидів. Зміни в існуючих послідовностях нуклеотидів у молекулах ДНК можуть спричинювати лише мутації. Отже, була виявлена специфічність взаємного розташування азотистих основ, яку почали розглядати як матеріальну основу генетичного коду.

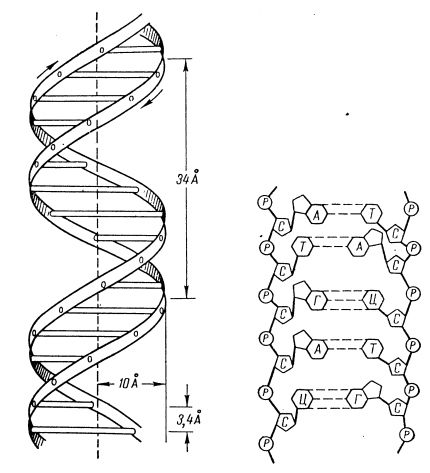


Рис.2.2. - Будова молекули ДНК: а –
схема двониткової спіралі; б –
структура складових компонентів
фрагменту молекули ДНК.

Символами А,Г, Т, Ц позначені азотисті основи, символом Р – залишок фосфornoї кислоти, С – цукор дезоксирибоза.

Важливою властивістю ДНК є її здатність до денатурації. Під терміном "денатурація" розуміють процес розділення двох комплементарно поєднаних водневими зв'язками ланцюгів, які утворюють подвійну спіраль ДНК. Цей процес відбувається під впливом високих температур або деяких хімічних реактивів. Так, під час нагрівання розчинів ДНК між пуринами і піримідинами руйнуються водневі зв'язки, а за наступного швидкого охолодження дволанцюгових молекул вони розділяються на одноланцюгові. Однак з'ясувалося, що подвійна спіраль може відтворитись із окремих комплементарних полінуклеотидних ланцюгів. Отже, денатурована ДНК здатна до ренатурації. Це дозволило розробити методи гібридизації фрагментів ДНК різного походження.

Таким чином, гібридизація ДНК виявилась ефективним методом у таксономічних дослідженнях.

Кільцеподібні молекули ДНК характерні для багатьох видів вірусів, бактеріальних спадкових структур та плазмід. Молекули ДНК пластид і мітохондрій також кільцеподібні, а от ДНК хромосом еукаріотів лінійна. У живій природі ДНК - це єдиний біополімер, синтез величезних молекул якого відбувається шляхом самоподвоєння (редуплікації) завдяки каталітичній дії ферменту ДНК-полімерази.

Вивчення рибонуклеїнової кислоти показало, що молекули цього полімеру, як правило, є одониткові. З'ясувалось, що РНК також здатна виконувати функцію носія спадковості. Наприклад, гени вірусу грипу, вірусу тютюнової мозаїки, ретровірусу та інших прокаріотів закодзовані в молекулах РНК. При цьому РНК ретровірусу, як виняток, існує у формі двониткової структури.

Як вже відзначалося, мономером молекули РНК є рибонуклеотид. До його складу входить фосфорна кислота, цукор рибоза і одна з чотирьох азотистих основ. Ці основи в складі РНК представлені пуринами (аденін та гуанін) і піримідинами (цитозин та урацил). Таким чином, РНК відрізняється від ДНК тим, що у її складі місце дезоксирибози займає рибоза, а місце тиміну - урацил.

Нуклеїнові кислоти - це найбільші за розмірами молекул функціонально активні біополімери. Довжина молекули ДНК бактерії сягає 1000 мкм, а до складу її ланцюгів входить понад 2,9 млн. пар нуклеотидів. Ще більшими є молекули ДНК хромосом в еукаріотів. Хоча до складу їхніх хромосом, крім ДНК, входять білки, проте в основі будови кожної еукаріотичної хромосоми лежить лише одна молекула двониткової ДНК. Якщо 23 молекули ДНК, які складають основу 23 хромосом статевої клітини людини, витягнути в одну лінію, то вона буде завжди 1 м, а середній розмір молекули однієї хромосоми сягає майже 4,35 см. У такій молекулі міститься понад 127 млн. комплементарно поєднаних пар нуклеотидів. Молекулярна маса таких молекул ДНК становить понад 77 000 т.

Після того, як було встановлено, що матеріальним носієм спадковості є нуклеїнові кислоти і розшифрована модель структури ДНК, вчені почали з'ясовувати механізм запису спадкової інформації на молекулах нуклеїнових кислот, зокрема на ДНК. Щодо цього питання склалося два погляди, які набули характеру догм. За однією з цих догм генетичний код можна представити у формі певної послідовності нуклеотидів, за допомогою якої генетична інформація записана в полінуклеотидних нитках ДНК. Інакше кажучи, подвійна

спіраль ДНК подібна до телеграфної стрічки, на якій генетична інформація записана за допомогою алфавіту з чотирьох букв - А, Т, Г і Ц. Оскільки спіраль молекули ДНК є дволанцюговою, то й генетична інформація в такій молекулі має бути записаною двічі. Звідси робили висновок про те, що хоч для запису генетичної інформації використовуються одні і ті самі чотири букви, інформація в двох протилежно направлених нитках спіралі має бути записана літерами алфавітів двох різних мов.

В основу другої догми було покладено уявлення про роль структури молекул поліпептидних ланцюгів. Сутність догми полягала в тому, що інформаційний зміст будь-якого гена криється в зображенні первинної структури відповідного поліпептиду.

З цих поглядів на можливий характер генетичного коду випливає, що нуклеотидні послідовності пуринових та піримідинових азотистих основ повинні детермінувати відповідні послідовності амінокислотних залишків у процесі синтезу поліпептидів. Тому тільки дуже простий за своєю генетичною функцією код спадкової інформації зможе своєчасно і безпомилково визначити, якою має бути кожна наступна амінокислота в процесі складання поліпептидного ланцюга. Розглядаючи архітектуру моделі двониткової структури ДНК, легко встановити, що найпростішою функцією генетичного коду буде здатність кожного нуклеотиду (або декількох сусідніх нуклеотидів) кодувати одну із 20 амінокислот, які входять до складу білків. Оскільки кодування окремої амінокислоти однією азотистою основою неможливе (бо це дозволило б кодувати однією азотистою основою лише 4, а двома -16 амінокислотних залишків), логічно було припустити, що кожна амінокислота має кодуватись трьома послідовно розміщеними нуклеотидами (кількість комбінацій по три з чотирьох дорівнює 64). Звідси триплет, утворений трьома послідовно розміщеними азотистими основами, почали вважати окремою одиницею, яка кодує одну із амінокислот.

Серед науковців, що брали участь у розгадці принципу побудови генетичного коду, був американський фізик-теоретик Г.Гамов, який у 1954 р.

зробив перший розрахунок генетичного коду. Сутність його полягала в тому, що кожна амінокислота кодується трьома комплементарно поєднаними парами нуклеотидів дволанцюгової молекули ДНК, тобто триплетами. При цьому кожна комплементарно поєднана пара нуклеотидів, що входить до складу триплету, бере участь у кодуванні зразу трьох амінокислот. Це означає, що генетичний код перекривається. Крім того, вважалось, що окрема амінокислота може кодуватись більш як одним триплетом. Тобто код характеризується наявністю синонімів.

Досконале вивчення білків показало, що особливості їх структури не підтверджують перекривання коду. Тому Ф.Крік і С.Бренер висунули гіпотезу, що генетичний код не перекривається.

Згідно з гіпотезою Кріка і Бренера кожний триплет із дезоксирибонуклеотидних пар у складі дволанцюгової молекули ДНК може кодувати лише одну амінокислоту. У свою чергу, кожна пара комплементарно поєднаних нуклеотидів, яка входить до складу триплету, може брати участь у детермінації лише однієї амінокислоти.

Пізніше схема Кріка знайшла експериментальне підтвердження. Численними дослідженнями було доведено, що генетична інформація закодована у вигляді триплетів, кожний з яких складається з трьох послідовно розміщених азотистих основ у складі молекули ДНК.

Уявлення про матеріальні механізми запису спадкової інформації на молекулах ДНК виявилось вдалим доповненням до відомих науці фактів про те, що в еукаріотів ця інформація локалізується в ядрах клітин. Наприклад, ще у 1883 р. німецький біолог В.Ру сформулював "ядерну" теорію спадковості, відповідно до якої спадкова інформація, котрою обумовлюється формування певних спадкових ознак у нащадків, локалізується в ядрах клітин цих організмів. Численні дослідження підтвердили дану теорію.

У свою чергу ще в 30-х роках XX ст. К.Касперсон і Дж.Браше звернули увагу на те, що в живих клітинах різні типи нуклеїнових кислот чітко відрізняються місцями своєї локалізації. З'ясувалось, що майже вся ДНК клітин

локалізована в ядрах, а РНК - в цитоплазмі. Крім того, було встановлено, що нові білки з'являються не в ядрах, а в цитоплазмі клітин. Це могло свідчити про те, що білки синтезуються саме в цитоплазмі.

У 1952 р. Х.Шахман, А.Парді і Р.Станлер за допомогою електронного мікроскопа знайшли, що в лізатах бактеріальних клітин молекули РНК зв'язані з білковими гранулами. Ці гранулярні частини білка (їх назвали рибосомами) виявились активними органелами клітин. Було встановлено, що рибосоми - це рибонуклеопротеїдні частини сферичної форми, які за об'ємом складаються з однакових частин білка та РНК. Розмір гранул у діаметрі сягає 150-350 А. Вони можуть знаходитись у цитоплазмі у формі суспендованої зависі. Проте частіше рибосоми локалізуються на мембранах ендоплазматичної сітки.

Найвища концентрація рибосом спостерігається на мембранах ендоплазматичної сітки секреторних клітин організмів, в яких білок синтезується та виводиться за межі цих клітин в інші ділянки відповідних організмів. Всі ці факти свідчать, що РНК-рибосомні комплекси - це місця синтезу білка.

На початку 60-х років деякі вчені, зокрема, С.Вейс, Дж.Гурвіц та інші, в екстрактах клітин кишкової палички та в клітинах деяких еукаріотів виявили існування ферменту, здатного за наявності у відповідному середовищі молекул ДНК та рибонуклеозидтрифосфатів каталізувати синтез РНК. Тому цей фермент дістав назву РНК-полімераз. Отже, РНК-полімераза каталізує синтез РНК лише в присутності ДНК.

У 1961 р. Д.М.Прескотт встановив, що під час розмноження клітин найпростішого *Tetrahymena* в присутності ³H-цитидину заново синтезовані молекули РНК, помічені радіоактивною міткою, в перші хвилини після введення ³H-цитидину, виявляються всі локалізованими в ядрі. Але якщо клітини перенести в нерадіоактивне середовище і продовжувати інкубацію їх, то через певний час вся мічена РНК виявляється локалізованою в цитоплазмі. Ці факти свідчать про те, що цитоплазматична РНК має ядерне походження.

У 1957 р. Є.Волкін і Л.Астрахан інфікували клітини кишкової палички вірусом Т-фага. Було з'ясовано, що вже через 7 хв. після введення молекули ДНК Т-вірусу в клітину-господаря, в останній припинявся синтез власної РНК і розпочинався синтез РНК, яка характеризувалась рибонуклеотидними послідовностями, відповідними до дезоксирибонуклеотидних послідовностей привнесеної фагової ДНК. Розширення цих досліджень дозволило у 1961 р. С.Бренеру, Ф.Жакобу і М.Мезельсону довести, що РНК, яка синтезується на молекулах фагової ДНК у клітинах кишкової палички (*Escherichia coli*), поєднується з рибосомами цих клітин, внаслідок чого починається синтез фагових білків.

Таким чином, фагова РНК виявилась посередником між дезоксирибонуклеотидними послідовностями ДНК та амінокислотними послідовностями білка. Тому РНК, яка характеризується властивостями транслятора або переносника з молекул ДНК на молекули білка, що синтезується, була названа інформаційною РНК (скорочено - іРНК).

Узагальнюючи результати досліджень, виконаних на той час різними вченими, Ф.Крік у 1958 р. висловив думку про те, що в процесі синтезу білка спадкова інформація передається з ДНК за допомогою іРНК на послідовність шикування амінокислотних залишків у поліпептидах. Цю ідею Крік назвав центральною догмою молекулярної біології.

2.2. Реплікація ДНК

Ряд досліджень показали, що синтез величезних молекул, таких як білки та нуклеїнові кислоти, на відміну від синтезу інших речовин, суттєво ускладнений. Довгий час молекулярні механізми синтезу цих полімерів були невідомі. І лише відкриття структурної будови молекул ДНК дозволили Дж.Уотсону і Ф.Кріку дати правдоподібне пояснення механізмів точного відтворення молекул цього полімеру. Вони дійшли висновку, що процес синтезу ДНК розпочинається розкручуванням дволанцюгової спіралі ДНК.

Разом з цим мають порушуватися водневі зв'язки між поєднаними в пари азотистими основами. Внаслідок цього комплементарно поєднані ланцюги ДНК, звільняючись один від одного (денатурація), набувають одониткової будови. Кожна з цих ниток стає своєрідною матрицею, на якій синтезується новий комплементарний ланцюг.

Сутність матричного синтезу полягає в тому, що слідом за поділом подвійної спіралі молекули ДНК на дві нитки до кожної пуринової азотистої основи одониткового ланцюга, звільненої від водневих зв'язків, зразу приєднується піримідиновий дезоксирибонуклеотид, а до кожної піримідинової азотистої основи - пуриновий дезоксирибонуклеотид. Зрозуміло, що в даному разі дезоксирибонуклеотиди надходять з протоплазми клітини, де вони синтезуються.

Кожний приєднаний дезоксирибонуклеотид утримується на одонитковому ланцюгу за допомогою водневих зв'язків. До складу синтезованої дочірньої спіралі має входити одна нитка ДНК, яка без будь-яких змін успадкувалась від вихідної материнської спіралі, і друга – нова синтезована нитка. Тому такий механізм отримав назву «напівконсервативного способу синтезу ДНК».

Гіпотеза Уотсона і Кріка щодо схеми напівконсервативного способу ауторепродукції ДНК блискуче підтвердилась у дослідях, які провели М.Мезельсон і Ф.Сталь у 1958 р. Вони вирощували бактерії *E. coli* на середовищі, в якому єдиним джерелом азоту був його ізотоп ^{15}N у складі $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$. Вся ДНК, накопичена відповідними бактеріями, мала щільність $1,724 \text{ г/см}^3$, а ДНК, що утворилась з нормального ізотопу азоту (^{14}N), - $1,710 \text{ г/см}^3$. Виходячи з цього зразок ДНК з вмістом ізотопу ^{15}N називатимемо важкою ДНК, а з вмістом ^{14}N - легкою ДНК.

Екстракти частини бактерій, що вирости на середовищі з ^{15}N , центрифугували в градієнті щільності 6-молярного розчину CsCl , а за допомогою ультрафіолетових променів з довжиною хвилі 2600 Å визначали зону остаточної седиментації молекул ДНК.

Крім того, синхронізовану щодо поділу клітин сукупність бактерій, вирощених на середовищі з ^{15}N , переносили на поживне середовище з ^{14}N , тобто легким ізотопом цього елемента. Клітинам дали змогу поділитись на новому середовищі лише один раз. Потім одну частину даного зразка клітин екстрагували, а другій - дозволили ще раз поділитись, після чого їх також екстрагували. Отримані екстракти центрифугували і визначали зони остаточної седиментації молекул ДНК. У бактерій, які жились ^{15}N найважчою виявилась ДНК. Перенесення бактерій на середовище з ^{14}N і одноразовий поділ клітин обумовило реплікацію й утворення гібридних молекул ДНК. За своєю масою вони виявились проміжними між важкою та легкою ДНК.

Нарешті, в процесі другого поділу бактеріальних клітин на середовищі з ^{14}N , половина матричних ниток ДНК містила важкі, а друга половина - легкі ізотопи азоту. Тому після закінчення реплікації половина розмножених молекул зберігає проміжну масу, а половина представлена фракцією легкої ДНК.

Аналіз та осмислення процесів синтезу ДНК бактерій на середовищах з ^{15}N і ^{14}N дозволяє зробити однозначний висновок - ауторепродукція ДНК відбувається напівконсервативним способом.

Дослідження процесів реплікації ДНК показало, що вони відбуваються за участі ряду ферментів, які складають певну ферментативну систему. Ферменти **гірази** (їх ще називають геліказами) розплітають чи розкручують дволанцюгову спіраль ДНК, внаслідок чого в зоні межування розплетеної і нерозплетеної ділянок утворюється реплікативна вилка. Звільнені одна від другої поодинокі нитки ДНК на відповідних ділянках починають виконувати функцію матриць.

Слід мати на увазі, що на реплікативній вилці, через різнонаправлену послідовність шикування дезоксирибонуклеотидів у складі комплементарних ниток, синтез ДНК в одному напрямку на цих обох нитках вилки неможливий. На матрицях він завжди відбувається у напрямку від кінця 5' до кінця 3'. Тому на одній з ниток, яка направлена своїми послідовностями 5'-3' до розвилки, під впливом ферменту ДНК-полімерази III відбувається безперервний синтез нової

нитки . Її нарощування встигає за пересуванням розвилки внаслідок розкручування вихідної молекули ДНК.

Друга нитка цієї вилки, навпаки, направлена своїми 3'-5' послідовностями в протилежний від неї бік. Тому на даній матриці синтезуються короткі (1 000-2 000 нуклеотидів) фрагменти дочірньої ДНК (рис. 3.3). (Нарощування синтезованих ниток відбувається від 5'- до 3'-кінців.) Такі фрагменти названі **фрагментами Оказаки**, на честь їхнього першовідкривача Р.Оказаки.

Синтез кожного фрагмента ініціюється коротким полірибонуклеотидом, який утворюється приблизно з 10 рибонуклеотидів під впливом ферменту **РНК-полімерази**. Цей полірибонуклеотид виконує функцію праймера, котрий започатковує синтез фрагмента ДНК. Останній синтезується під впливом **ДНК-полімерази II**, яка забезпечує початок синтезу від РНК-праймеру, але подальше нарощування довжини цього фрагмента каталізується **ДНК-полімеразою III**.

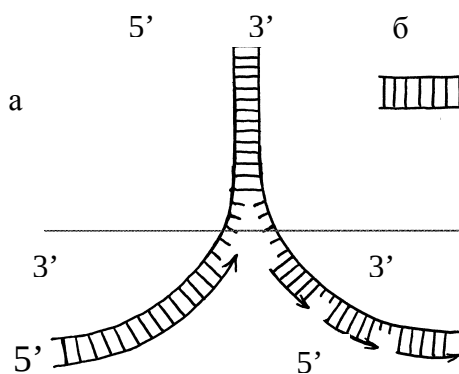


Рис.3.3. Схема реплікації двониткової молекули ДНК:
а – реплікативна вилка, б – початок утворення двох реплікативних вилок.

Після завершення синтезу фрагментів Оказаки починає функціонувати фермент **ДНК-полімераза I**. Цей фермент каталізує видалення з поміж фрагментів щойно синтезованої ДНК відпрацьованих праймерів, а утворені прогалини забудовує комплементарними дезоксирибонуклеотидами. В свою чергу, фермент **ДНК-лігаза** з'єднує фрагменти Оказаки в одну полінуклеотидну нитку ДНК.

Потім до роботи знову приступає фермент **ДНК-полімераза II**. Її молекули рухаються вздовж заново синтезованої ділянки ДНК. Якщо будь-який

нуклеотид невірно вбудувався у ланцюг ДНК, що синтезується, він видаляється, а прогалини зразу забудовуються комплементарними дезоксирибонуклеотидами. Так утворюється друга нитка ДНК, яка синтезується в протилежному напрямку до реплікативної вилки.

В результаті описаних процесів синтез нитки ДНК у напрямку від 3' до 5' кінця відбувається швидше, ніж у зворотному напрямку, тому цю нитку називають лідируючою. Оскільки за темпами синтезу друга нитка дещо відстає від лідируючої нитки, її назвали відстаючою ниткою.

Вивчаючи закономірності реплікації ДНК, яка забезпечує подвоєння плазмід, вірусів та бактерій, Ф.Жакоб і С.Бренер в 1963 р. показали, що у відстаючий ДНК є системи (блоки) генів, подвоєння яких контролюється генетично. Виявилось, що реплікація ДНК бактерії можлива лише при наявності певних блоків генів (вони були названі репліконами) і що є ген, який детермінує процес реплікації в межах реплікона (він дістав назву реплікатора). У свою чергу з'ясувалось, що генетична функція реплікатора контролюється геномініціатором. Цей ген видає "команду" про синтез речовини, яка включає в роботу ген-реплікатор.

Процеси синтезу ДНК відзначаються досить високою інтенсивністю. Наприклад, ДНК бактерій при утворенні реплікативної вилки розкручується із швидкістю 80 об./сек. Кільцева молекула ДНК геному *E.coli*, складається з 4.106 пар нуклеотидів. Поділ клітини цієї бактерії при температурі 37 °C відбуває за 20 хв. Оскільки кільцева ДНК кишкової палички представлена лише одним репліконом з двома протилежно спрямованими реплікативними вилками, неважко підрахувати, що швидкість реплікації в бік будь-якої вилки становить понад 1600 пар нуклеотидів за секунду, а в напрямках двох протилежних вилок - понад 3200 пар нуклеотидів за секунду.

Зауважимо, що в еукаріотів швидкість приєднання до себе нуклеотидів дещо нижча - 100-300 пар нуклеотидів за секунду. Проте на відміну від бактерій хромосоми еукаріотів є полірепліконними. Тому швидкість реплікації ДНК в еукаріотів не поступається такий у прокаріотів. Виходячи з

викладеного, можна сказати, що реплікон - це одиниця реплікації, в межах якої відбувається подвоєння ДНК під контролем регуляторних генів даного реплікона.

Реплікація ДНК як у прокаріотів, так і в еукаріотів - процес двонаправлений. В точці ініціації процесу реплікації завжди утворюються дві реплікативні вилки. По ходу синтезу ДНК вони віддаляються одна від одної в протилежних напрямках доти, поки не зустрінуться з реплікативними вилками сусідніх репліконів або одна з одною, в разі кільцевої молекули ДНК за умови, що вона представлена одним репліконом.

Хоча ми і підкреслювали, що процес реплікації ДНК двонаправлений, однак у природі існують схеми й однонаправленого синтезу молекул ДНК. Це має місце серед порівняно коротких молекул, замкнених у кільце, якими характеризуються плазмідні, мітохондрії, пластиди, деякі віруси і бактерії. У них процес реплікації подібний до колеса, яке, котиться і залишає слід.

Таким чином, у даному випадку є нитка ДНК. Процес починається тим, що фермент ендонуклеаза розрізує одну з двох ниток кільцевої ДНК, відкриваючи цією точкою розрізу 3' і 5' кінці.

Нитка з 5' кінцем (назвемо її плюс-ниткою) прикріплюється до оболонки клітини, а кільце починає обертатись проти годинникової стрілки. Плюс-нитка виходить за межі кільця, а мінус-нитка залишається у його складі. Відокремлені нитки набувають властивостей матриць, до яких починають приєднуватись комплементарні нуклеотиди. Цим самим і розпочинається синтез комплементарних ниток ДНК.

Зазначимо, що синтез ДНК, процес який нагадує колесо, яке котиться і залишає слід, мабуть не може відбуватись у клітинах з кільцевою молекулою, але великою довжиною. Наприклад, важко уявити, як могло б кільце молекули ДНК у *E.coli* завдовжки понад 1300 мкм поміститись у клітині завширшки 0,5 мкм і завдовжки 3-3,5 мкм. Проте фрагменти ДНК, які виникають унаслідок

розривів індукованих іонізуючими променями або хімічними мутагенами, замикаючись у кільця, можуть реплікуватись розглянутим способом.

Підсумовуючи викладене, відзначимо, що в специфіці самоподвоєння молекул ДНК закладена можливість стійкого збереження незмінності генетичної інформації впродовж багатьох поколінь. Це обумовлено принципом комплементарності (в нормі аденін комплементарний з тиміном, а гуанін - з цитозином), який реалізується в процесі синтезу молекул ДНК. Тому, розглядаючи закономірності розмноження живих клітин як окремих комірок життя, ми переконуємося, що заново синтезовані молекули в дочірніх поколіннях з абсолютною точністю відтворюють будову, якою характеризувались відповідні молекули попередніх поколінь. Цілком природно, що в разі порушення цілісності молекули ДНК, якщо це не спричинить загибелі клітини, виниклі зміни в послідовності розміщення одної або декількох нуклеотидних ланок будуть стабільно відтворюватись у нових молекулярних поколіннях.

Отже, принципи самоподвоєння і точне відтворення молекул ДНК складають матеріальну базу стабільного успадкування ознак, набутих у процесі еволюції всіма таксономічними видами організмів.

Питання для самоконтролю

10. Дайте визначення «матеріальним носіям спадковості».
11. Охарактеризуйте ДНК і РНК.
12. Яким чином відбувається реплікація ДНК?
13. Розкажіть про ферменти, які задіяні в процес реплікації.
14. Що Вам відомо про структуру нуклеїнових кислот?

ЛІТЕРАТУРА

1. Топчій Н.М., Бердишев Г.Д., Тищенко О.М., Демидов С.В. Зміни структури хроматину протягом старіння. - – К.: Фітосоціоцентр, 2007. – 104 с.
2. Гершензон С.М. Основы современной генетики. – К.: Наукова думка, 1983. – 560 с.
3. Демидов С.В., Бердишев Г.Д., Топчій Н.М., Черненко К.Д. Генетика. - – К.: Фітосоціоцентр, 2007. – 412 с.
4. Демидов С.В., Топчій Н.М., Бердишев Г.Д., Климнюк Г.І., Гавриленко Т.І. Генетика постнатального онтогенезу. – Київ: Фітосоціоцентр, 2006. – 251 с.
5. Демидов С.В., Мінченко Ж.А., Гавриленко Е.І., Топчій Н.М. Імуногенетика – К.: ТОВ «Знання», 2010. – 518 с.
6. Демидов С.В., Безруков В.Ф., Козерецька І.А., Сиволоб А.В., Рушковський С.Р., Лазаренко Л.М., Топчій Н.М. Загальна та молекулярна генетика. Практикум. - Київ: Фітосоціоцентр, 2005. – 259.
7. Иванов В.И., Барышникова Н.В., Билева Дж.С. и др. Генетика. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. – 638 с.
8. Ридли М. Геном. - М.: Эксмо, 2008. – 432 с.
9. Сиволоб А.В., Рушковський С.Р., Кир'яченко С.С., Афанасьєва К.С., Безруков В.Ф., Козерецька І.А., Демидов С.В. Генетика: Підручник. – К.: Видавничо-поліграфічний центр “Київський університет”, 2008. – 304 с.
10. Сиволоб А.В. Молекулярна біологія: Підручник. – К.: Видавничо-поліграфічний центр “Київський університет”, 2008. – 384 с.
11. Топчій Н.М., Демидов С.В., Шкляр С.Є., Скрипка К.О. Негістонові білки хроматину// Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія. – 2006. – Вип.48. – С.77-80.
12. Тищенко О.М., Дубровна О.В., Топчій Н.М. Метилування ДНК в онтогенезі рослин. – К.: Логос, 2008. – 268 с.
13. Уиллет Э. Генетика без тайн. – М.: Эксмо, 2008. – 224 с.

РОЗДІЛ 3

ТИПИ УСПАДКУВАННЯ У ЛЮДИНИ

3.1. Домінантні і рецесивні ознаки

З попередніх глав ми дізналися, що генетична інформація в основному зберігається в хромосомах ядра. У ДНК хромосоми по її довжині виділяють функціональні одиниці – цистрони, які відповідають генам. Ген, чи цитрон, є одиницею спадковості. Цистрон, в свою чергу, є складною структурою. Він складається з багатьох генів (триплетів, які кодують той чи інший кодон іРНК, що визначає положення амінокислоти в поліпептидному ланцюзі). Цистрони функціонально поєднуються в оперони, які визначають функціонування цілого блоку генів (цитронів) для перебігу певного ланцюга реакцій. Функція оперонів регулюється спеціальними генами (генами-регуляторами).

Статеві клітини (гамети) містять одинарний (гаплоїдний) набір хромосом. Під час запліднення яйцеклітини спермієм виникає зигота, яка має подвійний (диплоїдний) набір хромосом по дві хромосоми кожної пари. Одна хромосома кожної пари отримана від батька, а інша, гомологічна їй, - від матері. Гомологічні хромосоми мають як правило однаковий набір генів. Таким чином, кожний ген в соматичній клітині і в зиготі представлений подвійною кількістю (цим забезпечується подвійний запас міцності). Якщо ці два різновиди гену зовсім однакові і визначають одну і ту ж ознаку, то такий організм називається гомозиготним за даним геном. Але може бути, що ген визначає одну ознаку, наприклад темний колір волосся, а інший його гомолог – другий, наприклад світлий колір волосся. Такі гени, як ми говорили вище, називаються алельними, а організм є гетерозиготним за даним геном. Оскільки у людини генів декілька сот тисяч, а за іншими даними навіть декілька мільйонів, то як правило частина генів знаходиться в гомозиготному стані, а частина в

гетерозиготному. Якщо два різних гена знаходяться в різних хромосомах, то на протязі утворення гамет вони можуть комбінуватися незалежно і, отже, у потомстві буде незалежне розщеплення ознак. Якщо два гена входять в одну групу зчеплення (локалізовані в одній хромосомі) і під час реплікації хромосом не виник кросинговер, то ознаки, які ними обумовлені, успадковуються разом.

Домінантний ген проявляється як в гомозиготному, так і в гетерозиготному стані, а рецесивний – тільки в гомозиготному. Домінантні чи рецесивні гени можуть визначати певну хворобу. Ці хвороби в потомстві будуть проявлятися по різному. Розберемо це на буквених символах на прикладі гетерозиготного організму. Позначимо домінантний ген, який несе захворювання, прописною літерою з апострофом (A'), а нормальний ген – прописною літерою без апострофа (A). В даному організмі хвороба проявляється, не дивлячись на те, що інший ген нормальний (організм гетерозиготний).

Якщо такий хворий візьме шлюб зі здоровою жінкою (чи хвора жінка зі здоровим чоловіком), то половина їх дітей будуть хворі на цю хворобу, а друга половина – здоровими, відношення 1: 1.

Домінантні захворювання перебігають іноді дуже легко, ніж рецесивні, бо вони можуть проявлятися в гетерозиготному стані, коли один алельний ген нормальний. В гомозиготному стані такі хвороби не зустрічаються, оскільки вони в процесі еволюції хвороби з тяжкими дефектами не давали нащадків та елімінувались. Домінантні захворювання передаються з покоління в покоління (по вертикалі) в пропорції 1: 1. Великих забруднень для діагностики вони не представляють. Крім повного домінування, коли домінантний ген повністю пригнічує дію рецесивного алеля, спостерігається неповне домінування, коли повного пригнічення немає. У гетерозигот функціонально активними є обидва гени, і тому у фенотипі ознака виражається у вигляді проміжної форми. Ознака в таких випадках виражається в різноманітному ступені в певних межах. Так, під час серповидно клітинній анемії у гетерозигот вміст аномального гемоглобіну коливається в межах 25-45%.

Деякі домінантні і рецесивні ознаки людини

Домінантні ознаки	Рецесивні ознаки
Карі очі	Блакитні очі
Темне волосся	Світле волосся
«Монголоїдний» розріз очей	Європеїдний розріз очей
Ніс з горбинкою	Прямий ніс
Широка щілина між різцями	Вузька щілина між різцями або відсутність її
Зуби великі, виступають вперед	Звичайна форма і положення зубів
Наявність ластовиння	Відсутність ластовиння
Мочка вуха вільна	Мочка вуха приросла
Губи повні	Губи тонкі
Краще володіння правою рукою	Краще володіння лівою рукою
Кров резус-позитивна	Кров резус-негативна
Відчуття смаку фенілтіокарбаміду (ФТК)	Нездатність відчувати смак ФТК

Неповне домінування широко спостерігається у рослин і тварин. На протязі схрещування червоноплідної полуниці з білоплідною у першому поколінні отримують рожево плідну полуницю. Під час схрещення широко листових ротиків з вузьколистовими в першому поколінні отримують рослини з проміжною шириною листка. Протягом схрещування темних норок з білими отримують білі норки з чорним хрестом на спині (кохинурові норки). Це стосується кольору шерсті мурчаків, великої рогатої худоби і довжини рогів у них і т.д.

У людини неповне домінування спостерігається під час серповидно клітинній анемії (рис. 1), таласемії (рис.2), цистинурії, акаталаземії, родинній гіперхолістеремії, пельгерівській анемії і т.д.

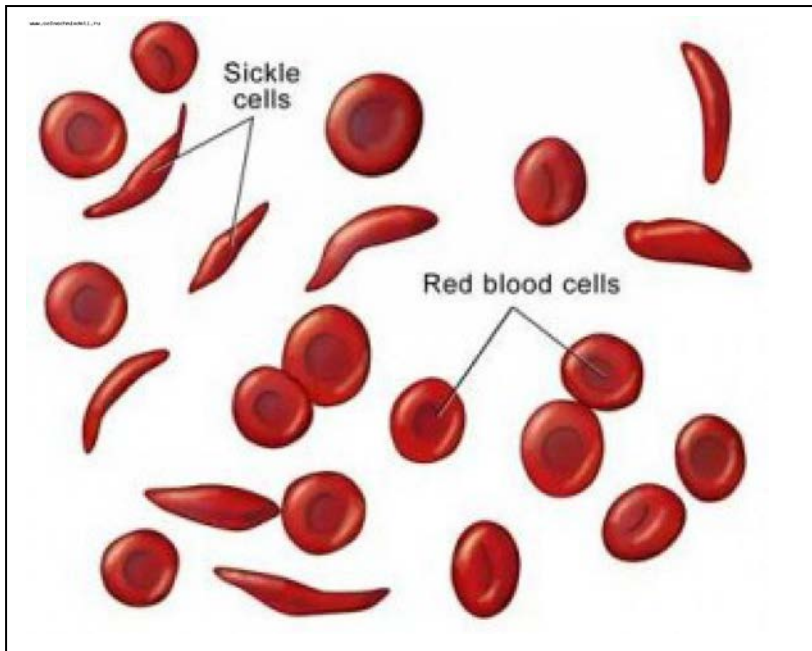


Рис.1. – Серповидно-клітинна анемія

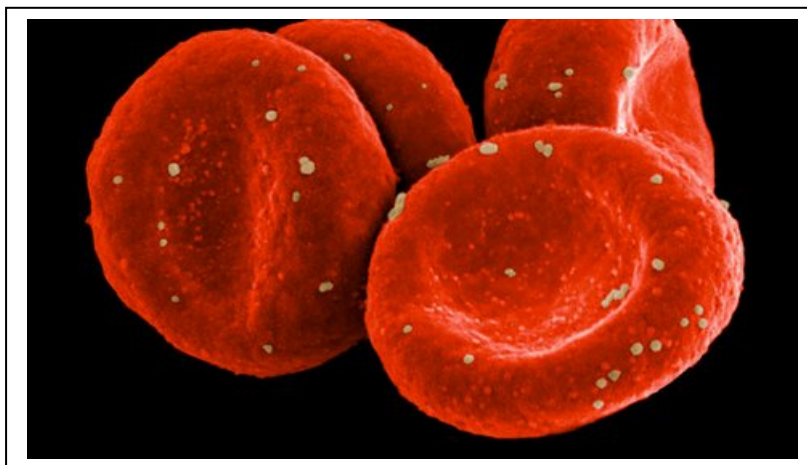


Рис.2. – Талассемія

Протягом пельгерівської анемії у гомозигот відсутня сегментація ядер лейкоцитів, а у гетерозигот ця сегментація незвичайна. У гомозигот за цистинурії відбувається утворення цистинових каменів у нирках, а у гетерозигот – підвищений вміст цистину у сечі. Під час акаталаземії у гомозигот повністю відсутня каталаза крові, у гетерозигот концентрація її знижується. У гетерозигот за сімейної гіперхолестеринемії спостерігається висока концентрація холестерину в крові, а у гомозигот, крім того, спостерігаються ксантоми, ранній атеросклероз. У гомозигот за таласемії (анемія Кулі) хвороба закінчується летально у 90-95 %, а у гетерозигот захворювання протікає у відносно легкій формі. То ж відбувається і за серповидноклітинної анемії.

Рецесивні захворювання проявляються у тих випадках, коли два рецесивні гена зустрінуться в зиготі разом – (aa).

Позначимо домінантний ген літерою A , а рецесивний – a . Якщо зустрінуться дві гетерозиготи, які несуть один і той же рецесивний ген, то у їх потомстві буде хворою кожна четверта дитина, хоча самі батьки здорові.

Рецесивних захворювань більше ніж домінантних і протікають вони у тяжчій формі ніж домінантні (оскільки тут обидва гена “хворі”). Передаються вони у нащадків не по вертикалі, а по горизонталі. Може бути пропуск в одному або кількох поколіннях, поки не зустрінуться в одній зиготі два рецесивних гена разом. Тому вони викликають труднощі для діагностики. Звідси стає зрозумілим, як важливо виявити гетерозиготних носіїв мутантного гена у відношенні народження дітей.

Каріотип людини містить 23 пари хромосом. Для зручності гени поділяють на аутосомні, тобто, локалізовані в аутосомах, і на гени, які локалізовані у статевих X - або Y -хромосомах (зчеплення зі статтю). Мутантні гени можуть локалізуватися у будь-якій хромосомі. Локалізація генів більш вивчена у статевій X -хромосомі. В аутосомах ще дуже мало локалізовано генів. Ці гени, у свою чергу, можуть бути домінантні і рецесивні. Якщо будь-який аутосомний ген викликає хворобу, то він може проявлятися як у чоловічому, так і в жіночому організмі. Гени, локалізовані у статевій X -хромосомі, у жінок проявляються тільки у гомозиготному стані або якщо цей ген домінантний. У чоловічому організмі патологічний ген, локалізований у статевій X -хромосомі, проявляється, будучи домінантним або рецесивним, оскільки у чоловіків немає другої гомологічної X -хромосоми і вони є гомозиготними за генами X -хромосоми, тобто, половинними. Доказом того, що дана ознака, або хвороба, зв'язані з X -хромосомою і що вона є рецесивною, є відсутність передачі цієї ознаки по чоловічій лінії, тобто, від батька до сина, тому що батько сину X -хромосому не передає. Сину X -хромосому передає мати. Якщо ознака домінантна, але зв'язана зі статевою X -хромосомою, то вона передається як дочці, так і сину, при чому ті та інші передають це захворювання своїм

нащадкам (як й аутосомно-домінантний тип), але на відміну від аутосомно-домінантного мати передає цю ознаку половині дочкам і половині синам, а батько передає ознаку всім дочкам і не передає синам. Але дочки цієї матері будуть лише носіями даної ознаки, як і вона сама, а сини – хворими. Дочки хворого батька будуть лише носіями дефектного гена.

Типи успадкування у людини багатьох спадкових захворювань ще не зрозумілі, бо інколи ці хвороби можуть бути викликані різноманітними причинами. Наприклад, атаксія Фридрайха – відсутність нейромускулярної координації – у деяких випадках проявляється в першому поколінні від шлюбу між двоюрідними родичами. Тут вона викликана рецесивним геном. В інших випадках захворювання виникає у дітей від неспоріднених шлюбів. Тут діє домінантний ген. Клініка різна у двох видів цієї атаксії.

За допомогою різноманітних методів дослідження зібрано достатній матеріал про спадковість і мінливість людського організму, який переконливо показує, що у людини, як і у інших видів тварин і рослин, бувають різноманітні типи успадкування. Людина підкоряється загальним закономірностям успадкування, відкритим Г. Менделем, Т. Морганом і вивченим сучасною генетикою. Багато ознак у людини виразно “менделюють”, тобто успадковуються по законам Менделя.

У людини, як і у інших організмів, можна відокремити успадкування домінантне і рецесивне. Щоб зрозуміти сутність цих видів успадкування, наведемо приклади домінантного і рецесивного успадкування.

Домінантне успадкування. За домінантним типом успадковуються наступні ознаки:

1. Шерстисте волосся – воно відростає швидко, не січеться і ніколи не буває довгим. Аналіз родоводів показує, що тут виникає пряме передавання ознаки одного з батьків половині дітей. Прояв ознаки не залежить від статі.
2. Ознака білого витка волосся. В деяких родинках прояв депігментованої ділянки волосся на голові простежено в багатьох поколіннях.
3. Брахидактилія – короткопалість верхніх кінцівок.

4. Куряча сліпота – нездатність розрізняти предмети в сутінках.
5. Карликовість хондродистрофічного типу. Такий карлик – людина, у якого тулуб і голова нормально розвинуті, а всі кінцівки сильно вкорочені.
6. Виступаюча вперед нижня щелепа і (відвисла) губа Габсбургів. Внаслідок цього рот залишається напіввідкритим. Завдяки портретам ці риси в династії Габсбургів простежуються до XIV ст.
7. Гіперхолестеримія – надлишковий вміст холестерину в крові – визначається домінантним геном. Від шлюбу двох осіб з гіперхолестеримією народжуються діти з важкою, іноді смертельною аномалією обміну речовин.

Рецесивне успадкування. Рецесивна спадковість у людини проявляється лише тоді, коли в генотипі поєднуються обидва рецесивних алеля. Це буває тоді, коли батьки мають такі генотипи:

$aa \times aa$, $aa \times Aa$, $Aa \times Aa$, де A – домінантний ген, a – рецесивний. У їх нащадків може виникнути генотип, в якому об'єднуються обидва гени a . Це забезпечує рецесивний тип успадкування за даним геном. Наприклад, нульва група крові (I) системи ABO – результат генотипу I^0I^0 . Нездатність відчувати смак фенілтіокарбаміду – інший приклад рецесивного успадкування.

Гіпотрихоз – відсутність волосся – викликається у гомозигот рідким рецесивним геном.

Домінантні ознаки: ямочки на щоках, ріст волосся по середній лінії чола, вільна мочка вуха, здатність звертати язик трубкою, загинати язик назад, нависаюче верхнє віко, розплюснуті великі пальці.

Рецесивні ознаки: тонкий великий палець, прирощена мочка вуха.

Всі ці ознаки обумовлені одним геном чи декількома генами, які знаходяться в одній групі зчеплення (тобто в одній хромосомі). Але існують і більш складні типи успадкування. Наприклад, одна і та ж хвороба – хоріоретинальна дегенерація – може успадковуватись то як домінантна, то як рецесивна, то може бути зчеплена зі статтю. Можливо, тут декілька різних захворювань, обумовлених різними генами, але клінічно ці захворювання не розрізняються між собою. Рецесивний ген, як правило, проявляється в

гомозиготному стані. Гетерозиготи не хворіють. Однак, якщо виникає велике навантаження на відповідний фермент, який детермінований даним геном, то захворювання може проявитися і у гетерозигот. Цукровий діабет у юнаків обумовлений рецесивним геном в гомозиготному стані (*aa*). Гетерозиготи *Aa* не хворі. Але під час відповідного навантаження він може проявитися й у гетерозигот (діабет осіб похилого віку).

Множинні алелі. У популяції може бути не два, а більше 100 алельних генів. Так, групи крові системи АВО визначаються трьома алелями одного гена – А, В, О. У кожної особи може бути не більше двох алелей, а у чоловіка і дружини не більше чотирьох. Взаємодія генів під час множинного алелізму може бути різноманітною. В одному випадку може бути домінування одного алеля над іншим, в іншому випадку домінування двох алелей (кодомінування), ще у решті випадків – утворення послідовних рядів домінування. Протягом сполучення двох алелей групи крові А і О у суб'єкта буде друга група крові, оскільки алель А домінує над алелем О, а під час сполучення А і В буде четверта група крові, тому що обидва алеля домінують (є кодомінантними).

Один ген може впливати на ряд симптомів чи ознак. Під час синдрому Марфана спостерігається цілий ряд порушень скелету, внутрішніх органів та очей. Ці хворі високого зросту, астенічної будови з вираженою гіпотонією м'язів, довгими тонкими пальцями, як ноги у павука (цей синдром ще називається арахнодактилією). У цих хворих загострене обличчя (пташине обличчя). відмічається вивихнення кришталика, аневризма аорти і т.д. Захворювання аутосомно-домінантне. Ген впливає на ряд органів через клітини, з яких побудовані ці органи. В даному випадку спостерігаються розлади обміну сполучної тканини, а останнє, мабуть, обумовлено порушенням обміну амінокислоти оксипроліна. Такий стан, коли один ген впливає на багато ознак, називається плеiotропією, а ген плеiotропним.

Найважче піддаються аналізу властивості, обумовлені багатьма генами (полігенна спадковість). Полігенно визначається розумовий розвиток, зріст, колір шкіри і, в якомусь ступені, вага тіла. Полігени дають ефект кількісних

ознак. На них великий вплив має зовнішнє середовище. Для аналізу цього типу успадкуваних властивостей використовують близнюковий аналіз.

Одні і ті ж захворювання (чи дуже подібні захворювання) можуть визначатись різними генами, тобто один ніби копіює собою інший. Такі захворювання називаються генокопіями, наприклад, міопатія. В клініці добре відомі 3 форми, які найчастіше зустрічаються: аутосомно-домінантна форма Ландузі-Дежеріна, аутосомно-рецесивна форма Ерба, пов'язана зі статтю форма Дюшена.

З іншого боку, деякі неспадкові (екзогенні) захворювання можуть копіювати спадкові. У спадок вони не передаються. Такі хвороби називаються фенокопіями. Протягом спадкових захворювань на гіперхромну анемію розвивається нейроанемічний синдром внаслідок пошкодженого синтезу V_{12} в організмі. Але такий же нейроанемічний синдром може розвиватися і під час глистових інвазій лентецем широким. Вигнання лентця призводить до одужання, і нащадки цієї людини будуть зовсім здоровими.

Не всі спадкові хвороби проявляються зразу після народження, вони можуть проявитися у дорослому віці і навіть в літньому віці. Так, гемофілія і кольорова сліпота проявляються зразу ж після народження, прогресивна м'язова атрофія – в дитячому і юначому віці, хорея Гентінгтона – в дорослому віці, а подагра – в літньому віці. Прояв дії будь якого гена, в тому числі і дефектного, характеризується двома термінами: пенетрантністю та експресивністю.

Пенетрантність – це частота чи ймовірність прояву певного гена. Термін запропонував у 1927 р. М.В. Тимофіїв-Ресовський. Пенетрантність визначається процентом популяції з числа особин, які несуть даний ген, у яких він проявився. Наприклад, пенетрантність 25% означає, що в $\frac{1}{4}$ частині генотипів, що несуть даний ген, він певним чином проявився у вигляді зміни ознаки організму (як кажуть, фенотипу організму).

Експресивність гена – ступінь фенотипового прояву гена, міра сили гена, яка визначається за ступенем розвитку ознаки. Експресивність гена відображує

мінливість його прояву. Наприклад, експресивність домінантного гена полідактилії *D*, який контролює кількість п'ястно-променевих кісточок на руках і ногах, змінюється. Таким чином, кількість пальців рук і ніг у носія цього гена може бути різним.

Іншим прикладом зміни експресивності гена може бути успадкування шизофренії: від вираженої патології психіки і різноманітних форм шизофренії до незначних відхилень психіки людини. Експресивність і пенетрантність мутантних генів, які викликають спадкові захворювання, залежать не тільки від взаємодії генів, але і від зовнішнього середовища.

Виділяють неповну пенетрантність генів. Як наприклад, ген каптодактилії (мізинець, що не згинається, або окостенілий) проявляється тільки на одній руці, на другій не проявляється, хоча мутантний ген в клітинах цієї руки існує, бо організм розвивається з зиготи, яка несе даний ген. Домінантний ген з неповною пенетрантністю обумовлює розвиток рахіту у дітей, резистентних до вітаміну Д. У дітей знайдена дуже низька концентрація неорганічного фосфату в крові. Рахіт не піддається лікуванню вітаміном Д. Іноді прояв гена залежить від віку організму. Ген *H*, який викликає хорею Гентингтона (прогресуючу дегенерацію нервової тканини) іноді проявляється в перші роки життя дитини, іноді у людей старших 50 років. У 5% людей є рецесивний гомозиготний ген цукрового діабету. Але він проявляється лише у 1/5 з цих людей, а у інших він виражений настільки слабо, що діабет не діагностується. Пенетрантність та експресивність мутантного гена, з одного боку, залежить від генотипу даного суб'єкту, тобто складу інших його генів, а з іншого боку – від впливу зовнішнього середовища. Тому в питаннях терапії хворих спадковими захворюваннями суттєве значення мають вивчення факторів зовнішнього середовища з метою затримання проявів захворювання чи пом'якшення його перебігу.

Для встановлення типу успадкування складається родовід і проводиться його аналіз. Якщо в родині є діти, то від лінії шлюбу проводять вниз невелику

пряму лінію, до якої домальовують горизонтальну лінію (“коромисло”), і до неї підмальовуються квадрати чи кружечки, що відповідає синам чи дочкам.

Порядок народження позначається зліва направо. На наведеному рис.42 (“Діти”) ми бачимо, що в родині народилось троє дітей – дві дочки і один син: перша і друга – дочки, а третій - син.

Якщо в родині народжуються близнята, то коромисла не малюють, а прямо від лінії шлюбу проводять вниз дві лінії, які розходяться (якщо близнята двояйцеві), чи спочатку проводять невелику загальну вертикальну лінію вниз, якщо близнята однайцеві.

Якщо хто-небудь з членів родини хворий, то цей квадрат чи кружечок заштриховують в центрі, залишаючи тільки вузьку світлу смужку по периферії (іноді заштриховують повністю). Цей суб’єкт називається пробандом, чи пропозитом. Складання родоводів починається з пробанда.

Аналіз родоводів дає підставу визначити тип успадкування тої чи іншої ознаки, тої чи іншої хвороби в кожному конкретному випадку. Для прикладу складемо і розберемо декілька родоводів.

В родині народилася здорова дитина. В дитинстві і в юнацькі роки вона розвивалась нормально. В 25-річному віці у неї встановлена хорея Гентингтона. Її мати і дід по материнській лінії також хворіли на хорею Гентингтона. Потрібно визначити тип успадкування. Складаємо родовід (рис. 43). В даному прикладі передача захворювання йде по вертикалі. Тому тип успадкування домінантний.

1. В родині молодого подружжя, двоюрідних сибсів, троє дітей. Один з них (молодша дитина) хворий на міопатію (форма Ерба). Батьки подружжя здорові. Їх загальний дід (дід подружжя) хворів на пізню форму міопатії Ерба. Необхідно визначити тип успадкування і вказати гетерозиготних носіїв паталогічного гена. Складаємо родовід (рис. 44). Тут в двох поколіннях захворювання не було. Але оскільки прадід пробанда хворів на міопатію Ерба, то він був гомозиготним носієм даного гена. Тому всі його діти могли бути гетерозиготними носіями дефектного гена. Цей ген у гетерозиготному стані

вони передали своїм дітям, тобто внукам хворого діда. Гетерозиготні носії тут відмічені символом Aa . На цьому прикладі показано, шкідливість шлюбів між родичами. Тип успадкування тут рецесивний.

На даний час вже відомий великий ряд домінантних і рецесивних ознак і захворювань у людини, список яких наведено в табл. 12.

Всі ці ознаки піддаються аналізу у відповідності до законів Менделя – це так звані менделюючі ознаки.

Розглянемо домінантні і рецесивні ознаки і захворювання людини більш докладно.

Домінантні ознаки. Теоретично домінантні ознаки у індивідуума можуть бути як гомозиготні AA , так і гетерозиготні Aa . Практично, коли мова йде про хвороби, завжди мають на увазі гетерозиготні індивідууми Aa . Гомозиготні особи з тією чи іншою домінантною хворобою звичайно не зустрічаються. Вони відсіваються ще під час народження. Позитивні домінантні якості можуть знаходитися і у гомозиготному стані. Тому тут індивідуумів ми можемо рахувати як гетерозигот Aa . При вступі у шлюб такої особи з нормальним за даним геном чоловіком у їх потомстві слід чекати народження половину дітей, хворих цією хворобою, і половину зовсім здорових дітей. У хворого нащадка у свою чергу можна чекати таке ж розщеплення у пропорції 1 : 1. У їх здорових братів онуки і наступні нащадки (правнуки і т. д.) будуть зовсім здоровими. Одже у домінантному типі успадкування у випадку, якщо хто-небудь, чоловік або жінка, хворіють на домінантне захворювання або є носіями певної домінантної ознаки, то розподіл у нащадків цієї хвороби або признаку відбудеться у співвідношенні 1: 1. Якщо це стосується хвороби, то ризик дуже великий і в даному випадку подальше народжувати дітей такій подружній парі не бажано.

Однак не всі домінантні захворювання повністю проявляються. Одні з них володіють повною пенетрантністю (100%), а у інших пенетрантність незначна, тому ступінь ризику зменшується в залежності від пенетрантності. Під час 100 % пенетрантності ступінь ризику рівна $1/2$, тобто, 0,5 або 50 %.

Пенетрантність протягом різних захворювань різна. Вона вже вирахована для багатьох захворювань і представлена у зведеннях. Однак її можна вирахувати і самому у кожному конкретному випадку.

Пенетрантність бажано було б вираховувати для кожної сім'ї і для кожного захворювання. Відомо, що пенетрантність, з одного боку, залежить від впливу факторів зовнішнього середовища, а з іншого – від ряду генів – модифікаторів даного організму, від усього генофонду даного суб'єкту.

Пенетрантність того чи іншого домінантного гена – це фактично доля індивідуумів певного генотипу, у яких дана ознака проявилася. Якщо за домінантного типу успадкування слід чекати пошкодження половину всіх дітей, то пенетрантність можна вирахувати поділом кількості пошкоджених дітей у даній сім'ї або даного роду на половину усіх народжених дітей. Наприклад, у 8 сім'ях одного роду з 60 дітей 10 хворих одним і тим же захворюванням. Необхідно визначити, яка пенетрантність патологічного гену даного роду: $p = 10/(60/2) = 10/30 = 1/3$, тобто, 33 % або 0,3. Тому ймовірність народження хворих дітей з даним домінантним захворюванням у цій сім'ї дорівнює не 0,5 а $0,5 \times 0,33 = 0,165$, або 16,5 %.

Відомо, що не всі захворювання проявляються зразу після народження. Для багатьох домінантних захворювань існує критичний вік, в якому вони проявляються. Наприклад, хорея Гентінглера проявляється у 35-40 років, тому під час прогнозування подібних захворювань проводиться обчислення за формулою Рюдіна:

$K = 200 M (3(b-\alpha)\alpha') \%$, де M – число хворих, b – число всіх спостережень, α – число осіб, які не досягли критичного віку, α' – число осіб критичного віку. До розрахунку приймаються брати і сестри, які не досягли критичного віку.

Враховуються всі, хто перейшли критичний вік і половина всіх тих, хто знаходяться у критичному віці.

Розглянемо кілька прикладів.

1.Отосклероз – аутосомно-домінантне захворювання з пенетрантністю 50 %. Визначити імовірність того, що син хворого чоловіка буде також страждати

на атеросклероз. Протягом домінантного типу успадкування розщеплення відбувається у пропорції 1 : 2, або 0,5. Пенетрантність цього захворювання також складає 0,5. Імовірність того, що син буде хворіти на атеросклероз $0,5 \times 0,5 = 0,25$ %. Це приклад апріорної імовірності.

Якщо пенетрантність домінантного гена 100 %, то розрахунки проводяться простіше.

2. Чоловік, який хворіє на ахондроплазію, одружився на жінці з нормально розвинутим скелетом. Яка імовірність народження у цій сім'ї дитини з ахондроплазією, якщо пенетрантність даного гена 100 %? У даному випадку імовірність розщеплення множимо на пенетрантність $1/2$ (або 0,5) $\times 100$ % = 0,5 або 50 %.

За генотипом дітей можна визначити генотип батьків і навпаки. Розглянемо кілька задач.

1. У матері I група крові, а у батька IV. Чи можуть діти успадкувати групу крові одного зі своїх батьків?

Розв'язок:

$$OO \times AB = AO \text{ або } BO,$$

Тобто, діти можуть мати другу і третю групи крові. Першу і четверту вони не можуть мати.

2. У пологовому будинку переплутали двох хлопчиків. Батьки одного з них мають першу і другу групи крові, батьки другого – другу і четверту. Діти мають першу і другу групи крові. Необхідно встановити, хто чий син.

Розв'язок:

у перших батьків дитина може мати наступні групи крові:

$$OO \times AO \text{ або } AA = OO \text{ або } AO, \text{ тобто, першу і другу групи.}$$

У других батьків дитина може мати наступні групи крові:

$$AO \text{ або } AA \times AB = AO \text{ або } AA, BO \text{ і } AB, \text{ тобто, другу, третю і четверту.}$$

Значить, дитина першої групи таки перших батьків, а дитина других батьків мала другу групу крові, тому що вони не могли мати дитину з першою групою крові.

Домінантні захворювання від покоління до покоління по вертикалі: від батька сину, онуку або дочці, онучці і т.д.

Наприклад, пробанд – чоловік, хворіє на уроджену катаракту, яка була також у матері і діда по материнській лінії. Дядько і тітка по лінії матері і три

двоюрідних брата по лінії дядька здорові. Батько пробанда, тітка по батьківській лінії, а також дід і баба зі сторони батька здорові. Жінка пробанда, її сестра, два її брата і батьки жінки здорові.

Із двох дітей пробанда син здоровий, а дочка хворіє уродженою катарактою. Необхідно визначити тип успадкування даного захворювання. Складаємо родовід 4-х поколінь (мал.45).

Із приведеного родоводу видно, що захворювання передається з покоління у покоління (по вертикалі) без пропусків. Тип успадкування домінантний.

До медико-генетичної консультації звернувся чоловік 35 років з питанням, чи не будуть його діти страждати на міотонію Томпсона, оскільки його молодший брат, батько і дід хворіють на це захворювання.

Міотонія Томпсона – домінантне захворювання, яке проявляється в дитячому і юнацькому віці. Якщо б чоловік, що звернувся, був носієм паталогічного гена, то захворювання неодмінно б вже проявилось у його віці. Якщо у нього в цьому віці ознак захворювання не виявлено, то можна стверджувати, що паталогічний ген він від свого батька не успадкував, являється повністю здоровим, і отже, всі його діти будуть здоровими.

Аутосомно-рецесивні ознаки. Рецесивні ознаки чи захворювання проявляються лише тоді, коли відповідні гени знаходяться в гомозиготному стані (aa).

Це може виникнути в тому випадку, коли обидва батьки є гетерозиготними носіями цього гена (Aa). Відповідно до схеми розподілення генотипів у таких батьків можна очікувати наступні нащадки: $Aa \times Aa = AA + 2Aa + aa$. Гомозиготних індивідів за рецесивним геном виявиться одна частина з чотирьох. Розщеплення за фенотипом буде в пропорції 3 : 1. Рецесивні алелі можуть передаватися від батьків до дітей протягом століть, залишаючись нерозпізнаними до тих пір, поки вони не об'єднуються в гомозиготний генотип. Тільки за допомогою аналізу родоводів людини можна

встановити тип успадкування тої чи іншої ознаки. Розберемо приклад з фенілкетонурією.

1. Батьки обоє гетерозиготні по гену фенілкетонурії. Яка ймовірність народження в цій родині хворої дитини?

Отримали $AA + 2 Aa + aa$, тобто $1 : 2 : 1$ за генотипом. Оскільки Aa не хворіють, а є носіями дефектного гену, то за фенотипом розщеплення $3 : 1$, чи $75\% : 25\%$. Ймовірність народження хворої дитини в цій родині $\frac{1}{4}$, чи 25% при 100% -й пенетрантності.

2. Дружина гетерозиготна за геном фенілкетонурії, а її чоловік гомозиготний за нормальних алелях цього гена. Яка ймовірність народження в цій родині дитини, хворої на фенілкетонурією?

Складаємо схему схрещування: $Aa \times AA = 2AA + 2Aa$.

У даному прикладі отримали відношення $2AA$ і $2Aa$. Гомозиготних суб'єктів за рецесивним геном тут нема. Отже, в цій родині хворих дітей не буде. Можуть народитися чи зовсім здорові діти, чи носії паталогічного гена, як їх мати, у відношенні $1 : 1$.

Якщо у цій сім'ї зустрічаються хворі на рецесивні захворювання, то ймовірність того, що родичі будуть гетерозиготними носіями паталогічного гена, відповідає ступеню спільності генів, а ймовірність народження в інбредному шлюбі хворої дитини дорівнює ступеню інбридингу. Але якщо у даній сім'ї рецесивні захворювання не зустрічаються, ймовірність появи хворих дітей в інбредному шлюбі різко підвищується порівняно з їх частотою у популяції.

Розглянемо приклад. У популяції гетерозиготні носії зустрічаються з частотою $1/70$. Під час укладання шлюбу двоюрідних сибсів ступінь ризику, або ймовірність народження хворої дитини з рецесивним захворюванням різко збільшується: $1/70 \times 1/8 \times \frac{1}{4} = 1/2240$ замість $1/20\,000$ у популяції.

Якщо у даній родині немає спадкових захворювань, то всі родинні шлюби мають негативний вплив на нащадків, хоча в таких сім'ях підвищена народжуваність (очевидно, завдяки меншій білковій несумісності гамет батьків). Смертність їх дітей у чотири рази вища, за інші родини (внаслідок

більшої кількості рецесивних генів у гомозиготному стані). Також діти мають ряд уроджених дефектів. Японські дослідники показали, що з 10 000 тисяч родів у двоюрідних сибсів 84,3 дитини мали різні аномалії, у той час як під час неспоріднених шлюбів аномалії мали місце лише у 46,7 дітей, тобто, майже у два рази менше. Крім того, такі діти відстають у рості. Чим більший ступінь споріднення, тим більша небезпека появи у нащадків різних аномалій. Це обумовлено тим, що людина є гетерозиготною за багатьма шкідливими рецесивними генами. На протязі переходу їх у гомозиготний стан виникає ряд спадкових дефектів і каліцтв.

Розглянемо ще один приклад рецесивного типу успадкування – альбінізм. Частота його у країнах Європи приблизно 1 на 20 000 жителів, серед дітей у Нігерії 1 : 300, а серед індійців Панами 1 : 132.

Припущення про рецесивний характер успадкування альбінізму підкріплюється наступними фактами: 1) обоє батьків дитини альбіносу можуть бути не альбіносами; 2) частота гена альбінізму вища у предків альбіносів, ніж серед звичайного населення; 3) шлюб альбіносу з альбіносом дає лише альбіносів; 4) монозиготні (ідентичні) близнята обоє альбіноси або обоє не альбіноси.

У Герберта Уельса є роман «Отец Христины Альберты», у якому описується, як у однієї білявки народилась донька з чорними волоссям і такими ж очима. Чоловік цієї жінки був також блондином. Недосвідчений у генетиці читач не зверне уваги на цю деталь, але генетика зрозуміє задум автора, який розкривається лише у середині книги: чоловік цієї жінки – не батько дитини, тому що її батьком може бути лише брюнет. Якщо б мати дівчинки подала позов на аліменти своєму законному чоловіку, то суд за даними генетики, мав би право відказати у позові.

Розглянемо кілька прикладів, зв'язаних з певним типом успадкування у людини під час множинного алелізму.

1. У людини короткозорість (M) домінує над нормальною рефракцією (m), а карі очі (B) над голубими (b).

Єдина дитина короткозорих карооких батьків має голубі очі і нормальний зір. Потрібно встановити генотипи всіх трьох членів цієї сім'ї. Гени, які визначають рефракцію ока і колір очей, знаходяться у різних хромосомах.

У даному прикладі дитина гомозиготна за рецесивними генами нормальної рефракції очей (*мм*) і по кольору очей (*вв*). По одному із цих генів вона одержала від батька, а по другому від матері. Значить, і мати і батько мали ці рецесивні гени. Оскільки вони були обоє короткозорими і кароокими, то вони були гетерозиготними за обома генами – рефракції очей і кольору, тобто, *Мм* і *Вв*. Це також приклад апостеріорної імовірності.

2. Блакитноокий короткозорий чоловік, мати якого мала нормальний зір, одружився на кароокій жінці з нормальним зором. Перша дитина від цього шлюбу – кароока, короткозора. Друга дитина – блакитноока, короткозора. Потрібно встановити генотипи батьків і дітей. Міркуючи аналогічно, встановлюємо, що перша дитина мала генотип *Мм Вв*, а друга - *Мм вв*. Батько - *Мм вв*, мати - *мм Вв*.

3. У людини антигени системи *ABO* представлені множинною алеломорфією I^0, I^a, I^b ; резус-антигени (Rh^+ і rh^-) – алелями *D* і *d*; групи крові – *MN* – кодомінантними алелями I^M і I^N .

Генотип матері - $I^a, I^0, I^M, I^N, D d$. Генотип батька - $I^b, I^b, I^M, I^N, D d$. Скільки і які сполучення антигенів можливі у їх дітей?

Розв'язок. У матері можливі 8 різних гамет - $I^a I^M D, I^a I^M d, I^a I^N D, I^a I^N d, I^0 I^M D, I^0 I^M d, I^a, I^0 I^N D, I^0 I^N d$, тому що у неї група крові *AO*. У батька група крові *BB*, тому у нього можливі 4 різні гамети: $I^b I^M D, I^b I^M d, I^b I^N D, I^b I^N d$.

У дітей можливі 12 різних сполучень антигенів: $ABMMR^+, ABMMrh^-, ABMNRh^+, ABMNRh^-, ABNNRh^+, ABNNrh^-, BMMRh^+, BMMrh^-, BMNRh^+, BMNRh^-, BNNRh^+, BNNrh^-$.

2. Перед судово-медичною експертизою поставлена задача: визначити, чи є хлопчик рідним або усиновленим сином для чоловіка і жінки *P*.

Розв'язок. Дослідження крові всіх трьох членів сім'ї дали наступні результати.

Жінка має резус-позитивну кров IV групи з антигеном *M*. Її чоловік – резус-негативну кров I групи з антигеном *N*. Кров дитини резус-позитивна I групи з антигеном *M*. Який висновок може дати експерт?

Випишемо сполучення антигенів усіх трьох членів сім'ї. Мати $Rh^+ MM$, *AB*. Батько $Rh^- NN$, *OO*. Дитина Rh^+ , *MM*, *OO*. За резус-фактором збіг є. Якщо мати резус-позитивна, то в залежності від того, гомозиготна вона чи гетерозиготна, дитина може бути резус-позитивною під час гомозиготності матері або резус-негативною при гетерозиготності матері.

За групою крові *ABO* збігу немає. При *AB* – групі матері і *OO* батька у дитини може бути або друга (*B*), або третя (*B*) група, але не перша. За системою *MN* також не співпадає. Якщо мати *MM*, а батько *NN*, то дитина може мати тільки *MN*, але не *MM* і не *NN*. Значить ця дитина не може бути сином цієї подружньої пари.

3.2. Успадкування, зчеплене зі статтю

До цього часу ми розглядали характер успадкування генів, що знаходяться в аутосомах. Тут захворювання, викликане дефектним геном, вражає в однаковій мірі осіб як чоловічої, так і жіночої статті. Однак бувають спадкові захворювання, які вражають тільки одну стать. Вони обумовлені розміщенням дефектних генів або у *X*, або у *Y*-хромосомі (ці гени абсолютно або повністю зчеплені зі статтю). Інша група генів шляхом кросинговера змінює свій локус і послідовно у поколіннях переходить із *X* - хромосоми у *Y*-хромосому або аутосому і зворотно. Такі гени називаються частково або неповно зчепленими зі статтю.

	Гомогаметна стать	Гетерогаметна стать
Людина	♀  	♂  
Птах	♂  	♀  

Рис.2 – Хромосомне визначення статі

Розглянемо приклад.

У сім'ї здорових батьків дитина у п'ятирічному віці захворіла на міопатію. Дядько пробанда по материнській лінії і син тітки по материнській лінії також хворі на міопатію.

Визначте тип успадкування і вкажіть носіїв патологічного гену.

Розв'язок. Складаємо родовід. У даному випадку носіями патологічного гену є жінки, починаючи з бабусі пробанда. Оскільки хворіють тільки особи чоловічої статі, то патологічний ген локалізується у статевій X – хромосомі.

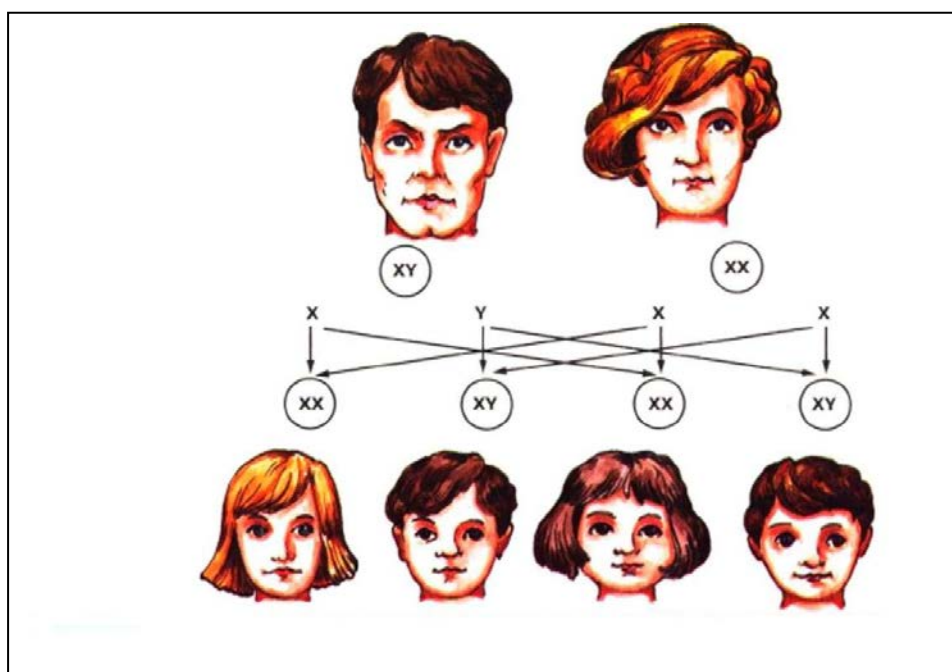


Рис.3 – Успадкування статевих хромосом.

Статеві X та Y-хромосоми неоднакові за розмірами. X – хромосома метацентрична, а Y-хромосома акроцентрична. Одне плече у них майже однакове, і деякі вчені вважають, що у них локалізовані однакові гени.

Друге плече нерівномірне. У X-хромосомі воно велике, а у Y-хромосомі маленьке. Гени, локалізовані у цих плечах X і Y-хромосом, називаються зчепленими зі статтю. Так розміщуються як домінантні, так і рецесивні гени. Деякі з них визначають хворобу. Так, у X-хромосомі розміщені 3 домінантних гена, які визначають хворобу, як вітаміно-Д-резистентний рахіт, гіпоплазія зубів і фолікулярний кератоз, і кілька рецесивних генів, які визначають дальтонізм, міопатію Дюшена, курячу сліпоту, гемофілію A і B, атрофію зорових нервів Лебера та інші. Вважають, що у короткому плечі Y-хромосомі локалізовані гени, які визначають синдикталію, фактор дикобраза, вушний гепертрихоз, мускульну силу, ріст, тембр голосу.

Захворювання, обумовлені домінантними генами, спостерігаються як у чоловіків, так і у жінок (у жінок у більш м'якій формі). Захворювання, обумовлені рецесивними генами, розміщеними у X-хромосомі, спостерігаються тільки у половини синів, а передають їх матері. Дочки можуть бути носіями цих рецесивних генів. Захворювання, обумовлені генами, розміщеними у короткому плечі Y-хромосомі, передаються всім синам і не передаються дочкам.

3.3. Успадкування, зчеплене з Y-хромосомою

Гени у Y-хромосомі проявляються тільки у чоловіків, передаються тільки синам, не дочкам (це називається голандричним успадкуванням). Але деякі ознаки, які зустрічаються тільки у чоловіків (наприклад: баритон, теноровий і басовий голос), залежать не від зчеплених з Y-хромосомою генів, а від аутосомних генів, які присутні як у чоловіків, так і у жінок, але по різному виражаються у осіб різної статті, в залежності від гормонального фону. Це аутосомні обмежені статтю ознаки. Вони залежать від генів, одержаних від обох батьків.

Як приклад зчеплення ознаки з Y-хромосомою приведемо нашумілу у свій час історію “Людина-дикобраза”. У 1716 році у зовнішньо здорових батьків народилась фенотипово нормальна дитина Едвард Ламберт. У віці 7-8 недінь шкіра Едварда почала жовтіти, почорніла, почала товщати. Все тіло, за виключенням долонь, підшов, голови і обличчя, як у дикобраза, вкрилося щетинистими, лускатими циліндричними щетиновидними виростками 2,5 см довжиною. Всі інші діти у цій сім’ї залишалися нормальними. У Едварда Ламберта у сім’ї народилося 6 синів, які всі мали таку ж шкіру дикобраза. У 6 наступних поколіннях ця ознака проявлялася у кожного з 12 синів, але ніколи її не було у дочок. Було народжено 7 нормальних дівчаток.

Якщо було б все так, як описано, то це - приклад успадкування, зчепленого з Y-хромосомою. Проте підчас докладного дослідження цього випадку ряд авторів відмітило, що і деякі дівчатка мали ненормальну шкіру.

Вважають, що ознака зчеплених пальців – сіндактілія – також зчеплена з Y-хромосомою, проте виявилось, що сіндактілія викликається домінантним аутосомним геном.

На даний час багато авторів вважають, що Y-хромосома у людини володіє сильним мускулінізуючим ефектом в ембріогенезі, тобто, сприяє розвитку сім’яників і визначає один з антигенів гістосумісності.

Таким чином, ряд генів Y-хромосомою все таки має вплив на розвиток деяких соматичних ознак людини.

3.4. Успадкування, зчеплене з X-хромосомою

Зупинимось на прикладах зчеплення ознак з X-хромосомою. Це перше за все деякі аномалії кольорового зору. Білий колір, як відомо, складається з червоного, синього і зеленого. У більшості людей нормальний трьохколірний зір вимагає змішування цих трьох елементарних кольорів у нормальному співвідношенні. Але деяким людям потрібна велика інтенсивність одного

кольору і менша двох інших. Це аномальний трьохкольоровий зір (трихромазія). Іншим потрібно лише два кольори, щоб бачити білий колір. Це – діхромати (діхромазія). Є і $\square$ ро банда $\square$ ог, і ахромати – вони бачать усе у білому або сірому кольорі, не розрізняють забарвлення предметів.

Т. Рібо певним чином пише про дальтонізм:

“Своєрідна спадковість дальтонізму в тому, що він передається через покоління і при тому майже виключно на нащадків чоловічої статі (від діда внукам), так що чоловік, який страждає на дальтонізмом, не передає його своїм синам чи дочкам, але вони, вступаючи у шлюб, народжують дітей чоловічої статі хворих на кольорову сліпоту. Через покоління ця історія знову повторюється по материній лінії. Таким чином, жіноча стать є у цьому випадку носієм прихованого спадкового дефекту. Дальтонізм – часті випадки уродженого $\square$ ро банда $\square$ о. Число випадків його у населення різних країн визначається у 3% і навіть 4% для чоловіків і тільки 0,2 – 0,3% для жінок”.

Аномальну трихромазію або дихромазію у народі називають дальтонізмом (за прізвищем вченого Дальтона, який страждав на це захворювання), або частковою кольоровою сліпотою. Гени дальтонізму знаходяться у Х-хромосомі. Це було виявлено ще у 1910 році. Виявилось, що нормальний кольоровий зір домінантний по відношенню до кольорової сліпоти.

Жінки можуть бути трьох типів у залежності від того, які гени, що визначають ген, містяться у їх Х-хромосомі.

1. Гомозиготні – нормальний зір – обидва гени нормальні.
2. Гомозиготні – кольорова сліпота – Х-хромосоми містять обидва дефектні гени.
3. Гетерозиготні – один ген нормальний, другий ген дефектний.

Чоловіки завжди містять один алель як нормального, так і аномального кольорового зору, тому ген дальтонізму у них легко виявляється. Якщо дальтонік одружується на нормальній жінці, всі діти народжуються нормальними. Якщо жінка, яка хворіє на кольорову сліпоту (dd), одружиться з нормальним чоловіком, то всі сини будуть страждати на кольорову сліпоту ($d\sigma$),

а всі дочки будуть мати нормальний зір (Dd). Зовнішньо нормальні дочки, які мають одного з батьків дальтоніка, передають цей $\square$ ро банда $\square$ о своїм синам, у яких гени дальтонізму виявляють свою дію.

У різних народів білої раси частота кольорової сліпоти складає 5-9%. Частота жінок, що страждають кольоровою сліпотою, рівна квадрату частоти чоловіків дальтоніків. Різні форми кольорової сліпоти обумовлені різними алелями, як думають. Двох генів.

Розглянемо кілька прикладів.

1. Жінка, яка страждає на кольорову сліпоту, одружилася з чоловіком з нормальним сприйняттям кольорів. Яким буде сприйняття кольору у синів і дочок цих батьків?

Розв'язок. Ген кольорової сліпоти рецесивний ген. У жінок кольорова сліпота може виявитися тільки у тому випадку, якщо вона гомозиготна за цим геном, тобто, і в одній X-хромосомі і в другій знаходяться ці гени.

Таким чином, всі сини будуть $\square$ ро банда $\square$ ог, а всі дочки будуть носіями гену дальтонізму.

2. Від шлюбу батьків з нормальним зором народилася дитина, яка страждає на кольорову сліпоту. Визначте генотип батьків.

У даному випадку можна скласти аналогічний родовід, але починати його треба від хворого сина. У цьому випадку мати буде гетерозиготним носієм гена кольорової сліпоти. Це приклад апостеріорної імовірності.

3. Жінка з нормальним зором, батько якої страждав на дальтонізм, одружилася з чоловіком з нормальним зором. Необхідно встановити імовірність народження дитини з кольоровою сліпотою.

Батько, який страждав на дальтонізм, мав XY-генотип. Тому всі його дочки могли бути тільки гетерозиготними носіями цього гена ($X'X$), а значить, у таких жінок половина їх синів може страждати на кольорову сліпоту, а половина дочок будуть носіями гена кольорової сліпоти у гетерозиготному стані.

Розглянемо інші ознаки, зчеплені з Х-хромосою. Крім генів, що визначають тип зору, у Х-хромосомі розміщуються гени, які детермінують наступні ознаки:

1. Здатність відчувати запах синильної кислоти (HCN) (18% чоловіків і 4-5% жінок не відчують запах цього гострого отрутного газу).
2. Кілька типів курячої сліпоти.
3. Відсутність вусів і зубів у чоловіків у деяких районах Індії і Америки.
4. Іхтіоз – у людини шорстка шкіра, ніби покрита рибною лускою.
5. Гіпогамаглобулінемія – зниження імунітету, висока сприйнятливість до багатьох інфекційних захворювань.
6. Рахіт, пов'язаний з нездатністю засвоювати вітамін D, так як у крові мало неорганічного фосфору. Це домінантне успадкування (рис.4).
7. Темні зуби: розвивається дефект емалі зубів. Звичайно захворювання викликається аутосомним домінантним геном. Але іноді домінантний ген знаходиться в Х-хромосомі.
8. Мускульна дистрофія типу Дюшена (рис.5).
9. Деякі види нецукрового діабету.
10. Альбінізм очей.
11. Недостатність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази еритроцитів. Це успадковане захворювання спостерігається майже у 10% американських негрів. Ці люди цілком нормальні, але під час контакту з пилком або речовиною кінських бобів, сульфаніламидами, нафталіном і деякими іншими у них в організмі настає руйнування великої кількості еритроцитів, настає анемія. Це захворювання називається фавізмом.



Рис.4 – Рахіт



Рис.5 – Мускульна дистрофія типу Дюшенена

Гемофілія – підвищена кровоточивість. Жінки *dd* зустрічаються дуже рідко, так як вони помирають від кровотеч при настанні статевої зрілості. Гемофілією страдають також чоловіки, але її передають їм жінки. Розглянемо кілька прикладів успадкування, зв'язаного з X-хромосомою.

1. Єдиний син здорових батьків страдає гемофілією. Хто із батьків передав ген гемофілії сину? Тут ситуація аналогічна кольорової сліпоті. Мати була гетерозиготним носієм X^Hx^h про банду x^h гена, який передала своєму сину.

2. Дочка дальтоніка одружується з сином другого дальтоніка, при чому наречений і наречена розрізняють кольори нормально. Який зір будуть мати їх діти? Батько-дальтонік обов'язково передасть ген кольорової сліпоті своїй дочці, так як дочка являється гетерозиготним носієм. Син дальтоніка мав нормальний ген кольорового зору, так як сини X-хромосому одержують від матері. У даному випадку виникає наступна ситуація. Дочка (наречена) – носійка гена кольорової сліпоті – одружується з чоловіком з нормальним зором. Значить, у їх потомстві можна чекати половину синів сліпими до кольорів і половину дочок – носіїв гена кольорової сліпоті.

3. Чоловіка з нормальним згортанням крові схвилювала звістка про те, що сестра його жінки родила хлопчика хворого гемофілією. Він схвилюваний здоров'ям своїх майбутніх дітей. В якій мірі могло б заспокоїти його повідомлення, що серед родичів його жінки по материнській лінії гемофілії ніколи не було.

У даному випадку можна допустити, що ген гемофілії мати хворої дитини могла одержати або від свого дідуса через матір, або від свого батька, якщо він був хворий гемофілією. В умові задачі сказано, що у родичів жінки по материнській лінії ніколи гемофілії не спостерігалось. У такому випадку можна допустити, що ген одержано від батька (але цей батько повинен сам хворіти гемофілією), а хворий батько передає ген гемофілії всім дочкам. Таким чином, у жінки вказаного чоловіка даний ген знаходиться у гетерозиготному стані, тобто, вона являється гетерозиготним носієм гена гемофілії.

За цих умов у даній сім'ї можна чекати хвору кожную другу дитину чоловічої статті. Але якщо дідусь хворої дитини сам гемофілією не хворів, то у такому випадку могла виникнути нова мутація. Поява однієї і тієї мутації у двох сестер одночасно або у всіх гаметах дідуса – явище мало ймовірне. У такому випадку чоловіку немає підстав побоюватися за здоров'я своїх майбутніх дітей.

Даний приклад показує, як тяжко зробити точний прогноз, коли немає повних даних про родовід пробанда у декількох поколіннях.

Необхідно відмітити, що якщо патологічний ген отримано у спадковість від батьків, то він називається сегрегантним, а хворий відповідно сегрегантом. Якщо патологічний ген виник спонтанно, внаслідок нової мутації у гаметах батьків, то він називається мутантним, а хворий відповідно – мутантом. Визначення появи сегрегантного або мутантного захворювання у потомстві має істотне значення для прогнозування потомства майбутніх сібсів хворого.

3.5. Летальні і сублетальні гени

Різні гени можуть дуже відрізнятися життєздатністю, якою вони забезпечують людину: від більш високої, чим у нормі, до сублетальної і летальної (летальні гени зменшують середню тривалість життя). Можливо існують гени довголіття, хоч невідомо, в чому полягає їх дія. Ці гени можуть мати різний вплив на життєздатність людини. Вони або підвищують

життєздатність всіх тканин і органів, або забезпечують високий імунітет до раку, атеросклерозу, діабету, туберкульозу і інших захворювань, або вони роблять оптимальними функції окремих органів – серця, деяких залоз внутрішньої секреції і т.д. Наявність таких генів добре пояснює спадкове довголіття. Однак необхідно відзначити, що багато алелей нейтральні у відношенні життєздатності.

Шкідливі гени можуть приводити до смерті на різних стадіях онтогенезу. Леталі – це алелі, які сприяють внутрішньоутробній смерті або смерті у дитячому віці. Сублеталі або полумлеталі приводять людину до смерті при досягненні періоду статевої зрілості. Леталі і сублеталі можуть бути домінантними і рецесивними. Носії домінантних сублеталей іноді доживають до статевої зрілості і залишають потомство. Тут чітко видно домінантне успадкування цих генів. Приклад прояву подібного гена – вроджена епілоїя - синдром, що включає ряд симптомів: мотилькове висипання обличчя, розумова відсталість, епілепсія, пухлини серця, нирок і інших органів.

Поява домінантних леталей і сублеталей часто являється результатом нової мутації. Однак, завжди необхідно виключати можливість гомозиготної рецесивності або внутрішньоутробного пошкодження плоду. Рецесивні леталі і сублеталі визначають велику кількість аномалій плоду, наприклад, розвиток вродженого іхтіозу з наявністю глибоких, що кровоточать, тріщин шкіри або вродженого паралічу (хвороба Вердінг-Гофмана), дитячу форму амавротичної ідіотії або хворобу Тей-Сакса (в мозку відкладається жирова речовина, що приводить до регенерації мозкової тканини , сліпоти і загибелі дитини). Гетерозиготні батьки цієї дитини здорові. Приблизно в 1 випадку на 500 родів зустрічається аненцефалія (відсутність мозку у плоду). Часто цей дефект являється причиною абортів і народження мертвої дитини. У гетерозиготному стані цей шкідливий ген проявляється у вигляді спіна біфіда (не заростає задня стінка неавральної пластинки, що приводить до неповного утворення нервової трубки).

Багато самовільних викиднів виникає від аномалії розвитку, які визначаються летальними генотипами. Летальні і сублетальні гени проявляють свою дію на певній стадії розвитку людини. Звичайно у дії гена існує мінливість і окремі особи можуть переносити критичний період і далі розвиватися нормально. Деякі типи леталей пов'язані зі статтю (абортівані плоди можуть бути, наприклад, лише чоловічої статі, при інших аномаліях переважають плоди жіночої статі). Багато випадків безпліддя пояснюється формуванням летальних генотипів у плода.

3.6. Проблема гетерозиготності носіння дефектних генів у людини

Дефектний ген, навіть знаходячись у гетерозиготному локусі спільно з нормальним алелем (тобто, у гетерозиготному стані), іноді проявляє дію, що пошкоджує і викликає патологічні зміни в організмі. Проблема гетерозиготного носія дефектних генів ускладнюється тим, що у більшості випадків їх важко виявити. Наведемо декілька прикладів.

Серед населення середземномор'я поширена особлива різновидність анемії, яка називається таласемією. Серед італійців зустрічається таласемія двох видів. Відзначається різка анемія, смертність у дитинстві. Це анемія Кулі, або таласемія майор. У цьому випадку діти являються гомозиготними за парою дефектних генів. Їх батьки були гетерозиготами і страждали помірною формою анемії – мікроцитемією або таласемією мінор.

Серед жінок – гетерозигот по типу дальтонізму – зустрічаються особи, що погано розрізняють кольори. Такі жінки страждають від неповного проявлення пошкодженого гена.

Пігментна ксеродермія – сублетальне захворювання, проявляється у гомозиготних носіїв дефектних генів. У гетерозигот по цьому типу дефектна алель викликає сильну веснушчатість. Ці приклади показують, що часто шкідливий ген у гетерозиготному стані, незважаючи на присутність

нормального алеля, все таки проявляє свою руйнуючу дію у вигляді тієї чи іншої ознаки або суми ознак, часто патологічних.

3.7. Кровне споріднення

Діти від шлюбу між родичами частіше являються гомозиготними по багатьом алелям, ніж діти від звичайних шлюбів. У деяких народів шлюб між родичами заохочувався і заохочується на даний час. Наприклад, древні єгиптяни і інки вважали, що “царська кров” повинна змішуватися лише з “царською кров’ю”, тому віддавали перевагу шлюбом між братами і сестрами.

У більшості людських співтовариствах звичаї і закони забороняють шлюби між близькими родичами. Однак, у деяких державах у даний час визнають деякі родинні шлюби, наприклад, шлюби між двоюрідними братами і сестрами.

Загальна частота шлюбів між родичами варіює від 1% до 10%. Шлюби між двоюрідними братами і сестрами - найбільш поширений вид шлюбів між родичами. Частота шлюбів між двоюрідними сібсами у різних країнах наступна:

1. Австрія – 0,53.
2. Португалія – 1,40.
3. Іспанія (сільське населення) – 4,67.
4. Японія (міське населення) – 5,03.
5. Японія (сільське населення) – 7,12.
6. Індія (каста паріїв) – 12,9.
7. Бразилія (сільські райони) – 19,55.
8. Острова Фіджі – 29,7.

Якщо група населення малочисельна і ізольована географічно, то частота шлюбів між родичами у ній велика. Родинні шлюби у малих ізолятах можуть бути складними і багаторазовими. Наприклад, родовід одного індійця показує, що його батьки були одночасно двоюрідними і троюрідними сібсами, дядьком і двоюрідною племінницею.

Розрахунки показують, що теоретичне число предків нині живучих людей за 1 000 років складає $2^{30} - 2^{40}$ людей, тобто, приблизно від мільярда до тисячі мільярдів. Однак, реальна чисельність всього людства 1 000 років складала лише деяку частину вище вказаного теоретичного числа предків, які мав би живучий нині індивід за умов, що серед них не було шлюбів між родичами. Така “втрата предків” відбувається тільки за рахунок шлюбів між родичами у попередніх поколіннях. Багато людей, які нині живуть на Землі, мають спільних далеких предків. За своєю генетичною спільністю - всі люди брати.

Інбридинг – близько споріднене схрещування. Райт і Бернштейн запропонували спосіб виміру ступеня інбридингу для окремих осіб і для популяції в цілому за допомогою коефіцієнту інбридингу F . Коефіцієнт інбридингу (F) – імовірність того, що який-небудь індивід гомозиготний за даним локусом, при чому обидва алеля пішли від одного і того ж алеля, який мав один із предків, F – вимірюється як міра імовірності від 0 до 1. Якщо F дорівнює 0 – це панмісія, F – одиниця – це повний інбридинг в результаті того, що всі у шлюбі були близькими родичами. Найпростіша формула $F = (1/2)^N$, де N – число предків на шляху від індивіду через одного з батьків до спільного предка. Є більш складні формули коефіцієнту інбридингу. Спостерігаючи потомство від шлюбів між родичами, люди відмітили велику кількість захворювань у дітей, що народилися у таких сім'ях.

В.Скот (1973) проводив деякі характеристики, які показали, що серед ескімосів і індіців є групи, для яких застосовано поняття “малі ізольовані популяції”. Серед ескімосів і тільки на Алясці зустрічається артригрипозний синдром. 17 випадків цього синдрому виявлені у 7 родинах. Він обумовлений аутосомним рецесивним геном, частота якого біля 4%. Другим спадковим захворюванням, виявленим у 51 людини з 29 ескімоських сімей, являється повна відсутність у сировотці холінестерази. У 29 чоловік із 14 ескімоських і індіських родин виявлена спадкова метгемоглобінемія. Частота цього гена складає у середньому 4%, а серед групи індіців - 7%. У 12 ескімоських

родинах виявлено 15 випадків андреногенітального синдрому. Частота цього гена складає також 4%.

Роз'єднання людей по національним, соціальним або релігійним причинам приводить до утворення невеликих ендемічних груп навіть у великих містах. Євреї у діаспорі, які на протязі багатьох віків держалися обособлено, у деяких країнах за своєю генетичною структурою відрізняються від своїх земляків, які проживають серед представників інших національностей.

При алькаптонурії відзначається 30-42 % шлюбів між родичами, при фенілкетонурії – 5-15 %, атаксії Фрідрайха – 10%, амавротичній ідіотії – 15%. 20 % альбіносів являються нащадками від шлюбів між близькими родичами.

Згідно деяких даних у США 22,5 % дітей від шлюбу між двоюрідними сібсами померли у ранньому віці проти 16 % серед дітей між батьками – не родичами, у Франції ці числа рівні 9,3 % і 3,9 % відповідно, у Японії – 4,6 % і 1,5 %. Процент родин з аномальними ознаками у 3 рази вищий серед нащадків від шлюбів між близькими родичами, ніж між не родичами.

Гомозиготність за рецесивним геном, яка виникає у результаті шлюбів між родичами, підсилює схильність до інфекційних і інших захворювань. Кривна спорідненість між батьками підвищує смертність у середньому на 5 %. Шкода інбридингу ще і в тому, що він сприяє проявові летальних генів.

Розрахунки показують, що у кожної людини є від 2 до 5 патологічних летальних генів, які викликають у гомозиготному стані смерть. Крім того, є 4-5 нелетальних шкідливих генів, які обумовлюють анатомічні і інші аномалії. Таким чином, генетичний вантаж у людини перевищує 10 шкідливих генів. Однак, крім виявлення рецесивних шкідливих генів і появи небажаних фенотипів, інбридинг іноді сприяє появі не тільки нормальних, але і організмів, що виділяються за своїми якостями. Існують рецесивні алелі, які у гомозиготному стані сприяють розвитку видатних здібностей.

Генетичні консультації з приводу шлюбів між родичами особливо необхідні, так як ризик мати хворих дітей більший у шлюбах між родичами ніж

між не родичами. Однак, тяжко визначити цей ризик, так як більшість шкідливих рецесивних алелей переходять непоміченими через багато поколінь.

Чи успадковуються розумові і психічні особливості людини? “Спадковість таланту є безсумнівний факт”, - стверджує Ф.Гальтон”¹.

“Батьки мають схильність передавати своїм дітям всі свої душевні особливості, загальні і індивідуальні, успадковані і новопридбані”, - вторить йому Т.Рибо².

Питання ролі спадковості і середовища у визначенні розумової здатності людини і у формуванні особистості – основне у сучасній дискусії, яка проходить у багатьох країнах, у тому числі і у нас. Однак відповісти однозначно на це важливе питання у даний час неможливо – надто складна і невивчена ще дана проблема.

Французькі антропологи простежили долю ста родин на протязі декількох століть і встановили, що деякі родини за тривалий термін дають потомство без яких-небудь проявів талановитості і обдарованості, тоді як інші родини відомі своїми талановитими представниками. Вони проявляються час від часу з неоднаковою частотою то у вигляді чоловічих, то у вигляді жіночих особин. У видатних людей в роду часто буває багато обдарованих особистостей. Наприклад, в роду Баха в п'яти поколіннях було 16 композиторів, 29 професіональних музикантів. У знаменитого Тиціані по висхідних лініях нараховувалося 8 родичів-художників.

Т.Рибо пише: “Сімейство Бахів представляє, можливо, найпрекрасніший приклад психічної спадковості. Воно починається у 1550 році і продовжується на протязі 8 поколінь, закінчилося воно Регіною Сюзаною, яка жила ще у 1800 році, але знаходилася у крайній бідності. Із цієї сім'ї на протязі близько двохсот років вийшло багато першорядних артистів. Родоначальник цієї сім'ї, Вейх Бах, був булочником у Петербурзі і відводив душу після своєї роботи музикою і співом. У нього було два сина; з них і розпочався безперервний ряд музикантів того ж імені, які наводнили Тюрінгію, Саксонію і Франконію впродовж більше

двох віків. Всі були і органістами, і парафіяльними півчими, і як у Німеччині називається, міськими музикантами”.

З іншої сторони, багато вчених або зовсім заперечують роль спадковості у формуванні психічних та інтелектуальних якостей людини, або зводять їх до мінімуму. І.М.Сеченов, наприклад, вважає, що людська психіка на 99 % являється продуктом середовища і лише на 1 % - спадковості.

Дослідження на близнятах показують, з однієї сторони, вплив на формування розумових здібностей спадковості, а з іншої – середовища.

Особливо яскраво генетичні фактори впливають на розумові здібності дітей, які розвиваються у сприятливих умовах середовища: у несприятливих вони можуть не проявитися.

“Групові розходження за коефіцієнтом розумових здібностей визначаються соціальним середовищем. Що стосується індивідуальних розходжень всередині тих чи інших соціально-економічних груп населення, то вони визначаються як середовищем, так і спадковістю”, – А.П.Пехов.

Визнання абсолютної спадковості інтелектуальних і психічних якостей людини суперечить фактам і приводить до абсурдних і небезпечних висновків. Деякі зарубіжні генетики висувують теорію генетичної стратифікації: вони стверджують, що гени, які визначають вищі розумові здібності, поширюються локально і приводять до утворення прошарку обдарованих людей, які внаслідок цього займають привілейоване положення у суспільстві. Наука ще не знає механізмів генетичної обумовленості розумових здібностей, щоб говорити про існування особливих генів таланту. Генетично детермінуються не самі розумові здібності, а фізико-анатомічні особливості мозку, які сприяють їх розвитку. У визначенні фізико-анатомічних особливостей мозку беруть не окремі гени, а весь генотип у цілому.

Відомий генетик, лауреат Нобелівської премії Д. Ледерберг підкреслює, що ще не відомі гени, які б забезпечували розвиток високих розумових здібностей дитини без створення сприятливих умов виховання і навчання. Саме розходженням в умовах виховання і навчання дітей, а не генетичною

стратифікацією, слід пояснювати розходження у частоті виявлення обдарованих дітей у різних соціальних групах.

Розглянемо ще одну реакційну концепцію, яка виправдовує соціальну нерівність за допомогою вчення про генетичну нерівність інтелектуальних можливостей людей.

У 60-х роках вийшла книга американського біолога і публіциста Роберта Ардрі “ Суспільний договір. Приватне розслідування еволюційних джерел порядку і безпорядку”. Вихідний постулат “філософії” Ардрі полягає в тому, що він об’являє джерелом всіх соціальних бід прагнення до рівності людей. Основна мета книги – оправдати і возвеличити нерівність людини за допомогою генетичних аргументів. За Ардрі, головна споконвічна помилка людини – це насильницьке придушення “біологічних наказів”. Людина зневажає закони біології і свідомо ігнорує “об’єктивний закон людської нерівності”. Згідно твердження Ардрі, релігія гуманізму – одна із головних причин бідності людства. “Цілком імовірно, - пише він, - що збереження слабого, хворого, неповноцінного потомства знижує генетичний фонд і веде до вимирання: це та доля, яку частіше всього передбачають людським племенам”. Слід відмітити, що запропоновані ним рецепти генетичного оздоровлення людського роду вже застосовувалося у великих масштабах фашистами і іншими расистами.

За Ардрі, генетично нерівні як індивідууми, так і групи людей. Він заявив, що “звіряча справедливость” – перший закон природи, який порушила людина, і це призвело до падіння народів, “генетически истощённых в силу несправедливости общественного порядка”.

Питання про передачу розумових і психічних здібностей у спадковість ще недостатньо вивчено, щоб на цій основі створити соціально-політичну концепцію.

В даний час тяжко заперечувати, що майже кожна риса організму людини залежить як від фактора середовища, так і від генетичних факторів.

Проблема заключається у тому, щоб знайти правильне співвідношення між ними. А це – справи майбутнього. В. Макьюсі пише: “Вероятно, в самом недалеком будущем удастся разработать методы регуляции фенотипа путем воздействия на контролируемые генами процессы, механизмы которых только теперь выясняются. Перспективны две области: регуляция размеров мозга и способностей, а также преодоление иммунологических барьеров при трансплантации органов (восстановительная хирургия)”¹.

Від покоління до покоління відбувається передача соціального досвіду. Т. Морган, Н.К. Кольцов і С.Н. Давиденков назвали це культурним успадкуванням, а Н.П. Дубінін говорить про соціальне успадкування. Цей досвід попередніх поколінь, придбаний дякуючи взаємодії людей між собою і з зовнішнім середовищем. Більшість вчених вважають, що такі якості, як творчі здібності, розумовий розвиток і уява, разом з силою волі і наполегливістю, являються цінними. Але вони повинні сполучатися з чесністю, добротою, терпимістю і співчуттям один до одного. Ці властивості скоріше являються не спадковими, а наслідком навчання і виховання, тобто, це приклад культурного, соціального успадкування. Носієм біологічної спадковості являється генотип людини, а носієм соціальної спадковості сама людина. Індивідуальний розвиток людини здійснюється за генетичною і соціальною програмою. Генетична програма служить лише базою для розвитку людських якостей. Сприйняття соціальної програми залежить від суспільно-економічного положення індивідуума у суспільстві. Н.П. Дубінін вважає, що генетична програма людини володіє великим потенціалом і стійкістю. Вона збережеться і зараз, і на майбутнє і немає потреби її міняти. Кожне втручання може бути шкідливим, тому що ще невідомі тонкі механізми взаємодії генетичної і соціальної програм.

Питання для самоконтролю

1. Розкажіть про різницю між рецесивними і домінантними генами.
2. Які ознаки у людини є домінантними?
3. Розкажіть про множинні алелі.
4. Чим характеризується серповидно-клітинна анемія?
5. Охарактеризуйте пігментну ксеродермію.
6. Які захворювання успадковуються зчеплено зі статтю.
7. Розкажіть про проблему гетерозиготності у носіїв дефектних генів.

Літератури

1. Гальтон Ф. Наследственность таланта. Ее законы и последствия. СПб., 1875.
2. Рибо Т. Наследственность душевных свойств. СПб., 1884.
3. Мюнтцинг А. Генетика. М., «Мир», 1967.
4. Гершкович И. Генетика. М., «Наука», 1968.
5. Лобашев М.Е. Генетика. Изд-во ЛГУ, 1967.
6. Дубинин Н.П. Общая генетика. М., «Наука», 1976.
7. Штерн К. Основы генетики человека. М., «Медицина», 1955.
8. Пехов А.П. Социальные проблемы генетики. М., «Знание», 1977.
9. Маккьюсик В. Генетика человека. М., «Мир», 1973.
10. Майр Э. Человек как биологический вид. - «Природа», 1974, №2, с. 38.
11. <http://images.km.ru/health/tema/blood480.jpg>

РОЗДІЛ IV

ГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ ВИЗНАЧЕННЯ СТАТІ

Питанням про те, коли і внаслідок яких причин у процесі розвитку зародка виникає тенденція до формування його чоловічого або жіночого стану, людина цікавилась ще з глибокої давнини. Про це свідчать праці Анаксагора, Гіппократа, Плінія та інших античних вчених. Так, у V-IV ст. до н. е. Гіппократ розвивав думку про те, що сім'я чоловіка з правого сім'яника обумовлює народження хлопчиків, а з лівого - дівчаток. У IV ст. н. е. римський лікар Аецій радив пов'язувати ліве чи праве стегно білою пов'язкою тим, хто бажає народити хлопчика, а барвистою – тим, хто бажає народити дівчинку.

Наприкінці XVIII ст. лейденський лікар Дрейлінгкоурт нарахував 262 гіпотези щодо механізмів визначення статі. Теоретичні судження, сформульовані на підставі спостережень дослідників XIX ст., дозволили зробити припущення, що стать визначається ще до запліднення яйцеклітини (**прогамно**) або в процесі запліднення яйцеклітини (**сингамно**) чи в період ембріонального розвитку (**метагамно**). Всі ці варіанти визначення статі зустрічаються в природі. Наприклад, тлі і коловертки продукують дрібні партеногенетичні яйця, з яких формуються самці, і великі, з яких формуються самки. Подібна диференціація яєць на дрібні і великі має місце також у деяких видів метеликів, павуків тощо. Тобто у названих видів організмів стать визначається прогамно.

Сингамне визначення статі дуже чітко проявляється у бджіл, ос, джмелів, деяких видів мурах. У цих комах з незапліднених яєць, як правило, розвиваються самці, а з запліднених - самки.

Явища інтерсексуальності і гермафродитизму в тварин, маскулізації жіночих та фемінізації чоловічих особин у дводомних рослин свідчать про існування метагамних механізмів визначення статі. З'ясувалось, що прогамний і сингамний механізми визначення статі є природними, а разом з цим метагамний обумовлюється впливом умов навколишнього середовища.

Наочним прикладом останнього може служити такий дослід. Коноплі сортів Південно-Чуйська та Італійська, які висіяли в теплиці наприкінці листопада без додаткового освітлення, наприкінці січня давали врожай нормального життєздатного насіння. На низьких (до 60 см) жіночих рослинах утворювалось по 10-20 життєздатних насінин. Після збору врожаю насіння ці жіночі рослини залишали для подальшого росту й розвитку. Наприкінці літа вони досягли 3 м у висоту, а на початку вересня на цих рослинах утворювались пишні чоловічі квітки з багатим виділенням життєздатного пилку.

У 1870 р. в листі німецького ботаніка до К.Негелі Г.Мендель висловив думку про те, що **стать успадковується за типом аналізуючого схрещування**. Якщо позначити спадковий фактор чоловічої статі символом М, а жіночої - символом F і припустити, що першій домінує над другим, то статеві формули чоловічих і жіночих особин матимуть такий вигляд: знак ♂(спис Марса) = М(F), знак ♀(дзеркало Венери) = FF. З формул видно, що чоловіча стать є гетерогаметною, бо здатна утворити два типи М- та F-гамет, а жіноча - гомогаметна, бо може утворити лише один тип F-гамет. Мендель допускав також можливість домінування жіночої тенденції над чоловічою.

В обох випадках теоретично очікується в кожному новому поколінні народження половини нащадків жіночої і половини - чоловічої статі. При цьому статеві формули нащадків будь-якої статі не відрізняються від статевих формул батьків відповідної статі. Ці погляди Менделя свідчать, що у живій природі і жіноча і чоловіча стать може бути гетерогаметною. При цьому в усіх випадках теоретично очікується, що половина нащадків буде жіночої, а половина - чоловічої статі.

Статеві хромосоми

У 1891 р., вивчаючи сперматогенез у трав'яних клопів *Pirchocoris apterus* з родини *Protenor*, Х.Генкінг виявила хромосому, яка в мейотичних клітинах не мала своєї гомологічної пари. На відміну від звичайних 12 хромосом, які на підстаді зиготени утворювали шість бівалентів, ця одинока хромосома не

вступала в кон'югацію, залишаючись у вигляді унівалента. В процесі редукційного поділу вона відходила до одного з полюсів мейотичної клітини. Тому з чотирьох сперматид, які утворювались внаслідок двох мейотичних поділів, у двох було по шість, а в інших двох - по сім хромосом.

У 1894 р. К.МакКлунг повторив ці досліді і, не знайшовши пояснення виявленим фактам, позначив цю одиноку хромосому символом X. У 1905 р. Е.Вільсон встановив, що в клітинах самок трав'яного клопа, на відміну від самців, X-хромосома має свою гомологічну пару, тобто вона представлена двома гомологами, котрі нормально кон'югують між собою в мейозі. Ці факти дозволили Вільсону зробити висновок про те, що X-хромосома є статевією хромосомою. Виходячи із зробленого узагальнення, Вільсон написав такі статеві формули трав'яного клопа за складом його хромосом:

$$\text{♂} = \frac{6A + X}{6A + X}; \quad \text{♀} = \frac{6A + X}{6A + X}.$$

З наведених формул видно, що після завершення редукційного поділу всі гамети в самок можуть бути представлені лише X-яйцеклітинами, а в самців - X- та O-сперматозоїдами. Злиття X-яйцеклітин з X-сперматозоїдами при заплідненні утворює XX-зиготи на розвиток жіночої статі, а з O-сперматозоїдами — на розвиток чоловічої статі.

Зауважимо, що в наведених формулах символом A позначають нестатеві хромосоми, які називають **аутосомами**. Як видно з формул, що у складі каріотипу самок трав'яного клопа міститься шість пар аутосом і одна пара статевих X-хромосом, а в самців - шість пар аутосом і лише одна статевіа X-хромосома. Оскільки в каріотипах самців і самок кількість аутосом завжди однакова, в статевих формулах їх не пишуть.

Дослідження на інших об'єктах показали, що в диплоїдних наборах самців X-хромосома має хромосому-партнера, котра за морфологічною конфігурацією може значно відрізнитись від X-хромосоми, але в мейозі вступає з нею в кон'югацію і утворює біваленти. Цю хромосому назвали Y-

хромосомою. В клопів *Lygaeus*, у ссавців (у тому числі і в людини), а також в роздільностатевих безквіткових рослин У-хромосома значно менша, ніж Х-хромосома. В прямокрилих комах, у хмелю та в інших видів, навпаки, У-хромосома більша, ніж Х-хромосома.

Детальне вивчення функціональної активності статевих хромосом показало, що Х-хромосома, як і аутосоми, має високу генетичну активність. У Х-хромосомах локалізується багато сотень і навіть тисяч різних генів, які не впливають на статеву диференціацію. Разом з тим У-хромосома генетично слабоактивна. В ній локалізовано (залежно від видів організмів) від одного до декількох десятків генів. Тому, незважаючи на кон'югацію Х-хромосом з У-хромосомами, переважна більшість локалізованих в Х-хромосомах генів не має в У-хромосомах своїх алельних пар. Кожний з цих генів перебуває в гомозиготному стані, тобто кожний з них входить до складу генотипу зиготи лише в одному екземплярі. Беручи до уваги існування У-хромосоми в складі каріотипів особин чоловічої статі, напишемо, наприклад, для клопів *Lygaeus* такі статеві формули каріотипів:

$$\text{♀} = XX; \quad \text{♂} = XX \text{ (або } XY\text{)}.$$

Вище зазначалось, що у статеві формули каріотипів кількість аутосом не вписують, оскільки в клітинах чи гаметах чоловічої і жіночої статі вона однакова. Звідси ці формули набувають вигляду:

$$\text{♂} = \frac{6A + X}{6A + X}; \quad \text{♀} = \frac{6A + X}{6A + X}.$$

Підсумовуючи викладене, можна зробити висновок, що в клопів, прямокрилих комах і ссавців чоловіча стать є гетерогаметною, а жіноча - гомогаметною (рис.5.1).

P ♀ ZW x ♂ ZZ

Г Z W Z

F₁ 0,5 ♀ ZW: 0,5 ♂ ZZ

Рис. 5.1. - Схема хромосомного механізму визначення статі при жіночій гетерогаметності.

Аналогічна закономірність виявляється і у рослин, які характеризуються статевою диференціацією. Наприклад, К.Корренс (1907 р.) здійснив пряме та реципрокне (зворотнє) схрещування між рослинами видів *Bryonia dioica* (двостатева форма) та *B.alba* (гермафродитна форма). Від запилення квіток *B.dioica* пилком з рослин *B.alba* було отримано 587 нащадків, з яких 585 були жіночої статі і лише два - чоловічої. Однак коли квітки *B.alba* запилювали пилком, взятим з *B.dioica*, половина нащадків виявилась чоловічої, а половина - жіночої статі.

Результати досліджень Корренса показали, що яйцеклітини рослин *B.dioica* прогамно проявляють жіночу тенденцію, а двостатева форма (рослини чоловічої та жіночої статі) домінує над гермафродитною. Крім того, рівновелика кількість жіночих та чоловічих особин у нащадків, одержаних від схрещування *B.alba* x *B.dioica* свідчить про те, що чоловічі гамети *B.dioica* генетично неоднорідні: одна половина їх несе прогамно чоловічу, а друга - прогамно жіночу тенденцію. На підставі цих даних Корренс зробив висновок, що в рослин виду *B.dioica* чоловіча стать є гетерогаметною, а жіноча - гомогаметною. Подальші дослідження багатьох учених, проведені на різних об'єктах показали, що ознаку статі успадковують чимало інших дводомних видів рослин, зокрема, це спостерігається в конопель, хмелю, шпинату, горицвіту лучного тощо.

Було встановлено, що на відміну від описаних об'єктів з'ясувалось, що в усіх видів комах, котрі в циклі розвитку мають стадію метелика, майже в усіх видів земноводних, плазунів і птахів гетерогаметною є жіноча стать, а

гомогаметною - чоловіча. В рослин гетерогаметною жіночою статтю характеризуються дводомні види полуниць роду *Fragaria*.

Явище гетерогаметності жіночої статі було виявлене у *Abraxas glossulariata*. З'ясувалось, що в каріотипі самця цієї комахи наявні 26 пар аутосом і одна пара морфологічно однакових статевих хромосом. Каріотип самки п'ядуна також має 26 пар аутосом і пару гетероморфних статевих хромосом.

Оскільки, як вже відзначалось, гетерогаметність жіночої статі спостерігається в комах, плазунів, птахів тощо, умовились статеві хромосоми у видів, які мають гетерогаметну жіночу стать, позначати символами Z і W замість X та Y відповідно. Виходячи з цього, статеву формулу для п'ядуна можна записати таким чином:

$$\text{♀} = \frac{26A + Z}{26A + WO} ; \quad \text{♂} = \frac{26A + Z}{26A + Z} .$$

Порівняння результатів досліджень, проведених на початку XX ст. Е.Вільсоном, К.Корренсом, Т.Морганом, К.Алленом та інш. вченими, які вивчали механізми визначення статі, з теоретичними викладками Г.Менделя, засвідчує повний збіг у експериментально виявлених і теоретично передбачених закономірностях, які обумовлюють статеву диференціацію організмів.

Хромосомні типи визначення статі

Відповідно до співвідношень статевих хромосом розрізняють чотири типи хромосомних механізмів визначення статі: XY-, XO-, ZW- і ZO-типи.

XY-тип характеризується гетерогаметністю чоловічих особин за X- та Y-хромосомами і гомогаметністю жіночих за X-хромосомами. Статеві формули мають такий вигляд: ♀ = XX, ♂ = XY. Такий хромосомний тип виявлений у клопів *Lygaeus*, переважної більшості видів комах, в розвитку яких немає стадії метелика, всіх видів ссавців, дводомних видів рослин за винятком видів роду *Fragaria*.

ХО-тип об'єднує види, в яких чоловічі особини гетерогаметні за Х- і 0-хромосомами, а жіночі - гомогаметні. Статеві формули за їхніми каріотипами мають такий вигляд: ♀ = XX, ♂ = XO. До цього типу відносяться трав'яні клопи *Protenor*, цвіркуни, рослини видів роду *Dioscorea* тощо.

ZW-тип. За статевими хромосомами тут гетерогаметними є жіночі особини, а гомогаметними - чоловічі. Виходячи з цього, статеві формули за комбінаціями жіночих та чоловічих статевих хромосом мають вигляд: ♀ = ZW, ♂ = ZZ. До цього типу визначення статі відносяться деякі види риб, переважна більшість видів комах, у циклі розвитку яких є стадія метелика, всі птахи, багато видів амфібій та рептилій, а також види рослин роду *Fragaria*.

ZO-тип характеризується гетерогаметністю жіночої статі та гомогаметністю чоловічої. У даному випадку статеві формули за статевими хромосомами мають такий вигляд: ♀ = ZO, ♂ = ZZ. До цього типу належать метелики молі *Fumea* та ящірки виду *Lacerta viripara*, яка зустрічається лише на острові Сахалін.

Успадкування ознак, зчеплених зі статтю

В статевих хромосомах, як і в аутосомах, локалізуються гени. Більшість з них бере участь у процесах формування первинних- або вторинних статевих ознак організму. Ці гени обумовлюють формування ознак, котрі є спільними для осіб жіночої і чоловічої статі. Особливість цього успадкування проявляється у тому, що Y- або W-хромосоми характеризуються надто низькою генетичною активністю, тоді як гени, локалізовані в X- або Z-хромосомах, функціонують нормально. Тому, особини з XX- чи ZZ-каріотипами можуть бути гомозиготними або гетерозиготними за генами, локалізованими у статевих хромосомах, тоді як у особин XY-, XO-, ZW- чи ZO-каріотипів з генетично неактивною Y- або W-хромосомою або без неї, кожний локалізований в X- чи в Z-хромосомі ген знаходиться в одному екземплярі (без своєї алельної пари), тобто в **гемізіготному стані**. Тому такі гени, незалежно від того домінантні

вони чи рецесивні, у складі генотипу завжди дають фенотиповий прояв, оскільки кожний з них – повторимо ще раз - перебуває в гемізиготному стані.

На закономірності успадкування ознак, гени яких локалізовані в статевих хромосомах, впливають особливості спадкування саме цих хромосом. Розглянемо схему схрещування самок плодової мушки - дрозофіли (*Drosophila melanogaster*), фасетки очей в якої мають нормальне червоне забарвлення, з білоокими самцями. Ген забарвлення очей позначимо символом w (від white - білий) або w^+ . Це ген дикого типу, який обумовлює червоне забарвлення очей. Він домінує над геном w^- і складає з ним алельну пару в генотипі гетерозиготних за цим геном самок.

У каріотиповій схемі статеві хромосоми з мутантним геном білих очей позначимо через X^w , а з нормальним геном дикого типу - через X^+ . Під час запліднення батько віддає єдину X-хромосому лише своїм дочкам, а мати віддає по одній X-хромосомі нащадкам як жіночої, так і чоловічої статі. Цим фактом і пояснюється те, що рецесивний ген білого забарвлення очей переходить від батька через каріотиби дочок до половини онуків жіночої і чоловічої статі. Проте в генотипі жіночої статі цей ген комбінується зі своїм домінантним алелем і тому фенотипово не проявляється, тимчасом як у генотипі чоловічої статі він виявляється в гемізиготному стані і тому фенотипово проявляється. При цьому фенотипово рецесивна ознака проявляється лише у чверті нащадків F_2 , тобто у співвідношенні 3:1. Але особливістю цих співвідношень є те, що рецесивна ознака проявляється лише в особин чоловічої статі.

Перехресне успадкування статевих хромосом при гетерогаметності як чоловічої, так і жіночої статі дістало назву **крис-крос успадкування**. Закономірності крис-крос успадкування проявляються не тільки в комах, а і в амфібій, рептилій, птахів, ссавців, у дводомних видів рослин. У разі гетерогаметності чоловічої статі передаються від батька лише до дочки, а в разі гетерогаметності жіночої статі - від матері до сина. При цьому у разі гетерогаметності чоловічої статі батько передає майбутньому синові єдину Y-

хромосому. Аналогічна ситуація складається і в разі гетерогаметності жіночої статі: тут мати передає свою єдину W-хромосому лише дочці.

У генотипі людини міститься понад 50 000 пар алельних генів. Це означає, що у гаплоїдному наборі хромосом кожний з цих генів представлений в одному екземплярі. Якщо зазначені гени містяться в 23 хромосомах гаплоїдного набору, це означає, що в середньому в кожній з цих хромосом має міститись понад 2 000 генів. Але на сьогодні в X-хромосомі людини, поки що, виявлено місце локалізації лише близько 200 генів. Зауважимо, що будь-який ген може бути виявлений за умови, що він мутує, а утворена мутація фенотипово проявляється новим якісним станом відповідної ознаки або летальним ефектом.

Якщо мутантний ген локалізується в статевій X-хромосомі, то у складі генотипу чоловічого ХУ-каріотипу він знаходиться в гемізіготному стані і тому має фенотиповий прояв, тоді як у складі жіночого ХХ-каріотипу рецесивний мутантний ген може не проявлятися за наявності нормального алеломорфа. З іншого боку, слід пам'ятати, що кожна мутація виникає ненаправлено, під впливом випадкової дії факторів зовнішнього та внутрішнього середовища. Тому мутантна зміна функції гена болісно сприймається організмом. Як тільки мутантний ген опиняється в гомозиготному або в гемізіготному стані і проявляється фенотипово, він обумовлює або загибель організму або його хворобливий стан.

Наприклад, у людини ген зсідання крові мутує в новий стан, при якому в гомозиготних чи гемізіготних за цією мутацією особин у разі поранення кров не зсідається. Ця мутація, і, відповідно, й хвороба дістали назву гемофілії. Якщо хворий на гемофілію чоловік вступає в шлюб зі здоровою жінкою, то свою єдину X-хромосому, в якій локалізується ген зсідання крові, він передає лише дочкам. Його ж сини одержують по одній X-хромосомі від здорової матері, а від батька по Y-хромосомі, до складу якої ген гемофілії не входить.

У наступному поколінні гетерозиготні за геном зсідання крові дочки віддають по одній X-хромосомі з мутацією гемофілії одній половині своїх

синів, а з немутантним, нормальним геном зсідання крові - другій половині. Відповідно до такого розподілу сини, які отримали від матері Х-хромосому з мутантним геном зсідання крові, виявляються гемофіліками, а сини, які отримали немутантну за геном зсідання крові Х-хромосому, виявляються повністю здоровими за ознакою гемофілії.

Гемофілія А або «класична гемофілія» найбільш поширене з важких порушень згортання крові, яке і протягом століть вважалося сімейним захворюванням. У світі частота захворювання коливається від 1×5000 до $1 \times 10\,000$. У Талмуді сказано, що хлопчиків, у яких брат або двоюрідні брати померли від втрати крові під час обрізання, звільняються від процедури (це можна вважати першим записаним прикладом генетичного консультування). Королева Англії Вікторія, яка мала ген гемофілії, передала його одному з своїх синів і двом донькам. Вони в свою чергу, передали цей ген багатьом членам королівських родин Німеччини, Іспанії та Росії.

Один з чоловіків, який мав цю хворобу був царевич Олексій, син останнього російського царя Миколи II та Олександри. Григорій Распутін, так званий "божевільний чернець", мав незвичайні здібності. Він, щоб зупинити кровотечі царевича, ймовірно, за багатьма історичними джерелами, використовував гіпноз. «Лікуючи» царевича він став впливовою людиною при царському дворі, і деякі історики вважають, що його дестабілізуючий вплив привів до революції 1917 р.

Викликають гемофілію А недостатня кількість або «розлади» фактору VIII, який є ключовим компонент згортання крові. Структура фібрину порушується в результаті тривалих і часто сильних кровотеч з ран і крововиливів в суглоби і м'язи. З'являється синець. Крововиливи у суглоби часто подібні і поширені в суглобах, таких як гомілка, коліно, стегно і лікоть. Вони болючі, і якщо часто повторюються, то це можуть призвести до руйнування синовіальної оболонки і зниження функції суглобів. Внутрішньочерепна кровотеча також досить поширена, і, до появи ефективних засобів її лікування, була основною причиною смерті серед хворих на

гемофілію. Слід підкреслити, що активність тромбоцитів у хворих на гемофілію нормальна, так що незначні порізи і подряпини, як правило, не призводять до надмірної кровотечі.

Гемофілія А має три форми прояву в залежності від кількості у хворих фактору VIII. Близько половини хворих на гемофілію А належать до першої - "важкої" - категорії (рівень фактору VIII у них становить менше 1% від норми). Ці люди мають часті кровотечі - по кілька разів на місяць. Помірна категорія хворих на гемофілію (рівень фактора VIII становить 1-5% від нормального), як правило, характеризується кровотечами тільки після незначних травм і, як правило, від одного до декількох разів на рік. «М'яка гемофілія», третя категорія, спостерігається у хворих, у яких 5% - 25% від нормального рівня VIII фактору. Як правило у них кровотечі відбуваються після операції або важкої травми.

До початку 1960-х, гемофілію А часто вважали фатальною і хворі доживали до 20 років. Лікувати це захворювання стало можливим після виділення з плазми донорів фактору VIII. Фактор VIII, як правило, вводять хворим при перших ознаках кровотеч. Профілактичне введення фактору VIII важким хворим на гемофілію є ефективним у запобіганні втрати функції суглобів. У 1970-х роках середній вік хворих на гемофілію збільшився до 68 років. Основним недоліком лікування гемофілії на той час та отримання фактору VIII був той факт, що, плазма донорів, яку одержували від сотень або тисяч різних людей, часто була забруднена вірусами, наприклад, такими як гепатит В і С, вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ). За оцінками експертів, половина американських хворих на гемофілію, які отримували VIII фактора в період з 1978 по 1985 роки були інфіковані ВІЛ-інфекцією.

На синдром набутого імунодефіциту (СНІД) припадає майже половина смертей серед американських хворих на гемофілію з 1979 по 1998 рр., і це призвело до зниження середнього віку в момент смерті до 49 років у 1980-х рр. З 1985 р. донорів почали перевіряти на ВІЛ і проводити термічну обробку донорської крові, з якої отримували фактор VIII, що призвело до майже

повного усунення загрози зараження ВІЛ та вірусу гепатиту В. Отже, смертність від СНІДу серед хворих на гемофілію помітно знизилася з 1995 року.

Ген фактору VIII був відкритий на дистальному довгому плечі Х-хромосоми і клонований. Довжина такого гену складає 186 т.п.н., з яких 26 екзонів. 9 т.п.н. мРНК кодують зрілий білок, який складається з 2332 амінокислоти. Клонування і секвенування гена привело до ряду висновків. Пацієнти з нонсенс-мутаціями в цьому гені, як правило, страждають на важку форму гемофілії, а з місенс-мутаціями, зазвичай, мають порівняно легку форму захворювання.

Припускають, що нонсенс-мутації «продукують» «усічений» білок, у той час як місенс-мутації є причиною заміни однієї амінокислоти без домінуючого негативного ефекту. Багато точкових мутацій відбуваються в послідовності ЦГ, які є гарячими точками для мутацій. Близько 45% важких випадків гемофілії А викликані хромосомними інверсіями, які порушують ген фактору VIII. Додаткові 5% хворих мають делеції, які зазвичай призводять до порівняно важкої форми захворювання. Клонування гена фактора VIII дозволило розпочати виробництво людського фактора VIII з використанням рекомбінантної ДНК.

Численні клінічні випробування показали, що рекомбінантний фактор VIII працює ефективно у хворих з будь-якою формою гемофілії А, і це започаткувало комерційне використання у 1994 році цього фактору. Рекомбінантний фактора VIII має перевагу по відношенню до природного аналогу, який виділяли з плазми, оскільки він запобігає можливості вірусного зараження. Однак, як й інші форми фактору VIII, рекомбінантний фактор VIII генерує антифактор VIII антитіл приблизно у 10 - 15% пацієнтів. (Така відповідь найчастіше зустрічається у пацієнтів, у яких VIII фактор не виробляється.)

Крім гемофілії А існують й інші хвороби згортання крові, такі, як гемофілія В і хвороба фон Віллебранда. Гемофілія В, яку іноді називають «Різдвяною хворобою»¹, також пов'язана з Х-хромосомою. Це рецесивне

захворювання викликане дефіцитом фактора згортання крові IX, яке зустрічається рідше, ніж гемофілія А - лише з частотою близькою до однієї п'ятої. Ген фактору IX також був клонований. Його ДНК складається з 34 т.п.н., з яких 8 екзонів. Хворих можна лікувати за допомогою отриманих донорського фактору IX.

Хвороба фон Віллебранда є аутосомно-домінантним захворюванням, з високоваріабельною експресією. Воно зустрічається з частотою 1% у кавказців, у решти народностей - менше ніж у 1×10000 . Фактор, який викликає синдром фон Віллебранда, кодується геном 12-ї хромосоми і виступає як білок-носії для фактора VIII. Крім того, він зв'язується з тромбоцитами і пошкоджує ендотелій кровоносних судин, що сприяє адгезії тромбоцитів з ушкодженої стінки судини.

Отже, ознака гемофілії в людини успадковується за крис-крос схемою. За цією схемою успадковуються й інші рецесивні мутації, гени яких локалізовані в Х-хромосомі. Наприклад, мутація, що обумовлює псевдогіпертрофічну м'язову дистрофію Дюшена, яка проявляється псевдогіпертрофією м'язів ніг у хлопчиків, зниженням їхнього інтелекту та рухливості. Є мутації локалізованих в Х-хромосомі генів, які обумовлюють формування в процесі розвитку та росту організму ожиріння і слабоумства (синдром Бер'ессона); розвиток сімейного пігментного невуса, який проявляється вогнищами гіперпигментації шкіри та аномаліями в розвитку нігтів, зубів, роговиці кришталика ока; ці ж гени спричиняють відсутність потових залоз, курячу сліпоту тощо.

Описано майже 200 генів, локалізованих в Х-хромосомах, мутації яких успадковуються за крис-крос схемою та обумовлюють аномалії розвитку відповідних ознак. Що стосується генів, локалізованих в У-хромосомі, то вони представлені двома групами.

Гени однієї з них локалізуються в ділянці У-хромосоми, яка гомологічна до відповідної ділянки Х-хромосоми; ці гени й обумовлені ними ознаки успадковуються за такою самою схемою як і аутосомні гени. Гени другої групи, локалізовані на ділянці, яка не має на Х-хромосомі відповідних гомологічних точок, успадковуються лише від батька до сина. Наприклад, у людини в У-

хромосомі виявлено 14 генів. З них дев'ять локалізовано на ділянці, яка гомологічна до такої ж ділянки на X-хромосомі, а п'ять - на ділянці, яка не має гомологічних точок на X-хромосомі. Це так звані **голандричні** гени, тобто гени, які в нормі передаються тільки від батька до сина.

Явище успадкування ознак, зчеплених зі статевими хромосомами, ефективно використовується в птахівництві, шовківництві тощо. Наприклад, у десятій хромосомі тутового шовкопряда є ген, котрий обумовлює темне забарвлення яєць, які відкладає самка. Мутація цього гена обумовлює формування білого забарвлення яєць, але темне забарвлення домінує над білим. Нагадаємо, що в тутового шовкопряда гетерогаметною є жіноча стать (ZW), а гомогаметною - чоловіча (ZZ). Користуючись методами експериментального мутагенезу, В.О.Струнников, за допомогою гамма-променів, перемістив невеличкий фрагмент десятої хромосоми з домінантним геном темного забарвлення яєць на W-хромосому метеликів тутового шовкопряда. Одержана транслокація в самок, у каріотипах яких вона утворилась, виявилась життєздатною, а локалізований в ній ген забарвлення яєць - функціонально активним. Наприкінці 50-років Струнников впровадив у виробництво метод вирощування шовковичних коконів тільки з лялечками чоловічої статі, бо вони дають вихід шовкового волокна на 25-30% більше, ніж кокони з лялечками жіночої статі.

Явище нерозходження статевих хромосом

Аналізуючи характер розщеплення нащадків при крис-крос успадкуванні від схрещування білооких самок з червоноокими самцями дрозофіли, К.Вріджес (1913), крім очікуваних у F_1 червонооких самок і білооких самців, виявив, хоча і в рідких випадках (частота виникнення даної події сягає лише сотих часток відсотка), з'являються білоокі самки і червоноокі самці).

Щоб пояснити такий аномальний факт, Вріджес припустив, що це відбувається внаслідок нерозходження бівалентів статевих хромосом, через що обидві X-хромосоми в процесі редукційного поділу відійшли в одну дочірню

клітину, а друга клітина не успадкувала жодної статеві хромосоми. Тому у самок дрозофіли, крім нормальних за статевими хромосомами Х-гамет утворились ХХ- та О-гамети. Нагадаємо, що під О-гаметою ми розуміємо статеву клітину, в складі каріотипу якої є повний набір аутосом, але відсутня статеві хромосома. Разом з цим в ХХ-гаметі на один набір аутосом міститься дві Х-хромосоми.

Запліднення Х-яйцеклітин Х- або У-сперматозоїдами утворює каріотипово нормальні ХХ-зиготи самок або ХУ-зиготи самців. Разом з цим запліднення ХХ-яйцеклітин Х- або У-сперматозоїдом обумовлює утворення низькожиттєздатних надсамок з ХХХ-каріотипом або ж, як виняток, фенотипово нормальних самок з ХХУ-каріотипом. У свою чергу, при заплідненні О-яйцеклітин Х- чи У-сперматозоїдами утворюються статеві стерильні, але життєздатні самці з ХО-каріотипом та ОУ-зиготи не життєздатні.

При схрещуванні Бріджесом білооких самок з X^wX^wU -каріотипом, крім очікуваних червонооких нащадків жіночої і білооких чоловічої статі, знову з'явилося понад 4% червонооких самців та білооких самок. На цій підставі К.Бріджес зробив висновок про правильність припущення відносно явища вторинного нерозходження статевих хромосом.

Факт нерозходження хромосом пояснюється виникненням у складі бівалентів у мейозі таких матеріальних сполучень між хромосомними нитками, які фізично зв'язують між собою гомологічні хромосоми в єдину структуру. Такі утворення можуть бути досить сталими і здатними до відтворення при розмноженні.

Нерозходження статевих хромосом, яке трапляється в мейотичних клітинах, іноді проявляється і в мітотичному поділі соматичних клітин. Наприклад, перший мітотичний поділ, яким започатковується дроблення зиготи, може характеризуватись нерозходженням якоїсь пари сестринських хромосом, які утворились унаслідок поділу кожної вихідної аутосоми, або статеві хромосоми, на дві дочірніх. В результаті цього утворюється два бластомери, один з яких за своїм каріотипом має нормальну статеву ХХ-

формулу, а другий - ХО-формулу. Отже, внаслідок першого поділу зиготи утворилось два бластомери, один з яких за складом статевих хромосом запрограмований на розвиток самки, а другий - на розвиток самця. Оскільки до схрещування були залучені нормальні самки дикого типу і білоокі самці з мініатюрними крилами, зигота мала статеву формулу $X^{++}X^{wm}$, де w-мутантний ген білих очей, а m-мутантний ген мініатюрних крил. У бластомері ХХ-каріотипу відтворився генотип зиготи, а в бластомері ХО-каріотипу - генотип вихідного батьківського організму.

Видно, що Х-хромосома залишилась нерухомою в екваторіальній зоні зиготи, після чого вона елімінується.

Подальший нормальний розвиток цих бластомерів буде супроводжуватись ростом та розвитком майбутнього організму мухи, одна половина якого буде характеризуватись первинними та вторинними ознаками чоловічої, а друга - жіночої статі.

Термін "гінандроморфізм" утворений від грецьких слів, означає жінкочоловічу форму. Явище гінандроморфізму, крім дрозофіл, виявлено у комах, у циклі розвитку яких є стадія метелика: бджіл, домашніх мух та в інших видів комах. У ссавців, наприклад, у разі втрати бластомером Х-хромосоми гінандроморфи не утворюються. Пояснюється це тим, що секрети ендокринної системи організму, зокрема секрети чоловічих статевих залоз ХО-каріотипу і жіночих статевих залоз ХХ-каріотипу, змішуючись у крові, усереднюють формування первинних та вторинних статевих ознак організму. Цим обумовлюється формування патологічного **гермафродитизму**.

Нерозходження хромосом у людини

У людей також має місце нерозходження хромосом. Це відбувається у мейозі, у процесі гаметогенезу. Внаслідок цього у людей можуть утворюватись гамети: Х-, ХХ- та О-каріотипів у жінок та Х- і У- каріотипів у чоловіків. Від запліднення зазначених яйцеклітин Х- та У- сперматозоїдами утворюються

каріотипово нормальні ХХ- та ХУ-зиготи й аномальні ХХХ-, ХХУ-, ХО- та УО-зиготи. Зрозуміло, що УО-зиготи нежиттєздатні - вони не розвиваються. Тим часом з ХХ- та ХУ-зигот утворюються нормальні особини жіночої та чоловічої статі. Але каріотипово аномальні зиготи, в яких виявився порушений баланс між статевими хромосомами і аутосомами, обумовлюють народження хворих нащадків (синдром Клайнфельтера). На відміну від дрозофіл, у людини зигота з ХО-каріотипом формуються у осіб жіночої статі. Такі жінки хворіють на синдром Шершевського-Тернера.

Нерозходження статевих хромосом у людини трапляється не тільки в мейозі, але і в мітозі на різних етапах розвитку зиготи. Виникають найрізноманітніші комбінації статевих хромосом у бластомерах ембріона. Створюються різні хромосомні комплекси в клітинах даного ембріона. Внаслідок цього формуються химерні, тобто неоднорідні за каріотиповим та генотиповим складом клітин, тканини.

Балансова гіпотеза визначення статі

Нерозходження статевих хромосом порушує співвідношення, які еволюційно склалися між числом гаплоїдних наборів аутосом та числом статевих хромосом. Фенотипово це проявляється в дрозофіл у вигляді перерозвитку або недорозвитку первинних та вторинних статевих ознак. Виникають інтерсексуальні (проміжні у статевому відношенні) нащадки, а також надсамці та над самки, тобто не тільки в статевих хромосомах, але і в аутосомах є гени, які визначають розвиток жіночої або чоловічої статі. Кількісні співвідношення між хромосомами, які несуть статеві гени, К.Бріджес (1939) назвав статевим індексом. Він установив, що в дрозофіли формування первинних і вторинних статевих ознак визначається величиною статевого індексу. Наприклад:

2 Х-хромосоми

_____ = 1 – нормальна самка;

2 набори аутосом

1 X-хромосома

_____ = 1/2 - нормальний самець;

2 набори аутосом

3 X-хромосоми

_____ = 3/2 - надсамка;

2 набори аутосом

2 X-хромосоми

_____ = 2/3 - інтерсексуальна особина;

3 набори аутосом

1 X-хромосома

_____ = 1/3 - надсамець;

3 набори аутосом

3 X-хромосоми

_____ = 3/4 - інтерсексуальна особина.

4 набори аутосом

Експериментально встановлені статеві індекси для плодових мух показують, що формування чоловічої чи жіночої статі у цих комах безумовно контролюється генами. Були зроблені висновки, що гени, які локалізуються в аутосомах, обумовлюють чоловічу стать, а гени, які локалізуються в статевих хромосомах - жіночу. Між генами чоловічої і жіночої тенденцій існує рівновага (баланс). Підсумовуючи результати своїх досліджень, Бріджес дійшов висновку про існування генного балансу між сукупностями генів чоловічої та жіночої

тенденцій. Згідно з цією гіпотезою, **організм відносно статевої диференціації є біпотенціальним. Він містить у складі свого генотипу гени як чоловічої, так і жіночої статі, і стать того чи іншого нащадка дрозофіли обумовлюється балансом між числом статевих хромосом та числом наборів аутосом.** Те, що стать детермінується генетично, підтвердилось також на статевих ознаках метеликів непарного шовкопряда *Lymantria dispar* у дослідях Р.Гольдшмідта у 1923 р. Він довів, що в непарного шовкопряда, гени чоловічої статі локалізуються в статевих Z-хромосомах, а жіночої - в аутосомах.

Е.Ейгвалд і К.Сілмсер у 1955 р. виявили в крові мишей з Х-каріотипом наявність Н-антигена, але проявлявся цей антиген лише в крові тварин з ХУ-каріотипом. У подальшому з'ясувалось, що в У-хромосомі немає гена, котрий видавав би команду на синтез Н-антигена. Такий ген, як було встановлено, локалізований в одній з аутосом, а У-хромосома лише видає генетичну інформацію на синтез генних продуктів, які дерепресують локалізований в аутосомі структурний ген, включаючи його в активне функціонування. Внаслідок цього відбувається синтез Н-антигена.

Балансова гіпотеза визначення статі цілком підтвердилася в дослідях на багатьох видах організмів. Вона дозволяє з'ясовувати бісексуальну природу, причини інтерсексуальності, гермафродитизму та гінандроморфізму в різних видів організмів, котрі використовуються як об'єкти відповідних досліджень.

Деякі особливості механізмів визначення статі

Розглядаючи механізми визначення статі у високо організованих організмів, ми дійшли висновку, що формування чоловічої чи жіночої статі обумовлене функцією двох протилежнодіючих груп статевих генів. Якщо гени однієї статі локалізуються в аутосомах, то гени протилежної статі - в статевих хромосомах. При цьому стать формується внаслідок домінування генів однієї статі над сумарною дією генів протилежної статі. Можливість порушення рівноваги в балансі статевих генів пояснюється тим, що під впливом умов

зовнішнього середовища може збільшуватись або зменшуватись сила домінування генів однієї статі відносно іншої, і саме цим фактором обумовлюється формування інтерсексів, надсамців, надсамок чи інших аномалій. Виникнення таких аномалій посилює дію природного добору в напрямку формування неоднакової генетичної активності, а також різних за формою статевих хромосом.

Внаслідок цього статеві хромосоми, на відміну від аутосом, як при спорідненому, так і при перехресному розмноженні, не можуть перейти в гомозиготний стан за обома статями. Одна з них (чоловіча або жіноча) в нормі завжди має залишатись гетерогаметною. Ця особливість статевих хромосом спричинила до еволюційне виникнення та становлення статі.

У нижчих рослин (наприклад, у грибів, водоростей), на відміну від вищих рослин чи тварин, відсутні будь-які первинні або вторинні статеві ознаки, а морфологічна диференціація гамет буває ледве помітна або й взагалі відсутня. Тому практично дуже важко зробити висновок, які з гамет слід віднести до чоловічої, а які до жіночої статі. У найпростіших одноклітинних інфузорій-туфельок проявляється до восьми морфологічно однакових, але генотипово різних статевих форм. І тут клітини однієї статевої форми можуть зливатися з клітинами, що належать до будь-якої іншої статевої форми.

Отже, однією з особливостей механізмів визначення статі у низькоорганізованих видів організмів є їх здатність утворювати замість двох очікуваних, по декілька статевих груп з неоднаковою статевою потенцією. При цьому простежується чітко виражена тенденція до заміни еволюційним шляхом полісексуальності на бісексуальність. Якщо в інфузорій та хламідомонад ця тенденція проявляється не дуже чітко, то в деяких базидіальних грибів генетичні механізми, які лежать в основі такої тенденції досить очевидні.

Статевий хроматин

У 1949 р. М.Л.Барр і Е.Г.Бертрам, вивчаючи морфологію нейронів у котів, виявили відмінність між цими клітинами в самців та самок. Було встановлено, що в нейронах самок на внутрішній поверхні ядерної оболонки локалізуються грудочки речовини, які активно забарвлюються ядерними барвниками, а в нейронах самців вони відсутні. Численні дослідження показали, що грудочки з'являються від конденсації, тобто від щільної компактизації хромосомної нитки в одній з двох Х-хромосом. Тому ці грудочки дістали назву статевого **хроматину**. Інша назва - тільця Барра (на честь їхнього першовідкривача).

Було встановлено, що статевий хроматин проявляється не тільки в нейронах, але і в інших типах клітин. Наприклад, у людини він присутній в клітинах слизистих оболонок тощо. Крім людини та кішок статевий хроматин притаманний і багатьом іншим видам ссавців, при чому він проявляється лише у нормальних особин жіночої статі.

Питання для самоконтролю

- 15.Розкажіть про механізми визначення статі.
- 16.Як під час розвитку формується стать у людини?
- 17.Яким чином формується захворювання «зчеплене зі статтю»?
- 18.Розкажіть про захворювання, зчеплені з У-хромосомою.
- 19.Що Вам відомо про захворювання, зчеплені з Х-хромосомою?
- 20.Чим відрізняються трисомії від нулісомій?
- 21.Що називають «статевим хроматином»?

ЛІТЕРАТУРА

14. Гершензон С.М. Основы современной генетики. – К.: Наукова думка, 1983. – 560 с.
15. Демидов С.В., Бердишев Г.Д., Топчій Н.М., Черненко К.Д. Генетика. - – К.: Фітосоціоцентр, 2007. – 412 с.
16. Демидов С.В., Топчій Н.М., Бердишев Г.Д., Климнюк Г.І., Гавриленко Т.І. Генетика постнатального онтогенезу. – Київ: Фітосоціоцентр, 2006. – 251 с.
17. Демидов С.В., Мінченко Ж.А., Гавриленко Е.І., Топчій Н.М. Імуногенетика – К.: ТОВ «Знання», 2010. – 518 с.
18. Демидов С.В., Безруков В.Ф., Козерецька І.А., Сиволоб А.В., Рушковський С.Р., Лазаренко Л.М., Топчій Н.М. Загальна та молекулярна генетика. Практикум. - Київ: Фітосоціоцентр, 2005. – 259.
19. Ридли М. Геном. - М.: Эксмо, 2008.
20. Сиволоб А.В., Рушковський С.Р., Кир'яченко С.С., Афанасьєва К.С., Безруков В.Ф., Козерецька І.А., Демидов С.В. Генетика: Підручник. – К.: Видавничо-поліграфічний центр “Київський університет”, 2008. – 304 с.
21. Сиволоб А.В. Молекулярна біологія: Підручник. – К.: Видавничо-поліграфічний центр “Київський університет”, 2008. – 384 с.
22. Тищенко О.М., Дубровна О.В., Топчій Н.М. Метилування ДНК в онтогенезі рослин. – К.: Логос, 2008. – 268 с.
23. Уиллет Э. Генетика без тайн. – М.: Эксмо, 2008. – 224 с.

5 ГЕНЕТИЧНІ ФАКТОРИ РОСТУ ЛЮДИНИ.

Існує багато класифікацій онтогенезу. Одна з них – класифікація за способом зміни активності генів, за якою весь онтогенез можна розділити на два періоди: морфологічний і постморфологічний. У морфологічний період відбувається становлення форми організму (тканин, органів, зовнішньої будови); в основному, він співпадає з періодом внутрішньоутробного розвитку. До народження закінчується формування органів більшості систем людини. Після народження продовжується формування імунологічної системи і деяких нейронів центральної нервової системи, яке закінчується у 3-4 роки. Морфологічний період характеризується різкими змінами активності генів, які полягають в їх включенні/виключенні та посиленні/послабленні, що, в свою чергу призводить до зміни або припинення синтезу різних білків.

У постморфологічний період закінчується формування організму, відбувається ріст, статеве дозрівання, старіння, настає смерть. Для цього періоду характерні, в основному, посилення або ослаблення генетичної активності. Спостерігається також масова репресія генів, яка призводить, наприклад, до посивіння волосся (припиняється синтез меланіну), появи зморшок та ін.. В той же час спостерігається включення обмеженої групи генів (наприклад, генів, які контролюють статеве дозрівання).

Другий приклад класифікації онтогенезу – класифікація, основана на характері морфофізіологічних особливостей організму, згідно якої онтогенез ділиться на пренатальний та постнатальний періоди. Постнатальний період включає ріст, статеве дозрівання, зрілість, старіння і смерть людини.

Розвиток організму – це проходження особою якісно різних стадій, від запліднення яйцеклітини до смерті. Ріст людини – це збільшення маси організму незалежно від того, за рахунок чого воно відбувається. Ця властивість людського організму є мало дослідженою. Її механізми зрозумілі

недостатньо. Відомо лише, що ріст людини визначається багатьма генетичними факторами, гормонами, умовами харчування і іншими причинами.

Умови, необхідні для росту і розвитку організму, часто не співпадають. Ріст має обернений зв'язок з диференціюванням клітин і тканин – чим швидше здійснюється диференціювання, тим повільніший ріст і навпаки. Різні тканини і органи мають різну інтенсивність росту (згідно праць М.С.Мильмана).

Відомі різні типи росту організмів. Наприклад, людині властивий обмежений ріст, на відміну від деяких організмів, які здатні до необмеженого або недетермінованого росту. Обмеженість росту виникла в еволюції як пристосування до оптимізації розміру тварин.

В основі росту лежать три процеси: поділ клітин, збільшення їх числа, збільшення об'єму клітин і міжклітинної речовини. У різних тканин ріст здійснюється різними механізмами. З точки зору мітотичної здатності всі тканини діляться на: 1) тканини з сталим числом клітин (наприклад, нервова тканина); 2) тканини з клітинами, які повільно обновлюються (тобто, деяке число одних клітин гине, а інші клітини діляться і стають на їх місце: наприклад, печінка, нирки, щитовидна залоза); 3) тканини з клітинами, які оновлюються (наприклад, кишковий епітелій – 70,4% оновлення, епідерміс – 3-5% оновлення).

Характерна особливість росту тварин і людини – ритмічність. У великих ссавців одна ритмічна хвиля займає приблизно 10 днів. Амплітуда цієї хвилі (тобто, різниця між максимумом росту і його мінімумом) дорівнює 40%. Ритмічність росту – прояв загальної ритмічності біологічних процесів. У похилому віці ріст людини зменшується на кілька сантиметрів.

Більшість функцій в організмі після народження здійснюється диференційованими клітинами, які не діляться. Генетичний апарат диференційованих клітин забезпечує синтез постійної, суворо обмеженої кількості білків. Він, як правило, не може забезпечити якісні зміни цього спектру, однак володіє здатністю у великих масштабах і високих темпах змінювати кількість цих білків і співвідношення між ними. У багатьох

диференційованих клітинах є запас стабільних іРНК для синтезу життєвоважливих білків, який може довгий час забезпечувати функціонування клітини після виключення її генетичного апарату. Це охороняє таку клітину від негайної загибелі у випадку будь-якого раптового порушення генної регуляторної системи. Існування стабільних іРНК – один із механізмів забезпечення надійності біологічних систем, вироблений у процесі еволюції життя. Також існують й інші способи забезпечення міцності структур і функцій організму, які лежать в основі його росту організму організму.

Різні діти ростуть і розвиваються з неоднаковою швидкістю – вони мають різний біологічний вік. У дітей однакового хронологічного віку (13-14 років) деякі вчені виділяють до 10 типів біологічного віку за швидкістю росту і статевим дозріванням. Крайні типи мають прискорений або сповільнений тип розвитку. Швидкість росту і розвиток дітей залежить від раси, клімату, висоти над рівнем моря.

У більшості людських популяцій дівчатка у 9-10 років випереджають за темпом росту хлопчиків. Однак у 14-15 років хлопчики беруть реванш: наздоганяють і переганяють у рості дівчаток. Крива росту хлопчиків і дівчаток має два перехреста. Однак діти високогірних районів повільніше розвиваються і ростуть, відповідно не маючи двох перехрестів кривих росту.

Зазвичай на статеве дозрівання клімат не впливає. Термін менархе (поява менструацій) співпадає у російських дівчат Москви, жительок Караганди і узбечок – 13 років, у японок, англійок – 13,2 роки. Однак екстремальні умови (високогір'я Паміру, Тибету) порушують термін появи менархе, час прорізування зубів і т.д. Термін прорізування постійних зубів у негрів на один рік раніше, ніж у людей з білою шкірою. У негрів у жаркому кліматі відношення поверхні тіла до ваги більше, чим у європейців. Вважають, що екстремальні умови змінюють інтенсивність функції щитовидної залози, яка визначає рівень основного обміну в організмі.

Коли ж припиняється ріст людини? Акселерація вплинула на час зупинки росту. Якщо 40 років тому назад ріст чоловіків припинявся у 25 років, а жінок –

у 20 років, то зараз він зупиняється у чоловіків у 18-20 років, у жінок – у 16-18 років. Середній ріст людей 170 см (чоловіків – 175, жінок – 165). Людей вищих 190 см, яких називають велетнями, у США – 5 на тисячу жителів, у Англії – 8, а в Італії – 1 на 10 000. Як правило, велетні народжуються у нормальних батьків і у дитинстві мало чим відрізняються від своїх однолітків. Гігантський ріст розпочинається у них у віці 9-10 років та продовжується до 20 років. Велетні бувають гармонійної статури або з ознаками акромегалії (непропорційне збільшення розмірів кінцівок); у таких людей долоня і ступні досягають великих розмірів. Велетні звичайно менш рухливі, ніж люди середнього або низького росту. Їх м'язова сила не відповідає їх росту. Вони рідко доживають до похилого віку.

Наприклад, римський імператор Максимин-Франс, будучи 250 см на зріст, користувався браслетом своєї дружини як перснем, міг зупинити на ходу колісницю і одним ударом кулака розбивав нижню щелепу коню. А велетень Вількінс при рості 245 см мав ступню в 56 см.

А найвищою людиною на землі був англієць Лускін, який мав ріст 265 см. Його воскова фігура знаходиться в одному із лондонських музеїв. Збоку фігури розміщуються виліплені із гіпсу зліпки з його стегна, гомілки і руки.

Історія знає ряд спроб створити покоління велетнів. Наприклад, французький граф П'єрнур де Сент-Кан із Руана заповів кілька мільйонів франків на устрій кожного року одного шлюбу між велетнем і велеткою. Він не сумнівався, що такі шлюби заселять землю людьми величезного росту. Однак дослід виявився безуспішним.

Пруський король Фридрих-Вільгельм I у свій час задумав оточити себе гвардійцями високого зросту. Звідусюди закликали велетнів-чоловіків, для яких спеціально вибиралися високі наречені: він допускав шлюб своїх гвардійців тільки з жінками однакового з ними росту. На жаль експеримент закінчився безрезультатно у зв'язку зі смертю короля. Навіть відомий біолог і математик К. Пірсон заявляв, якщо б у людському суспільстві можна було б застосувати

штучний добір, то через 6 поколінь він міг би одержати расу людей з заданим ростом. Ні одна із спроб шляхом добору поміняти ріст людини не вдалась.

Якщо б Пірсон та інші любителі, перед тим, як проводити селекцію на низький і високий ріст людини, мали уявлення про генетичну основу зросту людини, то вони не задавалися б такою нездійсненною мрією, адже при статевому способі розмноження неможливо зберегти у потомстві комплекс генів, які забезпечують високий або низький ріст. У нащадків ріст буде підкорятися закону випадкового розподілу: основна маса людей завжди буде середнього росту, а в якості відхилення будуть зустрічатися особи низького або високого росту.

Зріст людини визначається великою кількістю генів, тобто, кількісно контролюється багатьма факторами (є мультифакторіальною ознакою) – окрім, власне, генів та їх продуктів, умовами внутрішньоутробного розвитку, харчуванням, і т.д.

Гени впливають на ріст людини різними шляхами. Один із механізмів цього впливу – генетична обумовленість секреції гормонів, які контролюють ріст людини (гормон росту, інсулін, тироксин).

Порушення регулярних механізмів росту і розвитку людини приводить до різних форм патології росту: з однієї сторони, може спостерігатися затримка росту, низькорослість, з іншої – прискорення росту, гігантизм. Наприклад, надлишок в організмі статевих гормонів може привести до розвитку гігантів. Гормони впливають мають сильний вплив на формування конституційного типу людини (астенік, мускульний тип і т.д.), особливо гормон росту або соматотропний гормон (СТГ). Наприклад, при недостатці у гіпофізі СТГ різко сповільнюється ріст дітей (нанізм). При підвищеному надходженні СТГ у кров, наприклад, у випадку пухлини гіпофізу, може розвинути хвороба акромегалія, яка характеризується високим зростом, різким непропорційним збільшенням розмірів верхніх і нижніх кінцівок, а також носа, цукровим діабетом.

Однак зустрічаються надзвичайно високі або зовсім низькорослі люди, які не мають організми фізіологічних порушень. Особливості їх зросту визначаються набором генів, які передаються із покоління в покоління.

В пустелі Калахарі, в Африці, живуть бушмени. Їх ріст в середньому біля 150 см. А в екваторіальних лісах Африки, в тяжко доступних місцевостях басейну ріки Конго, можна зустріти ще більш низькорослих людей – пігмеїв. Ріст чоловіків пігмеїв – 140-150 см, а жінок – 125-130 см. Такі ж низькорослі племена живуть на Андаманських островах, що лежать недалеко від Індії. Низькорослі темношкірі люди живуть у центральних районах півострова Малакка, філіппінського острова Лусон, Нової Гвінеї і островів Нові Гебриди в Океанії.

У таких низькорослих людей секреція СТГ нормальна і введення їм цього гормону не збільшить їх ріст. Як вважають, вони мають знижену чутливість до гормону росту.

Особливості генотипу визначають велику частоту низькорослих серед японців, в'єтнамців, індонезійців і деяких інших народів, так як і високорослих людей, наприклад, серед жителів прибалтійських країн.

Що стосується карликів і ліліпутів, то їх низький ріст обумовлений різними, в основному, патологічними відхиленнями. У деяких із них знижена секреція СТГ, або зменшена чутливість до цього гормону, що визначається генетично.

У науково-популярній літературі давно обговорюються питання, чи жили на Землі раніше і чи живуть сьогодні велетні? Міфи, перекази і легенди про існування в далекому минулому титанів, велетнів, величезних циклопів, богатирів відомі майже кожному народу. Зображення гігантів і велетнів зустрічаються у культурній спадщині Греції, Камбоджі, Індонезії, Мексики і багатьох інших країн. Давньоримський історик Йосиф Флавій (І ст. н. е.) повідомляє, велетні, що вціліли з древніх часів, жили ще у XIII ст. до н. е.: «Тела их громадны, лица отличались от обычных человеческих лиц настолько, что видеть их было удивительно, а слышать как они говорят, – страшно».

Французький абат Генріон (XVI ст.) написав богословський твір і навіть подав його до Паризької академії надписів і витонченого мистецтва. У своєму творі він надзвичайно серйозно розрахував ріст біблейських патріархів. Складні розрахунки показали, що зріст Адама досягав 40 м, Єви – 35 м, Ноя – 31 м, Авраама – 8 м, Моїсея – 3 м. Причому багато людей вірили у розрахунки абата. Як повідомляє іспанська хроніка, перші завойовники Мексики були дуже здивовані, коли побачили в одному із храмів майя скелет величезного росту. Спеціальний посильний навіть повіз одну кістку у подарунок римському папі. Солдати Кортеса, заслані на південь, в дальні гори, знайшли область, де жили велетні. На доказ цього, вони привезли ребра, які були вийняті із тіл убитих велетнів.

Що ж говорить наука про можливість існування у минулому людей-велетнів? Дані палеонтології свідчать, що у Південній Азії і в Китаї, Африці, Монголії, Індії, на Яві мільйони років тому жили велетні-пітеки – величезні людиноподібні мавпи, 3, 4, 5 метрів висотою, вагою 500 і більше кілограмів. Набагато пізніше в цих же краях разом з первісними людьми жив метантроп, який своїми розмірами мало в чому уступав велетню-пітеку і був, очевидно, страшним ворогом людини. Всі вони вимерли. Це були бокові, безплідні гілки людського дерева еволюції. Однак перекази про них довго зберігалися у пам'яті перших людей – адже вони були небезпечними сусідами. Ці спогади і послужили, очевидно, підставою для виникнення міфів і легенд про велетнів і величезних людодідів.

Чи живуть в даний час на Землі люди гігантського росту? Відомо, що в Африці живуть найменші і найбільші люди. Там проживають двохметрові дінка, шиллуки, нуери і ватусі. Ватусі – плем'я рекордсменів росту – 2 метра і вище.

Деякі дослідники вважають, що гігантські людиноподібні істоти – залишки мегантропів - могли дожити до наших днів, зберігшись десь у глухих районах земної кулі. В кінці XIX століття етнографи повідомляли, що на півострові Малака у диких тяжко доступних районах, серед найвідсталіших

племен сеноїв і семантів ходять розмови про те, що у джунглях живуть племена велетнів. Оповідачі хотіли поцупити у гігантів забуту ними палицю, але навіть кілька людей не змогли її підняти – настільки вона була важка.

Розповіді про гігантів зустрічаються у індіців Канади і США. До цього часу не втихають суперечки про величезну «снігову людину», яка ніби то проживає високо у горах Кавказу, Паміру і Гімалаях.

До недавнього часу будь-який учень міг розповісти, що у джунглях Амазонки і Бразилії проживає плем'я індіців величезного росту (до трьох метрів). Такі розмови про величезних лісових жителів пішли від племен, які постійно знаходилися у стані війни з ними. Іноді ці племена перемагали, але значно частіше вони побиті зазнавали поразки. Гордим жителям Сельви тяжко було визнати свою поразку, тому вони говорили, що їх супротивники – непереможні велетні. Члени експедиції, яку організували бразильські дослідники брати Віллас, нещодавно зустрілися з представниками племені індіців, яких народна чутка назвала гігантами. Яке у них було здивування, коли вони побачили аборигенів, які ні чим не відрізнялися від інших жителів Амазонки і були людьми звичайного зросту.

Якщо шукати гігантів серед сучасних людей, то їх можна легко знайти у баскетбольних і волейбольних командах різних країн. Зустрічаються вони іноді і на вулицях сіл і міст.

Нещодавно проведене Масштабне статистичне дослідження відповідностей між ростом людей і їх генетичним кодом, проведене міжнародним науковим колективом, дозволило встановити один з генів, відповідальних за ріст, повідомляється в прес-релізі Броудівського інституту (США).

Відомо, що на зріст індивіда впливає безліч факторів, але в значній мірі ріст визначений генетично. До тепер не було відомо, які саме гени відповідають за цей параметр, вдавалося лише пов'язувати окремі випадки патологічно низького або високого зросту з деякими генетичними змінами.

Вчені з американських, британських, шведських і фінських університетів і лабораторій проаналізували декілька відкритих баз даних, що містять інформацію як про фізичні параметри індивідів, так і про їх ДНК. У цілому було перевірено близько 35 тисяч людей. Аналіз показав, що приблизно 0,3% варіативності росту (як у дорослих, так і в дітей) пояснюються змінами гену HMGA2.

Ми успадковуємо дві копії HMGA2: по одній від кожного з батьків. На зріст, за результатами дослідження, впливає те, який нуклеотид виявиться в конкретній ділянці цього гену: цитозин або тимін. Ті, у кого в обох копіях HMGA2 у ключовій ділянці виявлявся цитозин, були в середньому на сантиметр вище тих, хто в обох копіях мав тимін. Ті, хто в одній копії мав цитозин, а в іншій - тимін, були в середньому приблизно на півсантиметра нижчі перших і вище других.

Дослідники підкреслюють, що вони знайшли лише один з факторів, які впливають на ріст. Не можна стверджувати, що HMGA2 повністю визначає, чи буде людина високою чи низькою. Швидше за все (крім зовнішніх умов) зріст залежить ще від безлічі генів, відкриття і дослідження яких чекають на нас у майбутньому.

Питання для самоконтролю

- 22. Чим обумовлений ріст людини?
- 23. Дайте визначення розвитку.
- 24. Чи живуть в даний час на Землі люди гігантського росту?
- 25. Чим характеризується зріст людини?

Список літератури

1. Белоусов Л.В. Можно ли разделить процессы роста и морфогенеза? – В кн.: Количественные аспекты роста организмов. - М., «Наука», 1975. - с.170-176.

2. Бердышев Г.Д., Тюленев В.И., Череп Н.Н., Пирский Л.И., Ковальчук Л.Г. Изменение содержания нуклеиновых кислот в процессе роста печени и кишечника крыс// Цитология и генетика. – 1972. - Т.6, №6. - с.548-552.
3. Сергиенко Л.П. Основы спортивной генетики. - 2004. - 631 с.
4. Сологуб Е.Б., Таймазов В.А. Спортивная генетика.- 2000. - 127 с.
5. Федоров В.Н. Рост, развитие и продуктивность роста животных. - М. «Колос», 1973. - 272с.
6. Bouchard C., Malina R.M., Perusse L. Genetics of Fitness and Physical Performance. - 1997.- 408 p.
7. Roth S.M Genetics Primer for Exercise Science and Health..- 2007. 192 p.
8. <http://greenhome.com.ua/?module=articles&c=articles&b=6&a=23>

РОЗДІЛ 6
«Генетика старіння і довголіття людини»
для підручника «Медична генетика»

В біології старіння — це процес поступового порушення і втрати важливих функцій організму чи його частин, зокрема здатності до розмноження і регенерації. Внаслідок старіння організм стає менш пристосованим до умов оточуючого середовища, зменшує і втрачає свою здатність до боротьби з хижаками, хворобами і травмами. Наука, яка вивчає старіння людини, називається геронтологією.

Термін «старіння» може використовуватися для опису соціальних ефектів старіння людини, а також для опису руйнування неживих систем.

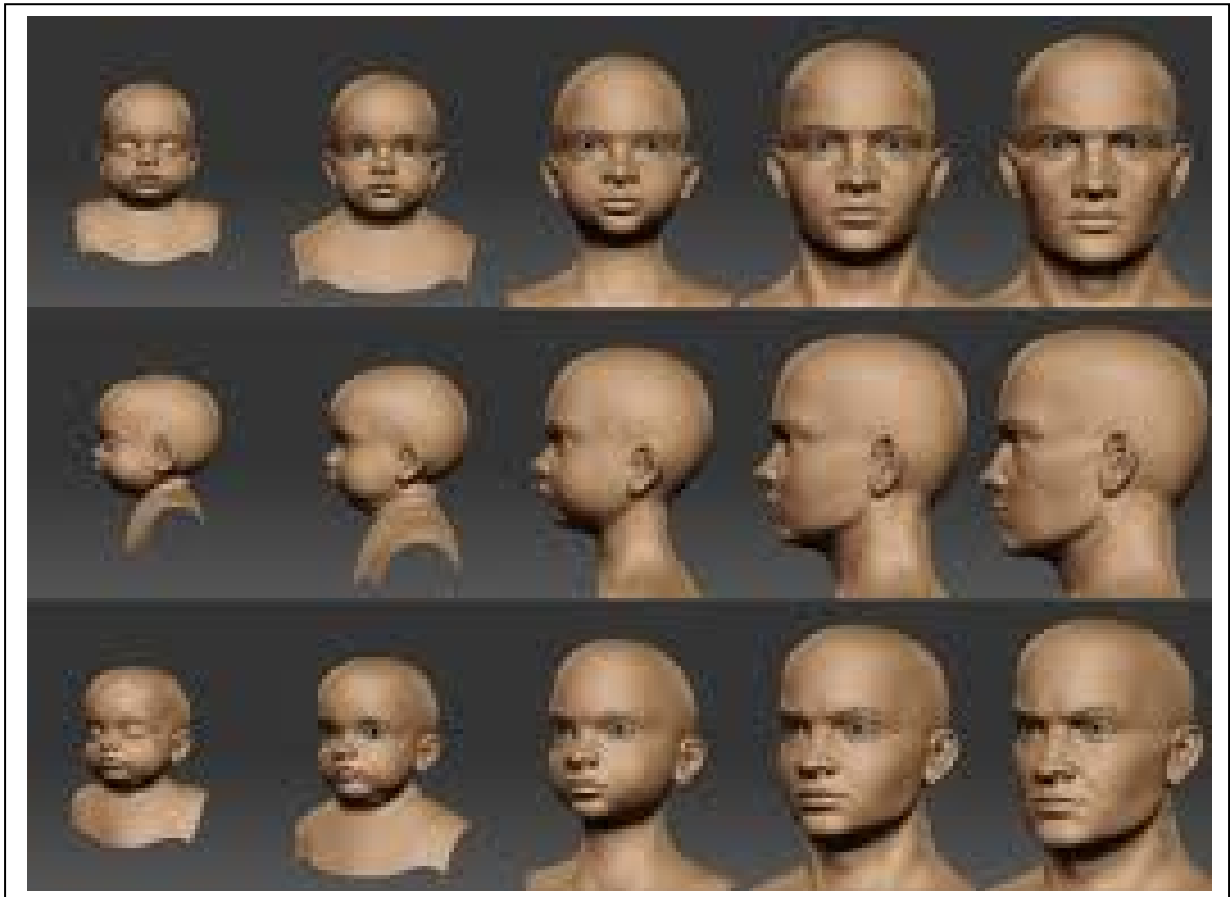


Рис. 5.1 Старіння (<http://www.google.com.ua/images>)

Існує багато теорій старіння, але їх всіх можна розділити на 3 групи: до 1-ї відносяться ті, які свідчать про чіткий детермінований процес старіння, що залежить від спадковості людини, тобто цей процес запускається генами. Гіпотези 2-ї групи говорять про те, що тільки фактори оточуючого середовища запускають механізм старіння, а 3-ї – що старіння залежить на 50% від спадковості людини і 50% від факторів зовнішнього середовища. Якщо умови оточуючого середовища різко погіршуються, то старіння, згідно 3-го класу гіпотез, прискорюються. Існує більше 100 генів людини, які пов'язані зі старінням.

Старіння може протікати на протязі десятків років, а може відбуватися дуже швидко (у деяких випадках протягом декілька років) в наслідок низки захворювань, так званих прогерій, завдяки специфічним мутаціям. Ці мутації призводять до певних дефектів на клітинному і молекулярному рівнях, які і підсилюють різке старіння всього організму, а також пов'язані з генами хелікази, ламінів, систем репарації ДНК. Прогерії належать до спадкових хвороб, хоча у багатьох випадках у хворого просто не має шансів, але у популяціях зустрічаються дуже рідко. Такі захворювання мають велике значення для наукового розуміння того факту, що конкретні мутації можуть призводити до процесів старіння.

До прогерій належить **синдром Вернера** - аутосомно-рецесивне захворювання, яке характеризується передчасним старінням шкіри, судинної і репродуктивної систем, кісток (рис.5.2). До статевої зрілості пацієнти розвиваються нормально. Симптоми старіння у них починаються в ранній зрілості. Вже в молодому віці вони страждають від катаракти, склеродермальних і дегенеративних судинних змін, діабету та атеросклерозу, остеопорозу, високої частоти деяких форм рака, посивіння. Хворі передчасно помирають чи від раку, чи від серцево-судинних хвороб. Середня тривалість життя під час такого захворювання – 40-50 років.

Функція гена даного захворювання була охарактеризована першою серед генів всіх прогерій. Синдром Вернера розвивається внаслідок аутосомно-

рецесивної мутації в гені *WRN* хромосоми 8, що призводить до порушення функції особливої ДНК-гелікази.

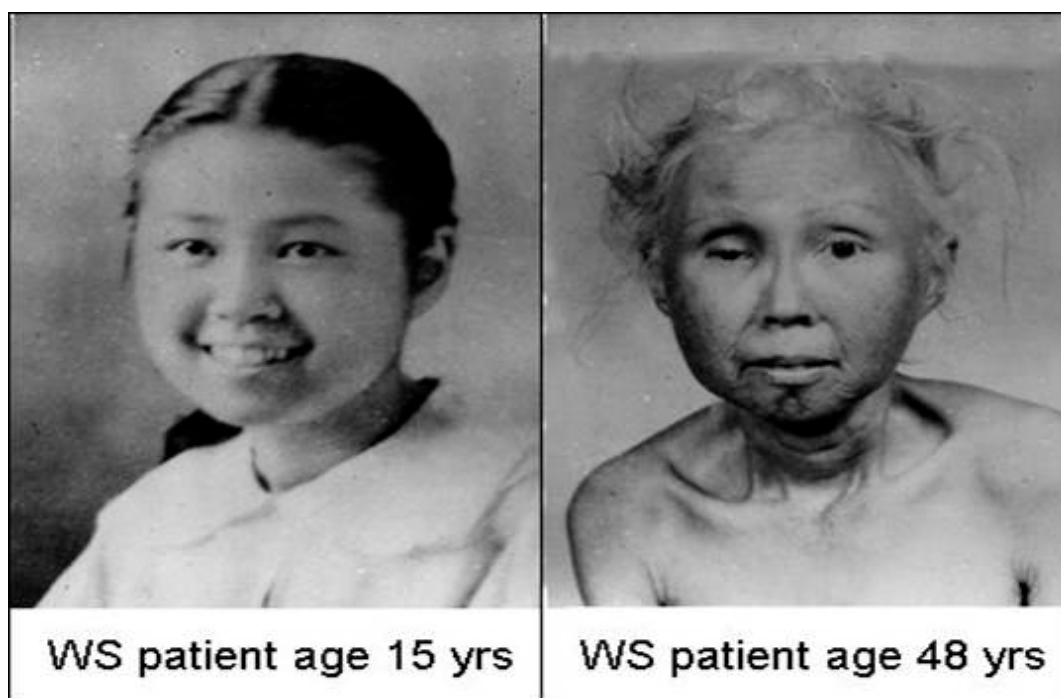


Рис. 5.2 Фото хворої на синдром Вернера (<http://milli-firka.orgblog.moikompas.ru/compas/progeria>)

Основна роль білка *WRN* в клітині – реініціювання заблокованих реплікаційних вилок. В результаті мутації порушуються процеси реплікації і репарації ДНК, експресії генів, прискорюється вкорочення теломер і збільшується чутливість клітин до апоптозу.

Дуже часто, коли говорять про прогерії, мають на увазі саме **синдром Хатчинсона-Гілфорда**, так звану "прогерію дітей" (рис.5.3). Це дуже рідкісна хвороба ($<1/1000000$, тоді як частота наведеної вище прогерії становить в середньому $<1/100000$). Ще однією відмінністю даної прогерії є те, що мутація, яка її викликає, завжди виникає *de novo*, тобто не успадковується. Це не викликає подиву, бо носії гинуть до репродуктивного віку. Діти шестилітнього віку з синдромом Хатчинсона-Гілфорда виглядають так як люди похилого віку і помирають від сильного атеросклерозу до 13 років. Хворі на даний синдром не здатні рости; для них характерна ліпоатрофія, кісткові порушення, маленький клювоподібний ніс, зрізане підборіддя, повна втрата волосся, п'ятниста гіпопигментація шкіри. Захворювання викликає дефект гена структурного білка

ядерної оболонки ламіна А (*lmpa*), що призводить до зміни структури ядра, нестабільності геному і порушенню експресії генів. Мутація призводить до синтезу вкороченої версії білка і, відповідно, до недостатньої кількості ламіна А дикого типу.



Рис.5.3. Синдром Хатчинсона-Гілфорда

(<http://milli-firka.orgblog.moikompas.ru/compas/progeria>)

Прогерія Хатчинсона-Джилфорда супроводжується дефектами в ядерній структурі і функціях: присутня дизморфія поверхні ядра, збільшення рівня пошкоджень ДНК, зниження експресії ядерних білків, в тому числі важливі гетерохроматинові білки HP1 і LAP2 (з групи ламін А-асоційованих білків). Крім того, в клітинах хворих порушений паттерн модифікованих гістонів: відбувається зниження гетерохроматин-специфічного триметилування по залишку Lys9 в гістоні H3. Таким чином, ядра клітин хворих на прогерію Хатчинсона-Джилфорда втрачають гетерохроматин.

Рестриктивна дермопатія представляє собою рідкісний аутосомно-рецесивний синдром. Це летальне перинатальне прогероїдне захворювання, яке характеризується затримкою роста, щільною і жорсткою шкірою, облісінням,

мікрогнатією та іншими порушеннями кісток, викликається делецією гена *ZMPSTE24*, що кодує протеазу, необхідну для ендопроотеолітичного процесінгу преламіна А в дозрілий ламін. Таким чином, як і синдром Хатчинсона-Гілфорда, вона викликається дефектом біогенезу ламіна А.

Існує багато різноманітних прогерій, проте можна чітко виявити загальні механізми, які їх обумовлюють:

- порушення властивостей теломер, хроматина і клітинного ядра;
- порушення репарації і реплікації ДНК, генетична нестабільність;
- порушення експресії генів;
- реплікативне старіння;
- збільшена чутливість клітин до апоптозу;
- елімінація стовбурових клітин.

Теломери є структурами на кінцях лінійних хромосом. У клітинах ссавців вони складаються з гексануклотидних (TTAGGG) повторів і з пов'язаними з ними білками. У клітин, які діляться відбувається поступове руйнування теломерів до критичного ступеня скорочення, що призводить до хромосомних аномалій і клітинної смерті чи старіння. Експресія ферменту, який подовжує теломери, теломерази, пригнічується рано під час розвитку у всіх нормальних людських соматичних тканинах.

Деякі дослідники вважають, що старіння людини - це продукт генетично обумовленого процесу поступово-паралельного вимкнення-включення (в основному вимкнення) життєво важливих генів, зокрема тих, які відповідають за енергетичний обмін, і можливим включенням певних генів у відповідності до певної програми. Проте ступінь детермінованості такої програми поки залишається не зовсім зрозумілим. При цьому, якщо на початку онтогенезу більшість генів включається, то в кінці його більшість генів виключається.

Таким чином, можна узагальнити основні **властивості процесу старіння** тварин:

1. Смертність серед тварин, в тому числі і в людських популяціях, відноситься до інваріантних констант, які забезпечують появу і збереження життя на Землі. Механізм старіння дуже надійний.

2. Всезагальність і подібність характеристик старіння у ссавців, універсальність динаміки смертності у представників різних класів тварин.

3. Диференціювання еукаріотичних клітин тварин на нестаріючі статеві і відповідальні за старіння соматичні.

4. Старіння є генетично обумовленим процесом з низьким коефіцієнтом успадкування. Середня тривалість життя - чітка видова ознака.

5. Кореляція тривалості життя з ефективністю роботи систем репарації ДНК.

6. Можливі штучний добір за тривалістю життя, а також швидка зміна тривалості життя в еволюції.

7. Ймовірна значна зміна середньої тривалості життя популяції від покоління до покоління однієї лінії без всяких зовнішніх впливів. Вариация індивідуальної тривалості життя зберігється у інбредних ліній і монозиготних близнюків, хоча у них є і певна конкордантність за тривалістю життя. Однакова варіація тривалості життя в популяціях різних видів.

8. На процеси старіння не діє природний добір, так як їх фенотипові проявлення відносяться до пострепродуктивного періоду.

9. Встановлено, що процес старіння і радіаційне вкорочення тривалості життя мають потенційну фазу - період, коли вони розвиваються, але ніяк себе не проявляють.

10. Опромінення іонізуючою радіацією в обмежаних дозах постмітотичних тканин організму може вкорочувати тривалість життя без викривлення природного старіння, а вплив антиоксидантів - збільшувати. Ця особливість механізму старіння дозволяє припустити, що в процесі старіння важливу роль відіграє не тільки генетичний механізм, але і його взаємодію зі стохастичними пошкодженнями.

Клітинне старіння. Старіння відбувається не тільки на організменому рівні, воно також характерне для органного, клітинного і молекулярного рівней. Деякі дослідники вважають, що більшість процесів, які відбуваються на клітинному і молекулярному рівнях, пізніше стають причиною старіння всього організму. Хоча інколи організм «жертвує» клітиною чи клітинами для спасіння всього організму.

Загибель клітин відбувається за чіткою програмою під керівництвом генів, яка називається *запрограмованою загибеллю клітин (ЗЗК)*. За останні роки дослідження молекулярних механізмів ЗЗК стало одним з найважчих і найактуальніших проблем біологічних і медичних наук.

Згідно з концепцією ЗЗК, яка була висунута в кінці 1920-х років і зараз є загально прийнятою, клітини беруть активну участь у своєму знищенні. Крім того, загибель еукаріотичних клітин відбувається різними диференційними шляхами і має різні форми прояву. Найдослідженішою формою запрограмованої загибелі еукаріотичних клітин є апоптоз. У перекладі з грецької мови “апоптоз” означає “опадання”, наприклад, листя.

Апоптоз регулює клітинну масу й архітектуру багатьох тканин. Чотири основні характеристики апоптозу: стискання клітини, агрегація хроматину, фрагментація генома та зміна в оболонках апоптуючої клітини, що призводить до розпізнавання її фагоцитами. У нормальному організмі генетично обумовлену смерть клітин іноді нелегко відрізнити від випадкової смерті. Випадкова смерть вражає клітини окремої особини без усякого вибору, хаотично: окрема клітина може загинути або й ні на певній стадії розвитку організму. Генетично обумовлена смерть обов'язково вражає кожну клітину даного виду на певній стадії нормального онтогенезу. Таким чином, останній вид смерті клітин характеризується певним просторовим розміщенням гинучих клітин, певною стадією онтогенезу нормального організму, специфічним, завжди однаковим для даної клітини, механізмом загибелі.

Відкриття феномену самонищення клітин тварин і людини було революційним явищем в біології. Воно дозволило по-новому оцінити механізми

підтримки клітинного гомеостазу в різні періоди онтогенезу і під час розвитку багатьох патологічних станів. Розкриття механізмів ЗЗК може мати важливе значення не тільки для поглиблення уявлень про роль ЗЗК у підтримці нормального клітинного гомеостазу і в патогенезі старіння і різних захворювань, але також для розробки сучасних діагностичних методів і терапевтичних засобів.

Клітинна смерть відома з моменту відкриття клітин. Ще з 1665 р. Р. Гук описав формації з загинулих клітин у корі дуба. Однак ці досліді довгий час залишалися без належної уваги. У 1842 р. К. Фогт і в 1859 р. Р. Вірхов опублікували свої дослідження клітинної смерті. А в 1923 р. П. Аллен, досліджуючи заражені грибами рослинні клітини, висунув концепцію ЗЗК, згідно з якою клітини беруть активну участь у своєму нищенні.

Фізіологічну роль та широке поширення ЗЗК почали визнавати з 1970-х роках. У ті часи багато хто вважав цей вид загибелі клітин “фізіологічним”. Перші дослідники ЗЗК вибирали модельні об’єкти, які дозволяли досліджувати тільки біохімічні або морфологічні феномени і механізми цього явища. Ультраструктурні зміни в клітині під час її запрограмованої загибелі були вперше докладно описані Дж. Керром і співавторами в 1972 р. Вони систематизували тогочасні дані і ввели термін “апоптоз” для позначення цього процесу, протилежного мітозові.

Хоча терміни “ЗЗК” і “апоптоз” часто вживаються як синоніми, між ними є певні відмінності. Під ЗЗК розуміють механізм елімінації клітини, який активується під час формування органів, тканин і всього організму в період ембріо- і морфогенезу, деяких форм старіння; у рослин — при відповіді клітини на патогени. Водночас протягом апоптозу загибель клітини не обов’язково є запрограмованою. І навпаки, ЗЗК не завжди відбувається шляхом апоптозу. Крім того, Керр зі співавторами відзначили існування двох різних видів клітинної смерті у тварин — апоптозу і некрозу.

До недавна вважалося, що некроз — це не запрограмована форма загибелі клітин. Проте останнім часом з'являються відомості що ця форма загибелі клітини також є запрограмованою.

Форми загибелі клітин. Приклади апоптозу в дорослому тваринному організмі поширені в різних типах тканин. Він трапляється як у помірно проліферуючих популяціях клітин (гепатоцити, клітини епітелію кори наднирників), так і в швидко проліферуючих клітинних популяціях. У першому випадку він виконує функцію гомеостатичної регуляції оптимального об'єму тканини. У другому випадку роль апоптозу, в основному, пов'язана з диференціюванням клітин.

Ще не так давно припускали, що некроз суто патологічний процес, який розвивається раптово й одночасно у великій групі клітин внаслідок гіпоксії, фізичних і хімічних впливів і під дією вірусів. Цей процес пов'язаний з повним метаболічним занепадом, який призводить до набряку клітини, ранньої втрати цілісності її оболонки, пошкодження мітохондрій та інших органел, що в кінцевому підсумку закінчується лізисом залишків клітини. Некроз не пов'язаний з поглинанням енергії і синтезом білка, тоді як апоптоз — це енергозалежний процес, що призводить до “самогубства” небажаних клітин, протягом якого внаслідок фрагментації ДНК їхній ядерний хроматин конденсується. Після цього клітини розпадаються на так звані “апоптичні тільця”, які включають зовнішні неушкоджені мітохондрії та інші органели. Потім такі тільця фагоцитуються як “професійними”, так і “непрофесійними” фагоцитами, роль яких виконують сусідні клітини — наприклад, мезангіоцити чи клітини тубулярного епітелію.

Останнім часом почали накопичуватись факти, які свідчать про наближеність, а не про протилежність некротичної та апоптичної форм елімінації “небажаних” клітин. З'ясувалось:

- патофізіологічні впливи (стреси): іонізуюча радіація, патогени, цитокініни викликають в одній і тій же популяції обидві форми загибелі;

- антиапоптичні механізми здатні захищати клітини і від некротичного, і від апоптичного знищення;
- біохімічні втручання (наприклад, інгібітори полі(ADP)-рибозополімерази) в сигнальний і виконавчий апарат ЗЗК може змінювати вибір форми клітинної загибелі.

Взагалі всі фактори, які викликають ЗЗК, можна розділити за походженням на фізичні, хімічні і біологічні (табл. 5.1).

Таблиця 5.1

Етіологічні фактори, які призводять до апоптозу

Фактори		
фізичні	хімічні	біологічні
Висока температура	Генотоксичні ксенобіотики	Віруси
Низька температура	Афлатоксини	Бактерії
Електричний струм	Бенз(а)пірен	Генетичні дефекти
Гіпероксія	Метилхолантрен	
Іонізуюча радіація	Ліки:	
УФ-промені	АСЕ-інгібітори	
	карведилол	
	цитостатики	
	глюкокортикоїди	
	тиреоїдні гормони	
	прогестерон	

Некроз характеризується розривом цитоплазматичної і внутрішньоклітинних мембран, що призводить до нищення органел, звільнення лізосомальних ензимів і виходу вмісту цитоплазми в міжклітинний простір. Натомість, під час апоптозу зберігається цілісність мембран, органели виглядають морфологічно інтактними (рис.5.4).

Форма клітинної загибелі — шлях апоптозу чи некрозу — у багатьох випадках визначається внутрішньоклітинною концентрацією NAD⁺ чи АТФ. Зниження рівня NAD⁺АТФ призводить до індукції некрозу. Таким чином, процеси апоптозу і некрозу мають як подібні, так і протилежні риси.

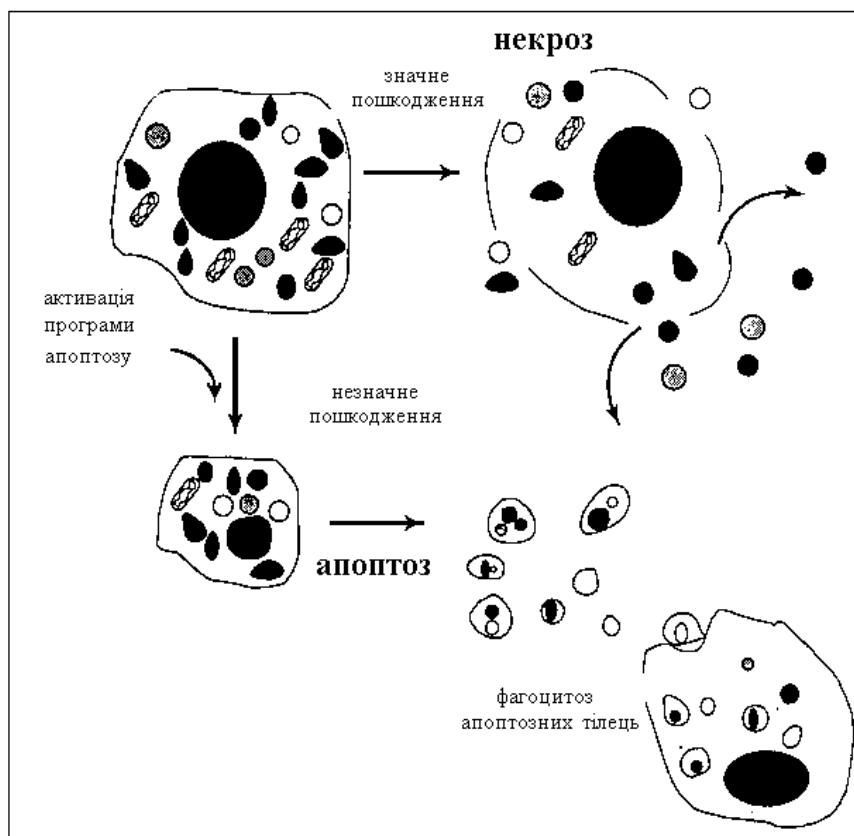


Рис. 5.4. Апоптоз і некроз

В таблиці 5.2 представлені відмінності апоптозу і некрозу. Використовуючи інформацію з цієї таблиці і рис.1 видно, що процеси апоптозу і некрозу характеризуються протилежними ефектами, хоча можуть викликатися одними і тими ж чинниками, тільки різними дозами (малі дози можуть викликати апоптоз, великі – некроз).

Таблиця 5.2

Морфологічні і біохімічні відмінності апоптозу і некрозу

Ознака	Апоптоз	Некроз
Причина	Пошкодження ДНК, сумісне з життям клітини. Активація специфічної генетичної програми, в тому числі специфічних протеаз і ендонуклеаз. Участь АТФ	Не сумісна з життям клітин масивна дія факторів різної природи. Активація лізосомальних ферментів. Виснаження АТФ
Вираженість змін	Окремі клітини, розташовані серед	Тотальна загибель клітин на ділянках того чи іншого

	нормальних елементів	розміру
Пошкодження оточуючих тканин	Немає	Є
Реакція запалення	Відсутня	Майже завжди є
Розмір клітини	Невеликий	Великий
Проникність клітинної мембрани	Нормальна	Збільшена
Формування “апоптичних” тілець	Є	Немає
Ядро	Міжнуклеосомні розриви ДНК. Фрагменти складають ~180 пар азотистих основ. Маргінальна агрегація хроматину. Фрагментація ядра (каріопікноз, каріорексис)	Довільні розриви ДНК і її загибель. Прогресивна втрата хроматину. Набухання і каріолізис
Конденсація ядерного хроматину	Є	Немає
Мембранні структури	Мембрани (ядерні, внутрішньоцитоплазматичні, мітохондріальні, поверхневі) зберігаються ззовні і в середині апоптичних тілець	Пошкоджуються на самих ранніх етапах некрозу
Внутрішньоклітинні органели (мітохондрії, лізосоми)	Зберігаються і добре помітні в апоптозних тільцях	Руйнуються і гинуть
Доля клітинних залишків	Апоптичні тільця фагоцитуються і переварюються епітеліальними, пухлинними клітинами і макрофагами. Якщо фагоцитоз	Фагоцитоз здійснюється макрофагами

	затримується, то апоптичні тільця можуть підлягати спонтанному некрозу	
Енерговитрати	Є	Немає
Протеоліз	Специфічний протеоліз з утворенням активних поліпептидів з про- і антиапоптозною функцією	Повний розпад протеїнів
Синтез білків	Інколи синтез специфічних білків	Відсутній
Тип смерті	Самогубство клітини	Вбивство клітини

Ключовою характеристикою апоптозу є систематична фрагментація ядерної ДНК (яДНК) з молекулярною масою фрагментів близько 180 пар нуклеотидів (п.н.), яка виникає внаслідок конденсації хроматину та фрагментації ядер. Існують й інші відомості, які стосуються розподілу фрагментів ДНК протягом апоптозу. Так, на думку деяких авторів розподіл за молекулярною вагою фрагментів ДНК становить більше 1000 тис. пар нуклеотидів (т.п.н.), 450-600 т.п.н. і 30-50 т.п.н. В інших роботах виявлено фрагменти, розмір яких становить 50 і 560 т.п.н., 50-100 т.п.н., 100-300 т.п.н., ~50 т.п.н.

Іноді утворюються невеликі фрагменти з розмірами 100 п.н., а потім 50 і 300 т.п.н. Мабуть це не випадково. Розподіл за молекулярною вагою фрагментів, що утворюються під час розпаду ДНК, можливо пов'язаний з організацією хроматину у вигляді структурних петель і розеток.

Існує низка генів, які пов'язані з ЗЗК. Так, ген *bcl-2* відкритий у 1985 р. одержав свою назву від захворювання В-клітинної лімфоми/лейкемії (B-cell lymphoma/leukemia), протягом якого спостерігалася його гіперекспресія. У геномі людини цей ген локалізований у 18-й хромосомі і може транслокуватися в область 14q32 14-ої хромосоми, де знаходяться енхансерні елементи генів важких ланцюгів імуноглобулінів. Унаслідок такої транслокації може

відбуватися злоякісна трансформація В-клітин з утворенням лімфом, і тому ген *bcl-2* може відноситись до розряду потенційних онкогенів.

Білок p53, який кодується однойменним геном, є супресором пухлинного росту і регулятором багатьох клітинних функцій: мітотичного циклу, репарації пошкоджень ДНК, диференціювання клітин і апоптозу. Він постійно синтезується клітинами, але дуже швидко розщеплюється, тому його концентрація у більшості нормальних клітин і тканин низька. Коли в клітині відбувається пошкодження ДНК, тоді вміст даного білка різко збільшується внаслідок його стабілізації. У випадку значного пошкодження ДНК білок p53 активує експресію гена *bax*. Збільшується рівень білка Bax, який утворює гетеродимер з білком Bcl-2, що викликає загибель клітин через апоптоз.

Отримані дані, які свідчать про те, що один ген p53 без участі інших генів не здатний викликати апоптоз клітин карциноми прямої кишки. Припускають, що апоптоз-індукуюча та ріст-інгібуюча активності білка p53 визначаються різними доменами його структури, а також те, що крім p53-опосередкованого механізму індукції апоптозу існує ще й p53-незалежний механізм.

Існують дані про те, що продукти гена *bcl-2* і його аналогів – це велика група білків, яким належить важлива роль у чутливості клітин до стресових і летальних сигналів. Антиапоптичні білки родини Bcl-2 здатні в багатьох випадках інгібувати як апоптичну, так і некротичну програми клітинної деструкції, які можуть викликатися, наприклад, цитокінінами, Ca^{2+} -іонофором та ін.

Відкрито ген, що викликає некротичну форму загибелі клітин, які його експресують. Пронекротичні функції у білка BNIP3 (індуктора апоптозу без функціонального домену BH3 з родини Bcl-2) виявлялися в клітинах, які були трансфіковані цим геном, у появі ранньої проникності плазматичної мембрани, вакуолізації цитоплазми та аутофагії мітохондрій. У цілому, як виконавчі механізми клітинної загибелі (проапоптичні члени родини Bcl-2), так і інгібуючі (антиапоптичні члени родини Bcl-2) мають багато спільного і для апоптичної, і для некротичної форм деструкції клітин.

Гени старіння. Останнім часом виділено багато генів, які впливають на хід старіння. Це, зокрема, ген теломерази, який підтримує певну довжину хромосом, гени p53 і p16, що контролюють апоптоз і проліферацію (в тому числі запобігають проліферації онкологічних клітин). В різних дослідках на тваринах і в культурах клітин було показано, що певні характеристики продуктів цих генів пов'язані зі старінням. Такими характеристиками можуть бути:

1. Рівень експресії гена і кількість відповідного білка.
2. Модифікації білка (наприклад, фосфорилування за певними амінокислотними залишками), які регулюють його активність.
3. Регуляція синтезу білка у часі (наприклад, на певних стадіях клітинного циклу) і просторі (тканино-специфічний синтез).

Регуляція експресії генів представляє собою складний процес: транскрипція, як і всі наступні стадії, контролюється різноманітними способами. Таким чином, на активність генів, зв'язаних безпосередньо з процесами старіння, впливають гени транскрипційних факторів, регуляторні РНК, регулятори трансляції РНК і т.д.

Для розуміння механізмів старіння і можливостей боротьби із ним мають значення такі питання, як:

1. Які саме варіанти послідовностей ДНК формують ті або інші характеристики білків, залучених у старіння? Які варіанти асоційовані із фенотипами, що відповідають за швидке старіння?
2. Як епігенетичні взаємодії (метилування ДНК, модифікації гістонів) запускають процеси, які відносяться до старіння на клітинному рівні? (Відомо, що метилування може відключити експресію гена. Модифікації гістонів в районі певного гена можуть дозволити йому експресуватися тільки в певних тканинах і в певні періоди часу).
3. Які регуляторні фактори (фактори альтернативного сплайсингу, активатори та інгібітори ферментів) впливають на гени, пов'язані зі старінням?

Оскільки активність регуляторних факторів також залежить від послідовностей ДНК, які кодують відповідні гени, то, маніпулюючи ДНК, теоретично можна очікувати на зміни системи в цілому.

Під час старіння може також змінюватися не тільки структура генів, а й напрямок їх функціонування. З віком в соматичних клітинах накопичуються не тільки мутації, але й хромосомні пербудови. Передбачається, що зміни хроматину можуть відігравати головну роль у вікових змінах пов'язаних з регуляцією експресії генів. Зі збільшенням віку не виявлені стехіометричні зміни більшості гістонів, крім подвиду гістона H₁. Передбачається, що ацетилювання гістонів може змінювати взаємодію гістон-ДНК і робить ДНК більш доступною, знижується по мірі старіння на 30-70%.

Встановлено, що в цілому транскрипційна активність клітин на протязі старіння організму знижується, хоча рівень загальної РНК залишається постійним за рахунок зниження швидкості поновлення РНК. У більшості досліджень була знайдена помітна кореляція між пов'язаними з віком змінами рівня мРНК і рівнем білка (чи ферментативною активністю), обумовленим різними видами мРНК.

Після розшифрування геному людини ведеться активний пошук кандидатів на роль генів смерті і довголіття. Schachter зі співавторами запропонували класифікувати такі гени на: 1) гени, гомологічні генам, що обумовлюють тривале життя у тварин інших видів; 2) гени, які беруть участь у підтримці клітинної рівноваги тканин і репарації; 3) гени, що відповідають за розвиток основних захворювань, пов'язаних зі старінням.

Було встановлено, що ген bcl-2 кодує білки мембрани мітохондрій і його функція проявляється у фенотипі безсмертя в тих клітинах, де він експресується. Однак, на відміну від інших онкогенів, він не викликає клітинну проліферацію. Показано, що ген bcl-2 блокує запрограмовану клітинну смерть і таким чином подовжує життя клітин. Продукт цього гена запобігає токсичному ефекту гідроксильних радикалів, захищаючи старіючі клітини від оксидативного стресу. Оскільки ген bcl-2 є частиною клітинної системи протидії апоптозу, то

на даний час досліджуються шляхи використання bcl-2 як лікувального засобу в терапії нейродегенеративних захворювань.

Ген білка p53 також є дуже важливим як для контролю еволюції онкологічних клітин, оскільки він обмежує їх неконтрольний ріст і навіть викликає регресію пухлин, так і для клітинного старіння, виконуючи функцію видалення старих, не функціонуючих клітин. Білок p53 веде себе як антионкоген: його введення у трансформовані клітини пригнічує їх неконтрольовану проліферацію. Було встановлено, що, якщо нормальний p53 бере участь у контролі тканинного росту за рахунок активації генів, які залучені у процес пригнічення росту, його мутантні форми можуть перешкоджати цьому процесу та ініціювати утворення пухлин. Мутації гена p53 є найпоширенішими мутаціями в клітинах пухлин людини і були знайдені в пухлинах різної локалізації.

Гени аполіпопротеїна Е (АпоЕ) і ангіотензин-конвертуючого ферменту (АКФ) відіграють важливу роль в ліпідному метаболізмі. Оскільки серцево-судинні захворювання є однією з головних причин смерті людини, то вони безпосередньо впливають на тривалість життя. Білки АпоЕ беруть участь в утворенні, секреції, транспорті і зв'язуванні макромолекулярних ліпопротеїдних комплексів. Вони є компонентами ТГ-збагачених ліпопротеїнів і ЛПВП плазми. АКФ - ключовий фермент ренін-ангіотензинової системи, важливої у контролі хвороби Альцгеймера, гомеостазі води і солі та в контролі клітинного росту. Три звичайні ізоформи АпоЕ: Е2, Е3, Е4 кодуються відповідними алелями ϵ 2, ϵ 3 и ϵ 4. В той час, як ізоформа Е4 асоційована з високим рівнем холестерину в крові і пов'язана з підвищеним ризиком ішемічної хвороби серця (ІХС), а відносно рідкісна ізоформа Е2 пов'язана з менш високим рівнем холестерину крові. Висока частота ϵ 2 алелей у столітніх передбачає, що ϵ 2 може виявляти захисний вплив у вигляді зниження рівня холестерину, що вторинно впливає на випадки ІХС. Також АпоЕ4 залучені у патогенез хвороби Альцгеймера.

Білок АпоЕ4 ненормально зв'язується з деякими внутрішньоклітинними білками, що призводить до їх агрегації і формуванню внутрішньоклітинних нейрофібрилярних пучків. Він також зв'язується з позаклітинним β -амілоїдним білком. Передбачається, що хвороба Альцгеймера розвивається тому, що АпоЕ4 варіант шкідливий для нейронів, позбавляючи їх нормального захисту від нейродегенерації. Виявлено, що у носіїв двох Е4 алелей хвороба Альцгеймера розвивається в середньому на 15 років раніше, ніж у носіїв двох Е3 алелей. Тем не менш, у столітніх з поліморфізмом $\epsilon 4/\epsilon 4$ деменції не спостерігається. Можливо, що АпоЕ4 зв'язується з іншими внутрішньо- і позаклітинними компонентами, що може відігравати роль у розвитку ІХС.

Полігенна система головного комплексу гістосумісності (HLA у людини і МНС у мишей) може відігравати важливу роль серед генетичних факторів довгожителів. Встановлено, що миші з алелем $H-2^d$ живуть довше, в них вища активність імунної системи і менша частота спонтанних лімфом. Хоча у столітніх в два рази частіше зустрічаються деякі алелі $HLA-A, -C$ і DR , поки відсутні підтвердження такого зв'язку для інших популяцій.

Значний практичний інтерес представляють дослідження поліморфних маркерів, які змінюють певні функції самих білків, важливі для активності останніх. Інформація про них може бути найбільш корисною при реконструкції системи взаємодії, що призводить до старіння. Наприклад, амінокислотна заміна Arg72Pro в гені p53 підсилює апоптичні функції білка і при цьому асоційована з тривалістю життя.

Методи боротьби зі старінням. Питання про граничні межі людського життя викликає дискусію серед учених. У літературі зустрічається опис різних випадків довгожителів, однак важко перевірити їх достовірність.

Дуже важко буває встановити дійсний вік більшості довгожителів. Всі ці повідомлення науково не перевірені. Під час перевірки часто виявлялося, що дійсний вік навмисно спотворювався.

Генетичні фактори діють на всіх етапах онтогенезу. Старість і смерть генетично детерміновані, в одних організмів більше, в інших менше. Всі організми за жорсткістю генетичного програмування тривалості життя можна розділити на три групи:

- 1 тривалість життя і швидкість старіння дуже жорстко запрограмовані, середовище мало впливає на тривалість життя;
- 2 середовище на 50-55% визначає тривалість життя і швидкість старіння;
- 3 смерть настає не від старості, а від випадкових причин (наприклад, самки камбал тощо).

Людина відноситься до другої групи організмів. Роль генетичних факторів у довголітті велика, але генетичний потенціал довголіття реалізується тільки в певних, нехай навіть мінімальних, умовах середовища.

Давно підмічено зв'язок між довголіттям батьків і дітей. Ще Ч. Дарвін писав: "...міцне здоров'я, витривалість і довговічність спадкові". Як мати, так і батько роблять приблизно однаковий внесок у передачу довголіття нащадкам. Деякі вчені припускають, що довголіття – це домінантна ознака, і тому нащадки тривало живучих батьків будуть довгожителами. Наприклад, у кінці 50-х рр. і на початку 60-х рр. F. Kallman, F. Kallman і L. Jarvik Fulek вважали, що існує ген довгожителства, який знаходиться в статевих хромосомах. Однак довголіття правильніше розглядати як результат дії багатьох генетичних факторів, відношення між якими складніші, ніж відношення між домінантністю і рецесивністю.

Bell у 1918 р. вивчив тривалість життя близько 3 тис. нащадків однієї американської родини. У нащадків, що померли у віці до 20 років, серед батьків було лише 24,1% довгожителів (80 років і більше), у померлих між 50 і 80 роками – вже 37,5%, а у померлих у 80 і більше років – 46%. Аналогічний зв'язок спостерігався між тривалістю життя нащадків і матерів.

Широкомасштабні дослідження довели успадкування довголіття. За їх даними, 86% людей, які дожили до 90 і 100 років, мали одного чи двох довголітніх батьків. У батьків з невеликою тривалістю життя діти не були довгожителами. У 1923 р. Rossle проаналізував родовід видатних вчених Шульца і Геккеля і встановив, що їх родини відмічалися великою частотою глибокої старості, високою плодовитістю, малою дитячою смертністю. Спадковість довголіття відмічена у англосаксів, фінів, китайців, болгар. Jalavisto виявила, що спадковість довголіття матері відіграє більшу роль, ніж батька. За даними R. Pearl, у 49% 90-річних і у 53% 100-річних людей довгожителами були і батько, і мати. Подібні результати досліджень наводять і багато інших авторів.

Для визначення рівня довголіття використовують деякі показники довголіття. Наприклад, індекс частоти сімейного довголіття, відношення числа осіб, котрі мають

довголітніх родичів, до загального числа обстежених. Сумарний показник сімейного довголіття:

$$(\text{СПСД}) Q = n_1 \times 0,5 + n_2 \times 0,25,$$

де n_1 – число довголітніх родичів 1-го ступеня (батько, матір, брати, сестри), n_2 – число довголітніх родичів 2-го ступеня поріднення (дідусі, бабусі, тітки, дядьки).

Для пробанда і його родичів 1-го ступеня поріднення “доля загальних генів”, отриманих від загального прашура, дорівнює 0,50, а 2-го ступеня – 0,25. Використовують і такий показник довголіття, як відношення осіб віком 90 років до числа осіб віком 60 років тощо.

Суспільство в усі часи виявляло цікавість до способу життя довгожителів. Серед факторів, котрі сприяють розвитку довголіття, велике значення надають харчуванню. У дослідженнях, виконаних в Інституті геронтології АМН України, показано, що для харчування довгожителів характерна низька калорійність, невеликий вміст цукру, високий вміст рослинних продуктів, вітамінів, антиоксидантів. Про очевидну роль дієтичних факторів свідчить і те, що огрядні люди більшою мірою страждають на різні захворювання, в першу чергу на атеросклероз, діабет, і тривалість їхнього життя зменшується. Тривалість життя огрядних людей, так само як і дуже худорлявих, менша, ніж у людей з нормальною вагою. Німецький геронтолог В. Рис встановив, що люди, які страждають на ожиріння, живуть у середньому на 6-8 років менше.

Вважається, що щоденно слід вживати по одній капсулі мультивітаміну, що гарантовано забезпечує організм усіма необхідними поживними речовинами, навіть коли людина харчується збалансовано. Деякі лікарі одержали дані про те, що вітаміни краще вживати без добавок заліза, а вміст вітаміну А має бути менше 8000 одиниць, оскільки висока концентрація заліза в організмі може призвести до розвитку серцевих хвороб, а надлишок вітаміну А може викликати багато проблем, починаючи від мігрені і нудоти і закінчуючи проблемами з кістками та печінкою.

Вітаміни С і Є є потужними антиоксидантами, які протистоять вільним радикалам. Без цих вітамінів людині загрожує ризик серцево-судинних хвороб, раку та інших симптомів старості. Щоденно слід додавати у раціон вітамін С (від 600 до 2000 мг), 400 одиниць вітаміну Є, 1200 мг кальцію. Кальцій забезпечує міцність кісток. Проте надлишок вітаміну С у деяких людей викликає діарею.

Ряд науковців вважає, що щоденні фізичні вправи: швидка ходьба, плавання, біг, велосипед, танцювальна аеробіка уповільнюють процес старіння. Яким чином? Будь-яка фізична активність, котра змушує працювати серце і легені, скорочує ризик захворювань цих органів, а також ризик інших небезпечних хвороб, наприклад: раку, артрити, діабету, які викликають передчасне старіння організму. Досліди, проведені серед 80 тис. жінок, показали, що у тих, хто займався ходьбою хоча би тричі на тиждень, на 40% знизився ризик інфаркту та інсульту.

Обмеження руху призводить до послаблення інтенсивності відновлювальних процесів, котрі не стимулюються напруженою діяльністю, до обмеження надходження струму імпульсації з рецепторів м'язів до нервових центрів, до перебудови нейрогормональних взаємовідносин тощо. Звідси впливає зміна збудливості нервових центрів, зниження інтенсивності процесів генерації енергії у клітині, падіння поновлення білка тощо. Все це врешті-решт обмежує пристосувальні можливості організму. Ось чому у гіподинамічному організмі частіше виникають і важче протікають більшість патологічних процесів.

Фізичні вправи психологічно відволікають від життєвих проблем, надають відчуття власної сили і впевненості у собі. Під час занять фізкультурою в людському організмі утворюються ендорфіни, котрі сприяють гарному настрою і блокують стреси.

В літературі можна зустріти термін ювенологія — науково-практична галузь, яка вивчає можливості затримання старіння, омолодження всього організму і запобігання старіння людини. **Ювенологія** рекомендує людині

знати загрози для здоров'я і замолоду не шкодити йому. Наприклад, піління прискорює процес старіння. Найзагальним положенням ювенології є біологічний вік, який залежить від способу життя. Необхідно дотримуватись правил гігієни, запобігати хворобам і травмам. Ювенологи вважають, що слід стримуватися у їжі, харчування без постійних перевантажень, правильно дихати, закалювати організм, фізично активно працювати, ходити, бігати, займатися гімнастикою та іншими видами спорту. На їх думку уявлення про максимальну напругу при фізкультурних заняттях є помилковим. Кожна людина може вибрати для себе певні вправи з систем аутогенного тренування і йоги, а також оволодіти прийомами самомасажу.

Чоловіки і жінки, які регулярно займаються спортом, не палять, не зазнають стресів, дотримуються здорової дієти, виглядають років на 20 молодше за свій хронологічний вік, вважає доктор Джонсон.

Численні дослідження показують, що щиро віруючі люди живуть довше. Більше того, виявлено, що жінки, які відвідують церкву раз на тиждень, втричі менше підлягають ризику передчасної смерті. У віруючих людей нижчий кров'яний тиск, рідше виникають інфаркти, вони не схильні до суїциду, швидше відновлюються після хвороби або операції і взагалі у них міцніший імунітет. На думку американських вчених, церква благотворно впливає на психологічний стан людини, допомагає розслабитись.

Багато медичних працівників і психологів вважають, що тривале накопичення неприємних емоцій може спровокувати розвиток ряду різних захворювань, у тому числі гіпертонії, серцево-судинних хвороб і навіть раку.

Позитивні емоції, які спричиняють сміх, знижують рівень гормонів стресу і активізують клітини імунної системи. На думку багатьох дослідників, чим більше позитивних емоцій, посмішок, тим менше хвороб і далі старість. Неприємні спогади, негативні думки є занадто великим навантаженням на серцево-судинну систему.

Коли ми журимося, наш організм виробляє речовини, які пригнічують і руйнують його захисні сили, і перестає чинити опір хворобам. У медичній

практиці відомі випадки, коли у людини починалось онкологічне захворювання, і організм сам переборював його, розсмоктуючи пухлини. Сам хворий про це нічого не знав. Просто він був енергійним, бадьорим, життєрадісним, і це допомогло перемогти біду. На думку лікарів, якщо би він дізнався про свою хворобу, вихід був би печальним.

Доведено, що від сміху організм з більшою енергією виробляє γ -глобулін. Результати досліджень також показують, що, наприклад, перегляд гумористичних відеофільмів стимулює імунну систему пацієнтів: рівень антитіл та інших захисних клітин в їхній крові стає вищим, ніж до перегляду. На думку деяких дослідників, сміх – це природний антибіотик, який вбиває хворобливі мікроорганізми, допомагає подолати будь-яке захворювання, захищає нас від нервових зривів. На думку Стендаля, сміх вбиває старість. Посміхаючися, ми видозмінюємо тонус м'язів усього обличчя, що в свою чергу змінює думки та емоції на краще.

Дружба і спілкування також стимулюють імунну систему. Проте дослідження показують, що у людей товариських імунна система функціонує на 20% краще, ніж у людей замкнених. Спеціалісти припускають, що соціальні контакти допомагають справлятися зі стресами.

Різноманітні стреси виснажують організм, погіршують самопочуття і вкорочують життя.

Медики дійшли висновку, що неправильний образ життя призводить до серцевих розладів, спотворене відношення до праці – до захворювань мозку. Часті стреси кохання викликають хвороби легенів і щитовидної залози. Заздрість – основа для розвитку захворювань стравоходу, а надмірне честолюбство обов'язково пошкодить роботі надниркових. Ревнощі – це також хвороба, яка псує роботу нирки. Страх перешкоджає роботі печінки. Хитрість губить шлунок. Статева невпевненість відобразиться на роботі підшлункової залози: може навіть розвинути діабет. В усіх людей із захворюваннями хребта спостерігається зацікленість на минулому. У жовчних за характером осіб, природно, виникають ускладнення з жовчним міхуром, а у людей підозрілих – з лімфою.

Вчені університету Пенсільванії висунули гіпотезу, що жінки живуть довше за чоловіків тому, що краще сплять. У середньому жінка проводить у

фазі глибокого сну 70 хв. протягом ночі, тоді як чоловік тільки 40 хв. Генетично жіночий організм краще пристосований до того, щоби просипатися серед ночі, коли жінка встає, наприклад, щоб нагодувати малюка. Саме завдяки спеціальним генам їй краще вдається засипати. Автори гіпотези вважають, що, коли подальші дослідження підтвердять її істину, з'явиться можливість скоротити розрив у тривалості життя, навчивши чоловіка краще спати.

Яким чином за допомогою генно-інженерних заходів можна вплинути на тривалість життя? Корекції ДНК можна досягнути, замінюючи варіант, який вже присутній в тканинах пацієнта, на інший, екзогенного походження, що має необхідні властивості. Або ж, при відсутності в геномі реципієнта бажаної послідовності, вона може бути вбудована в раніше вибраний локус.

Методи введення певних послідовностей ДНК в окремі клітини розроблюються вже давно і стали невід'ємною частиною методів молекулярної біології. В клітини бактерій ДНК вводиться у формі плазмід, в клітини еукаріот – за допомогою плазмід та інших векторів в комплексі з ліпідами, які полегшують проникнення вектора. Використовуються такі методики як електропорація чи трансформація за допомогою вірусних векторів.

Однак, існують очевидні і глибокі розходження між доставкою генетичного матеріалу в окремі клітини, які вирощуються в штучному середовищі, і доставкою того ж матеріалу в тканини багатоклітинного організму. Завдання по введенню ДНК в окремі клітини полегшується можливістю проведення селекції. А саме, разом з цільовим геном у вектор вбудовується послідовність, яка забезпечує, наприклад, стійкість до антибіотику, за допомогою якого в подальшому проводиться селекція. Ефективність трансфекції можна також перевірити, вставляючи у вектор послідовності, які кодують флуоресцентні білки.

До вектора, який можна було б застосовувати для доставки необхідної ДНК, наприклад, в нейрони головного мозку, висуваються набагато більш високі вимоги. Він повинен забезпечувати ефективну трансформацію, не бути токсичним і не пошкоджувати послідовності інших клітинних генів.

Найефективними для трансформації є вектори, спроектовані на основі вірусів. На протязі своєї еволюції віруси вже виробили ефективні пристосування для проникнення в клітину господаря і вбудовування своєї ДНК в її геном, якщо мова йде про інтегруючі віруси. Під час дизайну векторів використовуються вірусні варіанти, які нездатні розмножуватися в клітині, тобто такі, що несуть тільки ті геноми, які необхідні їм для проникнення через мембрану та експресії послідовності, що переноситься. Однак, необхідно враховувати, що вірусні геноми можуть перебудовуватися на протязі певного часу, а також використовувати ферменти, які кодуються іншими вірусами, для розмноження.

Серед обмежень подібних методик потрібно враховувати максимальний розмір генетичної послідовності, яку можна внести у вірусний геном, а також можливість імунної відповіді організму на вектор, який може бути розпізнаний лімфоцитами як звичайний вірус. Більшість вірусних векторів, які використовуються на даний час, створена на основі ретровірусів та аденовірусів. Однак (переважно у наукових дослідженнях) використовуються й інші віруси, такі як поксвіруси, бакуловіруси, Епштейн-Барр, і т.п.

На рис.5.5 представлений процес внесення здорового гена в геном ретровірусу і за допомогою такого ретровірусу його доставка у нездорові клітини, що призводить до «одужання» клітин.

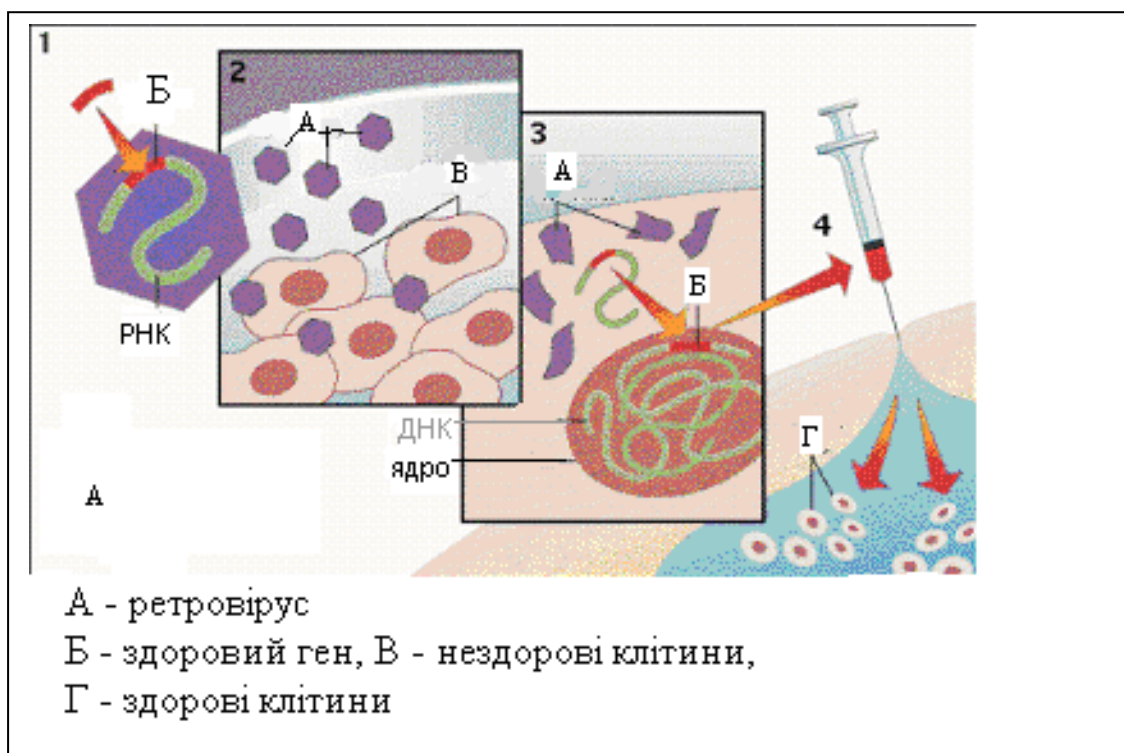


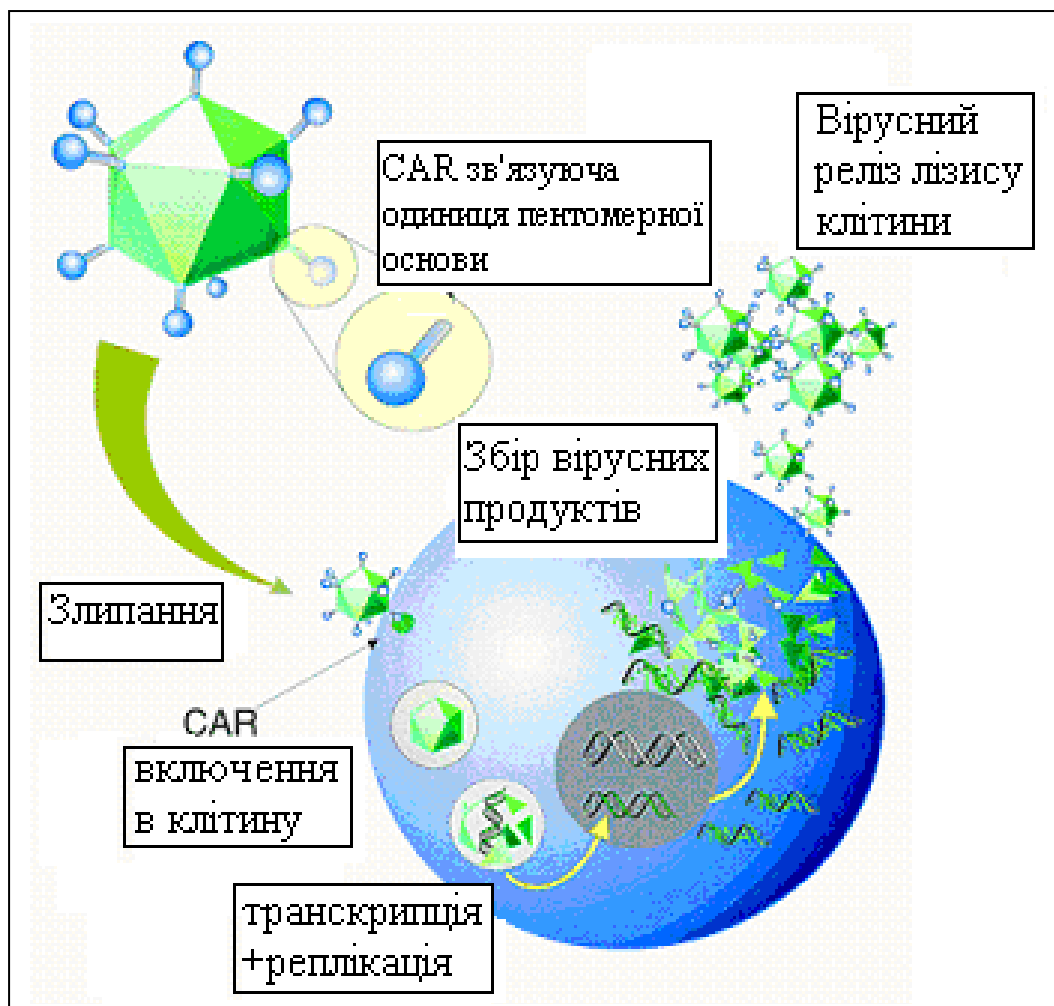
Рис.5.5. Використання ретровірусів у генній терапії.

Ретровіруси містять РНК в якості генетичного матеріалу. При зараженні клітини на матриці вірусної РНК за допомогою зворотної транскриптази (ревертази) синтезується її ДНК копія, яка згодом вбудовується в геном за допомогою іншого вірусного ферменту – інтегрази. Під час використання в якості векторів ретровіруси мають суттєвий недолік – неспецифічність інтеграції. Послідовність, яка вбудовується, може опинитись всередині послідовності будь-якого гену клітини-господаря і таким чином порушити його функцію. Однією з різновидностей ретровірусів є лентівіруси. Їх головна перевага в якості векторів полягає у здатності заражувати клітини, які не діляться.

Ретровірусні вектори успішно використовувались для лікування X-SCID - X-зчепленого важкого комбінованого імунodefіциту та ADA-SCID – й

імунодефіциту, який викликаний дефіцитом аденозиндезамінази. Починаючи з 1990 р. було вилікувано 17 осіб, проте така робота була припинена, коли виявилось, що у 4 пацієнтів виникла лейкемія. Припустили, що онкологічне захворювання виникло завдяки порушенням функції генів-онкосупресорів в результаті випадкової інтеграції (інсерційного мутагенезу). Однак, можливо, причиною стала експресія (під контролем вірусного промотора) гена *gamma s*, який вводився хворим з X-SCID.

В якості генетичного матеріалу використовують дволанцюгову ДНК. Вірусна ДНК не вбудовується в геном клітини, що виключає можливість інсерційного мутагенезу (рис.5.6). Модифікації аденовірусів дозволяють видаляти із їх геному майже всю вірусну ДНК (залишаючи лише ділянку, яка необхідна для упакування ДНК у віріон) і замінювати її на визначені для вбудовання послідовності.



Один з найбільш ефективних методів, розроблених на основі аденовірусних векторів, отримав назву Suicide Gene Therapy («самовбивча генна терапія»). Ракові клітини трансформуються вектором, що несе ген тимідинкінази, та який кодує, перетворюючи препарат ганцикловір на токсичну речовину. Хоча, клінічні дослідження показали, що існуючі вектори ще досить токсичні.

Окреме перспективний напрямок представляє собою генетична інженерія ембріонів на ранніх стадіях розвитку, або корекція генетичного матеріалу ще на стадіях заплідненої яйцеклітини чи статевих клітин. В цьому випадку виключаються забруднення, пов'язані з доставкою генетичного матеріалу в дорослий організм. Але, як і завжди при роботі з людськими ембріонами, виникає багато етичних аспектів. Робота по введенню гену зеленого флуоресцентного білка в ембріон людини, проведена у Корнельському університеті, викликала гучну критику. Необхідно бути впевненим, що намічена модифікація не заподіє ніякої шкоди майбутній дитині.

На даний час подібні роботи заборонені у більшості країн з етичних міркувань. У вищенаведеному дослідженні, на думку авторів, ген флуоресцентного білку був введений у попередньо відомий не життєздатний ембріон. Проте, якщо подібні технології покажуть свою безпечність та ефективність, їх можна буде використовувати для виправлення цілого ряду спадкових захворювань – результат буде розповсюджуватись і на нащадків цих дітей. Загальний підхід для досягнення тканинспецифічної активності екзогенних послідовностей полягає у використанні відповідних тканинспецифічних промоторів. Наприклад, у вірусному векторі природній вірусний промотор замінюється на певний промотор організму господаря. Причому транскрипційний фактор, який зв'язується з даним промотором, присутній тільки в певних тканинах (в тих, де необхідно провести корекцію експресії). Для боротьби з онкологічними хворобами був розроблений аденовірусний вектор, в якому промотор E4 був замінений на людський

промотор SPB, що активується тільки в епітелії. Для лікування ракових метастазів у кістковій тканині був запропонований вектор, який містить промотор остеокальцина.

Інше джерело специфічності полягає у характері взаємодій віріона з оболонкою клітини-господаря. Більшість вірусів заражують тільки певні типи клітин. Білки, які знаходяться на поверхні віріона, взаємодіють з клітинними білками та олігосахаридами. Специфічні клітинні білки, наприклад, рецептори, запускають структурні зміни у вірусній оболонці та активують проникнення всередину клітини. Змінюючи склад оболонки віріона чи упаковуючи вірусну ДНК в оболонку іншого, більш менш специфічного віруса, потенційно можна досягти доставки тільки в певну тканину. За допомогою подібної технології був розроблений лентивірусний вектор, який з високою специфічністю заражає тільки клітини, що несуть рецептор CD20.

Одним з методів виправлення дефектних генів може послужити застосування сайт специфічних нуклеаз - ферментів, здатних вносити дволанцюгові розриви в ДНК в строго певній ділянці. У поєднанні з гомологічною рекомбінацією ця методика дозволить замінювати небажану послідовність гена на «здорову», що вноситься з тим же вектором. Будь-який багатоклітинний організм володіє значною різноманітністю транскрипційних факторів, котрі дізнаються про різні ділянки ДНК. Володіючи інформацією про те, яким саме чином структури білкових доменів транскрипційних факторів дозволяє їм зв'язуватися з певними ДНК - послідовностями, можна створити штучні ДНК -зв'язуючі домени. Шляхом з'єднання таких доменів з спочатку неспецифічної нуклеази може бути отриманий фермент, що розпізнає, наприклад, певну мутацію, і вносить розрив у даний ген.

Дослідження з виявлення генів, які регулюють стовбурові клітини, звичайно приймають одну з двох різних ліній дослідження. Безпосередній генетичний підхід починається з вимірювальних фенотипових відмінностей до генетичного поліморфізму. Число відкритих локусів, відповідальних за специфічні для стовбурових клітин фенотипи і функціонування збільшується з

великою швидкістю внаслідок успіху обох підходів. Ці локуси регулюють стовбурові клітини внутрішніми (клітинно-автономними) та / або зовнішніми механізмами і диктують долю стовбурових клітин. Під час процесу старіння стовбурові клітини зазнають кількісних і якісних змін, які, за припущеннями, впливають як на швидкість старіння, так і на тривалість життя організму.

На самих ранніх стадіях ембріонального розвитку клітини здатні до необмеженого поділу і потім диференціюватися в різні типи клітин тіла. Недавні дослідження виявили, що велика частина регенераторного потенціалу ембріональних стовбурових клітин зберігається невеликою популяцією клітин у більшості тканин дорослого організму. Міжклітинні сигнали, які контролюють проліферацію, диференціювання і виживання стовбурових клітин були ідентифіковані і включені до набору різних факторів росту, цитокінів і молекул клітинної адгезії. Внутрішньоклітинні механізми, які визначають долю стовбурових клітин також були виявлені й включають встановлені шляхи вторинних месенджерів, нові транскрипційні фактори та теломеразу. Можливість того, що зменшення кількості або пластичності популяцій стовбурових клітин робить внесок у старіння і пов'язані зі старінням хвороби. Чудова пластичність стовбурових клітин передбачає, що ендогенні або трансплантовані стовбурові клітини можуть бути використані у шляхах, які дозволять їм відшкодовувати втрату дисфункціональної клітинної популяції при хворобах від нейродегенеративних і гематопоетичних розладів до діабету і серцево-судинної хвороби.

Роль стовбурових клітин у багаторівній організації структури тканини збільшує потенціал довголіття в багатоклітинному організмі. Ця роль може бути відповідальною за механізм еволюції самих стовбурових клітин. Успішний розвиток тканинної терапії та управління ними має проводитися з урахуванням принципів роботи цього механізму.

Старіння впливає кількісно та якісно на стовбурові клітини. Загалом якісні зміни більш важливі, оскільки вони впливають на потенціал самооновлення, потенціал розвитку і взаємодії з зовнішніми сигналами,

включаючи сигнали від строми. Хоча гематопоез зазвичай підтримується на нормальному рівні протягом нормального старіння, його функціонування знижується, коли стовбурові клітини піддаються стресу. Існує достатньо даних про зменшення здатності до самопоновлення, розвитку і зменшення числа потомства у старих стовбурових клітинах, які зазнали гематопоетичного впливу. Зроблено прогноз, що пластичність в потенціалі розвитку, якою володіють молоді стовбурові клітини, губиться на протязі старіння. У країнах Західної Європи та в деяких інших зростає кількість людей похилого віку серед населення. Вплив старіння на більшість фізіологічних функцій є погано вивченим та оціненим. Суспільна необхідність забезпечити поліпшення якості життя для цієї групи популяції вимагає більшої уваги до особливостей старіння в експериментальних дослідженнях. Дослідження популяцій стовбурових клітин ймовірно будуть плідними для старіючої верстви населення.

Стовбурові клітини визначаються за їх великою здатністю до самовідновлення, але, тим не менш, є безліч свідчень зниження функціонування стовбурових клітин під час старіння. У той час як внутрішньоклітинні відновлення і захисні механізми визначають тривалість життя окремих клітин, існують аргументи, що соматичні стовбурові клітини визначають тривалість життя всієї тканини, і тому відіграють ключову роль в процесі старіння організму. Нещодавно було показано, що потенціал розвитку соматичних стовбурових клітин може бути набагато більшим, ніж вважалося раніше. Хоча механізми, які регулюють пластичність стовбурових клітин, далекі від розуміння, варто обговорити потенційну доцільність цих відкриттів для пізнання процесу старіння.

Таким чином, під час процесу старіння стовбурові клітини зазнають як кількісних, так і якісних змін, які, як припускають, впливають на швидкість старіння і на тривалість життя організму. Згасання кісткового мозку і зменшення його здатності продукувати судинні прогеніторні клітини, відповідальні за відновлення артерій, сприяє розвитку атеросклерозу і його тромбоемболічних ускладнень. Гематопоез зберігається протягом всього життя,

хоча здатність справлятися з гематологічним стресом зменшується у літньому віці.

Питання для самоконтролю

1. Що таке «апоптоз»?
2. В чому полягає різниця між апоптозом і некрозом?
3. Охарактеризуйте прогерії.
4. Чи є процес старіння генетично обумовленим?
5. Назвіть методи, які на Вашу думку, здатні збільшити тривалість життя.
6. Які фактори впливають на тривалість життя?
7. Розкажіть про генетичні аспекти продовження тривалості життя.
8. Які фактори, на Вашу думку, найбільше впливають на тривалість життя людини? Відповідь обґрунтуйте.
9. Назвіть імена вчених, які займалися чи займаються проблемами, пов'язаними з омолодженням організму.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бердишев Г.Д., Топчій Н.М., Тищенко О.М., Демидов С.В. Зміни структури хроматину протягом старіння. – К.: Фітосоціоцентр, 2007. – 104 с.
2. Бердишев Г., Топчій Н., Тищенко О., Демидов С., Топчій Ю. Запрограмована загибель клітин// Науковий вісник Академії наук вищої школи України. – 2004. - № 28. – С.155-180.
3. Демидов С.В., Бердишев Г.Д., Топчій Н.М., Черненко К.Д. Генетика. - К.: Фітосоціоцентр, 2007. – 412 с.
4. Демидов С.В., Топчій Н.М., Бердишев Г.Д., Г.І. Климнюк, Гавриленко Т.І. Генетика постнатального онтогенезу. – К.: Фітосоціоцентр, 2006. – 251 с.
5. Топчій Н.М., Бердишев Г.Д., Демидов С.В. Запрограмована загибель клітин, захворювання і деякі підходи до їх лікування// Лікарський вісник Української медичної асоціації Північної Америки. – 2004. – Т.49, N 2 (152). – С.9-25.
6. Топчий Н.Н., Бердышев Г.Д., Тищенко Е.Н., Демидов С.В., Топчий Ю.Н. Запрограммированная гибель эукариотических клеток// Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2004. - №4. – С. 12-39.

7. Топчий Н.М., Бердишев Г.Д., Демидов С.В. Генетичні механізми апоптозу// Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія – 2003. – Вип. 40. – С. 68-69.
8. Edwards M G, Anderson R M, Yuan M., Kendzioriski C M. Gene expression profiling of aging reveals activation of a p53-mediated transcriptional program// BMC Genomics. – 2007. – V.80, N 8. – P. 1471-1484.
9. High K.A. Gene therapy: the moving finger// Nature. - 2005. – V. 435. – P. 577–579.
10. Reed J. Mechanism of apoptosis // Am. J. Pathol. – 2000. – V. 157, № 5. – P. 1415 – 1430.
11. <http://www.sciencevsaging.org/en/node/81>
12. <http://www.age40.ru/progeria.html>
13. <http://elementy.ru/news/430235>
14. http://proprostatit.info/med_enc/progerija.html
15. <http://medforce.ru/Pediatrica/Progeriya-sindrom-prejdevremennoie-starosti.html>
16. <http://humbio.ru/humbio/starenie/00016b93.htm>
17. <http://elibrary.ru/item.asp?id=880720>
18. <http://www.dtreg.com>
19. http://www.suite101.com/reference/aging_age_related_genes

ЧАСТИНА 2

ОСНОВИ МЕДИЧНОЇ ГЕНЕТИКИ

Розділ 1

Сучасний стан та перспективи розвитку медичної генетики

Сучасний стан практичної і теоретичної медицини характеризується поширенням застосування генетичних методів при обстеженні хворих. Це обумовлено необхідністю ранньої диференційної діагностики нозологічної форми захворювання, тому що сприяє індивідуалізації при обранні комплексу терапевтичних заходів, своєчасному початку лікування, а у випадках визначення генетичної схильності до патологічного процесу, допомагає в певних випадках мінімізувати ризик реалізації захворювання шляхом проведення профілактичних маніпуляцій.

Чому саме генетичні дослідження стали предметом прискіпливої уваги практичної медицини. Це обумовлено декількома обставинами:

1. Накопичення знань про закономірності індивідуального розвитку організму людини дає підставу визначити, що процеси росту і розвитку біологічної системи, якою є організм людини як у пренатальний так і постнатальний періоди являють собою реалізацію в певних умовах середовища конкретних генетичних програм, які індивід успадкував від батьків через статеві клітини. Тобто, будь які аномалії розвитку можна розглядати як порушення в тих чи інших ланцюгах реалізації даної генетичної програми.
2. Як свідчать дані популяційних досліджень, сучасні тенденції у зміні структури захворюваності спрямовані на підвищення кількості генетично обумовлених захворювань та патологічних станів людини. За даними світової статистики приблизно 10% усіх немовлят з'являються на світ з тим чи іншим генетичним дефектом, а значення таких дефектів у пренатальній патології ще вища. Встановлено, що, патологія спадкового характеру є причиною майже 50% спонтанних викиднів, 25% випадків природних каліцтв і вад розвитку, пренатальної смертності - 15%. Крім того, 10% новонароджених мають спадкові дефекти. При цьому вже відомо більш ніж 2500 нозологічних форм генетично обумовлених хвороб, які торкаються майже усіх органів і функцій організму.
3. Світовий рівень розуміння етіології і патогенезу цілої низки захворювань свідчить про вагомий внесок генетичної компоненти спадкової схильності до ризику реалізації патологічного процесу. До таких захворювань відносять так звану, мультифакторіальну патологію – онкогематологічні захворювання, групу психічних і серцево-судинних захворювань та інших.

4. Згідно сучасним уявлень патологія є результатом взаємодії патогенного агента (екзогенного або ендогенного) з організмом. З точки зору генетики кожний організм має індивідуальний неповторний набір генетичних структур і тому результат взаємодії організму з патогенним фактором буде теж строго індивідуальним. З цих позицій має місце необхідність розшифровки не тільки механізмів загальних реакцій організму але і специфічних проявів у конкретного індивіду, що надасть змогу виділити причини відмінних особливостей розвитку патології на рівні конкретного пацієнта.

У зв'язку з розвитком в галузі практичної медицини сучасних біотехнологій відносно боротьбі з інфекційними, токсичними факторами і травматизмом під час пологів, суттєво підвищився рівень саме спадкової патології серед усіх захворювань людини. Генетики визнають, що в наш час немає такої патології, до якої не була би причетна спадковість.

Отже, без перебільшення можна говорити про велике значення загальної і молекулярної генетики для теоретичної і практичної медицини. Задача полягає в оволодінні основами медичної генетики широкому навчально-науковому колу для розуміння механізмів і методів генетичного обстеження та аналізу стану хворого для покращання діагностики, лікування і профілактики реалізації ризику генетичної схильності до різних патологічних станів.

2.МЕТОДИ МЕДИКО- ГЕНЕТИЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ СПАДКОВОЇ ТА МУЛЬТИФАКТОРІАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ

Під час медико-генетичних досліджень використовується широкий спектр спеціальних методів, які дозволяють вирішити як наукові, так і прикладні завдання. У першому випадку основний інтерес спрямований на встановлення ролі спадкових факторів у виникненні того чи іншого захворювання і вивчення його етіопатогенетичних механізмів, у другому – на розробку способів діагностики і профілактики спадкової патології у родин, де є хворі або носії генів цих хвороб.

Розглянемо методи, які часто використовують в медико-генетичних дослідженнях.

2.1 Клініко-генеалогічний метод

Даний метод був запропонований Ф. Гальтоном у XIX ст. і в наш час є основним в медичній практиці. Він включає клінічне обстеження пацієнта (**пробанда**), збирання повного анамнезу відносно наявності аналогічної патології серед членів родини й низки поколінь за батьківською та материнською лініями, відносно репродуктивної функції, обстеження та опитування максимальної кількості родичів пробанда.

Таким чином, головна мета клініко-генеалогічного методу – на підставі опитування всіх членів аналізуючої родини скласти родовід, за яким можна простежити ту чи іншу ознаку в ряду поколінь.

Всіх дітей однієї подружньої пари називають **сибсами**. Якщо діти в сім'ї мають спільного лише батька, чи тільки спільну матір, то їх називають **напівсибсами**.

Для складання родоводу необхідно зібрати наступні дані (зовнішність пробанда): зріст, пропорційність та симетричність розвитку тіла, форма голови, ріст і характер волосся, форма і розташування вушних раковин (наявність

насічок на мочках вуха), брів, очних щілин, відстань між ними, характеристика лоба, носа, ротового отвору; опис губів (ямочки на слизовій оболонці нижньої губи, язика, нижньої та верхньої щелепи; наявність і кількість зубів, особливості їх росту; висота твердого піднебіння; форма і розміри шиї, грудної клітини; характер особливостей кінцівок, плечового і тазового поясів; кількість та форма пальців; розташування і позиція долонь, підонів. Обов'язково визначають чи відповідає біологічний вік паспортному, описують фізичний та психічний стан дитини. Велику увагу приділяють стану шкіри - еластичності, вологості, пігментації, наявності атипових складок та волосяному покриву.

Правильний діагноз залежить, у великій мірі, від виявлення мікроаномалій розвитку. Дослідження стану внутрішніх органів традиційними методами пальпації, перкусії та аускультатії завершує клінічне обстеження пацієнта. Принципове значення мають також наступні дані: перебіг вагітності, термін пологів, зріст і маса тіла дитини при народженні, акушерсько-гінекологічний анамнез матері. Необхідним є також опитування і клінічне обстеження максимальної кількості родичів пробанда для виявлення носіїв патологічних генів, як рецесивних так і домінантних, у тому числі і генів зчеплених зі статтю.

Рецесивні алелі генів проявляються лише в гомозиготному стані, домінантні як у гомозиготному так і у гетерозиготному наборі. Вираженість клінічної симптоматики залежить від пенетрантності та експресивності цього гена.

Пенетрантність – це частота або ймовірність прояву якогось гена. Ця величина виражається відсотковим відношенням кількості осіб, у яких ген проявляється у фенотипі, до всіх носіїв даного гена.

Експресивність - це ступінь фенотипового прояву гена, міра «сили» гена, яка визначається за силою розвитку і прояву ознаки. У медичній генетиці термін «експресивність» часто використовується саме для характеристики повноти прояву синдрому, а не лише одного конкретного симптому. Часто експресивність моногенного синдрому залежить від статі пробанда. Як

результат клініко-генеалогічного обстеження сім'ї є опис патологічного синдрому, складання родоводу, визначення типу успадкування патології та встановлення попереднього діагнозу.

Для складання родоводу використовують уніфіковані графічні символи. У родоводі, або генеалогічному дереві, покоління позначають римськими цифрами, кожну людину в одному поколінні – арабською, а особу, яка звернулась до лікаря (пробанд), - стрілкою. Кожний член сім'ї має свій номер, що означає його місце в родоводі.

Після встановлення попереднього діагнозу (на підставі клініко-генеалогічного анамнезу) проводять диференціальну діагностику з генокопіями (захворювання що мають одну, або схожу клініку, але визначаються різними генами) і фенокопіями (неспадкові хвороби, що копіюють спадкові) даної патології, верифікація діагнозу.

З цією метою проводять консультації з кваліфікованими фахівцями: окулістами, невропатологами, психіатрами, кардіологами, ортопедами та лікарями інших спеціальностей.

Щоб верифікувати діагноз призначають додаткові лабораторні дослідження; рентгенографію черепа, кінцівок, хребта (для визначення кісткового віку та виявлення конкретних аномалій), загальний аналіз крові й сечі, дослідження функціонального стану серцево-судинної, травної дихальної та сечостатевої систем. Проводять УЗД. У деяких випадках вирішальним для діагностики є визначення імунного та ендокринного статусу пацієнта. Важливим є також гістологічне дослідження біопсійного матеріалу.

Багато із спадкових синдромів зустрічаються в популяції дуже рідко (1×10^3 - 1×10^6). В зв'язку з цим для верифікації діагнозу слід порівняти даний випадок з описаним в літературі (атласи, керівництва, комп'ютеризовані діагностичні програми типу «Possum»). Рекомендуються також консультації генетиків. У випадках спадкової патології правильний діагноз визначає не тільки адекватну поведінку хворого, прогноз його життя і перебіг

захворювання, але і сприяє формуванню адаптивного середовища, вибір професії, прогноз народження здорових або хворих дітей.

Під час складання родовідних таблиць користуються умовними позначеннями, які запропоновані Г. Юстом у 1931 р. Фігури родоходу розміщуються горизонтально (чи по колу), в один рядок по поколінням. Зліва кожне покоління позначають римською цифрою, а індивіди в даному поколінні – арабськими. Родовід потрібно читати, починаючи з пробанда. Приклади позначення родоходу представлені на рис.1.

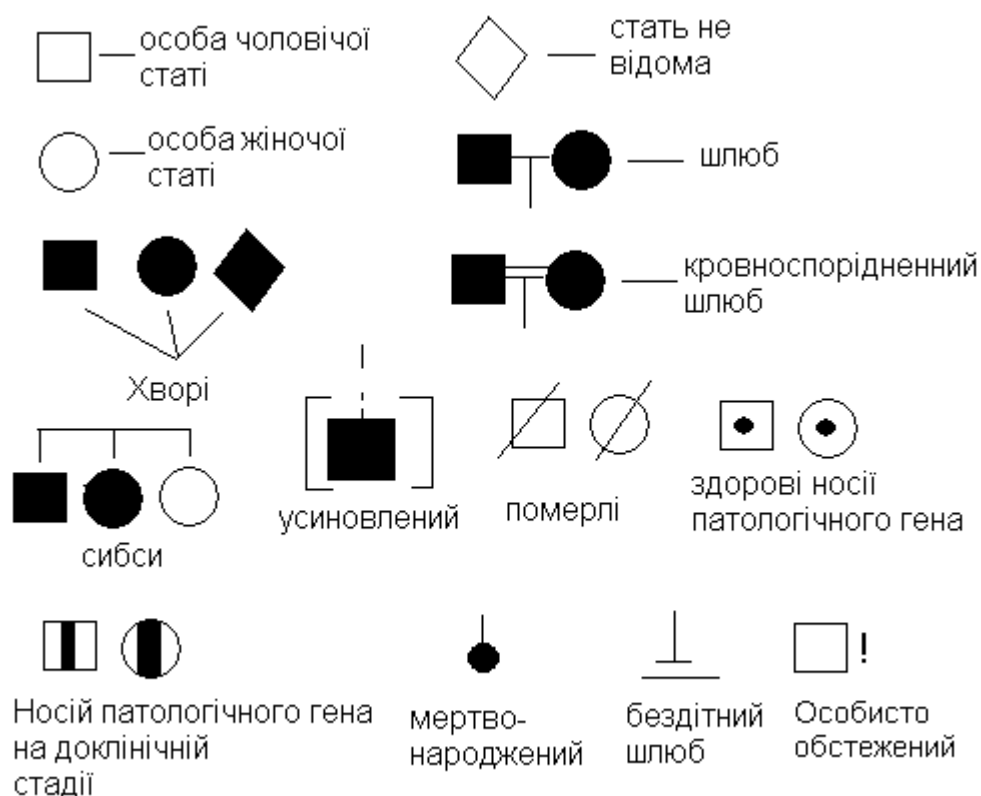


Рис.1. – Символи, які використовують при складанні родоходів.

Після складання родоходу до нього додається письмовий додаток – легенда родоходу, в якій повинні бути наведені: а) дані клінічного і неклінічного огляду пробанда; б) відомості про результати особистого огляду родичів пробанда; в) дані про співставлення результатів особистого огляду пробанда з даними опитування його родичів; г) дані про родичів, які живуть в інших місцевостях, отримані анкетним способом від оглянувших їх місцевих лікарів; д) висновок про тип успадкування хвороби чи ознаки, що вивчається.

На підставі геніалогічного дослідження можна зробити висновок про характер тої чи іншої ознаки (спадкова вона чи ні), про тип успадкування (аутосомно-домінантний, аутосомно-рецесивний чи зчеплений зі статтю), про зиготність пробанду (гомо- чи гетерозиготний за даною ознакою), а також про ступінь пенетрантності чи експресивності певного гену.

У генетиці існують поняття апріорна вірогідність (дається висновок на підставі вивчення родоводів пробанда і дослідження його фенотипу, але без врахування даних огляду дітей) та апостеріорна вірогідність (враховуються дані апріорної вірогідності і дані огляду дітей пробанда). Генеалогічний метод на перший погляд здається простим, однак, щоб виключити помилки, необхідне скрупульозне дослідження пробанда, і насамперед визначення типу успадкування. Оскільки більшість захворювань гетерогенні і вони можуть мати різні типи успадкування, то при однакових клінічних проявах прогноз нащадків може бути різний.

Ми вже говорили про те, що гени, розміщені в одному і тому ж локусі двох гомологічних хромосом і які визначають одну і ту саму ознаку, називаються алелями. Так, в диплоїдному організмі гомологічних хромосом дві, тож й алелей буде дві. При трисомії алелей - три. Але в популяції диплоїдних організмів може бути декілька алелів одного і того ж гена. Наприклад, групи крові системи АВО визначаються трьома алелями гена I, а локус для цих алелів тільки один, тому в популяції людей можливі різні їх комбінації I^0 , I^0 ; $I^A I^0$; $I^A I^A$; $I^B I^0$; $I^B I^B$; $I^A I^B$. Якщо гени в локусі ідентичні, то говорять про гомозиготність даного індивіду за даним геном. Так, люди з антигенами 00, AA, BB є гомозиготними, а індивіди A0, B0, AB – гетерозиготними. Оскільки в людському організмі приблизно сто тисяч генних локусів, то він гомозиготний за одними генами і гетерозиготний за багатьма іншими. В цьому проявляється різноманіття індивідів та їх унікальність в популяції людини.

У генетиці існують поняття генотип і фенотип. Нагадаємо, що генотип – це сукупність всіх взаємодіючих генів даного організму, тобто його генетична конституція, а фенотип – це зовнішній прояв генотипу, тобто сукупність ознак і

властивостей організму. У наведених вище прикладах фенотип осіб другої групи крові A(II) і він має два генотипи: $I^A I^A$ і $I^A I^0$. Фенотип осіб третьої групи крові B(III) має два генотипи: $I^B I^B$ і $I^B I^0$. В гетерозиготному стані не всі гени однаково проявляють себе у фенотипі. Один з них буває сильнішим, а інший слабшим. В такому випадку в гетерозиготному стані у фенотипі проявиться більш сильний алель (він називається домінантним). Більш слабший ген тут не проявиться і такий ген називається рецесивний, тобто пригнічений. Якщо в гетерозиготному стані обидва алеля рівноцінні, то вони обидва і проявляться у фенотипі. Такий стан двох алельних генів називається кодомінантним, так, наприклад, у випадку АВ (IV групи крові).

Відомі і більш складні взаємодії між алельними генами. наприклад, неповне, або проміжне, домінування. Ген, який визначає кучеряве волосся, домінує над геном прямого волосся, але при сполученні цих генів у фенотипі проявляється хвилясте волосся. За проміжним типом успадковується альбінізм, пігментний ретиніт, лейцином, фенілкетонурия та інші.

Один ген може впливати на багато ознак (створює множинний плейотропний вплив). Так, ген фенілкетонурии визначає світлий колір волосся, гіпотонію, олігофренію, зміну серцево-судинної і видільної систем та ін. ознаки. При захворюванні Марфана відмічається арахнодактилія (“павукоподібні” пальці), гіпотонія, вивих кришталика, аневризми великих судин, які обумовлені послабленням сполучної тканини в цих органах, і багато інших аномалій.

Взаємовідносини між неалельними генами більш складні. Тут можливе доповнення одного гена другим у розвитку тої чи іншої ознаки, чи супресія (пригнічення дії гена іншим неалельним геном). Ці явища добре вивчені в рослинному світі і на тваринах (гребінь півня). У людини явище епістазу вивчене менше. Так, брахідактилія успадковується як аутосомно-домінантна ознака. Однак існує форми цієї патології: різке укорочення пальців. Це можна пояснити впливом неалельного гена модифікатора, який в домінантному стані пригнічує прояв гену брахідактилії.

Інший приклад. Група крові Левіс (Le) визначається одним геном, а секретарство антигенів групи крові ABO у слині – іншим неалельним геном. Якщо ген, який визначає секретарство (Se), знаходиться в рецесивному стані, то спостерігається секретарство антигенів ABO і визначається група крові Левіс. Якщо ген секретарства знаходиться в домінантному стані, то антиген групи крові Левіс не виявляється і значно зменшується секреція антигенів групи крові ABO в слині.

Багато ознак організму залежать не від одного гена, а від дії багатьох генів, тобто обумовлені полігенно (наприклад, зріст людини, її маса, розумові здібності, багато захворювань – гіпертонічна хвороба, виразкова хвороба, шизофренія та ін.).

Орієнтовним методом визначення типу успадкування є сегрегаційний аналіз методом сибсів (метод Вайнберга). Визначається відношення числа хворих братів і сестер до загальної кількості сибсів в обстежених родинах. Якщо це відношення досягає 0,5 і вище, то можна говорити про домінантний тип успадкування даної ознаки чи хвороби. Якщо воно дорівнює 0,25, то йде мова про рецесивне успадкування. При більш низьких цифрах (в межах 0,1) мова йде про полігенний (мультифакторальний) тип успадкування.

Охарактеризуємо основні типи успадкування.

Домінантне успадкування

Теоретично індивіди, які несуть домінантну ознаку, можуть бути як гомозиготними, так і гетерозиготними. Однак, коли мова йде про хвороби з домінантним типом успадкування, то мають на увазі гетерозигот; оскільки гомозиготи за будь-яким домінантним захворюванням помирають на ранніх етапах онтогенезу, а у дорослому стані, як правило, не зустрічаються. Позитивні домінантні ознаки можуть знаходитися як у гомозиготному, так і у гетерозиготному стані. Вони підхоплюються добором і зберігаються у потомстві. Тому індивідів, які несуть шкідливу домінантну ознаку, розглядають у якості гетерозигот. Під час утворення статевих клітин у даного індивіда половина гамет буде містити нормальний ген, а друга половина – патологічний.

Для обговорення механізмів передачі домінантної ознаки або захворювання у потомстві розглянемо різні випадки комбінацій генів за допомогою буквених символів. Позначимо патологічний ген прописною літерою Д, а його нормальний алель – літерою д. Генотип досліджуваного індивіда за даним геном можна записати так – Дд. Якщо така людина укладає шлюб з нормальним за даною ознакою особою (дд) у потомстві від цього шлюбу можна чекати наступне розщеплення: половина дітей (50%) успадкують захворювання від свого батька і, можуть передати його половині своїх дітей. Хоча може виявитися, що всі діти успадкують тільки дефектний алель – здорові діти у цьому шлюбі не народяться. Навпаки, якщо вони успадкують лише здоровий алель, тоді у даній сім'ї патологічний ген відсіється. Однак, не у всіх випадках патологічний ген проявляється у фенотипі. Це залежить як від впливу інших неалельних генів, так і від факторів зовнішнього середовища.

За 100%-вої пенетрантності частота прояву домінантного гену дорівнює 0,5 (чи 50%). Пенетрантність різних генів при різних захворюваннях різна. Для багатьох захворювань вона визначається на підставі великої кількості спостережень за хворими, але її можна вирахувати і для кожної родини. Вона дорівнює відношенню фактичної кількості носіїв даної ознаки до кількості очікуваних носіїв цієї ознаки в даній родині. При домінантному типі успадкування потрібно очікувати половину (50%) дітей з цим спадковим захворюванням. Тоді пенетрантність даного патологічного гену дорівнює частці від поділу кількості уражених людей на очікувану кількість уражених. Наприклад, в деяких родинах, де один з подружжя хворів одним і тим же захворюванням, народилося 60 дітей, причому 10 з них успадкували ту ж хворобу, що і один з батьків. Тоді пенетрантність гену дорівнює $10/60:2=10/30=1/3$ чи 0,33 (чи 33%). Тому вірогідність повторного народження хворої дитини з домінантним захворюванням в цих родинах дорівнює не 0,5, а $0,5 \times 0,33 = 0,165$, чи 16,5%.

Відомо також, що не всі захворювання проявляються зразу ж під час народження дитини. Для багатьох домінантних спадкових захворювань існують

критичні періоди (критичний вік), в яких вони переважно проявляються. Наприклад, хореєю Гентингтона хворіють у віці 35-40 років. Пізно проявляється міотонія, полікістоз нирок. Тому при прогнозуванні подібних захворювань до уваги не беруться брати й сестри, які не досягли критичного віку.

В даному випадку протягом генеалогічного дослідження враховуються всі особи, які перейшли критичний вік, і половина всіх, які знаходяться в критичному віці за формулою Рюдина: пенетрантність гена $K \frac{200m}{2a(v-a)a'}$ %, де m – число хворих; v – число всіх спостережень; a – число осіб, які досягли критичного віку; a' – число осіб, які знаходяться в критичному віці. Наприклад, в 8 родинх зареєстровано 15 хворих на хорею Гентингтона. Всього в цих родинх 25 дітей. З них досягли критичного віку (35 років) 20 осіб, а не досягли цього віку – 5. Визначити пенетрантність гена хореї Гентигтона.

Підставляємо ці дані у формулу Рюдина:

$$K = \frac{200 \times 15}{2 \times 5(25 - 5) \times 20} = \frac{3000}{4000} = 0,75, \text{ чи } 75 \% .$$

Тобто, в цих родинх пенетрантність патологічного гена $K=75\%$.

Розглянемо декілька інших прикладів.

1. Отосклероз – аутосомно-домінантне захворювання з пенетрантністю патологічного гена 50%. Визначити ймовірність того, що син хворого також буде мати отосклероз. При домінантному типі успадкування розщеплення проходить у пропорції 1:1, чи 0,5. Пенетрантність гена також становить 0,5. Таким чином, ймовірність того, що син пробанда буде хворіти отосклерозом $0,5 \times 0,5 = 0,25$, чи 25%. Це приклад апріорної імовірності.

За генотипом дітей можна визначити генотип батьків і навпаки. Розглянемо інший приклад.

2. У матері перша група крові (00), а у батька четверта (AB). Чи можуть діти успадкувати групу крові одного з своїх батьків? Пишемо формулу

схрещування: $00 \times AB = A0$ і $B0$. Видно, що діти можуть мати другу ($A0$) і третю ($B0$) групу крові, але не можуть успадкувати групу крові ні одного з батьків (00 чи AB).

3. В родовому будинку переплутали двох хлопчиків. Батьки одного мають першу (00) і другу (AA , $A0$) групи крові, батьки другого – другу (AA , $A0$) і четверту (AB). У дітей перша і друга групи крові. Треба визначити, хто чий син. У перших батьків дитина може мати наступні групи крові: $00 \times AA$ чи $A0 = 00$, $A0$ (тобто першу чи другу). У других батьків дитина може мати наступні групи: AA чи $A0 \times AA = A0$, AA , $B0$, AB (тобто другу, третю і четверту).

Тобто, дитина з першою групою крові (00) була сином перших батьків, а дитина з другою ($A0$ чи AA) групою – син других батьків.

Домінантні ознаки чи захворювання передаються з покоління в покоління по вертикалі, тобто від батька (матері) до сина(доньки), внука (внучки) і т.д. Наприклад, досліджуваний чоловік страждає на вроджену катаракту, яка була у його матері й діда по материнській лінії. Дядько і тітка з боку матері і три двоюрідних брати (сини дядька) – здорові. Батько пробанда, тітка по батьківській лінії, а також дід і бабця з боку батька здорові. Дружина пробанда, її сестра, два її брата і батьки дружини здорові. З двох дітей пробанда син здоровий, а дочка страждає на вроджену катаракту. Складаємо родовід з чотирьох поколінь. З родоводу видно, що захворювання передається по вертикалі із покоління в покоління без пропусків, що свідчать про домінантний тип успадкування. Так визначається даний тип успадкування.

Аутосомно-рецесивне успадкування

Рецесивні захворювання проявляються тільки тоді, коли відповідні патологічні гени знаходяться в гомозиготному стані, оскільки нормальний алель домінує над рецесивним, який визначає хворобу. Рецесивні спадкові захворювання виникають у нащадків у тому випадку, коли обоє батьків являються гетерозиготними носіями патологічного гену (Aa). Після укладання шлюбу двох гетерозигот в їх потомстві можна очікувати наступні розщеплення: $Aa \times Aa = AA + 2Aa + aa$, тобто, гомозиготним по рецесивному алелю

(хворим) виявиться кожен четвертий нащадок. Наприклад, батьки гетерозиготи за геном фенілкетонурії. Яка імовірність народження хворої на фенілкетонурію дитини в цій сім'ї? Складемо родовід (рис.): $Aa \times Aa = AA + 2Aa + aa$, тобто, розщеплення 1:2:1 за генотипом.

Оскільки у гетерозигот (Aa) захворювання не проявляється, то за фенотипом розщеплення відбувається у співвідношенні 3:1. У результаті імовірність народження дитини хворою на фенілкетонурію, складає 25 %. Якщо один з батьків є гетерозиготним носієм патологічного алелю, а другий – гомозиготним за нормальним алелем, то у цієї подружньої пари хворих дітей не буде. Однак половина з них може бути носієм патологічного алельного гену, як і один з батьків, тобто, $AA \times Aa = AA + Aa + Aa = 2AA + 2Aa$.

Гетерозиготні носії патологічного гену можуть передати його своїм дітям, а ті, в свою чергу, онукам і т.д. В цьому підступництво і небезпека патологічних рецесивних генів. Вони можуть не проявлятися у багатьох або декількох поколіннях, але зберегтися у популяції, й у шлюбі двох гетерозигот за даним геном можуть народитися діти, хворі на те чи інше захворювання з рецесивним типом успадкування. Рецесивні захворювання поширюються у поколінні по горизонталі.

У генетиці існує також поняття про ступінь споріднення (γ) і коефіцієнт інбридингу (F). Ступінь споріднення – це доля тих генів, які у двох досліджуваних осіб ідентичні завдяки їх походженню від спільного предка.

Доля спільних генів у людей в залежності від ступеня спорідненості.

Коефіцієнт інбридингу – це імовірність того, що два алельних гена даного локуса, розміщеного у двох гомологічних хромосомах даної людини, ідентичні, тобто, одержані від одного предка. Це доля всіх локусів, які є гомозиготними у даного індивіда.

Коефіцієнт інбридингу визначається шляхом множення ступеню споріднення (γ) на $1/2$.

Так, у нащадка батька і дочки $F = 1/2 \times 1/2 = 1/4$, у нащадка дядька і племінниці $F = 1/4 \times 1/2 = 1/8$, у нащадка двоюрідних сибсів $F = 1/8 \times 1/2 = 1/16$,

у нащадка двоюрідних напівсибсів $F = 1/16 \times 1/2 = 1/32$, у нащадків троюрідних сибсів $F = 1/32 \times 1/2 = 1/64$.

Виходячи зі ступеня споріднення, можна розрахувати долю спільних генів у дітей у родинних шлюбах. Так, у дитини, яка родиться у шлюбі двоюрідних сибсів, спільних генів $1/8 + 1/8 = 1/4$, у шлюбі дядька і племінниці – $1/4 + 1/4 = 1/2$ і т.д., тобто, імовірність народження дитини з рецесивним успадкованим захворюванням у родинних шлюбах значно зростає. Якщо у популяції гетерозиготні носії зустрічаються з частотою $1/70$, то у шлюбі двоюрідних сибсів, у яких $1/4$ спільних генів, ризик народження хворої дитини дорівнює: $1/70 \times 1/4 \times 1/4 = 1/1120$ замість $1/20000$ у популяції. Але якщо у даній сім'ї немає спадкових захворювань, родинні шлюбні зв'язки шкідливо впливають на нащадків. Чим вищий ступінь споріднення, тим більша небезпека появи у потомстві різних аномалій, викликаних рецесивними генами. Це обумовлено тим, що людина гетерозиготна по багатьом рецесивним генам. При переході їх у гомозиготний стан виникає ряд спадкових дефектів розвитку.

Наведемо наступні приклади.

Два здорових брата оженилися на своїх двоюрідних сестрах. У них народилося четверо дітей, хворих на амавротичну ідіотію Тея-Сакса. Батьки чоловіка і жінки здорові, але вони також були рідними братом і сестрою. У даному випадку в четвертому поколінні патологічний ген поширився по горизонталі. В наступних поколіннях хворих на дане захворювання не було. Батьки хворих дітей, їх дід і баба були носіями гену амавротичної ідіотії в гетерозиготному стані – вони відзначені крапкою. Цей приклад характеризує особливості успадкування у близько споріднених шлюбах.

Рецесивне успадкування, зчеплене зі статтю

Ознаки, обумовлені генами, які розміщені у голандричній частині Y-хромосоми, передаються всім синам цього батька і не передаються дочкам. Рецесивні гени, які розміщені у X-хромосомі, передаються половині дочкам та половині синам. Оскільки у дочок дві X-хромосоми, то рецесивні гени, розміщені в одній із них, не проявляються (їх ніби прикриває нормальний

алель). Дочки будуть носіями цих рецесивних генів і, в свою чергу, передадуть їх половині своїх дітей. У синів тільки одна X-хромосома, тому вони є гемізіготними (половинними) за генами, розміщеними у X-хромосомі. Якщо у X-хромосомі знаходиться патологічний ген, то він може проявитися. Розглянемо кілька прикладів.

1. В сім'ї у здорових батьків народилася дитина хвора на гемофілію. У дядька пробанда по материнській лінії, а також у двоюрідного сибса по материнській лінії була гемофілія. Із родоводу видно, що хворіють особи чоловічої статті, а їх матері є носіями патологічного гену гемофілії. Це свідчить про те, що в даному випадку успадкування зчеплене зі статтю.

2. Від шлюбу батьків з нормальним зором народився син хворий на дальтонізм. Необхідно встановити генотип батьків. Ген, який визначає колір зору, локалізується в X-хромосомі і є рецесивним. У даному випадку можна скласти аналогічний родовід. Починати складання і читання родовіду необхідно з пробанда (в даному випадку – з хворого сина). Мати є носієм патологічного гену. Таким чином, за генотипами дітей можна визначити генотип батьків. Це приклад апостеріорної імовірності.

Захворювання, зчеплені з X-хромосомою, можуть спостерігатися й у жінок під час синдрому Тернера (45,XO) і протягом тестикулярної фемінізації (46,XY), тому що у таких хворих активна тільки одна X-хромосома.

Якщо ген, який визначає будь-яке захворювання, локалізований у Y-хромосомі, то його передача відбувається по чоловічій лінії.

Розглянемо наступний приклад. У пробанда зрослі пальці на ногах. У трьох його синів також зрослі пальці, а у двох дочок пальці нормальні. У сестер пробанда пальці нормальні, а у брата і батька пальці також зрослі. Із представленого родоводу на рис.18 видно, що даний дефект передається виключно по чоловічій лінії без пропусків.

Таким чином, дана ознака зчеплена з Y-хромосомою. В половых хромосомах розміщені також гени, які визначають домінантні ознаки і захворювання. Наприклад, у X-хромосомі локалізовані гени, які визначають

такі захворювання, як вітамінно-Д-резистентний рахіт, гіпоплазію зубів, фолікулярний кератоз. Якщо на це захворювання хворий чоловік, то він передасть своїм дочкам, а якщо мати, то половині синів і дочок. Деякі захворювання, обумовлені домінантними генами, локалізованими у Х-хромосомі, проявляються лише в осіб жіночої статі, оскільки для осіб чоловічої статі вони летальні (синдром Блоха-Сульцбергера, синдром Гольца, рот-лице-пальцевий синдром (РЛП), гіпоплазія шкіри й інші). У таких сім'ях народжуються діти тільки жіночої статі, плід чоловічої статі є нежиттєздатним. Що стосується патологічного гену в Y-хромосомі, то остаточно ця проблема не вивчена. Вважається, що у короткому плечі Y-хромосоми знаходяться гени, які визначають чоловічу стать, вушний гіпертрихоз, синдактилію, фактор дикобразу, а також ряд інших генів, які визначають ріст, силу м'язів, тембр голосу.

Встановлено, що у короткому плечі Y-хромосоми знаходяться гени, що визначають диференціацію сіменників, проявлення антигенів гістосумісності і розмір зубів. Властивості, що визначають ці гени, передаються від батька до сина (голандричне успадкування).

Крім успадкованих захворювань, зчеплених зі статтю, існує ряд захворювань, обмежених статтю. Вони обумовлені генами, розміщених в аутосомах, але гормони того чи іншого роду регулюють їх пенетрантність або експресивність. У людини статтю обмежені передчасне статеве дозрівання, гіпоспадія, поява лисини.

Якщо прослідкувати успадкування ознак, які визначаються двома генами, то механізм успадкування буде іншим. Якщо вони розміщені в одній хромосомі, то входять в одну групу зчеплення й успадковуються разом. Якщо ці гени домінантні, то у шлюбі такої подружньої пари можна очікувати 50 % дітей з цими двома захворюваннями і 50 % здорових дітей. Якщо два домінантних патологічних гена знаходяться у двох різних хромосомах, то у шлюбі такої особи зі здоровим партнером можна очікувати народження 25 %

дітей з обома захворюваннями, 50 % - тільки з одним захворюванням і 25 % - здорових.

Вивчення груп зчеплення нерідко допомагає безпосередньо говорити про гени, які визначають ту чи іншу хворобу (гени-маркери). Так, ген, який визначає оніхоостеодисплазію, входить до групи зчеплення з геном, який визначає групу крові АВ0. Тут аномалія нігтів і патели поєднуються з антигеном В. В одному випадку оніхоостеодисплазії проаналізували родовід в трьох поколіннях. У дружини була 00 група крові, а у чоловіка АВ. Чоловік страждав на оніхоостеодисплазію. З його 12 дітей 7 мали групу крові А0, а 5 – В0, і у всіх їх була оніхоостеодисплазія. Особи А0 групи були здорові.

Ген, який визначає групу крові Дафі, входить до групи зчеплення з геном уродженої катаракти. Ген, який визначає резус-фактор, зчеплений з геном еліптоцитозу, а ген групи крові Лютеран – з фактором секреторства АВ0. У статевій Х-хромосомі виявлена група зчеплення; гени, які визначають групу крові Хg, іхтіоза, очного альбінізму, ангіокератозу, сироваткового фактору Х, кольорового зору глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г6ФД), гемофілії та ін. Тому захворювання, які визначаються даними генами, батько може передати донці, а мати – сину.

Якщо патологічний ген отримано у спадок від одного з батьків, то він називається сегрегентним, а хворий – відповідно – сегрегантом. Якщо патологічний ген виник спонтанно внаслідок мутації, то він називається мутантним, а хворий – відповідно – мутантом. Визначення сегрегентного чи мутантного прояву захворювання у нащадків має суттєве значення для прогнозування нащадків сибсів хворого.

Більш складні види успадкування (дигібридне і полігібридне)

Якщо два різних гена знаходяться у різних хромосомах, то під час утворення гамет вони можуть комбінуватися незалежно. Простежено цю закономірність на прикладах. Наприклад, у хворого короткозорість (М) домінує над нормальним зором (м), а карі очі (В) домінують над блакитними (в). Єдина дитина карооких батьків має блакитні очі і нормальний зір. Необхідно

встановити генотипи всіх трьох членів родини. Гени короткозорості і кольору очей знаходяться в різних хромосомах. Дитина рецесивна по гостроті зору (мм) і кольору очей (вв). По одному з цих генів вона отримала від батька, а по другому – від матері. Отже, і батько і мати мали ці рецесивні гени. Оскільки вони обидва були короткозорими і кароокими, то вони були гетерозиготами за обома генами – рефракції очей і кольору, тобто - Мм і Вв.

Блакитноокий короткозорий чоловік, мати якого мала нормальний зір, одружився з кароокою жінкою з нормальним зором. Перша дитина від цього шлюбу – кароока, короткозора, друга – блакитноока, короткозора. Необхідно встановити генотипи батьків і дітей. Проаналізувавши одержані дані, нами встановлено, що перша дитина мала генотип МмВв, а друга Ммвв. Батько - МмВв, а мати – ммВв.

У людини антигени системи АВ0 представлені множинною алеломорфою I^0 , I^a , I^b , резус антигени (Rh^+ і Rh^-) – алелями D і d; групи крові MN – кодомінантними алелями I^M і I^N .

Генотип матері I^a , I^0 , I^M I^N , Dd. Генотип батька - $I^b I^b$, I^M , I^N , Dd. Скільки і які поєднання антигенів можливі у їх дітей? У матері можливі 8 різних гамет – $I^a I^M$, D; $I^a I^M$, d; $I^a I^N$, D; $I^a I^N$, d; $I^0 I^M$ D; $I^0 I^M$ d; $I^0 I^N$ d; $I^0 I^N$ d, так як у неї група крові A0. У батька група крові BB, тому у нього можливі 4 різні гамети: $I^b I^M$ d; $I^b I^M$ d; $I^b I^N$ d; $I^b I^N$ d.

Для наочності складаємо решітку Пеннета.

У дітей можливі 12 різних поєднань антигенів: ABMNRh⁺, ABMNRh⁺, ABMRh⁻, ABMNRh⁻, ABNRh⁺, ABNRh⁺, BMRh⁺, BMRh⁻, BMNRh⁺, BMNRh⁻, BNRh⁺, BNRh⁻.

Схема утворення генотипів різних груп крові

Жіночі гамети	Чоловічі гамети			
	$I^B I^M D$	$I^B I^M d$	$I^B I^N D$	$I^B I^N d$
$I^A I^M D$	ABMMDD	ABMMDd	ABMNDD	ABMNdd
$I^A I^M d$	ABMMDD	ABMMdd	ABMNdd	ABMNdd
$I^A I^N D$	ABMNDD	ABMNdd	ABNNDD	ABNNdd
$I^A I^N d$	ABMNdd	ABMNdd	ABNNdd	ABNNdd
$I^0 I^M D$	BOMMDD	BOMMDd	BOMNDD	BOMNdd
$I^0 I^M d$	BOMMDD	BOMMdd	BOMNdd	BOMNdd
$I^0 I^N D$	BOMNDD	BOMNdd	BONNDD	BONNdd
$I^0 I^M d$	BOMNdd	BOMNdd	BONNdd	BONNdd

Перед судово-медичною експертизою поставлено завдання в'яснити, чи є хлопчик, який є присутнім в родині подружжя Р, рідною чи прийомною дитиною. Дослідження крові всіх трьох членів родини дало такі результати: жінка мала резус-позитивну кров групи IV з антигеном М, її чоловік – резус-негативну кров I групи з антигеном N. Кров дитини резус-позитивна I групи з антигеном М. Який висновок може дати судовий експерт? Випишемо сполучення всіх антигенів трьох членів родини. Антигени дружини: Rh^+ , AA, AB; чоловіка: Rh^- , NN, OO; дитини: Rh^+ , MM, OO. За резус-фактором збіг є. Якщо мати резус-позитивна, то в залежності від того, гомозиготна вона чи гетерозиготна, дитина може бути резус-позитивною за гомозиготності матері чи резус-негативною за гетерозиготності матері. За групою крові AB0 збігу немає. При AB матері і OO батька у дитини може бути A чи B група, але не 0. За

системою MN співпадіння теж немає. Якщо мати MM, а батько NN, то дитина може мати тільки MN, але не MM і не NN. Таким чином, така дитина не може бути сином цього подружжя.

Полігенний тип успадкування.

Ряд ознак і захворювань обумовлений багатьма генами, тому їх позначають терміном “полігенні”. На їх розвиток великий вплив мають фактори зовнішнього середовища, тому їх ще часто називають мультифакторальними. Їх розподіл у нащадків не підпадає під закон Менделя. Частота їх прояву розраховується на підставі великої кількості спостережень і представлена в спеціальних таблицях. Спадковий характер цих захворювань можна довести на підставі великої частоти їх зустрічі в одній родині у порівнянні з частотою захворювання в популяції, а також близнюковим методом дослідження.

Частота експресії полігенних ознак дорівнює квадратному кореню з частоти експресії в популяції. Наприклад, якщо частота якогось захворювання в популяції складає $1/1000000$, а у родичів $1/1000$, то це характерно для полігенного типу успадкування ознаки, оскільки $\sqrt{1/1000000}=1/1000$. Якщо протягом домінантного типу успадкування частота появи захворювання доходить до 50%, а при рецесивних – до 25%, то під час полігенного типу успадкування вона може дорівнювати 5%. Припущення про полігенний тип успадкування вираховується шляхом порівняння частоти захворюваності в популяції з частотою захворюваності в родині:

(Популяційна частота/Родинна частота) x 100.

Під час полігенних (мультифакторальних) захворювань ризик повторного народження хворої дитини збільшується з наступною вагітністю, в той час як при моногенних ризик повторного народження хворої дитини залишається таким же, як і при попередніх пологах. Так, розщеплення хребта протягом перших пологів спостерігається у 4% дітонароджень, а під час повторних пологів в тих же самх родинх його частота доходить до 10%. На частоту полігенних захворювань впливає стать того з батьків, хто хворіє на дане захворювання і стать самої хворої дитини, тобто існують різні пороги

пенетрантності генів для осіб чоловічої і жіночої статі. Так, поліроstenоз частіше буває у хлопчиків, а вроджений вивих стегна у дівчат.

Для полігенних (мультифакторіальних) спадкових захворювань характерне існування перехідних форм – від прихованих до клінічно виражених, більш ранній початок і посилення клінічної картини в наступних поколіннях. Ступінь ризику для родичів хворого залежить від частоти хвороби в популяції. Вона тим вища, чим рідше зустрічається дане захворювання, причому вона підвищується по мірі зростання важкості захворювання пробанда. Клінічні прояви хвороби у найближчих родичів і пробанда мають схожість. Полігенно успадковуються багато фізіологічних особливостей організму: зріст, тривалість життя, розумові здібності, стійкість до різноманітних екзогенних захворювань і пагубних звичок і т.п.

Як моногенно, так і полігенно обумовлені спадкові хвороби можуть проявлятися в різні періоди життя. В одних випадках вони проявляються зразу ж при народженні (гемофілія, дальтонізм), в інших випадках – в дитячому і юначому віці (наприклад, міопатія, юнача прогерія), в третіх – в дорослому періоді (хорея Гентінгтона, атрофічна міотонія, полікістоз нирок), у четвертих – в літньому віці (хвороба Паркінсона). Тому, під час медико-генетичного консультування необхідно враховувати критичні періоди розвитку захворювання, тобто вік, в якому, як правило, проявляється те чи інше захворювання.

Однак не у всіх носіїв патологічного гена він обов'язково проявляється. Один ген може проявитися в 100% випадків, а інший – у значно меншому процесі випадків або зовсім не проявитися. Крім того, ген, що проявився, не в усіх випадках експресується в однаковому ступені у фенотипі.

Ряд спадкових захворювань, обумовлених різними генами, клінічно можуть протікати однаково, походить один на одного. Це так звані генокопії (тут один ген копіює дію іншого). Так, відома псевдо гіпертрофічна форма міопатії Дюшенна. Але існує і форма Беккера, яка також обумовлена зміненним геном, локалізованим у Х-хромосомі, але він знаходиться в іншому локусі.

Відомий ряд генокопій нейросенсорної глухоти й інших патологічних станів. Наприклад, існує декілька форм спадкової катаракти, але катаракта може розвиватися і після поранення ока, запальних процесів, під час діабету, при галактоземії. Нейроанемічний синдром спостерігається протягом бірмеровської анемії, однак він може розвиватися і під час глистовій інвазії широким лентецем, протягом аліментарній анемії, крововтратах і т.п. Такі неспадкові захворювання називаються генокопіями. Знання всіх вказаних питань важливе під час медико-генетичного консультування, при наданні порад по відношенню подальшого дітонародження і в інших випадках роботи медичного генетика.

2.2 Лабораторні генетичні методи дослідження

Ці методи дозволяють визначити характер і локалізацію спадкового дефекту на рівні продукту гена, точкової мутації в гені, або алельному варіанту, хромосомі або в геномі. Ці методи незамінні при масових скринінгах патології, пренатальній діагностиці, виявленні носійства патологічного гена, встановленні батьківства, проведенні доклінічної діагностики патології.

2.3 Цитогенетичні методи

Цей спектр методів використовуються для визначення кількості і структури хромосом, виявлення хромосомної патології, мозаїцизму, носіїв збалансованої хромосомної аномалії. До різновидів даного методу відносять способи диференційного забарвлення хромосом, у тому числі і з використанням люмінісцюючих і радіоактивних маркерів, молекулярно-цитогенетичні методи.

2.4. Спеціальні біохімічні методи

Спеціальні біохімічні методи дають змогу виявити специфічні продукти порушення роботи генів (вільні амінокислоти, ліпіди, глікопротеїди,

мінеральний дисбаланс, ферменти та їх інгібітори в крові, сечі, тканинах і клітинах організму, амніотичній рідині). *Нужно ли?*

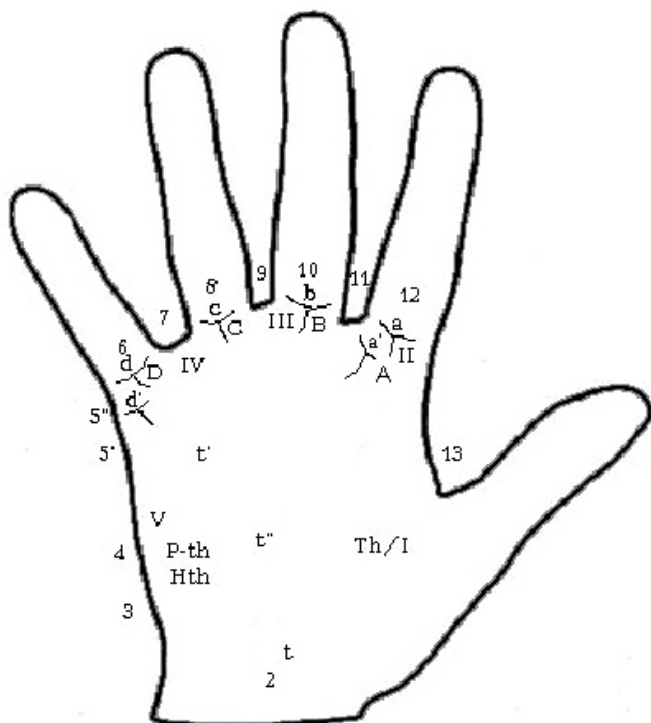
2.5. Дерматогліфічний метод

Метод досліджує деталі рельєфу шкіри долоней та стоп, а також долонних поверхнь пальців. Одночасне формування шкірного м'ялюнка на зазначених поверхнях тіла і головного мозку в ембріональний період дає підстави вважати великі потенційні можливості цього методу. .

Вважається, що дерматогліфічне дослідження є важливою складовою частиною клінічного огляду людини, як первинний моніторинг щодо визначення генетичної схильності до розвитку спадкових та спадковообумовлених захворювань ще на етапі віднесення пацієнта до групи підвищеного ризику та прогнозування перебігу патологічного процесу на ранніх етапах діагностики хвороби.

Дерматогліфічні ознаки чи істинні візерунки епідермальних гребнів на пальцях представлені трьома основними типами візерунків (дуги, петлі, завитки), а на долоні чи відсутністю візерунків (норма), чи наявністю звичайних або рідких візерунків на тенарі, гіпотенарі та міжпальцевих подушечках. Основними критеріями оцінки дерматогліфікограм є рідка

ознака дерматогліфіки (популяційна частота 5% і нижче); рідка дерматогліфіка (1-2 рідкі ознаки дерматогліфіки); та патологічна дерматогліфіка (3 та більш рідких ознак).



1-13 -долонні поля;

Th/I, Hth, II - IV -долонні подушечки;
a, b, c, d - основні пальцеві трирадіуси;
a', d' - додаткові пальцеві трирадіуси;
A, B, C, D - головні долонні лінії;
t, t', t'' - долонні трирадіуси;

Г щ - гребнева щільність.

Рисунок – Топографія руки людини.

Рідкі ознаки дерматогліфіки мають місце в трьох структурах кісті (складки згинання, візерунки пальців та долонь) як у якісному, так і у кількісному відношенні (гребневий рахунок, розташування осевого трирадіусу та ін.), а також у вигляді односторонньої чи бімануальної локалізації. У людини нараховується більш 30 рідких ознак дерматогліфіки, які використовуються в дизморфології як інформативні морфогенетичні варіанти, що вказують на можливість хромосомного дисбалансу, менделюючих мутацій чи тератогенного ефекту у пробанда Гени головного комплексу, що продукує папілярний візерунок, мають різну локалізацію: ген W в групах 13-15, ген A – 17-18, ген L – в 21 хромосомі. Тобто, дерматогліфи можуть свідчити про наявність генного дефекту та рецисивних патологічних генів. За думкою деяких авторів, по змінам папілярних ліній пальців та долоні можна судити про порушення в хромосомах (хромосоми 21, 22, 13-15, 16-18 за Денверовською класифікацією) Згідно літературних даних, частота прояву певного типу кожного візерунка на тому чи іншому пальці може свідчить також і про те, який вид аномалії хромосом обумовив захворювання в кожному конкретному випадку. Як показали в своїх роботах Shiono и Kadowaki у 1986 р., спадково обумовлені захворювання без

хромосомних аберацій мають значно більш стерту дерматогліфічну симптоматику. Проте на сьогодні в клінічній практиці метод дерматогліфічного дослідження ще не дістав широкого застосування

2.6. Мікробіологічні методи

Використовуються для виявлення продуктів метаболізму в матеріалі, отриманому від хворих, для чого визначають здатність розмножуватись за їх присутності залежних бактерій – ауксотрофів (наприклад, у випадку фенілкетонурії).

2.7. Молекулярно-генетичні методи

Ця група методів ґрунтуються на використанні специфічності ферментів, «розрізаючих» нуклеїнові кислоти, принципу комплементарності нуклеотидних послідовностей, вибіркової ампліфікації (помноження) двониткових ділянок ДНК у цих структурах *in vitro*. Такі методи є дуже ефективними для диференційної діагностики онкологічних та онкогематологічних захворювань, для проведення пренатальної діагностики, визначення батьківства, ідентифікації генетичної індивідуальності особистості. Вони є найбільш специфічними та універсальними.

Молекулярна клінічна діагностика почала свій розвиток у 70-х рр. минулого століття. Цьому сприяло відкриття моноклональних антитіл і створення методу гібридизації на фільтрах. Потім були розроблені методи Нозерн- і Вестерн-блотінга, що дають змогу виявляти індивідуальні РНК і білки. Важливою подією в молекулярній біології стало відкриття полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у 1983 році і подальше успішне використання її в практичній медицині для диференційної діагностики.

Незаперечною перевагою методів молекулярної діагностики є їх універсальність відносно використання для аналізу будь-яких ДНК-містких клітин або тканин. Методичні підходи до ідентифікації певних мутацій у генах або фрагментах ДНК ґрунтуються на двох базисних технологіях – блот-гібридизації та ампліфікації окремих ділянок ДНК.

Метод блот-гібридизації, запропонований англійським вченим Едвардом Саузерном у 1975 р. (Саузерн-блотинг від англ. Blot -намокати) і був одним з перших ефективних методів ідентифікації мутацій. Послідовність даного методу складається з кількох етапів. **Перший етап дослідження** – виділення ДНК з будь-якої ядровмісної клітини організму. В обстежуваної особи беруть периферичну кров, а у випадках пренатальної діагностики беруть амніотичну рідину або ворсини хоріона. Виділену ДНК обробляють спеціальними ферментами рестриктазами, що розрізають її на фрагменти в певних ділянках. Отримують характерний для даної особи набір фрагментів ДНК різної довжини. Методом електрофорезу проводиться розподілення фрагментів ДНК в агарозному або поліакриламідному гелі залежно від їх молекулярної маси. **Другий етап** – Саузерн-блотинг. Фрагмент ДНК переноситься осмотичним струменем рідини з гелю на розташований на ньому нітроцелюлозний або нейлоновий фільтр. На фільтрі утворюється відбиток фрагмента ДНК. У разі здійснення перенесення фрагментів в лужному середовищі, ДНК може переходити в одноланцюговий стан, тобто денатурувати. При цьому ДНК гібридизується з міченим ДНК-зондом. Залежно від способу мічення (радіоактивний, флуоресцентний) фрагменти гібридизованої ДНК можна виявити авторадіографічно або за допомогою флуоресцентної мітки (рис. 3). Це високочутливий метод ідентифікації і дає змогу виявляти менш за 0,1 пг ДНК. Незважаючи на достатню тривалість і трудомісткість методу, а також необхідність застосування радіоактивних зондів цей метод не втратив діагностичного значення. Останнім часом найбільш поширеним є застосування нерадіоактивного мічення ДНК нітратом срібла.

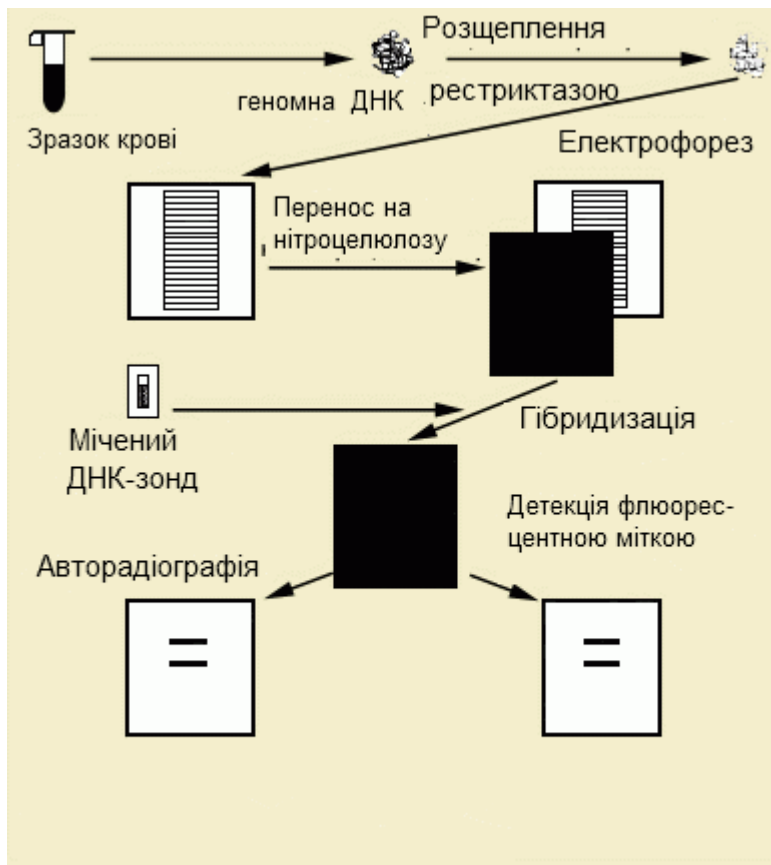


Рисунок 3 – Схема блот-гібридизації за Саузерном

Секвенування є метод виявлення первинної нуклеотидної послідовності ДНК. Суть методу полягає в тому, щоби одержати серію комплементарних молекул ДНК, кожна з яких довша за попередню на одну основу. Цей метод вважається достатньо трудомістким. Існує два основних методи секвенування: хімічний - метод Максма-Гілберта і дезоксисеквенування – метод Санджера. В основі першого метода лежить хімічне розщеплення ДНК по одній основі, при використанні другого методу синтезують потрібну послідовність ДНК *in vitro*, специфічно зупиняючи синтез на заданій основі. Частіше при секвенуванні використовують метод Санджера, зокрема для окремих генів, що мають невеликі розміри, наприклад для діагностики гемофілії В.

В основному використовують напівавтоматичні ДНК-секвенатори, які виявляють флуоресцентно-мічені ДНК-фрагменти спеціальною лазерною системою. У рутинних дослідженнях певний регіон геному ампліфікується спочатку за допомогою методу ПЛР. Потім отримані ампліфіковані фрагменти очищують і секвенують зі спеціальними праймерами і dNTP (олігонуклеїдними послідовностями – зондами, що промарковані спеціальним флуоресцентним маркером dye). Після проведення секвенування отримані фрагменти розділяють в акриламідному гелі або застосовують капілярний електрофорез (рис. 4).

Зараз в автоматизованих системах для секвенування використовують метод обриву ланцюга за Sanger, (1977 р.). При цьому ДНК-залежна реакція подовження за допомогою ДНК-полімерази припиняється при приєднанні одного з чотирьох різних флуоресцентно мічених дезоксинуклеотидів до комплементарної ділянки матричної ДНК. Аналіз мічених продуктів реакції елонгації відбувається в спеціальній камері з агарозним гелем.

Одержану під час секвенування нову послідовність нуклеотидів порівнюють з відомими послідовностями алелей з банку даних і таким чином ідентифікують їх або додають до банку даних, якщо послідовність ще не відома, після відповідної перевірки. Завдяки високій точності методу секвенування HLA-генів вже використовують в клінічній лабораторній діагностиці при пошуку неродинних гістосумісних донорів для пацієнтів, що потребують трансплантацію кісткового мозку.

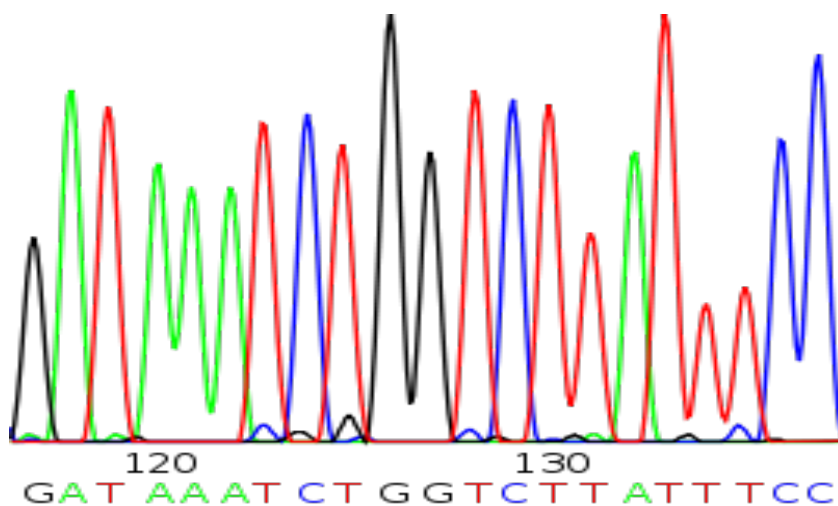


Рисунок 4- Фрагмент результату сіквенса ДНК

Одним із базових методів молекулярної діагностики є метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), або специфічної ампліфікації. Завдяки цьому методу можливо не тільки проводити ідентифікацію відомих мутацій, але і разом з іншими методами молекулярної діагностики застосовується для ідентифікації невідомих мутацій (рис.).

Метод був запропонований американським вченим Керрі Мюллісом (рис. 5) у 1983 р., за що йому було присуджено Нобелівську премію.

Метод ПЛР дає змогу проводити селективну ампліфікацію, або копіювання окремих ділянок ДНК, завдовжки від кількох десятків до кількох сотень пар нуклеотидів. ПЛР імітує процес природної реплікації ДНК, що постійно відбувається в ядрах клітин.

Метод включає кілька етапів (рис. 6):

Спочатку фрагменти ДНК нагрівають до температури близько 100°C. При цьому комплементарні ланцюги ДНК розходяться між собою (ДНК денатурує). На другому етапі (отжиг або анілінг) до обох ланцюгів ДНК за принципом комплементарності приєднують штучно синтезовані праймери, в результаті чого утворюються короткі дволанцюгові "стартові" ділянки або затравки. На третьому етапі (елонгація) в дію вступає специфічний бактеріальний фермент - Таq-полімераза, стійка до високих температур, при яких інші білки втрачають свої властивості. За допомогою термостабільної полімерази здійснюють *in vitro* синтез комплементарних ланцюгів ДНК в напрямку 5'-3'.



Рис. 5 - Керрі Мюлліс

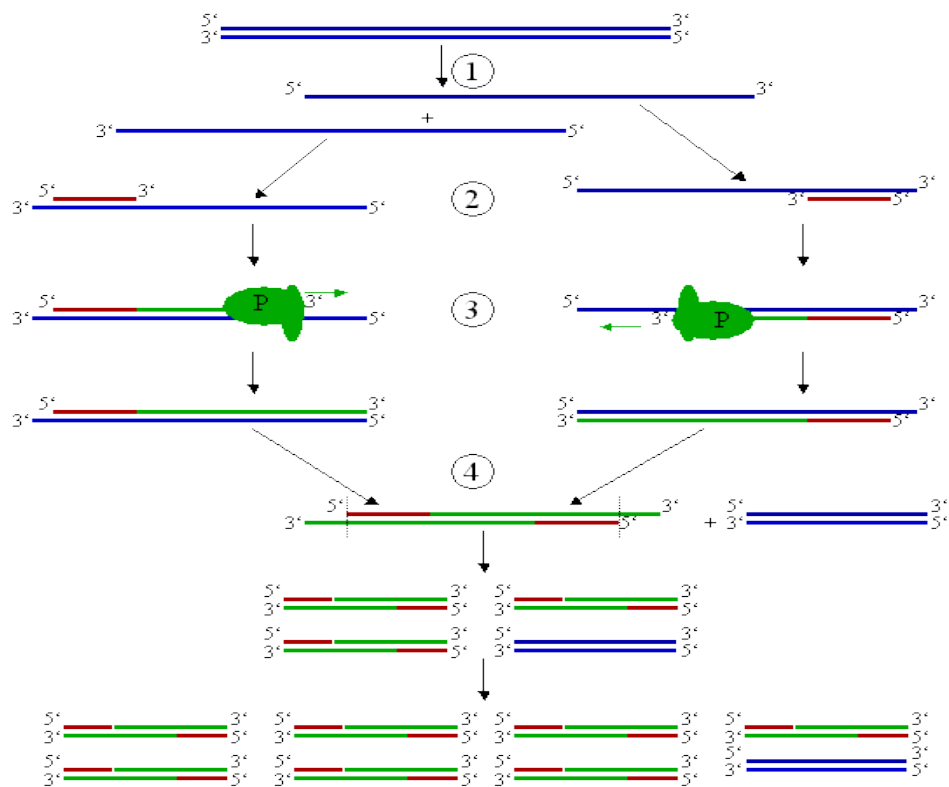


Рисунок 6 - Схематичне зображення процесу ПЛР. 1 - денатурація при 94-96 ° C; 2 - отжиг або анілінг при ~ 65 ° C (P- фермент Таq-полімераза); 3 - елонгація при 72 ° C; 4 –завершення першого і наступні цикли ПЛР. Paul Rabinow (Making PCR, A Story of Biotechnology, University of Chicago Press, 1996).

Специфічність реакції залежить від правильного вибору праймерів. Зміна етапів ПЛР відбувається в результаті простої зміни температури. Для проведення ПЛР використовують спеціальні прилади - ДНК-ампліфікатори (рис. 7), що дають змогу програмувати і підтримувати оптимальний температурний режим.



Рисунок 7 – ДНК ампліфікатор

Метод ПЛР дає змогу протягом кількох годин виділити і багаторазово копіювати певний фрагмент ДНК у кількості, що перевищує вихідну в 10^6 разів. Для аналізу ПЛР-ампліфікованої ДНК використовують різні методи, з яких найбільш розповсюджені: гель-електрофорез, дот-блот-гібридизацію і блот-гібридизацію по Саузерну.

За їхньої допомоги можна аналізувати більшість ПЛР-продуктів, але абсолютно точні результати можна одержати тільки секвенуванням.

Метод визначення поліморфізму довжини рестриктивних фрагментів ДНК за допомогою рестриктивних нуклеаз (ПДРФ, RFLP – restriction fragment length polymorphism). Це перший метод аналізу ДНК, у якому вирізані рестриктивними нуклеазами фрагменти геномної ДНК розділяють методом електрофорезу в агарозному гелі, де фрагменти різної довжини (заряду) виявляють різну рухливість і переміщуються в електромагнітному полі на різні відстані. Візуалізація та оцінювання можливі після гібридизації фрагментів з радіоактивно міченими зондами ДНК у порівнянні із зразками

раніше ідентифікованих типів. ПФРН дає більшу кількість помилок визначення поліморфізмів, ніж нові молекулярно-біологічні методи, засновані на принципі ПЛР.

Методи ідентифікації поліморфізмів на основі ПЛР. ПЛР з міченими специфічними за своєю послідовністю олігонуклеотидами (ПЛР-СПО,) та ПЛР зі специфічними за своєю послідовністю праймерами (ПЛР-СПП).

ПЛР з міченими, специфічними за своєю послідовністю олігонуклеотидами (ПЛР-СПО, PCR-SSO sequence-specific oligonucleotide). Спочатку в ПЛР-СПО ампліфікують ділянки матричної ДНК окремих генів HLA регіону.

Продукти ампліфікації фіксують на нейлоновій мембрані і гібридизують зі специфічними за своєю послідовністю, хімічно або радіоактивне міченими олігонуклеотидами. Розрізнення конкретного алелю засноване на тому, що при достатньому виборі олігонуклеотидів позитивна гібридизація має місце лише тоді, коли певний олігонуклеотид комплементарний до відповідної послідовності нуклеотидів на ампліфікованих продуктах матричної ДНК.

ПЛР зі специфічними за своєю послідовністю праймерами (ПЛР-СПП, PCR-SSP sequence-specific primer). Принцип ПЛР-СПП (синоніми: алельспецифічна ампліфікація, система ампліфікації рефрактерних мутацій) полягає в тому, що ампліфікація специфічного продукту в ПЛР відбувається лише в тому разі, коли 3'-кінець праймеру комплементарний до цільової послідовності матричної ДНК. Одна єдина різниця між послідовностями нуклеотидів матричної ДНК та відповідного праймеру заважає ампліфікації в ПЛР, що зумовлює високу специфічність методу СПП в ідентифікації алелів. Для контролю ампліфікації до кожної проби додається ще одна пара праймерів. Вона забезпечує утворення продукту ПЛР при будь-яких умовах ампліфікації, незалежно від типу HLA. Це так званий внутрішній контроль (рис. 8).

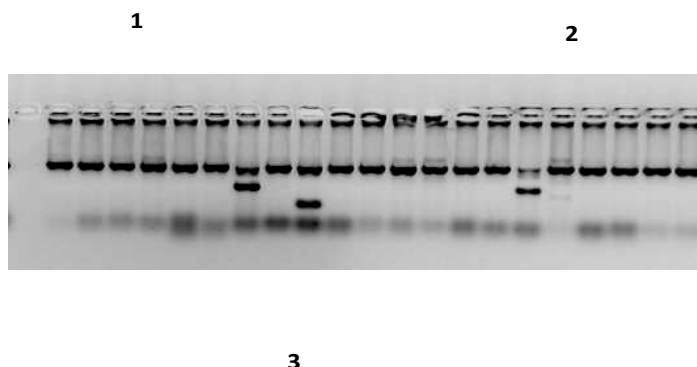


Рис. 8 – Результати детекції продуктів ампліфікації молекулярно-генетичного типування системи HLA II класу локусу DQA1.

1 – негативний контроль, ПЛР-суміш бкз додавання ДНК; 2 – внутрішній контроль якості ПЛР; 3 – продукти специфічної ампліфікації.

Розподільна здатність цього методу залежить від виду та позиції різних пар нуклеотидних основ і можливості їхнього використання для ПЛР. На відміну від методу СПО ідентифікація окремих алелей відбувається вже на основі ампліфікації і гібридизація не потрібна. Розрізнення окремих алелей чи їх груп відбувається при порівнянні специфічних продуктів реакції ампліфікації при електрофорезі в агарозному гелі, де продукти ПЛР розділяють за їх довжиною (зарядом) і візуалізують в ультрафіолетовому випромінюванні.

Значною перевагою СПП–технології є здатність проводити типування як на низькому (на рівні окремих груп генів), так і на високому рівні (на рівні окремих алелей, визначаючи точковий алельний поліморфізм).

Метод визначення поліморфізму фрагментів ДНК за допомогою рестриктаз на основі ПЛР (ПЛР-ПФРН). У ПЛР-ПФРН після ампліфікації ділянки ДНК зі специфічним екзоном окремі алелі чи групи алелів розпізнають на основі розщеплення продуктів ампліфікації рестриктивними нуклеазами.

Розділення алель-специфічних фрагментів за їх довжиною та їх аналіз здійснюють методом електрофорезу в агарозному гелі.

Інтенсивний розвиток новітніх біотехнологій розширив спектр методів ідентифікації мутацій. На сьогодні для масового скринінгу поширених мутацій, що являють собою однонуклеотидні заміни (SNP) застосовують метод ДНК-чипів (array based analysis). Як правило, чіп - це тверда поверхня (скло) маленьких розмірів з нанесеним і зафіксованим на ній послідовностями ДНК, різними за своїм складом (на 1 см² поверхні можна розмістити до 10 000 таких послідовностей рис. 9).

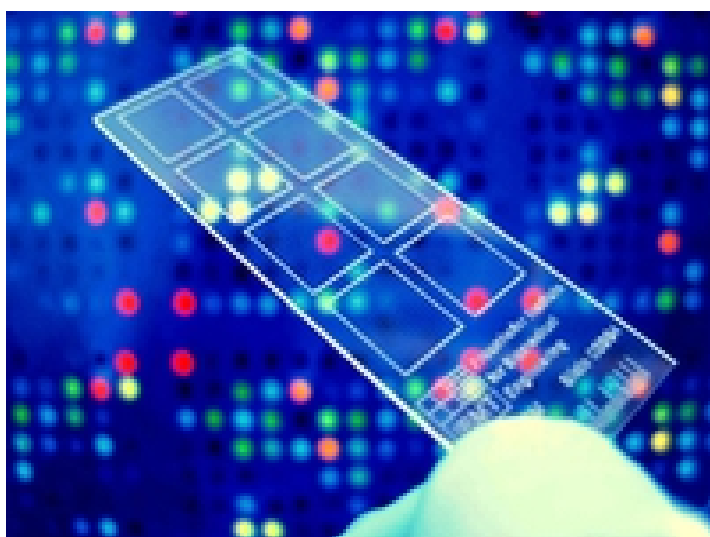


Рисунок 9 – Біочіп.

На сьогодні розроблено три типи таких ДНК-чипів. Вони відрізняються один від одного матеріалом, на якому фіксують послідовності ДНК (скло, агарозний гель) і способами фіксації (хімічний, або під дією електричного струму). В основі методу ДНК-чипів лежить принцип гібридизації. На поверхню ДНК-чіпа з розміщеними на ній відомими мутантними послідовностями, попередньо позначеними різними флуорохромами (зондами), наносять зразок ДНК досліджуваної особи і, якщо існує конкретна мутація, то відбувається реакція гібридизації (зв'язування) на чіпі.

Послідовності, які містять мутацію ідентифікують за допомогою відеокамери й аналізують з використанням спеціальної комп'ютерної програми. Технології виробництва таких чіпів повністю автоматизовані. За допомогою спеціального пристрою-робота проводиться нанесення однонуклеотидних

послідовностей на чіп. Переважно розроблені чіпи для точкових мутацій у бета-глобіновому гені (діагностика таласемії), у гені CFTR (муковісцидоз), у гені BRCA1 (рак грудної залози), а також для діагностики спадкової схильності до наркоманії (рис. 10). Даний метод використовують для різних скринінгових програм в рамках програми «геном людини».

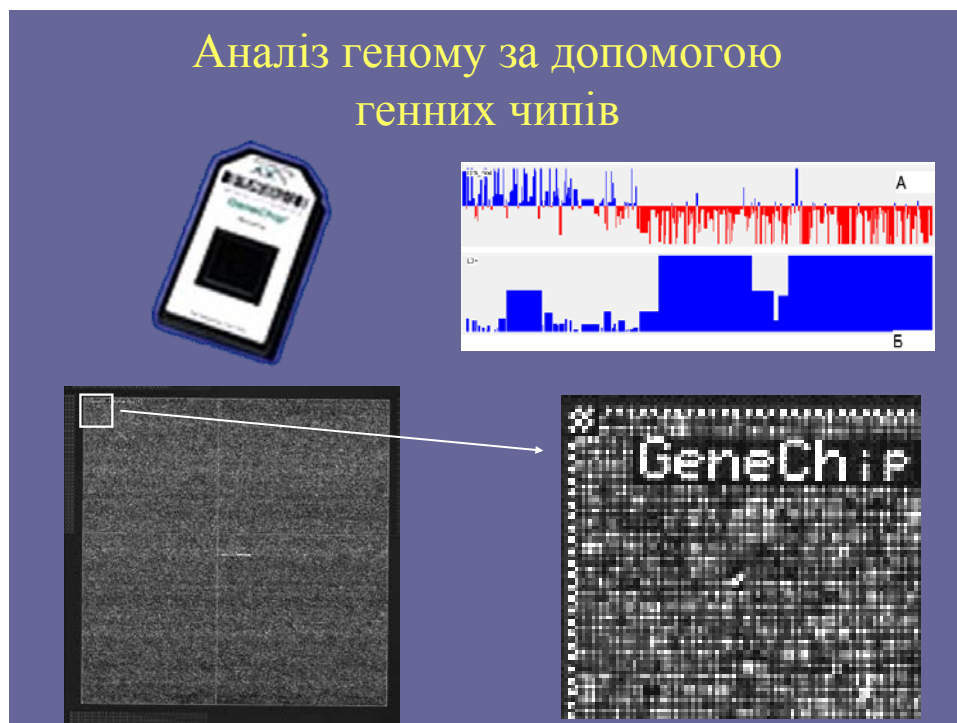


Рис. 10 – Аналіз геному за допомогою генних чипів дозволяє визначити втрати або набуття хромосомного матеріалу невеликих ділянок.

2.8 Близнюковий, популяційний та варіаційно-статистичні методи дослідження

Близнюків метод запропонував англієць Ф. Гальтон у 1876 р. для визначення ролі спадковості і середовища у розвитку психічних властивостей людини. В основі методу лежить той факт, що монозиготні близнюки (МБ) виникають з однієї яйцеклітини, заплідненої одним сперматозоїдом, завдяки поділу зиготи на два зародка. Тому їхній генотип ідентичний (вони завжди однієї статі). Вони мають 100% загальних генів.

Дизиготні близнюки (ДБ) виникають внаслідок одночасного запліднення двох чи більше яйцеклітин. Це може відбутися завдяки одночасному утворенню двох яйцеклітин у двох фолікулах, або внаслідок того, що друге редукційне

тільки такого ж розміру, як і нормальне яйце. ДБ – сибси (брати чи сестри), але народились в один час і вони мають 50% загальних генів.

МБ завжди однієї статі, а ДБ можуть бути як однієї статі, так і різностатевими. Якщо близнюки різностатеві, то, природно, вони дизиготні, якщо ж однієї статі, то диференціювати монозиготних і дизиготних близнюків досить важко. Двояйцевих близнюків частіше народжують жінки у віці 40-45 років, а також жінки, які лікувалися гонадотропними гормонами. Схильність до народження таких близнюків передається по материнській лінії.

Метод близнюків використовується для об'єктивної оцінки ролі спадковості у розвитку ознаки і включає наступні етапи:

- а) складання вибірки,
- б) визначення типу зиготності,
- в) оцінювання результатів співставлення пар.

Останнім часом він не має широкого практичного застосування, як раніше, оскільки існують більші точні сучасні методики, які дають однозначну відповідь відносно генетичної схильності до конкретного захворювання.

Популяційний метод дає інформацію про ступінь гетерозиготності і поліморфізму людських популяцій, виявляє відмінності частот окремих алельних генів між різними популяціями людей і т.д. Метод включає наступні етапи:

- 1) підбір популяції з урахуванням демографічних характеристик (народжуваності, смертності, розміру популяції і т.д.),
- 2) збір матеріалу.
- 3) вибір методу статистичного аналізу.

Кожний таксономічний вид тварин, рослин і мікроорганізмів розділяється на складові сукупності – популяції. Термін "популяція" (від лат. *populus* – народ) означає сукупність особин певного виду організмів, які здатні до вільного схрещування, населяють певну територію і деякою мірою ізольовані від сусідніх популяцій. Спостереження показали, що особини кожної з популяцій будь-якого виду організмів виявляються дуже добре пристосованими

до умов зовнішнього середовища тієї природно-кліматичної зони, яку вони заселяють. Таку зону називають **ареалом розповсюдження** популяції.

Найхарактернішою рисою популяцій є їхня постійна спадкова гетерогенність та внутрішня генетична єдність. Така єдність проявляється в здатності особин будь-якої популяції до панміксії в межах своєї сукупності. Здатність до панміксії систематично відновлює високу гетерогенність і генотипову пластичність популяцій у пристосувальному плані.

У просторі і в часі популяція виступає в ролі цілісної генетичної системи, здатної спадково змінюватись у поколіннях, пристосовуючись до певних умов середовища. При цьому будь-які спадкові зміни в генетичній системі популяції можуть розглядатись як елементи еволюційних подій. Отже популяції характеризуються рядом описаних ознак, які надають їм рангу елементарних еволюційних одиниць. Зауважимо, що елементарною еволюційною одиницею не може бути окремий організм, бо з віком він гине. Цю функцію не можуть виконувати лінії, біотики, підвиди або види, оскільки вони не мають ознак, притаманних елементарній еволюційній одиниці.

Отже, **популяція – це найменша самовідновлювальна сукупність організмів виду з самостійною генетичною системою, котра заселяє територію певної природно-кліматичної зони, утворюючи на ній свою екологічну нішу.**

Видом називають сукупність особин, які подібні за основними морфологічними і функціональними ознаками, каріотипом, реакціями поведінки, мають спільне походження, заселяють певну територію (ареал), схрещуються в природних умовах виключно між собою і при цьому дають плодюче потомство. Належність особин до виду визначається за основними критеріями: морфологічними, фізіологічними, цитогенетичними, екологічними тощо. Найважливішою ознакою виду є повна генетична (репродуктивна) ізоляція, яка полягає в неможливості схрещування особин одного виду з представниками інших видів. Особини будь-якого виду поширені у своєму ареалі не рівномірно, а окремими стійкими скупченнями – популяціями. Це

пояснюється тим, що умови існування у межах ареалу не скрізь рівнозначні і представники будь-якого виду концентруються на ділянках з найбільш сприятливими умовами.

За вивчення генетичної будови та мінливості популяції дуже важливим є поняття **генофонд**. **Генофондом** популяції називається сукупність генів всіх її особин. Мінливість генофонду виражається або частотами генів, або частотами генотипів. За частоту алельного гена приймають відношення його кількості у всіх особин до загальної суми всіх генів, що є в популяції. **Частота генотипу** – це його доля (частка) у загальній сукупності особин популяції. Частота фенотипу – це його доля (частка) у загальній сукупності особин популяції.

Закону Харді-Вайнберга: **в теоретично можливій панміктичній популяції, всі особини якої не зазнають впливу процесів мутагенезу, дії добору та ефектів міграцій і зберігають здатність до вільного розмноження, співвідношення частот домінантних і рецесивних алельних генів залишається незмінним у ряду наступних поколінь.**

Незважаючи на те, тому що в природі ідеальних популяцій не існує, відкритий для таких популяцій закон має важливе значення в плані наукового пізнання. За рівнянням закону Харді-Вайнберга легко визначити структуру генотипу певної сукупності організмів за домінантними та рецесивними алельними генами. Наприклад, серед багатьох спадкових хвороб людини є хвороба Менкеса. У хворих на неї сеча має запах кленового сиропу, що це обумовлено порушенням амінокислотного обміну в організмі. У таких хворих уражається функція нервової системи. Хвороба Менкеса успадковується за аутосомно-рецесивним типом. Вона проявляється у середньому в одного з кожних 50 000 чоловік. З'ясувалось, що за допомогою формули закону Харді-Вайнберга можна визначити структуру генотипів обстеженої сукупності людей з наявністю відповідного мутантного гена. Якщо умовно позначити рецесивний мутантний ген хвороби Менкеса через a , а домінантний алель через A , то, спираючись на формулу Харді-Вайнберга, можна записати:

$$p^2AA + 2PqAa + q^2aa = 1$$

$$\text{або ж } A^2 + 2Aa + a^2 = 1$$

З 50 000 чоловік лише один виявляється гомозиготним за рецесивним а-геном. Тому можна записати: $aa = a^2 = 1/50000$. Звідси

$$a = \sqrt{1/50000} = 1/224.$$

Неважко зрозуміти, що в даній сукупності людей частота нормального, немутантного гена має бути: $A = 1 - 1/224 = 223/224$, а частота гетерозигот – $2Aa = 2 \times 223/224 \times 1/224$. Виконавши відповідні розрахунки, знаходимо, що в обмеженій сукупності людей на гомозиготи за нормальним, домінантним геном припадає 99,109%, на гомозиготи за мутантним геном – 0,002%, на гетерозиготи – 0,889%.

Проведені розрахунки показали, що частота особин, які хворіють на синдром Менкеса досить незначна, всього 0,002 %. Але частота гетерозигот 0,89% є істотною, а отже, нею не можна нехтувати. Описаним способом можна обрахувати структуру генотипів обстеженої сукупності організмів виду за вмістом гомозигот та гетерозигот за будь-якою парою алельних генів. Знаючи частоту гетерозигот по певному аутосомному гену, дослідник може прогнозувати ймовірність шлюбних зустрічей та народження гомозиготних за мутантним геном нащадків.

Природні популяції організмів у своїй переважній більшості **генетично гетерогенні**, тобто складаються з особин з різними генотипами. Ця генетична неоднорідність популяцій в першу чергу пояснюється явищем існуючого в них множинного алелізму і постійним виникненням нових (здебільшого рецесивних) алелей генів у мутаційному процесі. Саме мутації є первинним джерелом фенотипової мінливості організмів. Слід відмітити, що мутаційний процес діє на кожну популяцію незалежно від способу розмноження її особин. Показником генетичної мінливості може слугувати середня частота особин, гетерозиготних по певних локусах, тобто **гетерозиготність (H)** популяції. Цю величину вираховують відношенням гетерозигот до загальної кількості досліджених генотипів. Спершу визначають частоти особин, гетерозиготних по кожному локусу, а потім вираховують середнє арифметичне, яке приймають за

середню гетерозиготність популяції. Як правило, гетерозиготність призводить до кращої життєздатності особин.

Поліморфність (P) популяції – це доля поліморфних (з алельними варіантами) генних локусів із числа всіх досліджених.

До **факторів динаміки популяцій** належать: добір, мутаційний процес, порушення панміксії, ізоляція, дрейф генів. Спонтанний мутаційний процес відбувається безперервно; мутації торкаються всіх ознак організмів. Нагромадження мутантних алелей створює комбінативну мінливість, яка призводить до генетичної гетерогенності (генетичного поліморфізму) природних популяцій. Отже мутаційний процес служить систематичним постачальником елементарного еволюційного матеріалу.

Найголовніший фактор еволюції – природний добір. **Природним добором** називають процес виживання тих організмів, які завдяки особливостям їх генотипів найбільш пристосовані до навколишніх умов і залишають найбільшу кількість нащадків. Іншими словами, природний добір – це диференційоване відтворення різних варіантів генотипів до даних умов. В процесі природного добору організми пристосовуються до умов середовища. **Штучний добір** відрізняється від природного тим, що він здійснюється людиною на її розсуд з метою отримання нових сортів рослин, порід тварин і штамів мікроорганізмів. Природний добір відбувається в природних умовах під впливом факторів середовища, але без цілеспрямованого втручання людини.

Якщо розглядати окремий таксономічний вид, то між його популяціями **панміксія**, або вільне схрещування, пригнічується механізмами ізоляції. Але оскільки частоти мутування генів і напрямки природного добору в різних популяціях не збігаються, то й за генетичною конституцією кожна з них відрізняється від усіх інших.

Механізми ізоляції бувають досить різноманітними. Наприклад, **біологічні форми ізоляції** обумовлені мутаціями генів, які обмежують можливості панміксії. Це мутації, які зміщують терміни дозрівання пилку відносно зародкових мішків; мутації гаметофітної несумісності, за якої пилки

втрачає здатність проростати пилковими трубками в тканинах маточки; мутації несумісності гамет; нездатність утворених гібридів до відтворення власних нащадків тощо. Крім того, існує **територіально-географічна, або просторова, ізоляція**, за якої популяції виду роз'єднанні, скажімо, гірськими хребтами, водними перепонами тощо. Ізоляція може здійснюватись також за допомогою часу.

Отже, ізоляція є першопричиною різних напрямків генетичного розвитку популяцій, їхньої дивергенції (розходження ознак у організмів однієї систематичної групи в процесі еволюції). Саме дивергенція в популяціях приводить до виникнення нових видів.

Дрейф генів (або просто дрейф) – це абсолютно випадковий генетично-автоматичний процес, за якого частота того чи іншого алельного гена в популяції різко зменшується або, навпаки, дуже зростає. Якщо дрейф йде на користь алеля, що зменшує пристосованість особин, то популяція за рахунок негативного добору може зменшуватись аж до повного вимирання. Проте інколи за рахунок дрейфу генів виникають особини, які відрізняються від інших високою пристосованістю до навколишніх умов та деякими іншими властивостями. Такі особини, на думку деяких авторів, можуть еволюціонувати у нові різновидності і навіть види.

Міграція або потік генів – це переміщення особин з одної популяції до іншої з наступною участю їх у процесах розмноження. Міграції можуть бути активними і пасивними (наприклад, перенос насіння вітром або птахами). Іноді людина навмисно частково змішує популяції для отримання цінних гібридних форм.

Мірою гомозиготизації (або інбредності) окремої особини слугує **коефіцієнт інбридингу (F)**, який вказує на ймовірність знаходження у даному локусі двох ідентичних за походженнями алелів, тобто двох точних копій одного з генів, що знаходився у генотипі одного з прабатьків цієї особини.

Все описане вище дає підстави вважати, що популяції є функціональними еволюційними одиницями.

Важливим мірилом інтенсивності природного добору є різниця пристосованості порівнювальних генотипів або так званий коефіцієнт добору (S). Він визначає швидкість зменшення у популяції того чи іншого генотипу і вираховується за формулою: $S = 1 - W$, де W - пристосованість.

Розрізняють три основні форми природного добору: рушійний, стабілізуючий і дизруптивний (дивергентний).

Рушійний добір може відбуватися у двох напрямках: у бік збільшення або зменшення показників ознаки. **Стабілізуючий добір** спрямований на закріплення тієї вузької норми реакції, яка виявилася оптимальною при даних умовах існування. У людських популяціях інтенсивно діє стабілізуючий добір на ранніх стадіях ембріонального розвитку, усуваючи багато шкідливих мутацій.

Дизруптивний добір призводить до розпадання (дивергенції) попередньої форми і формування не однієї, а двох або більше різних норм реакції. Класичним прикладом цієї форми добору є поява на океанічних островах комах безкрилих або з дуже добре розвиненими крилами.

Будь-які форми добору призводять до адаптації, тобто відповідності будови, функцій, поведінки живих організмів середовищу існування. Нові адаптивні пристосування часто зумовлені наявністю структур, які раніше виконували інші функції. Наявність таких структур, які розширюють або змінюють свої функції, називають преадаптацією.

Розрізняють адаптації пасивні і активні. До перших відносяться - інтенсивне розмноження, захисне і попереджувальне забарвлення тощо. До других – розвиток нервової системи та органів чуттів, органів руху тощо.

Географічно розділені групи популяцій іноді називають **расами**. Вони визначаються як популяції одного і того ж виду, дещо відмінні у генетичному відношенні. Відмінності між расами відносяться до генофонду в цілому, отже складаються зі змін частот алелів по багатьох локусах.

Інбридинг – близькоспоріднене схрещування організмів, які мають спільних предків. Спільність походження схрещуваних організмів збільшує

ймовірність наявності у них одних і тих же алелів будь-яких генів. **Аутбридинг** - схрещування неспоріднених між собою організмів.

Теорія нейтральної еволюції була запропонована японським генетиком М. Кімураю та амер. вченими Дж. Кінгом і Т. Джупсом. Суть її полягає у тому, що природний добір є рушієм еволюції лише на рівні організмів, а зміни первинної структури нуклеїнових кислот і білків у переважній їх більшості не підлягають добору і здійснюються шляхом випадкового дрейфу нейтральних мутацій. Згідно з цією концепцією, нейтральні мутації, які не впливають на пристосованість організму, складають основну кількість мутацій, що розповсюджуються у популяції.

Питання для самоконтролю

1. Перелічіть методи медико-генетичних досліджень.
2. Охарактеризуйте клініко-генеалогічний метод.
3. Що називають експресивністю?
4. З якою метою використовують метод близнюків?
5. Хто такий про банд?
6. Розкажіть про метод ПЛР.
7. На які питання дає відповідь популяційний метод?
8. Що таке секвенування ДНК?

ЛІТЕРАТУРА

1. Бочков Н.П. Клиническая генетика. – М.: Медицина, 1997. – 288 с.
2. Демидов С.В., Бердишев Г.Д., Топчій Н.М., Черненко К.Д. Генетика. – К.: Фітосоціоцентр, 2007. – 412 с.
3. Иванов В.И., Барышникова Н.В., Билева Дж. С., Дадали Е.Л. Генетика. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. – 638 с.
4. Инге-Вечтомов С.Г. Генетика с основами селекции. – М.: Высшая шк., 1989. – 560 с.

5. Жимулёв И.Ф. Общая и молекулярная генетика – Из-во Новосибирского университета, 2002. – 458 с.
6. Стрельчук С.І, Демидов С.В., Бердишев Г.Д., Голда Д.М. Генетика з основами селекції. – К.: Фітосоціоцентр, 2000. – 292 с.

Иванов В.И., Барышников

РОЗДІЛ 3

ПРЯМІ І НЕПРЯМІ МЕТОДИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ДІАГНОСТИКИ

ДНК-діагностика спадкових хвороб базується на використанні прямих і непрямих методів молекулярної діагностики.

Основним завданням прямої діагностики є ідентифікація мутацій певного гена. Для цього необхідною умовою є наявність інформації про локалізацію гена, походження і частоту мутацій, або ділянок частого мутування (горячих точок). До переваг прямої діагностики відносять:

- Майже 10% точність діагностики обстежуваних осіб;
- відсутність необхідності обстежувати інших родичів пробанда;

До захворювань, які визначаються за допомогою прямої ДНК-діагностики відносять:

- Муковісцидоз;
- Міодістрофія Дюшена;
- Гемофілія А;
- Фенілкетонурія;
- Адреногенітальний синдром;
- Таласемія;
- Нейрофіброматоз;
- Недостатність α_1 -антитрипсину;
- Недостатність 21-гідроксилази;
- Синдром FRA X;

Відомо, що значна частина дефектів у генах пов'язана саме з точковими мутаціями – нуклеотидними замінами, делеціями.

Наприклад, 95% порушень гена VIII фактора згортання крові пов'язані саме з точковими мутаціями (гемофілія А). Майже 600 точкових мутацій у гені CFTR (ген трансмембранного регуляторного білка муковісцидозу) складають основу даного захворювання.

На сьогодні застосовують різні варіанти ідентифікації точкових мутацій у ДНК: метод аналізу конформаційного поліморфізму одноланцюгової ДНК (SSCP), метод градієнтного гель-електрофорезу (DGGE), метод хімічного розщеплення некомплементарних сайтів (СМС), метод гетеродуплексного аналізу (НА), а також метод секвенування. Для діагностики великих мутацій генів стало можливим використання мультиплексної ПЛР.

Визначення поліморфізму конформації онониткового ланцюга ДНК SSCP (singl strand conformation polymorphism) (ПЛР-ПКОЛ). Полімеразна ланцюгова реакція з використанням принципу ПКОЛ полягає в тому, що електрофоретична рухливість окремих ланцюгів ДНК після ампліфікації залежить від розбіжностей у послідовності нуклеотидів. ПЛР-ПКОЛ використовують для визначення точкових мутацій та порівняння специфічності двох алелів або двох індивідуумів. Заміна навіть однієї основи в молекулах однакового розміру призводить до зміни просторової організації молекули ДНК. Аналізований фрагмент ДНК ампліфікують за допомогою ПЛР, а потім отримані копії ДНК нагрівають, при цьому ланцюг ДНК денатурують і різко охолоджують, щоб не відбулося реасоціації ниток ДНК. Потім проводять електрофорез в поліакриламідному гелі і досліджувальний фрагмент порівнюють за рухливістю з контрольним (рис. 10).

Наявність у середині досліджувального ланцюга хоча би однієї точкової мутації вже призводить до зміни електрофоретичної рухливості внаслідок зміни конформаційної структури ДНК. Тобто фрагменти однієї довжини але різні за нуклеотидним складом мають відмінні швидкості міграції в процесі електрофорезу. Ефективність детекції мутацій за розмірів ампліфікованого фрагмента менш ніж 200 п.н. становить 70-95%, але при довжині фрагментів вище ніж 400 п.н., імовірність виявлення мутацій знижується до 50%.

DGGE (Denaturation Gradient Gel Electrophoresis) - метод денатуруючого градієнтного гель-електрофорезу - заснований на залежності властивостей плавлення (або денатурації) невеликих дволанцюгових молекул ДНК від їх

нуклеотидної послідовності, а точніше - від співвідношення пар А-Т і G-C у досліджуваних фрагментах.

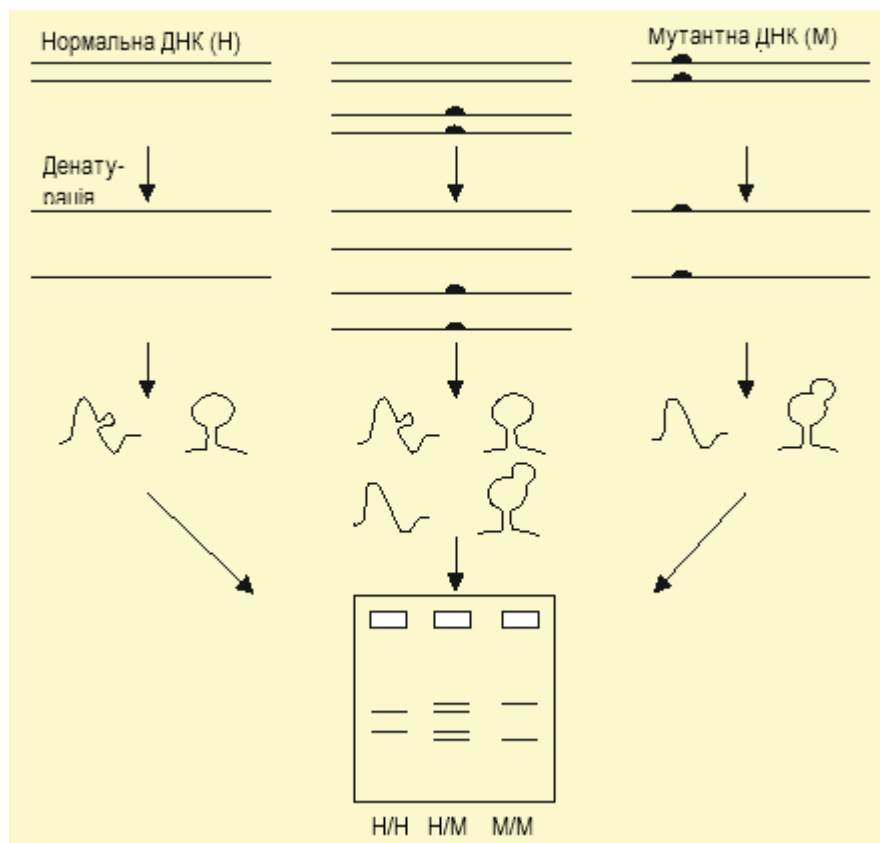


Рис. 3.1. - Принципова схема SSCP методу. Нормальний (Н) і мутантний (М) тип ДНК, • - позначено місце точкової мутації.

Пояснюється це тим, що зв'язок між парами G-C- міцніший порівняно із зв'язком між парами А-Т. Подібні відмінності в динаміці плавлення можуть бути виявлені шляхом порівняння рухливості нормальних і мутантних дволанцюгових фрагментів ДНК при їх електрофорезі в денатуруючих умовах (рис. 11).

Гradient денатурації досягається різницею температур, різною концентрацією сечовини або формальдегіду в гелях. За цих умов однакові за величиною дволанцюгові молекули ДНК, що відрізняються за нуклеотидною послідовністю, денатурують по-різному. Розроблено комп'ютерний алгоритм, що дозволяє передбачати характер плавлення в залежності від нуклеотидної послідовності. При електрофорезі ампліфікованих дволанцюгових фрагментів

ДНК в гелі з лінійно зростаючим градієнтом концентрацій денатуруючих агентів плавлення ниток ДНК відбувається в специфічній для даної послідовності області, еквівалентній температурі плавлення - t_m , тобто такій температурі, при якій кожна пара нуклеотидів з 50% ймовірністю може з'єднатися або розійтися.



Рис. 3.2 - Принципова схема методу градієнтного денатуруючого геле-електрофорезу.

Після початку плавлення просування дволанцюгового фрагмента ДНК в гелі різко сповільнюється внаслідок складної просторової конфігурації молекул, ця затримка зумовлена процесом денатурації ДНК. У результаті відбувається поділ фрагментів ДНК, що розрізняються за нуклеотидним складом. Таким способом вдається ідентифікувати лише близько 50% одонуклеотидних замін у фрагментах ДНК довжиною від 50 до кількох сотень нуклеотидів. Пов'язано це з тим, що при проходженні ДНК через гель може початися часткова

денатурація кінців молекул ще до досягнення оптимальної області плавлення. Тому мутації, локалізовані поблизу кінців ампліфікованих ділянок ДНК, менше впливають на процес плавлення і можуть не виявлятися. Ефективність виявлення мутацій за допомогою градієнтного денатуруючого електрофорезу може бути істотно підвищена за рахунок приєднання до кінців ампліфікованої геномної ДНК синтетичних фрагментів GC-нуклеотидів довжиною в кілька десятків пар основ. Такі монотонні тугоплавкі кінці виконують роль своєрідних затискачів і різко збільшують шанси виявлення всіх точкових мутацій, незалежно від їх локалізації усередині досліджуваного фрагмента ДНК. Ця модифікація робить метод більш чутливим (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Приклади позначення мутацій в гені муковісцидозу

Назва	Зміни в нуклеотидах	Позиція	Зміни в амінокислотах	Позиція	Екзон
Місенс	A-G	263	Asp-Gly	44	2
D44G	C-A	1496	Ala-Glu	455	9
A455E	A-C	1777	Ser-Arg	549	11
S549(A-C)	T-G	1779	Ser-Arg	549	11
S549(T-G)	A-G	263	Asp-Gly	44	2
<i>Нонсенс</i>					
Q39X	C-T	247	Gln-Stop	39	2
W1282X	G-A	3978	Trp-Stop	1282	20
Вставка, делеція, зсув рамки зчитування					
delF508	Делеція 3 п.о.	1652-1655	Делеція F	508	10
241delAT	Делеція AT	241	Зсув рамки		2
852del22	Делеція 22 п.н.	852	Зсув рамки		6а
1154insTC	Вставка TC	1154	Зсув рамки		7
Сплайсинг					
621+1G-T	G-T	621+1	5`-сигнал		Інtron 4
622-2A-C	A-C	622-2	3`-сигнал		Інtron 4
3849+10kbC-T	C-T		Помилковий сплайсинг		Інtron 19
Поліморфізми					

M/V470	AG	1540	М або G	470	10
1716G/A	GA	1716	Без змін	528	10
125G/C	GC	125	5`- область що не транслюється	-	-

На відміну від SSCP, метод DGGE придатний для ампліфікованих фрагментів ДНК більшої довжини. При дослідженні фрагментів до 600 п.н. ефективність виявлення мутацій цим методом досягає 95%. Найчастіше цей метод застосовується для скринінгу мутацій в ампліфікованих екзонах, при цьому в якості матриці використовують геномну ДНК. DGGE-метод може бути з успіхом застосований також для аналізу індукованих мутацій, тому що дозволяє виявляти точкові мутації, які виникли навіть в одній з 100 оброблених мутагеном клітин. До недоліків методу слід віднести технічну складність отримання рівномірного градієнта денатуруючого агента в поліакриламідному гелі, а також високу вартість штучно синтезованих GC-решт.

Аналіз гетеродуплексів (Heteroduplex analysis) - дозволяє ідентифікувати мутації, що знаходяться в компаунді або в гетерозиготному стані. У переважної більшості пацієнтів з генними хворобами, успадкованими за аутосомно-рецесивним типом, мутації в гомологічних хромосомах знаходяться в компаунді, тобто в кожному з гомологічних генів є функціонально значущі порушення, але їх молекулярна природа і внутрішньогенна локалізація різні. Виняток становлять лише мажорні мутації, частота яких у популяції сягає менше однієї десятої відсотка. Прикладами таких мутацій є дельта F508 в гені муковісцидозу або мутація R408W в гені фенілкетонурії. Принцип НА-методу полягає в тому, що при ампліфікації відносно невеликих фрагментів генів гетерозигот або гомозиготних компаундів мутація може бути локалізована лише в одному з гомологічних ланцюгів матричної ДНК. Тому в ампліфікаційній суміші поряд з двома типами гомодуплексів утворюються гетеродуплекси між нормальним і мутантним ланцюгами ДНК. Наявність в дволанцюговому фрагменті ДНК неспарених

нуклеотидних пар змінює конформацію такого гетеродуплекса, що проявляється у зміні електрофоретичної рухливості фрагмента при проведенні гель-електрофорезу. Гетеродуплексні молекули ДНК мають іншу електрофоретична рухливість в порівнянні з гомодуплексами (не відрізняються між собою по рухливості) за рахунок конформаційних особливостей у місцях розбіжності нуклеотидів (mismatch) рис. 3.3.

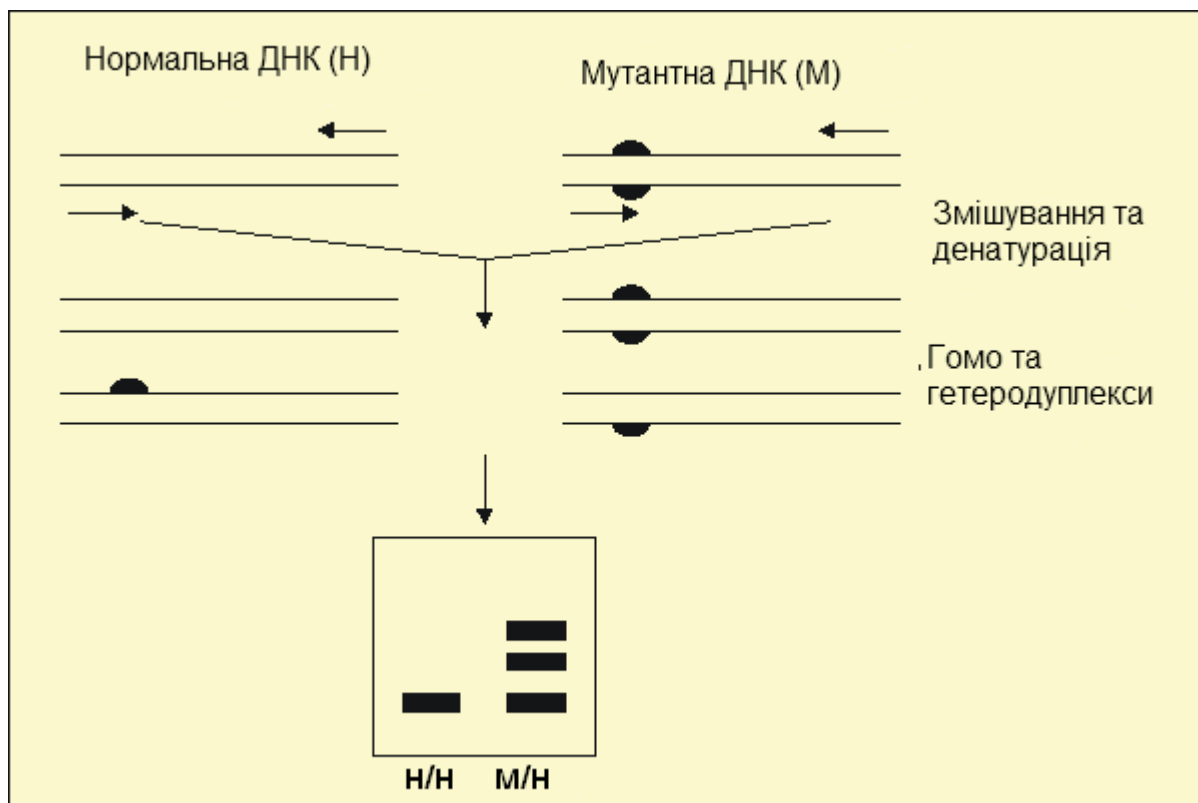


Рис. 3.3 - Схема гетеродуплексного аналізу.

Ці відмінності можуть бути виявлені при електрофорезі в звичайному поліакриламідному гелі. Метод дозволяє знаходити до 80% мутацій. Значно більш ефективно розділення гомо-і гетеродуплексів може бути досягнуто при використанні нових варіантів гелів - Hydrolink або MDE. Вірогідність ідентифікації точкових мутацій цим способом на фрагментах ДНК менше 300 п.н. досягає 80-90%. Детекція мутацій здійснюється як ізотопним, так і неізотопними методами.

СМС (Chemical Mismatch Cleavage) - метод хімічного або ферментативного розщеплення некомплементарних сайтів - заснований на здатності деяких хімічних агентів специфічно розривати нитка ДНК в місці локалізації неспареного нуклеотида (рис. 13). Так, цитозин чутливий до дії гідроксиламіну, а тимін - до дії осмію тетраоксида. Деякі модифікації методу використовують чутливість тиміну і гуаніну до карбодіїмідів. Подальша обробка пиперидином призводить до повного розриву молекули ДНК в модифікованому сайті. Виявлення мутацій здійснюють за допомогою мічених ДНК-зондів, які відповідають нормальним варіантам послідовності ДНК. Такими зондами можуть бути синтезовані олігонуклеотиди, клоновані послідовності ДНК або її ампліфіковані фрагменти.

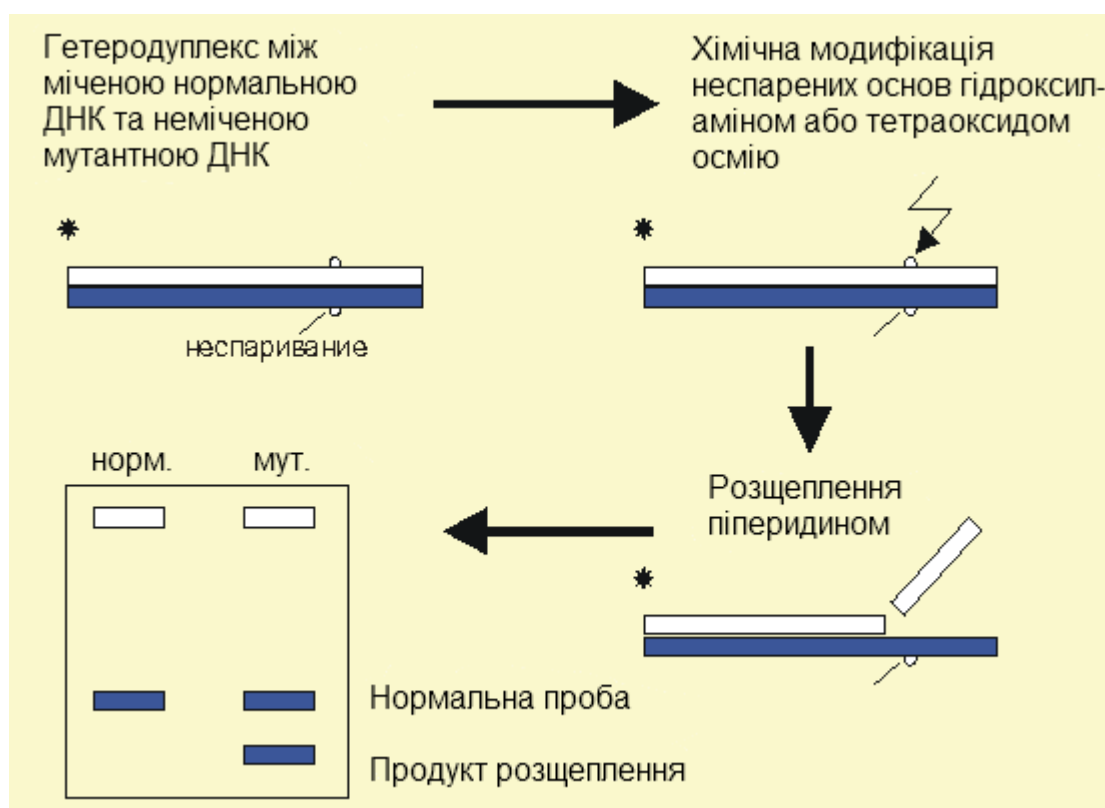


Рис. 3.4 - Принципова схема методу СМС ілюструє хімічне розщеплення в місці локалізації неспарених основ.

При проведенні дослідження еталонну мічену ДНК змішують з надлишком тестованої ДНК (або РНК). Тестованим зразком ДНК може

служувати клонована ДНК, а також оброблені відповідними ендонуклеазами, або ампліфіковані фрагменти ДНК. Суміш нагрівають до повної денатурації дволанцюгової молекули і потім охолоджують, щоб створити умови для утворення дуплексів. При наявності мутацій у тестованих зразках ДНК в гетеродуплексах, що виникли в результаті гібридизації між одноланцюговими молекулами еталонної і тестованої ДНК, утворюються місця з негомологічністю спарювання. Після обробки відповідними хімічними агентами ідентифікація і локалізація мутантних сайтів в досліджуваних ділянках ДНК проводиться шляхом електрофорезу і радіоавтографії. Поява укорочених фрагментів ДНК на електрофореграмі (а точніше - незвичайних утворень в нижній частині гелю) свідчить про наявність мутантного сайту, а визначення розміру укорочених фрагментів однозначно визначає локалізацію цього сайту у вихідній тестованій молекулі ДНК. Модифікації методу СМС дозволяють ідентифікувати до 95-100% мутацій. Перевагами методу є: можливість досліджувати протяжні ділянки ДНК - до 2 тис. п.о.; здатність одночасно виявити і локалізувати кілька мутацій в одному фрагменті ДНК; можливість одночасно використовувати кілька ДНК-зондів для пошуку мутацій - мультиплексний варіант методики. До недоліків можна віднести високу токсичність використовуваних хімічних реактивів, яка може бути ослаблена використанням карбодіімідів для ідентифікації GT-гетеродуплексів.

Непрямі методи молекулярної діагностики.

Непрямі методи аналізу ДНК у хворих на спадкові хвороби є більш універсальними, оскільки їх можна застосовувати в тих випадках, коли походження мутацій невідомо, а ген захворювання не ідентифікований, а також коли мутації в генах достатньо різноманітні, але невиражені основні або мажорні. Дані підходи ДНК-діагностики ґрунтуються на сімейному аналізі і використанні зчеплених із геном поліморфних маркерів, саме за допомогою яких і проводиться ідентифікація мутантного гена в родинах високого генетичного ризику.

В наш час непрямі методи ДНК-діагностики використовують при верифікації всіх відомих моногенних захворювань., для яких розроблена зручна система зовнішніх і внутрішньогенних поліморфних маркерів, які знаходяться в безпосередньої близькості від мутантного гена або всередині нього (в інтронах). За допомогою таких сайтів можна маркувати мутантні алелі гена і простежити передавання їх наступним поколінням. Серед цих методів найчастіше застосовується варіант ПДРФ-аналіз (restriction fragment lengs polimorphism – RFLP-analysis) – метод аналізу поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів.

Метод складається з таких етапів:

- виділення геномної ДНК;
- ампліфікація певної ділянки ДНК, що містить поліморфний сайт рестрикції;
- рестрикція вказаної ділянки специфічним ферментом ендонуклеазою;
- електрофоретичний поділ фрагментів ДНК, що утворюються, та їх ідентифікація.

За відсутності сайту рестрикції в досліджувальній ділянці ДНК розмір фрагмента після його обробки ферментом не змінюється, а за наявності сайту рестрикції утворюються два фрагмента певної довжини. У гетерозиготних носіїв будуть наявні три фрагменти, один з яких за довжиною відповідатиме розміру фрагмента, що не змінився після його оброблення рестрикційним ферментом, і два менші фрагменти із сумарною довжиною. У гомозиготних носіїв мутації, що змінює поліморфний сайт рестрикції, можна спостерігати один фрагмент, який відповідає за розміром незміненому фрагменту.

Активно досліджуються високополіморфні локуси, відомі як **тандемні повтори**. Тандемні повтори містять в своєму складі такі послідовності ДНК, які повторюються та варіюють за кількістю копій; наприклад: GGGCG, CCG, GAG. Довжина даних повторів залежить від кількості копій, що повторюються.

Виділяють два типи таких повторів:

- мінісателіти, або VNTR (variable number of tandem repeats). Розмір фрагмента складає 10 – 20 п.н.;

- мікросателіти або STR (short tandem repeats). Розмір фрагмента складає 2 – 5 п.н.

Загальна кількість високополіморфних мінісателітних послідовностей у геномі перевищує 1500. Як приклад VNTR можна навести послідовність, яку виявлено в інтроні міоглобінового гена. Отримані з цієї ділянки ДНК-зонди достатньо успішно використовують для ідентифікації особи методом геномної дактилоскопії. Високополіморфні VNTR виявлені також у гені інсуліну, X-хромосомі, а також в хромосомах 1, 2, 14, 16, 17, 19.

STR мають високий рівень поліморфізму і успадковуються стабільно. У X-хромосомі такі повтори виявлені через кожні 300-500 тис. п.н., тоді як в інших частинах геному їх спостерігають на відстані 100 тис. п.н. один від одного. Для виявлення різних класів мікросателітних послідовностей і STR-повторів застосовують ефективні методи на основі ПЛР. Дані методи часто використовують у судовій медицині для ідентифікації особи. Значно підвищує вірогідність результатів застосування мультиплексних варіантів ПЛР, що дає змогу встановити генотип індивіду за кількома STR сайтами водночас.

Як і інші повтори, STR звичайно трапляються в частинах генів, які не кодуються. Разом з тим, вже виявлено групу структурних генів, які несуть тривимірні повтори в регуляторних і навіть у трансльованих ділянках генів. Зміна кількості внутрішньогенних повторів у бік збільшення обумовлює порушення функції генів, що в свою чергу призводить до появи важких спадкових захворювань – хвороб експансії.

У медичній генетиці використовують також близнюковий, популяційний, варіаційно-статистичний методи досліджень. Це дає змогу проводити багатофакторний аналіз, зокрема взаємодії спадковості і середовища в розвитку патологічного стану, а також поширеності спадкової патології в популяції та носійства патологічних алелей; визначати величину сегрегаційного генетичного вантажу (частота існуючих у даній популяції

мутантних генів у гетерозиготному стані, що проявляються в поколіннях у вигляді патології), мутаційного тиску (різниця між частотою нових прямих та зворотніх мутацій за одним і тим самим геном).

Питання для самоконтролю

1. Які методи молекулярної діагностики називають прямими, а які непрямими?
2. Основне завдання прямої діагностики.
3. Назвіть переваги прямої діагностики.
4. Коли використовують непрямі методи аналізу ДНК?
5. До захворювань, які визначаються за допомогою прямої ДНК-діагностики відносять

ЛІТЕРАТУРА

20. Бердишев Г.Д., Топчій Н.М., Тищенко О.М., Демидов С.В. Зміни структури хроматину протягом старіння. – К.: Фітосоціоцентр, 2007. – 104 с.
21. Демидов С.В., Бердишев Г.Д., Топчій Н.М., Черненко К.Д. Генетика. - К.: Фітосоціоцентр, 2007. – 412 с.
22. Уиллет Э. Генетика без тайн. – М.: Эксмо, 2008. – 224 с.
23. http://intranet.tdmu.edu.ua/data/kafedra/internal/pediatrics/classes_stud
24. http://ualib.com.ua/br_5275.html
25. http://www.labprice.ua/statti_iz_zastosuvannya_priladiv/metod_amplifikacii_dnk_dlya_dia_gnostiki
26. <http://ramintek.com/links/story/21/>

РОЗДІЛ 4

МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ СПАДКОВИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

Спадкові хвороби виникають внаслідок змін спадкового апарату клітини (мутацій), які виникають під впливом променевої, теплової енергії, хімічними речовинами (в тому числі і медикаментами) і біологічними факторами (вірусами, мігруючими елементами – транспозонами, живими вакцинами, глистними токсинами та ін.). Ряд мутацій викликається генетичними рекомбінаціями (у людини під час кросинговеру), недосконалістю процесів репарації, виникає в результаті помилок біосинтезу білків та нуклеїнових кислот.

Мутації властиві як соматичним, так і статевим клітинам. Розрізняють геномні (зміна набору хромосом), генні (зміна структури гена) мутації і хромосомні аберації. Геном людини представлено 23 хромосомами в статевих клітинах, що складають гаплоїдний набір ($1n$), а в соматичних клітинах - 46 хромосомами (диплоїдний набір, $2n$). Зміна структури хромосом чи їх числа призводить до хромосомних мутацій. Оскільки патогенез спадкових захворювань в багато чому визначається характером мутаційних змін, розглянемо мутації більш докладно.

Геномні мутації – це зміна плоїдності хромосом, як правило збільшення (поліплоїдія): триплоїдія (у людини 69 хромосом – $3n$), тетраплоїдія (92 хромосоми – $4n$) і т.п. В рослинному світі поліплоїдія – явище поширене і в багатьох випадках корисне. Відомі поліплоїдна кукурудза, пшениця, буряк тощо. У людини поліплоїдія як правило з життям не сумісна. При вивченні абортусів (абортованих плодів) випадки поліплоїдії зустрічаються не так вже і рідко. Наприклад, Г.І. Лазюк у 1979 р. описав триплоїдну дитину (анеуплоїдія) (69 хромосом – $3n$), яка прожила декілька днів. Сумісною з життям являється гетероплоїдна анеуплоїдія – збільшення чи зменшення не всього набору хромосом, а якоїсь однієї хромосоми з даної пари – трисомія чи моносомія по тій чи іншій хромосомі. При цьому порушено збалансований набір хромосом,

що призводить до розвитку захворювань. Чим більше хромосома, тим більше інформації в ній закладено. Тому зміна кількості великих хромосом в каріотипі призводить до значних порушень у будові та обміні речовин організму, які, як правило, з життям несумісні. Такі зиготи або не розвиваються, або плід гине на ранніх стадіях розвитку, що супроводжується спонтанним абортom, або викиднем. Найбільш вивченими і сумісними з життям є зміни кількості статевих хромосом і 21-ї хромосоми. Однак носії вказаних хромосомних змін мають багато дефектів у фенотипі.

Хромосомні аберації – це зміна структури хромосом: делеція (відрив частини хромосоми), дуплікація (подвоєння частини хромосоми), інверсія (поворот частини хромосоми на 180^0 , транслокація (переміщення частини однієї хромосоми на іншу) та ін.

Вивчення хромосомних аберацій стало більш доступним після розробки методу диференційного забарвлення хромосом. Хромосомні аберації, як правило, призводять до менш тяжких дефектів організму у порівнянні з моносомією чи трисомією по цілій хромосомі.

Так, під час делеції короткого плеча у одної з п'ятої пари хромосом розвивається синдром “котячого крику” – у результаті недорозвинення гортані у хворої дитини її плач схожий на котячий крик. При транслокації довгого плеча 22-ї хромосоми на 9-ту хромосому розвивається мієлолейкоз і т.п.

Генні мутації викликаються змінами структури ДНК. Це призводить до порушень синтезу поліпептидних ланцюгів білкових молекул, структурних транспортних білків і білків-ферментів. Майже половина спадкових захворювань – це наслідок генних мутацій.

Мутації бувають спонтанними та індукованими. Спонтанні мутації виникають приблизно з частотою 10^{-5} і 10^{-10} на ген протягом 30 років. Спонтанні мутації мають велике значення для еволюції, багато з них підхоплюються добorem. Індуковані мутації викликаються променевою, тепловою і механічною енергією, а також хімічними речовинами, в тому числі і медикаментозними препаратами, і деякими біологічними факторами.

Під час мутацій виникають різноманітні зміни молекули ДНК. Головні з цих змін такі:

1. Заміна однієї аналогічної азотистої основи на іншу (пуринової на пуринову ($A \leftrightarrow G$), чи піримідинової на піримідинову ($T \leftrightarrow C$)) називаються транзиціями. Заміна пуринової основи на піримідинову ($A \leftrightarrow T$, $A \leftrightarrow C$, $G \leftrightarrow T$, $G \leftrightarrow C$) називається трансверсією. Такі мутації найчастіше виникають спонтанно.

2. Зміна числа нуклеотидів (вставки нової послідовності в молекулу ДНК, дуплікація – подвоєння певної ділянки молекули ДНК, делеція – втрата одного чи декількох нуклеотидів). Вставки чи делеції призводять до зсуву послідовності зчитування нуклеотидів (зсув рамки зчитування). Якщо це стосується нуклеотиду, то змінюється послідовність включення амінокислот у поліпептид. Якщо всередині гена при цьому утворюються триплети-термінатори, які не кодують амінокислот, то виникає обрив синтезу поліпептидного ланцюга.

3. Інверсії – поворот ділянки ДНК на 180° .

4. Транслокація – перенесення однієї ділянки ДНК на іншу.

5. Транспозиція – вбудування в геном різноманітних “стрибаючих” генів (транспозонів) чи вірусів і вірусоподібних елементів.

Мутацію може викликати хімічна модифікація азотистої основи (метилування, дезамінування, гідратація, навішання вінільної групи, утворення пірамід нових димерів і т.п.), одностратий або двостратий розрив ДНК, утворення поперечних зшивок ДНК – ДНК, ДНК – РНК, ДНК – білок і деякі інші зміни структури ДНК або РНК. Частина з них репарується, інколи невідомим способом. Пошкодження, які не репаруються можуть привести до мутації. Іноді первинне пошкодження ДНК виникає протягом репарації (наприклад, неправильне спарювання азотистих основ) і, прориваючись крізь багаточисельні рівні антимутаційних бар’єрів клітин в організмі, реалізується в мутацію.

У клітині є декілька захисних систем, які перешкоджають розвитку первинного пошкодження ДНК і реалізації його в мутацію. Перш за все це система антиоксидантного захисту, яка знижує концентрацію вільних радикалів у клітині. До цієї системи входять різні ферменти (каталізу, супероксиддисмутази і т.д.), ендогенні та екзогенні антиоксиданти та антирадикальні сполуки і т.д. Ця система антиоксидантного захисту охороняє генетично важливі молекули від пошкодження вільними радикалами та іншими хімічно активними сполуками. Після того як первинне пошкодження ДНК відбулося, включаються складні процеси репарації – фотореактивація, ексцизійна, післяреплікаційна, SOS–репарація та інші, ще мало досліджені або зовсім невідомі механізми відновлення клітини і нуклеїнових кислот. Якщо пошкодження не усунуто, в дію вступає система протиінфекційного захисту, задача якої полягає у нейтралізації дії зміненої макромолекули – носія спадкової інформації. У випадку прориву одного бар'єра на шляху реалізації первинного пошкодження в мутацію вступають інші механізми антимутаційних бар'єрів. Назвемо деякі з них.

По-перше, це всі механізми, які забезпечують надійність біологічних систем: дублювання клітинних структур (парність органів, диплоїдність хромосом, багаторазова повторюваність певних генів і т.д.), наявність обхідних метаболічних шляхів, особлива організація генетичного коду та апарату синтезу білків (вродженість кодонів і т.д.). По-друге, якщо відбулася заміна амінокислоти в поліпептидному ланцюгу білка, то при цьому має значення збереження гідрофільного або гідрофобного характеру нової амінокислоти, що впливає на збереження третинної – глобулярної – структури білкової молекули. Приблизно протягом 1/3 всіх амінокислотних замін (нейтральних або гомологічних) зберігається просторова структура глобулярних білків та їх біологічна функція – потенційно мутаційне первинне пошкодження ДНК нейтралізується.

Антимутаційні бар'єри клітини та організму багаточисельні і різноманітні і ще не до кінця вивчені. Вони дозволяють людині жити у ворожому світі мутагенних факторів.

Генні мутації як правило не супроводжуються зміною форми хромосом, тому в світловому мікроскопі їх помітити неможливо. Вони проявляються в зміні ознак організму (фенотипу) внаслідок синтезу змінених білків ферментів. В результаті мутації активність ферменту може змінюватись – підвищуватись або знижуватись. Ступінь зміни активності залежить від місця мутації у відповідному гені і величині дефекту. Тому в клінічній картині прояв спадкових захворювань завжди різний, хоча дефектний ген один і той самий. Крім того, спостерігається різна експресивність нормального і зміненого гена. У людини набір хромосом і, відповідно генів, диплоїдний. Мутації як правило відбуваються в одному з двох алелей одного і того ж гена. В результаті виникає гетерозиготність. Фенотип таких гетерозигот визначається взаємодією відповідних алелей і генетичного чи епігенетичного поля, яке створюють всі інші гени у взаємодії з середовищем.

Молекулярні механізми деяких спадкових захворювань, які викликані генними мутаціями, біль менш вивчені. Такі спадкові захворювання отримали назву *молекулярних*.

Добре вивченими антимутаційними захворюваннями людини є різні гемоглобінопатії і фенілкетонурія. Гемоглобінопатії найчастіше є результатом порушення структури і регуляції синтезу глобінів, а фенілкетонурія – структури одного з ферментів, який регулює обмін фенілаланіна і перетворює його через ряд етапів на тирозин і меланін.

Розглянемо механізми розвитку цих захворювань. Відомо, що глобін гемоглобіну дорослої здорової людини складається з 4 поліпептидів: двох α -ланцюгів зі 141 амінокислотними залишками в кожному ланцюгу і двох β -ланцюгів зі 146 амінокислотними залишками в кожному. Всього в гемоглобіні $2 \times (141+146)=574$ амінокислоти. Нормальний гемоглобін позначається як А (НвА), чи $2\alpha 2\beta$ -гемоглобін.

Структура всіх ланцюгів гемоглобіну повністю розшифрована, відома послідовність всіх амінокислотних залишків в чотирьох ланцюгах. Зокрема, в β -ланцюгу нормального гемоглобіну на 6-му місті стоїть залишок глютамінової кислоти. Такий гемоглобін (гемоглобін А) має певні біохімічні і фізіологічні властивості, які забезпечують швидке приєднання і відщеплення CO_2 і O_2 в тканинах і легенях. Але якщо в β -ланцюзі виникне заміна залишка глютамінової кислоти на залишок валіну, то фізикохімічні властивості гемоглобіну різко зміняться, як і його властивість переносити CO_2 і O_2 . Якщо заміна відбудеться в двох β -ланцюгах, то еритроцити, які містять такий гемоглобін, набудуть форми серпа, і такий гемоглобін називається серповидно-клітинним. Він позначається символом HbS ($2\alpha 2\beta$, 6 глю $\rightarrow$ вал). Змінюється його електрофоретична рухомість у відновленій формі, швидкість приєднання і відщеплення CO_2 і O_2 , що призводить до розвитку важкої гемоглобінопатії – серповидно-клітинної анемії. Якщо заміна глютамінової кислоти виникає тільки в одному β -ланцюгу, а в другому залишається нормальний залишок цієї амінокислоти, то такі еритроцити в звичайних умовах мають нормальну форму. Але в умовах гіпоксії (в горах, у літаку) вони також набувають форму серпа, можуть підлягати гемолізу, що призводить до важкої патології і навіть до смерті хворого.

β -ланцюг з 146 амінокислотними залишками кодується 146 триплетами (438 нуклеотидами) іРНК. Глютамінова кислота кодується триплетами ГАА чи ГАГ, а валін – триплетами ГУА чи ГУГ, тобто виникає заміна ГАА на ГУА чи ГАГ на ГУГ. Це відбувається за рахунок зміни тільки одного нуклеотиду, який стоїть на 17-му місті в іРНК: А на У (пуринового на піримідиновий – трансверсія). У ДНК Т замінюється на А. Заміна позитивно зарядженої глютамінової кислоти на нейтральний валін нейтралізує заряд в молекулах гемоглобіну. Він втрачає здатність рівномірно диспергуватися в еритроциті, збивається в кучу та утворює нейтральний серповидний кристал, який нездатний до участі в нормальному газообміні крові. При заміні залишку глютамінової кислоти на 6-му місті в β -ланцюгу на лізин виникає гемоглобін С.

Лізин кодується триплетами AAA чи AAG. Заміна пуринового нуклеотиду на 16-му місті іРНК на пуриновий нуклеотид – транзиція (наприклад, перетворення ГАА на AAA і ГАГ на AAG).

В наш час відомо більше 300 гемоглобінопатій, обумовлених різними змінами структури як β , так і α -ланцюгів. Деякі форми гемоглобінопатій (наприклад, таласемія) викликаються порушенням швидкості синтезу α - і β -ланцюгів глобіну.

Можливі й інші різноманітні варіанти зміни структури ДНК та іРНК. Наприклад, може виникнути випадіння нуклеотида без його заміни іншим нуклеотидом. В такому випадку виникне зсув рамки зчитування гена. При цьому послідовність триплету, який зчитується, в гені буде інша, структура поліпептидного ланцюга і властивості білка значно зміняться. Якщо виникне випадіння цілого триплету, то в поліпептиді не буде вистачати однієї амінокислоти. Такий білок буде досить нестабільним, підданий дії протеаз.

Описані гемоглобіни з дефектом однієї амінокислоти в β -ланцюзі і навіть п'яти амінокислотних залишків. За таким принципом, як гемоглобінопатії, розвивається більшість молекулярних домінантних спадкових захворювань. Однак кінцеві біохімічні механізми їх розвитку ще вивчені не достатньо.

Велику групу білків складають білки-ферменти, які регулюють швидкість різних видів обміну речовин. Зміни структури білку-ферменту призводять до ензимопатії. В наш час виділяють кілька груп вроджених ензімопатій в залежності від того, обмін яких речовин порушений (амінокислот, білків, вуглеводів, ліпідів, пігментів і т.д.). Краще за інші вивчене порушення обміну амінокислоти фенілаланіну, яке викликає низку спадкових захворювань. В нормі амінокислота фенілаланін, яка входить до складу білків харчових продуктів, частково поступає на побудову власних білків організму, а частково, під впливом ферменту фенілаланінгідроксилази, перетворюється на тирозин. Тирозин, у свою чергу, під впливом ферменту тирозинази частково перетворюється на тироксин, а інша його частина через ряд проміжних продуктів йде на утворення меланіну, адреналіну (норадреналіну) і

гомогентизинової кислоти (алькаптону). Остання, через малеїлацетатну кислоту, розпадається на CO_2 і H_2O . При дефекті ферменту фенілаланінгідроксилази, що спостерігається під час фенілкетонурії, фенілаланін не розпадається зазначеним шляхом. По-перше, він накопичується в крові у великих концентраціях (по 0,5-0,6 г/л замість 0,003-0,04 г/л). У цьому випадку обмін відбувається по-іншому: фенілаланін перетворюється на фенілпіровиноградну кислоту, яка в свою чергу – на кетокислоти (фенілоцтову, фенілмолочну, фенілацеталдегід). Ці продукти, а також сам фенілаланін, мають токсичний вплив на мозок дитини, внаслідок чого у дітей спостерігаються різні дефекти у розумового розвитку. Крім того, високі концентрації фенілаланіну інгібують ряд ферментних систем, які беруть участь у перетворенні інших амінокислот. Частково, пригнічується перетворення триптофану на серотонін, а глютамінової кислоти – на γ -аміномасляну. Дефіцит серотоніну призводить до розумової відсталості, а дефіцит γ -аміномасляної кислоти – до розвитку судомного синдрому. В нормі γ -аміномасляна кислота є нейромедіатор і виконує функцію антиконвульсанта.

Внаслідок порушення синтезу меланіну у таких хворих спостерігається слабка пігментація волосся і райдужки очей. Порушення синтезу нікотинової кислоти у цих хворих призводить до розвитку дерматиту. В сукупності все вище викладене визначає клінічну картину фенілкетонурії (розумової відсталості дітей, порушення пігментації, корчі, екземоподібні висипання і т.п.)

Дефект обміну (генетичний блок активного ферменту) може відбутися і в інших ланках вказаного ланцюга. Так, при порушенні перетворення тирозину на тироксин розвивається кретинізм, внаслідок неможливості перетворення гомогентизинової кислоти (алькаптону) на кінцеві продукти розвивається алькаптонурія.

Вказані вище захворювання є ензимопатіями, оскільки в основі їх розвитку лежать порушення синтезу білка – ферменту (ензиму), який бере участь у процесах перетворення одних речовин на інші. За таким принципом розвивається більшість рецесивних спадкових захворювань.

Багато білків, в тому числі і ферментів, складаються з декількох (щонайменше - з двох) поліпептидів, кожен з яких синтезується під контролем одного або двох алельних генів гомологічних хромосом. Для розвитку виражених ензимопатій необхідна наявність дефекту в обох алельних генах, тому що дефект лише в одній алелі може клінічно і не проявитися, оскільки при цьому один поліпептид синтезується нормальним. Таким чином, ензимопатії – це аутосомнорецесивні захворювання. Вони проявляються тільки у гомозигот за патологічним геном. Гетерозиготних носіїв даного патологічного гена можна виявити протягом навантаження відповідними хімічними речовинами або іншими методами біохімічних досліджень.

Деякі ферменти складаються з декількох поліпептидів, які кодуються різними генними локусами, причому в різних тканинах даний фермент може мати різні поліпептиди. Так утворюються ізоферменти, які в різних тканинах мають різну активність. Існує кілька ізоферментів лактатдегідрогенази (ферменту, який каталізує взаємоперетворення піровиноградної кислоти на молочну і зворотньо), фосфоглюкомутази, каталізуючої взаємоперетворення глюкозо-1-фосфата на глюкозо-6-фосфат, декілька ферментів, що беруть участь у розпаді глікогену і т.д. Так, внаслідок хвороби Мак-Ардля порушений гліколіз (розпад) мускульного глікогену, а нирковий розпадається нормально. При хворобі Герса (V тип глікогенозу за Г.Корі) порушується гліколіз печінкового глікогену, а мускульний глікоген розпадається нормально, хоча в обох випадках ферментом гліколізу, що пошкоджує, є фосфорилаза глікогену.

Різні ферменти можуть мати свій оптимум активності за певним рН середовища. Цим пояснюється різноманітність спадкових порушень обміну речовин під час однієї і тієї ж форми ензимопатії.

Відомі й інші механізми розвитку спадкових молекулярних хвороб. Під час дії на клітину організму ультрафіолетових променів, іонізуючої радіації або хімічних речовин у молекулі ДНК може відбутися утворення зв'язків між двома азотистими основами (утворення димерів тиміну й інших основ). У нормі вказані порушення усуваються репаративними системами клітини. При

неповноцінності репаративних систем указані димери не усуваються. Чим більше димерів піримідинів утворюється в клітині, тим менш життєздатною вона стає, що сприяє розвитку низки захворювань (названих хворобою репарації ДНК). До таких захворювань відноситься пігментна ксеродерма, анемія Фанконі, прогерія, синдром Блюма, атаксія – телеангіектазія та інші.

Встановлено, що ДНК людини містить 3 млрд. нуклеотидів. Під час поділу клітини число помилок нуклеотидної послідовності досягає 50 тис. У клітині людського організму при температурі 37°C за день в середньому втрачається 20 тис. азотистих основ спонтанно. Зовнішній вплив збільшує кількість цих витрат.

Так, під час ультрафіолетового опромінення виникають зміни у молекулі ДНК у вигляді утворення міцних хімічних зв'язків між піримідиновими основами (Т, Ц) одного ланцюга. При цьому порушуються водневі зв'язки між двома нитками ДНК і ускладнюється реплікація ланцюгів.

При опроміненні рентгеном або γ -променями відбувається розрив подвійного ланцюга ДНК в основному за рахунок продуктів радіолізу води до водню і гідроксилу (H^+ і OH^-). Ці радикали у край реакційно здатні.

Хімічні речовини самі по собі або продукти їх перетворення міцно зв'язуються з пуриновими основами ДНК (А, Г) і таким чином модифікують вказані основи. До таких речовин відноситься бензипірен, який знаходиться у тютюновому диму цигарок. Інші мутагени послаблюють зв'язки пуринових основ з цукром дезоксирибозою, і вони легко втрачаються.

В нормі ці дефекти усуваються репаративними системами. Є декілька способів репарації. Один з них ферментативний. Фермент ендонуклеаза знаходить місце дефекту і розрізає нитку ДНК поблизу такого розриву. Екзонуклеаза знаходить місце дефекту і розрізає нитку ДНК поблизу нього. Утворений пролом в одній нитці подвійної спіралі за допомогою ферменту ДНК-полімерази заповнюється нуклеотидами, комплементарними нуклеотидам цілої нитки. Потім фермент лігаза зшиває новоутворений фрагмент з іншою ниткою і цілісність подвійної спіралі ДНК відновлюється.

Якщо пролом дуже великий і репаративна ферментна система не в змозі виправити дефект, то може вступити інший механізм репарації ДНК. Молекула ДНК розплітається на одиночні ланцюги, і на цих ланцюгах проходить реплікація за рахунок вільних нуклеотидів за допомогою ДНК-полімерази. Однак нуклеотиди можуть бути не комплементарними, а випадковими. Так виникає мутація, яка буде передана наступним дочірнім клітинам протягом їх поділу.

Чим більше не виправлених дефектів утворюється в клітині, тим менш життєздатною стає дана клітина, що прискорює її старіння і сприяє появі ряду захворювань. У процесі репарації можуть виникнути помилки відновлення. Репарація дозволяє відновити молекули нуклеїнових кислот в організмі.

Питання для самоконтролю

26. Розкажіть про механізми репарації.
27. Що таке «мутагени» та «антимутагени»?
28. Розкажіть про класифікацію мутагенів.
29. Які типи аберацій хромосом Вам відомі?
30. Що Вам відомо про точкові мутації?
31. Яким чином формуються спадкові захворювання у людини?
32. Що запобігає утворенню спадкових захворювань?

ЛІТЕРАТУРА

24. Гершензон С.М. Основы современной генетики. – К.: Наукова думка, 1983. – 560 с.
25. Демидов С.В., Бердишев Г.Д., Топчий Н.М., Черненко К.Д. Генетика. – К.: Фітосоціоцентр, 2007. – 412 с.

26. Демидов С.В., Топчій Н.М., Бердишев Г.Д., Климнюк Г.І., Гавриленко Т.І. Генетика постнатального онтогенезу. – Київ: Фітосоціоцентр, 2006. – 251 с.
27. Демидов С.В., Мінченко Ж.А., Гавриленко Е.І., Топчій Н.М. Імуногенетика – К.: ТОВ «Знання», 2010. – 518 с.
28. Демидов С.В., Безруков В.Ф., Козерецька І.А., Сиволоб А.В., Рушковський С.Р., Лазаренко Л.М., Топчій Н.М. Загальна та молекулярна генетика. Практикум. - Київ: Фітосоціоцентр, 2005. – 259.
29. Ридли М. Геном. - М.: Эксмо, 2008.
30. Сиволоб А.В., Рушковський С.Р., Кир'яченко С.С., Афанасьєва К.С., Безруков В.Ф., Козерецька І.А., Демидов С.В. Генетика: Підручник. – К.: Видавничо-поліграфічний центр “Київський університет”, 2008. – 304 с.
31. Сиволоб А.В. Молекулярна біологія: Підручник. – К.: Видавничо-поліграфічний центр “Київський університет”, 2008. – 384 с.
32. Уиллет Э. Генетика без тайн. – М.: Эксмо, 2008. – 224 с.

РОЗДІЛ 5

Мітохондріальні захворювання

Новітні наукові досягнення в галузі молекулярно-генетичних технологій дозволили виявити спільність етіопатогенетичних чинників розвитку досить великої гетерогенної групи хвороб із поліморфізмом клінічних проявів, що дало змогу об'єднати їх в загальну групу **мітохондріальних захворювань (МТЗ)**, які за характером порушень можна виявити як серед спадкових хвороб із класичним характером успадкування, так і серед синдромів неясного, мультифакторного походження. Мітохондріальні захворювання мають тяжкий перебіг, викликають інвалідизацію і часто супроводжуються резистентністю до терапевтичних заходів. До даної групи захворювань відносять досить широкий спектр хвороб нервової, ендокринної, м'язової систем, хвороб зору, серця, нирок та інших органів.

Останнім часом було висунуте припущення, що саме мітохондріальні мутації складають основу механізмів формування і прогресії цілої низки нейродегенеративних синдромів, зокрема паркінсонізм, хвороба Альцгеймера, а також ішемічна хвороба серця.

5.1. Мітохондріальний геном (mitochondrial genome)

Мітохондріальний геном - це сукупність генів, які знаходяться в мітохондріях і контролюють біогенез енергії шляхом окисного фосфорилування. (На рис. 1 представлена структура мтДНК людини). Клітини людини містять від 1 – 3 до кількох тисяч мітохондрій, кожна з яких несе від 1 – 2 до 15 копій мтДНК. У мтДНК можуть виникати структурні зміни, які і складають основу дегенеративних процесів, онкогенезу і старіння організму. Наприклад, один із сучасних світопоглядів на механізм старіння організму людини пов'язаний саме з накопиченням структурних змін в мтДНК, і відсутністю систем репарації.

В мітохондріях знаходиться майже 90% усієї клітинної АТФ. Накопичення в ній мутацій, делецій, обумовлено окисними пошкодженнями в постмітотичних клітинах.



Рис.1 Структура мтДНК людини.

З віком частота таких ушкоджень в ДНК мітохондрій клітин головного мозку, м'язів скелету, серця зростає і відіграє велику роль в розвитку дегенеративних процесів.

Для мітохондріального геному характерна більш висока швидкість мутагенезу порівняно з ядерним геномом. Точкові мутації в генах мтДНК виникають у 6—17 разів швидше, ніж в аналогічних ядерних генах. Оскільки еволюційна консервативність мітохондріальних генів така сама як і ядерних, то висока швидкість виникнення мутації свідчить про те, що патогенні мутації є більшіймовірними для мітохондріальної ДНК в порівнянні з ядерною. На рис. 2

Human mitochondrial DNA

Гени:

- Комплекс I (НАДФ дегідрогеназа)
- Комплекс II (Цит С оксидоредуктаза)
- Комплекс III (Цит С оксидаза)
- Комплекс IV (АТФ синтаза)

— тРНК
— рРНК

Мутації, асоційовані з діабетом

Відносно пухлинних клітин також відомо, що характерною їх ознакою є висока нестабільність мітохондріального геному, яка визначається за частотою мутацій і мікросателітному поліморфізму. Тобто, мітохондріальний геном являє собою високочутливу мішень для екзогенних фізичних і хімічних агентів і структурні порушення які виникають в ньому внаслідок негативного впливу екзогенних чинників ініціюють формування патологічних процесів. містить Мітохондрії локалізовані практично в кожній клітині людського організму.

Мітохондрія (mitochondria) - це органоїд цитоплазми, який відіграє ключову роль в окисному фосфорилуванні, аеробному метаболізмі глюкози і жирних кислот, в сигнальному шляху кальцію і апоптозі клітин. Мітохондріальні гени передаються по материнській лінії (рис. 3).



Рис. 3. Схема успадкування мітохондріальної ДНК.

Мітохондрії мають власний спадковий апарат, мтДНК і відіграють важливу роль у передаванні спадкової інформації незалежно від ядра. На рис. 4 представлені схематично генетичні і біохімічні процеси, які відбуваються в мітохондріях.

ДНК мітохондрій складаються з 15 568 пар основ. Така коротка нуклеотидна послідовність ДНК кодує лише незначну частину усіх білків і РНК, вміщених в мітохондріях. Мутації в ДНК мітохондрій виникають значно легше ніж в ДНК ядер клітин, оскільки в мітохондріях не існує механізму репарації ДНК. Вони

не захищені гістонами (білками з лужними властивостями), які присутні в ядрах клітин еукаріот у складі комплексів з ДНК (хроматин, нуклеосоми).

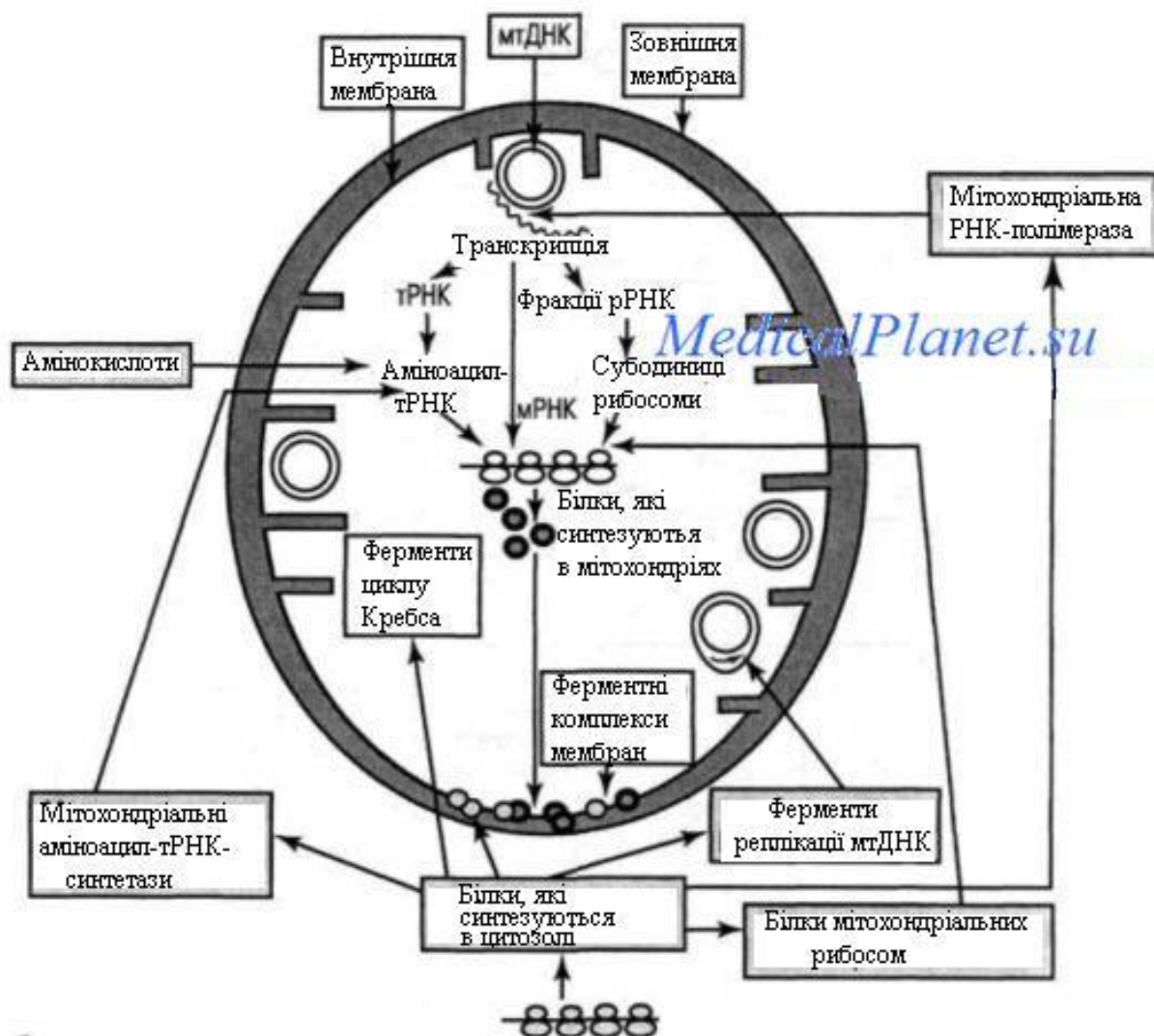


Рис. 4. Процеси, які відбуваються в мітохондрії.

Мітохондрії не можуть самовідновлюватися. Реплікація і транскрипція залежать від трансдіючих чинників, які кодуються ядерним геномом, таких як *BRCA1*. Розвиток злоякісних новоутворень пов'язаний з накопиченням мутацій, які виникають як в ядерній так і в мітохондріальній ДНК. Але гени, які присутні в мтДНК пухлинних клітин, мають посилену дію агресивних сполук кисню (реактивних кисневих часток –ROS-reactive oxygen species), які є побічними продуктами при роботі дихального ланцюга і можуть бути

активними мутагенами. Іншим фактором може бути більш низька точність реплікації і репарації ДНК в мітохондріях. Відсутність гістонів у мтДНК є причиною її високої доступності для дії різних мутагенів, що викликає накопичення значно більшої кількості мутацій ніж в ядерній ДНК. Далі відбувається витиснення мітохондрій з нормальними генами за рахунок переважного розмноження мітохондрій з мутантною мтДНК. Як наслідок, всі мітохондрії в пухлинних клітинах є нащадками мітохондрій з мутантною ДНК. Для порівняння – якщо в гені ядерної ДНК може бути присутнім лише одна або дві копії мутантного гена, то в мітохондріях пухлинної клітини може бути від кількох сотен до 10 000 копій мутантного гена мтДНК. Даний факт свідчить про те, що якщо вивчати мутантні гени мітохондрій в крові онкологічних хворих, то чутливість диференційної діагностики можна підвищити в сотні разів по відношенню до методів виявлення онкогенів з ядерної ДНК пухлинних клітин. Наприклад, вважається можливим виявлення пухлини з діаметром 2 – 3 мм. При виявленні в крові пацієнта мутантної мтДНК з пухлинних клітин, можливо визначити новоутворення розміром до 1мм. На рис.5 можна побачити розташування мітохондрій відносно інших клітинних елементів і структуру мітохондрій в розрізі.

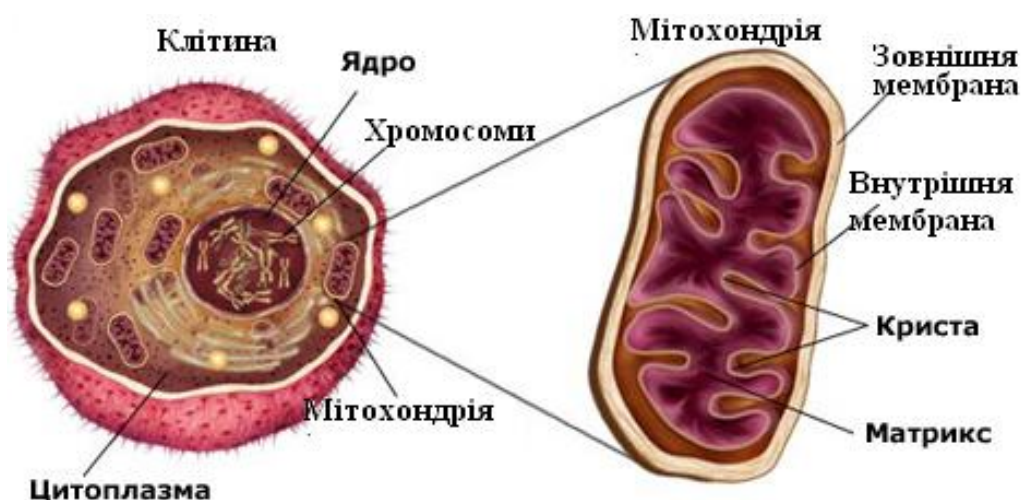


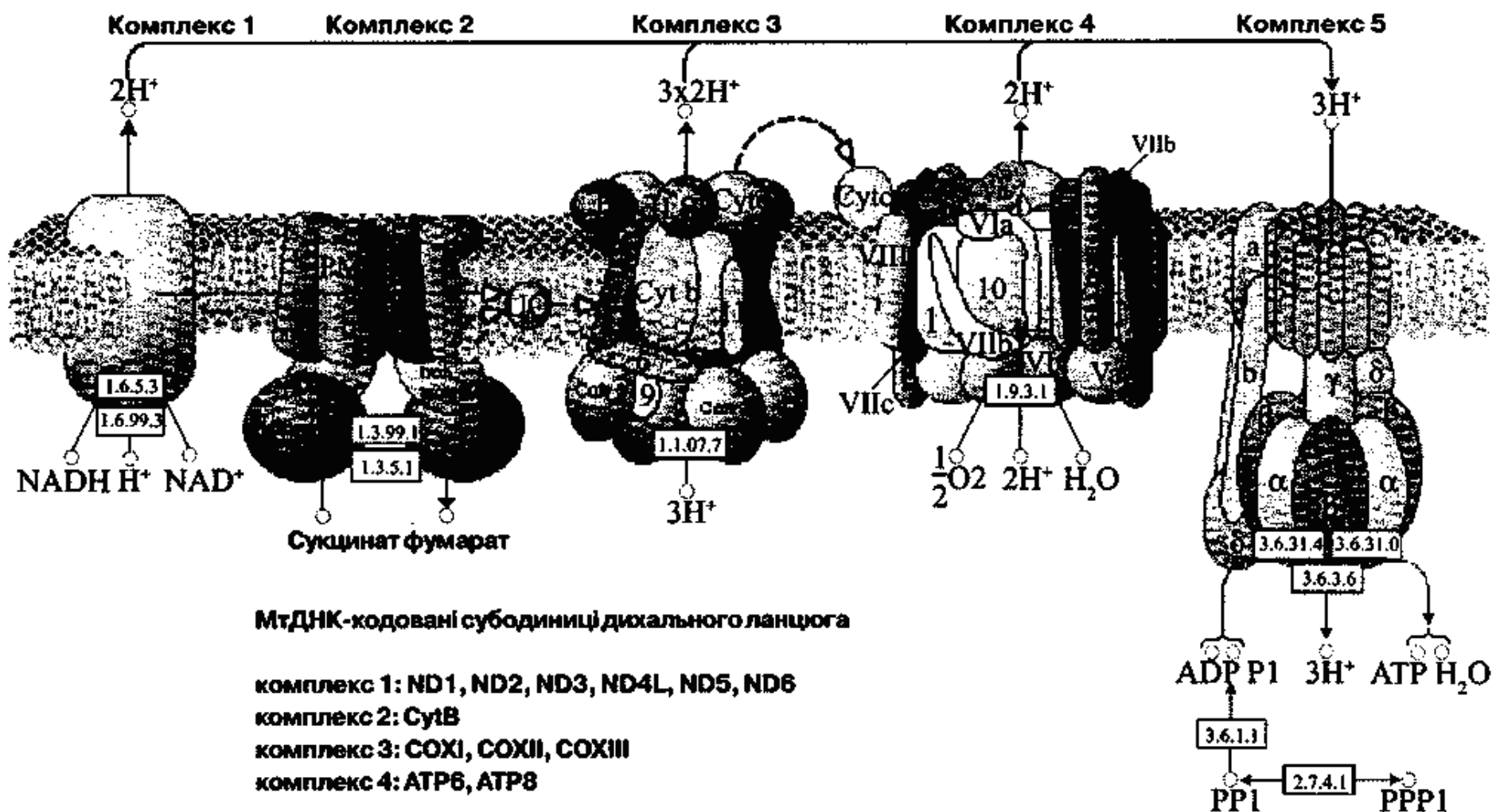
Рис. 5. Структура мітохондрії в середині клітини.

У матриксі мітохондрій відбувається основна частина клітинних біохімічних процесів, зокрема, процес акумуляції внутрішньоклітинної енергії у формі макроергічних зв'язків молекул АТФ-, процес окисного фосфорилування. Синтез АТФ включає комплекс висококоординованих ферментативних реакцій від процесів катаболізму вуглеводів і жирів з утворенням ацетил-КоА, його окиснення в циклі Кребса, до формування ланцюга дихальних ферментів електрохімічного мембранного градієнта, який запускає роботу АТФ-синтетази. Дихальний ланцюг структурно складається з групи взаємозалежних ферментних комплексів, інтегрованих у внутрішню мембрану органели, і відіграє ключову роль у процесі енергетичного обміну (рис. 6). Майже 90 % усієї енергії, як на рівні клітини так і на рівні організму в цілому, забезпечується функціонуванням дихального ланцюга мітохондрій.

При цьому велике метаболічне значення має молекулярна гетерогенність ізоферментів. Наприклад, гетерогенність МДГ у клітині пов'язана із адаптаційною здатністю ферменту до мікрое впливів середовища. МДГ₂ більш чутлива до змін, ніж МДГ₁. Обидва фермента однаково зв'язують НАД × Н₂, утворюючи менш стійке з'єднання в процесі зростання рН. Цим пояснюється гальмування в мітохондріях відновлення оксалацетат, а в надосадовій фракції – окислення малату. Вважається, що ці процеси виконують важливу роль в енергообміні метаболічних реакцій в мітохондріях. На рис. 7 представлена схема біологічної ролі цитоплазматичної та мітохондріальної МДГ. В мітохондріях проходить окислення малату. Утворений оксалацетат потрапляє до цитоплазми, де відновлюється до малату. Малат надходить до мітохондрії і цикл замикається.

Треба відзначити роль ізоферментів МДГ, які обіймають більш повне використання енергії біологічного окислення і передачі разом з малатом електронів в мітохондрії з наступною участю в синтезі АТФ. Розподіл

цитоплазматичного і мітохондріального ізоферментів в різних тканинах неоднаковий.



5.6. – Схема процесу окисного фосфорилювання і структурна організація ферментних комплексів дихального ланцюга

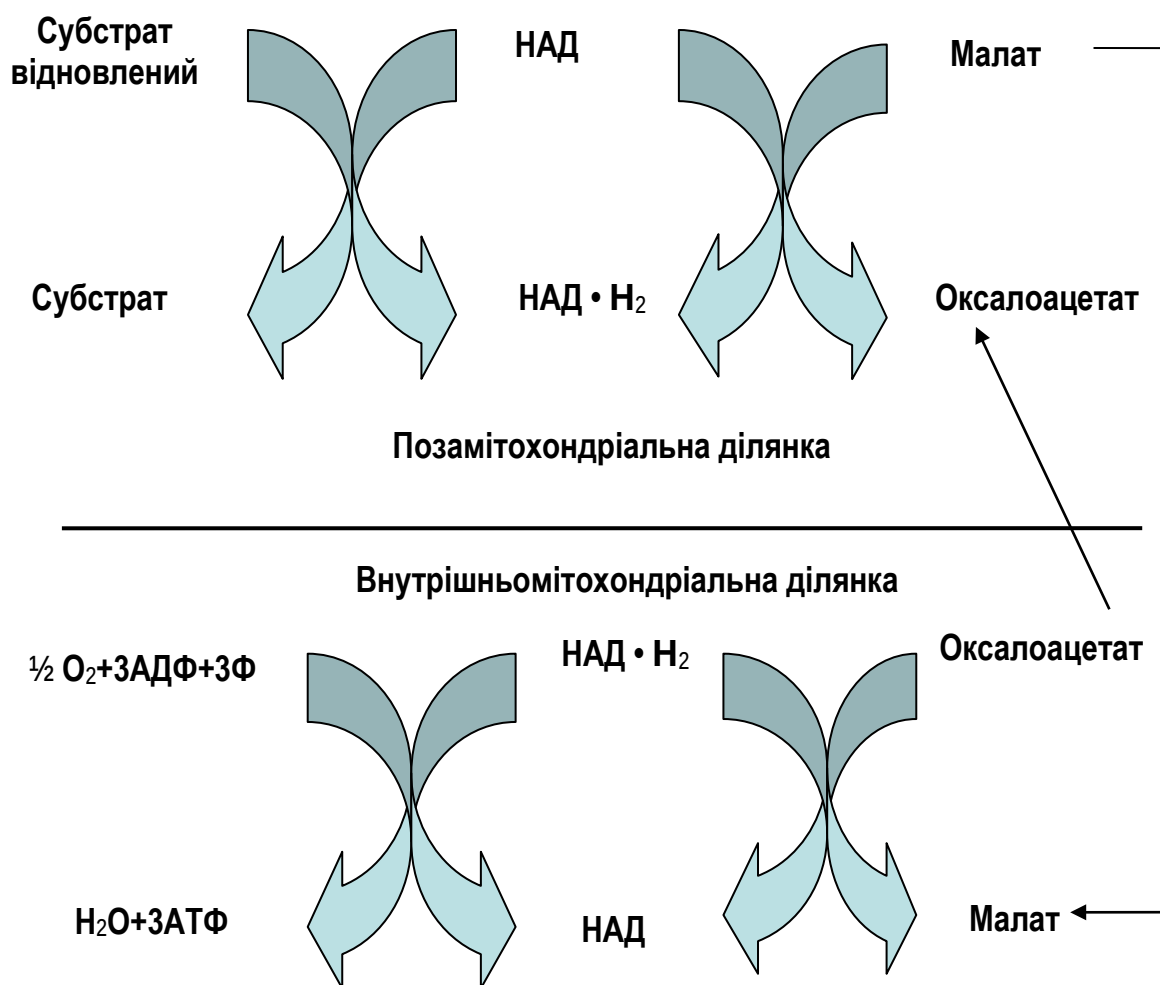


Рис. 7 - Функції мітохондріальної та цитоплазматичної МДГ.

У жировій тканині, мозковій речовині наднирників, печінці вміщується цитоплазматичний ізофермент. Екстрамітохондріальне положення МДГ (НАДФ⁺) у печінці і жировій тканині відповідає основному місцю ліпогенезу і співвідноситься з концепцією про те, що даний ізофермент забезпечує НАДФН для синтезу жирних кислот. Мозок, серце, коркова речовина, наднирників і нирка вміщують цитоплазматичний і мітохондріальний ізоферменти, що передбачає іншу функціональну роль. Для гідроксилірування стероїдів в мітохондріях коркової речовини наднирників необхідно НАДФН. Генерування НАДФН для даної системи

пов'язано з активністю мітохондріальної МДГ(НАДФ+). Базуючись на існуванні 2 ізоферментів Симпсон і Естабрус розписують „шунт малату”, коли мітохондріальний фермент діє у напрямку прямої реакції, а цитоплазматичний – зворотної і утворює малат з пірувату і CO_2 . Це підтверджується виміром співвідношення $U_{\text{макс}}$ Прямой реакції і $U_{\text{макс}}$ зворотної, яке для мітохондріального ферменту дорівнює 50, а для цитоплазматичного - 25.

Материнське успадкування мітохондріальних генів - є загальний тип успадкування для усіх хребетних, у тому числі й у людини, і має певні відміни від класичного, менделівського типу успадкування, властивого ядерним генам (рис. 8).

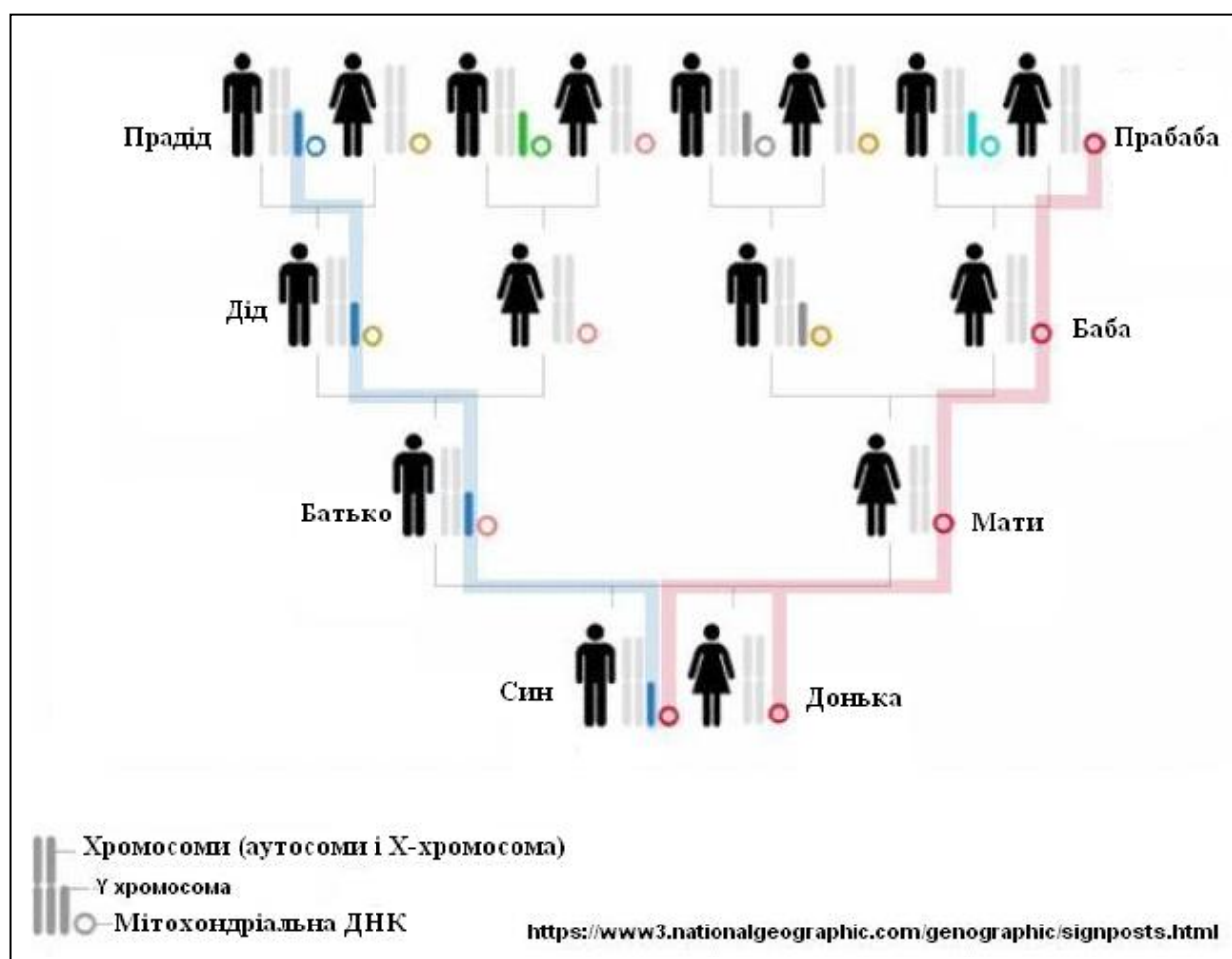


Рис.8. Родовід передачі мітохондріальної ДНК.

Фізіологічний механізм материнського успадкування полягає в тому, що під час запліднення сперматозоїд після проникнення в яйцеклітину втрачає хвіст із мітохондріями і мтДНК, або остання селективно елімінується. Таким чином, у заплідненні бере участь лише ядерна ДНК спермія. Даний механізм обумовлює передачу патогенних мутацій мтДНК, а також викликаних ними клінічних фенотипів, як правило передаються нащадкам лише від матері. (рис. 9).

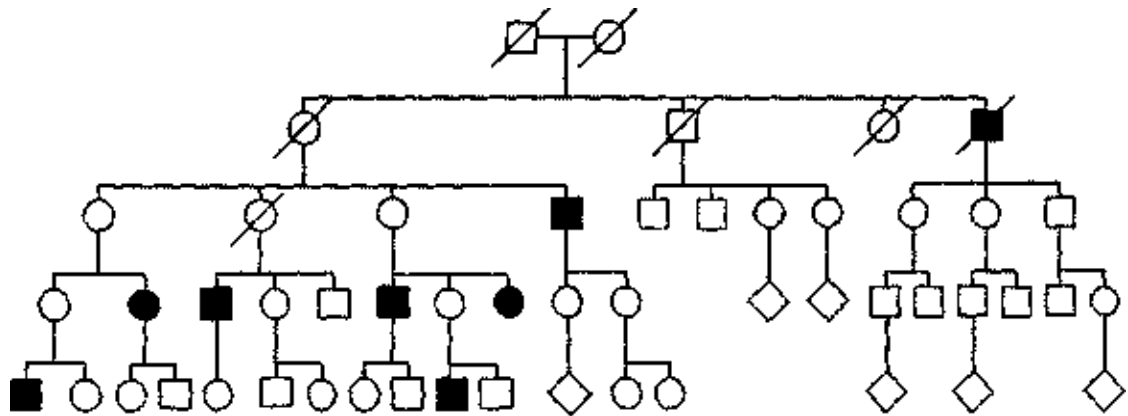


Рис. 9. - Родовід людини з хворобою Лебера. Хворі (темні символи) виявляли маніфестацію захворювання у віці 15 - 33 років. Характерною ознакою є передання фенотипу по материнській лінії і значне варіювання пенетрантності.

5.2. Реплікаційна сегрегація і гетероплазмія.

Під час розподілу клітин з гетероплазмією процес розподілу мутантної мтДНК серед дочірніх клітин носить випадковий характер. Тобто, як наслідок багаторазових клітинних розподілів склад мутантних мтДНК у різних клітинних лініях може дрейфувати лише в напрямку мутантного чи дикого типів. Такий процес отримав назву реплікаційної **сегрегації** (рис. 10).

Феномен реплікаційної сегрегації може відбуватись як у соматичних клітинах так і в клітинах зародкових шляхів. Цим пояснюється

непропорційне розходження мутантних молекул мтДНК, а такожі фенотипне розходження між нащадкам і між різними тканинами й органами індивіда.

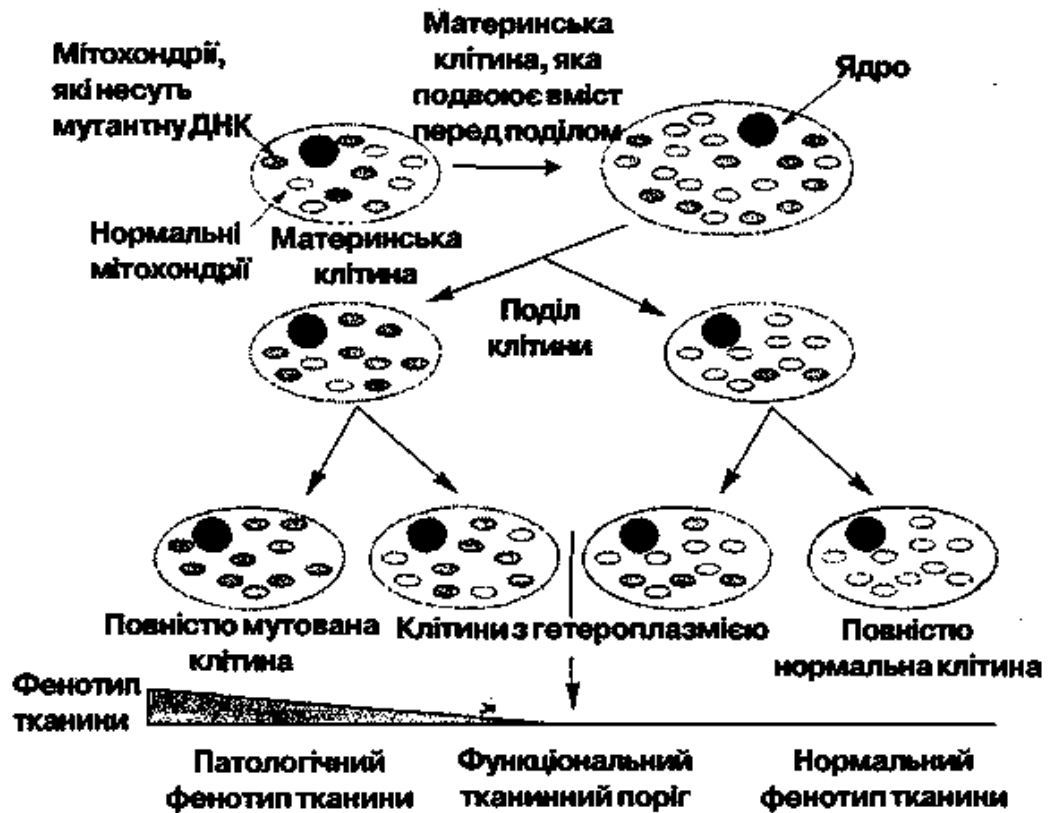


Рис. 10. Феномен реплікаційної сегрегації і гранична експресія фенотипу

Інколи мітохондріальний генотип може змінюватися протягом одного покоління. Такий випадковий характер реплікаційної сегрегації не дає змоги визначити істинний рівень мутантних молекул мтДНК і ймовірний ризик експресії фенотипу. Це в певній мірі обмежує можливості медико-генетичного консультування. Як наслідок, реплікаційна сегрегація формує значне варіювання різних клінічних симптомів і ураження різних органів у індивідів навіть у межах однієї родини. Дослідження клінічній картини мітохондропатій на основі родоводів людини з патологічними мутаціями мтДНК дозволяє заключити про переважання симптомів ураження нервової і м'язової систем організму.

5.3. Мутації мтДНК

Різні тканини мають відмінну чутливість відносно пошкоджувальної дії мутацій мтДНК, що може бути обумовлено:

- комбінованим впливом феномену реплікаційної сегрегації;
- патогенності мтДНК мутації;
- відмінностями в енергетичній потребі органів і тканин;
- відмінностями в компенсаторних можливостях клітин.

Слід пам'ятати про те, що для підтримки базисних клітинних функцій, мінімальний рівень АТФ-продукції є відмінним для різних тканин. Доки кількість нормальних мтДНК залишається в межах, достатніх для підтримки дихального ланцюга ферментів(вироблення необхідного рівня енергії), доти клітинний фенотип залишається незмінним. У випадках, коли пропорція мутантних мтДНК перевищує допустимий рівень, тоді відбувається швидка зміна нормального клітинного фенотипу на аномальний.

До загальних характерних рис МТЗ відносять:

- Полісиндромність уражень переважно з залученням нервової системи, органа зору, серця і соматичних м'язів.
- Відстрочена експресія - більшість захворювань мають невроджений характер і починаються в дитячому та молодому віці.
- Прогредієнтність перебігу з негативною динамікою і збільшенням симптомів ураження різних органів і систем.
- Мала ефективність застосування традиційних лікувальних заходів. Порушення системи окисного фосфорилування може носити сімейний характер і мати у родоводі кількох хворих.

Наявність атипового перебігу захворювання може свідчити про мітохондріальне походження даного синдрому (табл. 1).

Відносно класифікації захворювань, в основі яких лежить порушення нормальної роботи окисного фосфорилування мітохондрій, на сьогодні ще

немає загальноприйнятої, оскільки існує певна складність в інтерпретації як біохімічного дефекту, так і поліморфізму проявів захворювань..

Таблиця 1

Атипові ознаки деяких захворювань, які можуть свідчити про мітохондріальне походження хвороби (Гречаніна і соавт., 2007р.)

Діагноз	Атипові ознаки	Дефект мтДНК
Аутизм	Судоми	Перебудови мтДНК
Затримання мовного розвитку	Підвищення рівня лактату плазми	MELAS
Лейкемія	Материнське успадкування	Перебудови мтДНК
	тромбоцитопенії	
Лейкодистрофія	М'язова гіпотонія	Перебудови мтДНК
Мігрені	Зниження слуху, інсульт, діабет	MELAS
Міоклонічна епілепсія	Міопатія	MERRF
Мозкові інсульти	Молодий вік	MELAS
Печінкова недостатність	Відсутність вірусних маркерів, підвищення лактату плазми	Мутації мтДНК
Пігментна ретинопатія	Неврологічні розлади	NARP
Поперечні блокади	Молодий і дитячий вік	Мутації мтДНК

серця		
Нирковий	Підвищення лактату,	Мутації мтДНК
канальцевий ацидоз	гіпотонія	
Птоз,	Серцеві блокади	CPEO
офтальмоплегія		
Раннє зниження	Вік 20—40 років	MELAS
слуху		
Розсіяний склероз	Судоми	Мутації мтДНК
Серцева	Початок до 50 років	Мутації мтДНК
недостатність	гіпертрофічної кардіоміопатії	
Синдром раптової	Гіпоглікемія	MCAD
дитячої		
смерті (SIDS)		
Сліпота	Зорова атрофія, дистонія	LHON
Цукровий діабет II	Приглухуватість	MELAS
типу		
Хронічний	Інсультоподібні епізоди	Перебудови
панкреатит	або	мтДНК,
	тромбоцито-лейкопенія	MELAS
Шизофренія	Судоми	MELAS
Епілепсія	Раптовий початок у віці	Перебудови
	1—8 років на тлі або	мтДНК
	після інфекції, нічні	
	епізоди, нефокальна ЕЕГ	

Найбільш адекватною є молекулярно-генетична класифікація, відповідно до якої ідентифіковано 3 класи мутацій мтДНК, порушення нормального функціонування дихального ланцюга:

1) мутації структурних генів;

2) заміна основ, що порушують трансляцію білка в мітохондріях;

3) перебудова мітохондріального геному.

Вже описано понад 100 точкових мутацій мтДНК і сотні перебудов мітохондріального геному, асоційованих зі значним спектром захворювань людини, що варіює від летальних неонатальних розладів до нейродегенератив-них захворювань пізнього віку. На рис.11 представлений спектр патогенних мутацій у структурних генах мтДНК, які призводять до атаксії, хореї, дистонії та хвороби Паркінсона.

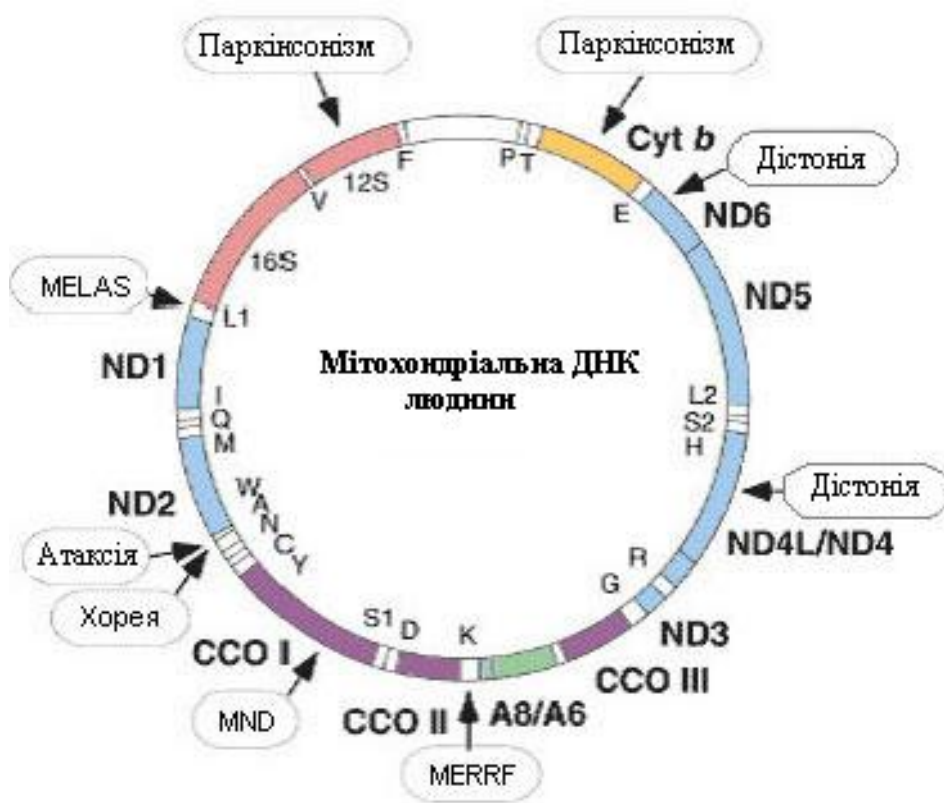


Рис. 11. - Спектр патогенних мутацій у структурних генах мтДНК

Загалом, описано понад 50 мутацій в структурних генах мтДНК, експресія яких призводить до розвитку спадкових синдромів. Спектр МТЗ є досить широкий – це : хвороба Альцгеймера, хвороба Лебера, дистонія, хвороба Паркінсона, дитяча кардіоміопатія "плюс", гастроінтестинальний рефлюкс, інсулінонезалежний цукровий діабет, летальна дитяча мітохондріальна міопатія, материнська міопатія і кардіоміопатія, успадковані по материнській лінії: гіпертрофічна кардіоміопатія, аміноглікозидзумовлена

приглухуватість, синдром Лея; синдром міоклонічної епілепсії і "рваних червоних волокон" (MERRF), синдром мітохондріальної енцефаломіопатії, лактатацидозу й інсультподібних епізодів (MELAS) та інші.

5.4. Загальна клініко-генетична характеристика мітохондріальних хвороб

Патогенетичний субстрат мітохондріальних хвороб складають генетичні дефекти дихального ланцюга (АТФ-недостатність), які спричиняють порушення функціональних систем клітини. Як правило, це торкається високоенергетичних органів - сітківки ока, серця, нирки, м'язів і проявляється в різних комбінаціях симптомів, як нервово-м'язових так і інших. Перебіг хвороби є прогресивним, але може варіювати. Дефекти дихального ланцюга можуть проявлятися у будь-якому віці. Так, може порушуватись внутрішньоутробний розвиток плода (тяжка внутрішньоутробна гіпотрофія, вади розвитку мозку). У маленьких дітей частіше діагностується енцефаломіопатія, у дорослих особин — міопатія. Оскільки уражені органи можуть бути різними, молекулярна діагностика їх є гетерогенною. Тип успадкування може бути рецесивним, домінантним, Х-зчепленим (у разі уражень ядерної ДНК, особливо у дітей перших 5 років життя) або материнським з варіабельною експресією чи пенетрантністю.

На відміну від дефектів дихального ланцюга, у випадку ізольованої недостатності піруватдегідрогенази (ПДГ), не виникає кардіоміопатія і досить рідко даний дефект спричиняє печінкову недостатність. Головними клінічними ознаками захворювань є затримання розвитку, м'язова гіпотонія, епілепсія, атаксія, апное і прогресивна енцефалопатія. Найчастіше уражується субодиниця Е, ПДГ-комплексу. Оскільки цей білок кодується геном на Х-хромосомі, хлопчики уражуються частіше і хвороба має тяжчий перебіг, ніж у дівчаток. Недостатність Е₃ викликає недостатність ПДГ та призводить до розвитку хвороби "кленового сиропу".

У разі дефектів дихального ланцюга до характерних клінічних симптомів відносять:

ЦНС: пре- та перинатальна енцефалопатія у вигляді дегенеративних процесів у мозку (гліоз, гіпотрофія, судомний синдром — міоклонуси, епіеквіваленти, епілепсія, поліневропатія, патологічні рефлексії, зниження чутливості, летаргія, кома, затримання психомоторного розвитку, деменція, атаксія, дистонія, "метаболічний удар", зменшення розмірів турецького сідла.

Очі: птоз, амбліопія, офтальмоплегія, пігментний ретиніт, атрофія зорових нервів, ністагм, катаракта.

Серце: кардіоміопатія (гіпертрофічна), аритмії, порушення провідної системи серця.

Печінка: прогресивна печінкова недостатність (особливо в немовлят), помірна гепатомегалія, неоднорідність паренхіми печінки.

Селезінка: спленомегалія, неоднорідність паренхіми селезінки.

Нирки: тубулопатія (синдром Фанконі), нефрит, ниркова недостатність, пієлєктазія, гідрокалікоз.

Травний тракт: рецидивне блювання, діарея, атрофія ворсин кишківника, порушення екзокринної панкреатичної функції.

Ендокринна система: низький зріст, цукровий діабет.

Кістковий мозок: панцитопенія, макроцитарна анемія.

Шкіра: раннє старіння, недостатній розвиток підшкірної жирової клітковини.

Скелет: аномалії розвитку.

До характерних ознак мітохондріальних захворювань можна віднести також прогресивний тип захворювання, специфічний фенотип (низький зріст, тонке волосся, блакитні білкові оболонки очей), високе піднебіння, лактатацидоз.

5.5. Мітохондріопатії Синдром Кернса—Сейра

Вперше описано в 1958 р. під назвою "пігментний ретиніт, прогресивна зовнішня офтальмоплегія, повна блокада серця". Генетична основа захворювання - делеція мтДНК була виявлена за допомогою молекулярно-генетичних досліджень лише в 1989 р

Синдром має неменделівський характер успадкування та високу частоту спорадичних випадків. Це можна пояснити тим, що великі перебудови мтДНК відбуваються після запліднення яйцеклітини і виявляються головним чином у соматичних, а не статевих клітинах, а овоцити, що містять делеції мтДНК, як правило не здатні до розвитку ембріона.

Захворюваність не залежить від статі, вік маніфестації становить 4—18 років. У клінічній картині характерна тріада ознак:

- 1) початок захворювання у віці до 20 років;
- 2) прогресивна зовнішня офтальмоплегія;
- 3) пігментний ретиніт.

Птоз, як правило, симетричний і білатеральний; рух очних яблук різко обмежений. Часто знижується гострота зору, на очному дні виявляють пігментну грануляцію. Міопатичний синдром визначають через кілька років після виникнення птозу. Обличчя стає гіпомімічним, набуває маскоподібного вигляду, змінюється тембр голосу, виникають часті поперхування, втомлюваність під час тривалої розмови.

У разі фізичних навантажень можуть розвиватися міалгії, кramпi, міотонії, інтенційний тремор. Відзначають епізоди коми внаслідок метаболічних порушень. Ендокринні розлади варіабельні (гінекомастія, гіпогонадізм, цукровий діабет, гіперальдостеронізм, гіпопаратиреоз, дефіцит гормону росту). атрофія кори головного мозку, лейкоенцефалопатія, кальцифіка-ти базальних гангліїв;

У крові відмічають підвищення вмісту аланіну, зниження загального карнітину, фолієвої кислоти, лактату, пірувату;

Відомі два варіанти розвитку синдрому — **повний та неповний**. **Повний варіант** включає хронічну прогресивну зовнішню офтальмоплегію, пігментний ретиніт і передсердно-шлуночкову блокаду. **Неповний**, у свою чергу, поділяють на два варіанти. До першого відносять хронічну прогресивну зовнішню офтальмоплегію та міопатію спадного типу. Другий тип характеризується лише ізольованою хронічною прогресивною зовнішньою офтальмоплегією, виявляється рідко, має пізній початок. Перебіг захворювання прогресивний.

Критерії діагнозу:

Диференціальну діагностику потрібно проводити з іншими формами прогресивних міопатій (окулофарингодистальною міопатією, супрануклеарним латеральним паралічем погляду зі сколіозом та ін.), а також із захворюваннями, що поєднуються з птозом (міастенія, діабетична поліневропатія, синдром Толоза—Ханта, офтальмоплегічна мігрень).

Синдром Пірсона. Уперше описав у 1979 р. Н.А. Pearson із співавт. під назвою "рефрактерна сідеробластна анемія з вакуолізацією клітин кісткового мозку та екзокринною дисфункцією підшлункової залози". Синдром зумовлений делецією мтДНК. Імовірна фенотипна трансформація синдрому Пірсона в синдром Кернса—Сейра внаслідок тканиноспецифічної мітохондріальної гетероплазмії.

Характерні клінічні ознаки:

- початок захворювання від народження або в перші місяці життя;
- гіпопластична анемія;
- порушення екзокринної функції підшлункової залози;
- в окремих випадках — енцефаломіопатія, атаксія, деменція, прогресивна зовнішня офтальмоплегія.

5.6. Синдроми множинних делецій мітохондріальних ДНК

Синдром множинних делецій мітохондріальної ДНК характеризується слабкістю м'язів кінцівок, білатеральними катарактами, передчасною смертю.

Делеції можуть відбуватися в багатьох ділянкахок мітохондріального геному, що призводить до залучення в процес великих фрагментів мтДНК.

Множинні делеції мтДНК успадковуються за менделівським типом, водночас множинні делеції виявляють і в родинях без наявності автосомно-домінантного успадкування. З огляду на тенденцію до збільшення множинних делецій з віком, слід враховувати, що вони можуть бути вторинними щодо процесу старіння.

Синдром множинних делецій мтДНК проявляється зазвичай у 30—40 років, однак може розпочатися і в дитячому віці. Серед кардинальних симптомів хвороби більшість авторів виділяють очні (прогресивний птоз, зовнішня офтальмоплегія, офтальмопарез) і м'язові (м'язова слабкість, стомлюваність, гіпотрофія). Часом відзначають також міоглобіну-рію, непереносимість алкоголю, множинні міоми, афективні розлади та ін.

У крові визначають підвищення рівня лактату, зміну співвідношення лак-тату/пірувату, посилення активності креатинфосфокінази.

Перебіг прогресивний, варіабельний у різних родинях. У разі пізнього розвитку (3-я декада життя) хворі вмирають у віці 40—50 років. Основною причиною смерті стають дихальні розлади. Характерні клінічні ознаки:

- блефароптоз, зовнішня офтальмоплегія;
- м'язова слабкість;
- ЦНС (нейросенсорна глухота, атрофія зорових нервів);
- прогресивний перебіг;
- у крові реєструється підвищення лактату, зміна співвідношення лактату/пірувату, підвищення активності креатинфосфокінази;
- простежується феномен "рваних червоних волокон" у біоптатах скелетних м'язів.

5.7. Делеції і дуплікації ділянок мітохондріальної ДНК

Тип успадкування - успадковується аутосомно-рецесивний. Основу патології складає дефект ядерної ДНК, який контролює реплікацію мтДНК..

Вперше делеції мтДНК були описані Moraes С.Т. із співавт. у 1991р. Крім спадкових форм даного синдрому існують і набуті форми - наприклад у разі застосування препарату зидовудину під час лікування ВІЛ-інфекції. Розрізняють різні його форми: фатальна інфантильна гепатопатія (**Форма 1**), вроджена міопатія (**Форма 2**) та інфантильна міопатія (**Форма 3**).

Критерії діагнозу:

Форма 1:Печінкова недостатність. М'язова гіпотонія. Смерть на першому році життя.

Форма 2: М'язова гіпотонія. Кардіоміопатія. Судоми. Синдром де Тоні—Дебре—Фанконі. У крові — лактат-ацидоз. Зниження активності всіх ферментів дихального ланцюга, У біоптатах — "рвані червоні волокна". Смерть на першому році життя;

Форма 3: Розвиток захворювання у перші 2 роки життя. М'язова гіпотонія. Атрофія проксимальних відділів кінцівок. Втрата сухожилкових рефлексів. Дихальні розлади. У крові — підвищена креатинфосфокіназа, У біоптатах — "рвані червоні волокна". Смерть на третьому році життя

Диференціальну діагностику потрібно проводити, враховуючи спадкові захворювання, які поєднуються з атактичним синдромом і пігментним ретинітом (оливопонтocereбелярні дегенерації, абеталіпопротеїнемії, хвороба Рефсума). Лікування поки що не розроблене.

Синдром Кернса—Сейра вперше описаний у 1958 р. під назвою "пігментний ретиніт, прогресивна зовнішня офтальмоплегія, повна блокада серця. Делеція мтДНК була виявлена за допомогою молекулярно-генетичних досліджень лише в 1989 р

Як і всі МТХЗ, синдром має неменделівський характер успадкування та високу частоту спорадичних випадків, що можна пояснити з двох позицій:

1) великі перебудови мтДНК відбуваються після запліднення яйцеклітини і виявляються головним чином у соматичних, а не статевих клітинах;

2) овоцити, що містять делеції мтДНК, здебільшого не здатні до розвитку ембріона.

Захворюваність не залежить від статі, вік маніфестації становить 4—18 років.

Критерії діагнозу: початок захворювання у віці до 20 років; прогресивна зовнішня офтальмоплегія; пігментний ретиніт.

Ще одна з ознак — передсердно-шлуночкова блокада серця, мозочковий синдром, підвищення рівня білка у спинномозковій рідині (понад 1 г/л).

Птоз, як правило, симетричний і білатеральний; рух очних яблук різко обмежений. Часто знижується гострота зору, на очному дні виявляють пігментну грануляцію. Може розвинутися диплопія, що не коригується антихолінестеразними препаратами.

Міопатичний синдром визначають через кілька років після виникнення птозу. Обличчя стає гіпомімічним, набуває маскоподібного вигляду, змінюється тембр голосу, виникають часті поперхування, втомлюваність під час тривалої розмови.

У разі фізичних навантажень можуть розвиватися міалгії, кramпi, міотонії, інтенційний тремор. Відзначають епізоди коми внаслідок метаболічних порушень. Ендокринні розлади варіабельні (гінекомастія, гіпогонадізм, цукровий діабет, гіперальдостеронізм, гіпопаратиреоз, дефіцит гормону росту). Можуть відмічатись кіфосколіоз, краніосиностоз, метафізарна дисплазія, порушення емалегенезу, ураження нирок за типом ниркового тубулярного ацидозу або синдрому де Тоні—Дебре—Фанконі. Імовірні два варіанти розвитку синдрому — повний та неповний. Повний варіант включає хронічну прогресивну зовнішню офтальмоплегію, пігментний ретиніт і передсердно-шлуночкову блокаду. Неповний, у свою чергу, поділяють на два варіанти. До першого відносять хронічну прогресивну зовнішню офтальмоплегію та міопатію спадного типу. Другий тип характеризується лише ізольованою хронічною прогресивною зовнішньою офтальмоплегією, виявляється рідко, має пізній початок. Перебіг захворювання прогресивний.

5.8. Мутації в ядерній ДНК

Глутова ацидемія.

Тип успадкування — Х-зчеплений, рецесивний та аутосомно-рецесивний. Захворювання спричинюється множинним дефіцитом мітохондріальних флавопротеїнових ацил-КоА-дегідрогеназ. Має дві форми:

Форма 1 — глутарил-КоА-дегідрогеназа, дефект у метаболізмі лізину та триптофану, зниження рівня карнітину.

Форма 2 - множинна недостатність ацил-КоА-дегідрогеназ жирних кислот. Форми: летальна, неонатальна з вродженими аномаліями (Х-зчеплена, рецесивна ПА типу), неонатальна без вроджених аномалій (ІВ типу), інфантильна (ІВ типу), дитяча та пізня (легкі форми глутової ацидемії ІІ В типу — метилмалонова-адипінова ацидемія).

Критерії діагнозу, диференціальна діагностика, лікування:

Форма 1: Респіраторний дистрес-синдром, макроцефалія, фронтально-скронева атрофія, гострі енцефалопатичні кризи (особливо у віці 6—18 місяців), деструкція смугастого тіла, дистоніко-дискінетичне порушення, м'язова гіпотонія, блювання, гепатоспленомегалія, незвичайний запах сечі, анемія, у сечі — підвищення рівня глутової кислоти, 3-гідроксиглутової кислоти, глутарилкарнітину, зниження вмісту карнітину (іноді результати можуть бути в нормі). Прогноз сприятливий, коли діагноз установлений на ранніх стадіях, в інших випадках виникають проблеми в лікуванні.

Форма 2: (ІІ А тип): хворіють переважно хлопці. Респіраторний дистрес-синдром, м'язова гіпотонія, летаргія, кома, блювання, гепатоспленомегалія, незвичайний запах сечі, анемія, черепно-лицеві дисморфії, які нагадують синдром Целльвегера. У сечі — органічні кислоти, КТ — дегенерація мозку, аномалії травного тракту, полікістоз нирок, вроджені вади серця, ранній прояв захворювання. Тяжкий перебіг хвороби і рання смерть.

(II В тип): Ранній прояв захворювання. Тяжкий перебіг хвороби і рання смерть.

Фумарова ацидемія. тип успадкування автосомно-рецесивний; Уперше описали Zinn зі співавт. у 1968 р. Локус — 1q42.

Критерії діагнозу: прояви до 5—7 місяців; поганий приріст маси тіла; повторюване блювання; підвищена збудливість; тоніко-клонічні судоми; дистонія; мікроцефалія; аутизм; ферментодіагностика — дефект фумарази; у сечі відзначають високу концентрацію фумарової кислоти; у крові — підвищення рівня лактату, пірувату, співвідношення лактату/пірувату; ЕЕГ — "спайк-хвиля"; КТ — атрофія кори головного мозку, розширення шлуночкової системи, агенезія мозолистого тіла, можливі кісти головного мозку; у біоптатах — "рвані червоні волокна".

Прогноз несприятливий, смерть унаслідок інтеркурентних інфекційних захворювань.

Дефіцит комплексу 1 (НАДН₂:КоQ-редуктаза).

Тип успадкування: аутосомно-домінантний. Імовірний - рецесивний Х-зчеплений тип успадкування.

Комплекс містить 25 поліпептидів (18 кодується ядерною ДНК, 7 — мтДНК). Уперше його описали В. Senior, R. L. Jungas у 1974 р. Описано два варіанти: неонатальний (варіант 1), Ранній дитячий (варіант 2).

Критерії діагнозу:

Варіант 1: Генералізована м'язова гіпотонія. Затримка психомоторного розвитку, серцево-судинна недостатність. Смерть настає упродовж перших місяців життя дитини.

Варіант 2: Регрес нервово-психічного розвитку. Прогресивна енцефалопатія (погіршення пам'яті, емоційна лабільність), судоми, резистентні до антиконвульсантів, атаксія, нейросенсорна глухота, офтальмоплегія, пігментний ретиніт, імовірно поєднання міоклонусів зі спастичним тетрапарезом та розумовою відсталістю. Перебіг прогресивний. Прогноз несприятливий у разі неонатального розвитку

Дефіцит комплексу 2 (сукцинат-КоQ-редуктаза). Тип успадкування: аутосомно-домінантний. Уперше описав J.E. Riggs у 1984 р

Критерії діагнозу: енцефаломієлопатія; крампі; міоглобінурія; низький зріст; деменція; міоклонуси; дефіцит аконітази, сукцинатдегідрогенази. Перебіг прогресивний.

Дефіцит комплексу 3 (КоQ-цитохром С-оксидоредуктаза). Уперше його описав A.J. Spiro у 1984 р. Комплекс містить 11 субодиниць, одна з яких кодується мтДНК. Імовірно як менделівське, так і материнське успадкування.

Можуть виникати генералізовані мультисистемні порушення і тканино-специфічні синдроми. Описано 3 типи розвитку: неонатальний (1-тип), ранній дитячий (2-тип), дорослий (3-тип).

Критерії діагнозу:

1 -й тип: генералізована м'язова гіпотонія, лактат-ацидоз.

2-й тип: міопатія, атаксія, сенсорна поліневропатія, нейросенсорна глухота, зниження гостроти зору, пігментний ретиніт, низькорослість, цукровий діабет, проксимальні тубулопатії.

3-й тип: Непереносимість фізичного навантаження, крампі, міопатія, м'язова атрофія, енцефалопатія, кардіоміопатія.

Перебіг прогресивний. У кожного з обстежуваних хворих регресія ознак розвивалась через 3 роки після початку захворювання.

Дефіцит комплексу 4.

Комплекс 4 (цитохром С-оксидаза) каталізує перехід редукованих еквівалентів з цитохрому С на молекулярний кисень. Цитохром С містить 13 субодиниць, 3 з яких кодуються мтДНК. Тип успадкування — аутосомно-рецесивний. Існує 2 форми: **міопатична та мультисистемна.**

Міопатична, у свою чергу, поділяють на **фатальний та доброякісний типи**, на першому році життя. Мультисистемні варіанти мають перебіг як окремі тяжкі енцефаломіопатії або асоціюються з іншими синдромами.

Фатальний тип: розвиток у неонатальний період, дихальні розлади, дифузна

м'язова гіпотонія, зниження сухожилкових рефлексів, вроджений лактат-ацидоз.

У деяких хворих міопатія пов'язана з порушенням ниркових функцій (синдром Фанконі) або з кардіопатією. Пацієнти вмирають на першому році життя. Доброякісна інфантильна мітохондріальна недостатність включає трихополіодистрофію та мітохондріальні енцефаломіопатії (хвороба Лея, хвороба Альперса).

Підгостра некротизивна енцефаломієлопатія Лея (D. Leigh) уперше описана у 1951 р. Це хвороба першого-другого років життя (рідко — до 7 років). Тип успадкування аутосомно-рецесивний, Х-зчеплений рецесивний, мітохондріальний.

Критерії діагнозу: прояв із другого тижня життя до 7 років; ЦНС — атаксія, затримання психомоторного розвитку або регресія; м'язова гіпотонія або спастичність; атрофія зорових нервів, пігментний ретиніт, офтальмоплегія, ністагм; респіраторний дистрес-синдром; синдром, подібний до синдрому Рее; лактат-ацидоз; гостре виснаження після звичайних інфекцій; ЯМРТ — симетричне ураження базальних гангліїв, спонгіозна дегенерація середнього мозку, базальних гангліїв; генетичний дефект — мутації мтДНК 8993T>C або T>G (NARP-мутація), мутації SURF1 (недостатність 4-го комплексу), різні ядерні гени (особливо недостатність 1-го комплексу).

Прогресивна склерозивна поліодистрофія Альперса (B.J. Alpers).

Тип успадкування аутосомно-рецесивний. Існує дві форми: **типова форма** та **гостра неонатальна форма**.

Критерії діагнозу:

Гостра неонатальна форма: Пренатальний прояв, ікроцефалія, Затримка психомоторного розвитку, Деформація грудної клітки, Зниження рухомості суглобів, Мікрогнатія, Неонатальні судоми, Порушення ковтання, Пізня форма проявляється в 17—18 років. КТ — атрофія кори головного мозку, спонгіозна дегенерація сірої субстанції головного мозку, У

крові — підвищений вміст лактату, пірувату, гіпербілірубінемія, гіперамоніємія, зниження рівня альбуміну, протромбін.

Типова форма: Генералізовані або парціальні, тоніко-клонічні судоми, міоклонії, затримка психомоторного розвитку, порушення неврологічного статусу, гепатомегалія, летаргія, зниження зору і слуху.

Трихополідистрофія Менкеса. Уперше описав J.H. Menkes у 1962 р. Х-зчеплений рецесивний тип успадкування. Локус — Xq13.3. У жінок ця хвороба зустрічається тільки разом з хромосомною аномалією (транслокація або синдром Шерешевського—Тернера). Патогенез зумовлений дефектом обміну та транспорту міді. Існує дві форми: класична та атипова.

Критерії діагнозу:

Класична форма: виявляється з перших тижнів життя, поганий приріст маси тіла, затримка психомоторного розвитку, гіпотрофія, гіпотермія, генералізовані судоми, міоклонуси, незвичайне волосся ("pili torti") та шкіра за типом "cutis laxa", лице херувима" (гіпомімічне, з низьким переніссям), атрофія зорових нервів, імовірні мікрокісти сітківки. Смерть настає від сепсису або субдуральних крововиливів.

Атипова форма:

Пізній прояв, легкий перебіг, ЕЕГ — гіпсаритмія, КТ — атрофія головного мозку. Хворіють тільки хлопці. У крові — низький рівень міді.

Характерною ознакою МХ є наявність безсимптомного періоду, тривалість якого залежить від порушень метаболізму.

Таким чином, генетичну основу мітохондріальних хвороб можуть складати мутації в генах тРНК, делеції або дуплікації ділянок мітохондріальної ДНК, множинні делеції мітохондріальної ДНК і мутації в ядерній ДНК.

Питання для самоконтролю

1. Надайте характеристику мітохондріальному геному
2. Які саме генетичні дефекти складають Патогенетичний субстрат мітохондріальних хвороб
3. В якому віці зазвичай проявляються генетичні дефекти окиснення жирних кислот?
4. Що таке реплікаційна сегрегація і гетероплазмія.
5. Охарактерізуйте розподіл цитоплазматичних і мітохондріальних ізоферментів в різних тканинах.
6. Основу яких синдромів складають делеції або дуплікації ділянок мітохондріальної ДНК?

ЛІТЕРАТУРА

1. Билл Дж., Ноулз Дж. Внеядерная наследственность. - М., Мир, 1981. – 168 с.
2. Дымшиц Г.М. Сюрпризы митохондриального генома// Природа. – 2002. – № 6.
3. Львова Л.М. Материнское наследие// Провизор. – 2005. – Вып.5.
4. Минченко А.Г., Дударева Н.А. Митохондриальный геном. – Новосибирск: Наука, 1990. – 194 с.
5. Chen SD, Yang DI, Lin TK, Shaw FZ, Liou CW, Chuang YC. Roles of Oxidative Stress, Apoptosis, PGC-1 α and Mitochondrial Biogenesis in Cerebral Ischemia.// Int J Mol Sci.- 2011. - V. 12, № 10. – P. 7199-7215.
6. O'Rourke B, Van Eyk JE, Foster DB. Mitochondrial protein phosphorylation as a regulatory modality: implications for mitochondrial dysfunction in heart failure// Congest Heart Fail.- 2011. – V. 176. – P. 269-282.

7. Sato S, Hattori N. Genetic mutations and mitochondrial toxins shed new light on the pathogenesis of Parkinson's disease.// Parkinsons Dis. -2011. – N. 9. -792-801.
8. Yamada Y, Harashima H. Delivery of bioactive molecules to the mitochondrial genome using a membrane-fusing, liposome-based carrier, DF-MITO-Porter// Biomaterials. – 2011. – N 11.
9. <http://medicalplanet.su/genetica/117.html>
10. <http://images.yandex.ua/>

РОЗДІЛ 7

ХРОМОСОМНІ ХВОРОБИ ЛЮДИНИ

Хромосомні хвороби – це велика група вроджених спадкових захворювань, обумовлених геномними мутаціями або структурними змінами окремих хромосом, що клінічно характеризуються множинними (численними) вродженими вадами розвитку (ВВР) різного ступеню вираженості.

Загальна частота хромосомних хвороб серед новонароджених становить 0,6 - 1,0 %. В структурі множинних вад розвитку хромосомна патологія складає приблизно 30 % від загального числа усіх вад розвитку у новонароджених.

Хромосомні порушення у дітей, які народились з тими чи іншими вадами розвитку, вцілому реєструються у 10 % випадків, а серед тих, хто має множинні вади - до 50 %. Серед дітей з вродженими вадами розвитку (ВВР), народжених раніше строку, частота хромосомної патології сягає 18 %, а за наявності комплексних вад - більше 45 %. У 15 % пацієнтів з недиференційованими формами розумової відсталості, вадами та мікроанаомаліями розвитку також реєструються хромосомні аномалії.

Крім того, за результатами проведених досліджень хромосомними аномаліями обумовлено приблизно 45 % усіх випадків спонтанних (самовільних) абортів та близько 6-7 % мертвонароджень. Найбільша частота хромосомної патології зафіксована в матеріалі ранніх спонтанних абортусів, а близько 30 % усіх запліднених яйцеклітин гине в передімплантаційному періоді (перші 10 днів) через наявність хромосомних аномалій. Таким чином, більшість хромосомних порушень у людини несумісні навіть з ранніми етапами ембріогенезу.

Натепер у людини відомо більше 700 хвороб, що пов'язані зі зміною кількості чи структури хромосом. Приблизно в 25 % реєструються аутосомні трисомії, 46 % —патологія статевих хромосом. Структурні хромосомні

перебудови, серед яких частіше зустрічаються транслокації та делеції, варіюють в межах 10 %.

7.1. Механізми, патогенез, діагностика

Хромосомні хвороби формуються внаслідок ушкодження геному, що виникає при дозріванні гамет, в процесі запліднення та на ранніх стадіях дроблення зиготи.

Етіологічними факторами хромосомної патології є геномні та хромосомні мутації, що виникають в статевих клітинах одного з батьків. Проте у спадок декільком поколінням передається не більше 3- 5 % з них.

Мутації (лат. mutatio — зміна) — це стійкі (такі, що можуть бути успадковані) порушення структури спадкового матеріалу на різних рівнях його організації, що виникають під впливом ендогенних та екзогенних факторів, та призводять до змін тих чи інших ознак організму.

Процес виникнення мутацій отримав назву мутагенезу. Розрізняють **спонтанні та індуковані мутації**.

Спонтанні мутації виникають самовільно протягом життя. За нормальних умов докільця у клітинах щохвилини спонтанно виникає близько 130 ушкоджень ДНК, переважна більшість яких репарується протягом декількох хвилин.

Індуковані мутації — це зміни геному, що виникають під впливом несприятливих чинників довкілля або в умовах експерименту.

Такі чинники називають мутагенними. До них відносяться:

- хімічні мутагени (окислювачі, пестициди, деякі харчові добавки, розчинники і т.інш.)
- фізичні мутагени (іонізуюче, ультрафіолетове випромінювання, занадто висока або низька температура та інш.)
- біологічні мутагени (ретровіруси, ретротранспозони, продукти обміну речовин)

Мутації з'являються переважно за реплікації ДНК, порушень процесів

її репарації та генетичної рекомбінації.

Вирізняють:

- геномні мутації (кратні зміни числа хромосом),
- хромосомні мутації або хромосомні аберації (структурні та чисельні зміни хромосом)
- генні мутації (зміни молекулярної структури генів)

Геномні мутації

Геномні мутації пов'язані зі зміною кількості хромосом та виникають внаслідок порушень нормального перебігу процесів мітозу та мейозу.

У людини визначені **поліплоїдії** (три- і тетраплоїдія) та **анеуплоїдія**.

Поліплоїдія — збільшення числа хромосом, кратне гаплоїдному ($3n$, $4n$, $5n$ і т.д.). Вважається, що виникають внаслідок подвійного запліднення ті відсутності першого мейотичного поділу. Ембріони людини з подібними аномаліями не життєздатні.

Анеуплоїдія (гетероплоїдія) — не кратне гаплоїдному зменшення або збільшення числа хромосом в диплоїдному наборі ($2n+1$, $2n-1$ і т.д.). Найвірогіднішою причиною цієї аномалії може бути нерозходження в процесі мейозу будь якої пари гомологічних хромосом у одного з батьків. Як наслідок, одна з гамет буде містити на одну хромосому більше, друга — менше. За запліднення злиття таких аномальних гамет з нормальною призводить до формування зиготи зі зміненим числом хромосом у порівнянні з диплоїдним набором, характерним для даного виду: нулесомія ($2n - 2$), моносомія ($2n - 1$), трисомія ($2n + 1$), тетрасомія ($2n + 2$) і т.інш.

Зазвичай у людини спостерігається зменшення (моносомія) або збільшення (трисомія) на одну, дуже рідко - на дві та більше хромосоми. При цьому з усіх варіантів анеуплоїдій зустрічаються тільки трисомії аутосом, полісомії за статевими хромосомами (три-, тетра- й пентасомії), а з моносомій реєструється тільки моносомія хромосоми X, за якої формується синдром Шерешевського-Тернера ($45,X0$).

Трисомія — наявність трьох гомологічних хромосом у каріотипі. Наприклад, трисомія 21 за синдрому Дауна, трисомія 18 за синдрому Едвардса, при формуванні синдрому Патау визначається трисомія хромосоми 13.

Моносомія — наявність тільки однієї з двох гомологічних хромосом. За моносомії аутосом нормальний розвиток ембріона неможливий.

Хромосомні мутації

Хромосомні мутації - це зміни структури хромосом. Перебудови в межах однієї хромосоми — внутрішньохромосомні мутації (делеції, інверсії, дуплікації, інсерції), при залученні двох і більше хромосом — міжхромосомні мутації (транслокації).

- делеція — втрата ділянки хромосоми;
- інверсія — поворот ділянки хромосоми на 180°;
- дуплікація — подвоєння ділянки хромосоми;
- інсерція — перестановка ділянки хромосоми;
- транслокація — перенесення ділянки хромосоми або цілої хромосомії на іншу.

У людини визначаються усі типи хромосомних мутацій

7.2. Цитогенетика хромосомних хвороб

Ідентифікація хромосомних аномалій забезпечує встановлення діагнозу, отримання інформації щодо перебігу захворювання, а також можливого ризику повторного прояву даного генетичного захворювання в сім'ї.

Структуру та функції окремих хромосом або хромосомного набору в цілому досліджує **цитогенетика**. **Клінічна цитогенетика** вивчає аномалії хромосом в поєднанні з клінічними проявами хромосомної патології.

Вважається, що початок розвитку цитогенетики як науки про хромосоми було покладено Вальтером Флемінгом (W. Flemming), цитологом та професором анатомії, який у 1882 р. опублікував перші ілюстрації хромосом. Проте, ще в 1880 р. він вперше застосував термін «мітоз» та назвав вміст ядра, що фарбувалось, *хроматином*. Вчений показав, що під час мітозу, коли відбувається поділ хромосом поздовжнім розчепленням, кожна половина переходить до однієї з дочірніх клітин.

У 1883 році Е. ван Бенеденом (van Beneden) було підтверджено, що хромосоми нащадків походять в однаковій мірі від обох батьків (внаслідок злиття зародкових клітин). Більш того, до найдрібніших деталей повторюють будову материнської хромосоми.

Термін «хромосома» був запропонований у 1888 р. В.Валдейером, а вже у 1900 р. В.Сеттон (W.Sutton) в США та Т.Бовери (Т.Boveri) в Німеччині незалежно один від одного висловили припущення, що гени розташовані в хромосомах. Ця ідея лягла в основу хромосомної теорії спадковості. Об'єднавши такі дисципліни як цитологія і генетика, В.Сеттон ввів поняття «цитогенетика».

В кінці XIX-го на початку XX-го сторіччя цитогенетичні дослідження було продовжено у напрямку визначення точного числа хромосом, а також залежності статі від конфігурації статевих хромосом. Було опубліковано декілька звітів з досить суперечливими даними. Так у 1912 р. Winiwarter дійшов висновку, що чоловіки мають 47, а жінки - 48 хромосом. Згодом, у 1923 році, Painter повідомив, що кількість хромосом людини становить 48, хоча двома роками раніше ним було отримано дані, які доводили наявність саме 46 хромосом. Тоді ж ним була запропонована гіпотеза щодо залежності статі від X та Y конфігурації хромосом.

І тільки у 1956 році Дж.Тійо і А.Леван визначили, що диплоїдне число хромосом людини становить $2n=46$, а не 48, що в цьому ж році було підтверджено Фордом і Хамертоном. Нижче наведені **найбільш важливі етапи розвитку цитогенетики**.

- 1956 р.** Дж.Тійо (Tjio) і А.Леван (Levan), Форд і Хамертон визначили, що диплоїдне число хромосом людини становить $2n=46$.
- 1959 р.** Лежен відкрив трисомію 21 при синдромі Дауна; Форд і співр., а також Джекобс і Стронг визначили каріотип XXУ при синдромі Клайнфельтера та каріотип ХО при синдромі Тернера.
- 1960 р.** Мурхед та співр. розробили метод приготування хромосом з короткочасової культури лімфоцитів; Патау та співр. і Едвардс та співр. описали дві аутосомні трисомії, пізніше ідентифіковані як трисомії 13 і 18; Ноуелл і Хангерфорд описали «філадельфійську» хромосому при хронічній мієлолейкемії.
- 1963 р.** Лежен та співр. описали перший синдром, пов'язаний з хромосомною делецією, т.з. синдром «кошачого крику» (cri du chat).
- 1964/65 рр.** Шрьодер та співр.(1964 р.) і Джерман та співр. (1965 р.) описали генетично детерміновану хромосомну нестабільність при анемії Фанконі та синдромі Блума; Джекобс та співр. висловили припущення щодо зв'язку між каріотипом ХУУ та кримінальною психопатією.
- 1970 р.** Розроблені методи диференційного фарбування хромосом. Це дозволило остаточно ідентифікувати усі хромосоми людини.

Цитогенетичний метод (метод хромосомного аналізу) ґрунтується на мікроскопічному дослідженні структури і кількості хромосом.

Вивчення хромосом людини відіграє суттєву роль в діагностиці, прогнозі та моніторингу ефективності лікування не тільки в медичній генетиці, але й педіатрії, гематології, онкології, ендокринології та т.інш.

Характеристика хромосом

Хромосома – це структурний елемент ядра клітини, що здатний до самовідтворення, та складається з ДНК і великої кількості ядерних білків різного типу.

Всі хромосоми містять дуже довгий безперервний полімеризований ланцюг ДНК, що включає гени, регуляторні елементи та проміжні нуклеотидні послідовності.

Середня хромосома людини близько 45 мкм довжиною та містить 130×10^6 пар основ.

Термін «хромосома» введено німецьким анатомом Вальдейером (H.W.G. Waldeyer.) у 1888 році для позначення пофарбованих ниткоподібних структур, які було видно в процесі мітоза. Походить від грецьких слів «хрома» — колір та «сома» — тіло.

Хромосоми розташовані в ядрах усіх клітин людини (за винятком зрілих еритроцитів), і кожна клітина містить 23 різні пари хромосом. Число, розмір та форма хромосом чітко визначені й специфічні для кожного виду.

Хромосома складається з двох сестринських хроматид, кожна з яких містить компактно організовану подвійну спіраль ДНК, яка є основою спадковості, та регулює усі аспекти побудови та функціонування організму людини.

Хромосоми можуть перебувати в двох структурно-функціональних станах: в конденсованому (спіралізованому) та деконденсованому (деспіралізованому). В інтерфазі хромосоми частково або повністю деконденсовані (в такому стані процеси синтезу відбуваються активніше), тому в живій клітині можна спостерігати лише гранули хроматину. Під час мітотичного поділу клітини, коли відбувається конденсація хроматину, хромосоми добре візуалізуються, тому морфологію хромосом еукаріот визначають саме на стадії метафази мітозу.

Будова хроматину

Хроматин людини це хромосомний матеріал, утворений подвійною спіраллю ДНК, що зв'язана з гістоновими (H1, H2A, H2B, H3, и H4) та негістоновими білками.

Варто зазначити, що якщо спіраль ДНК однієї диплоїдної клітини людини розкрутити, то її довжина становила б приблизно 2 м, проте вона, насправді, досить компактно розміщена в ядрі.

Розрізняють декілька рівнів організації ДНК в хроматині (Рис.1).

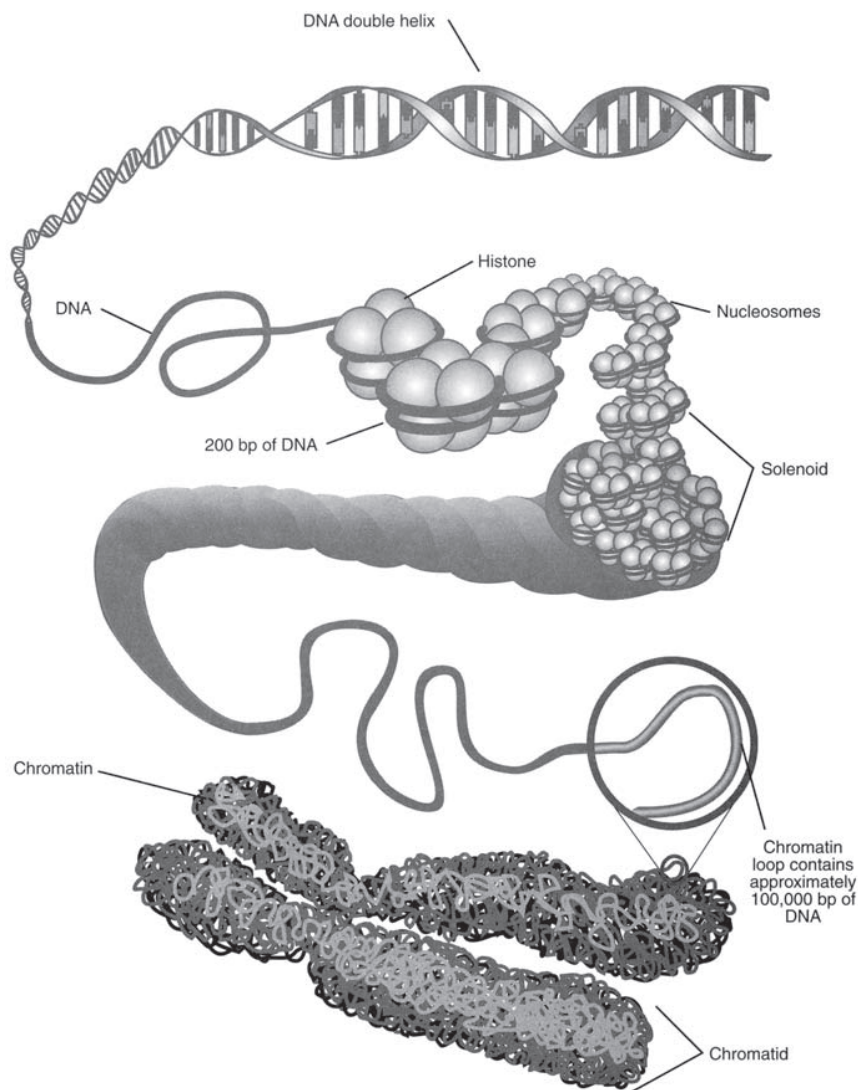


Рисунок 1. Рівні організації ДНК (Передруковано з дж. 1).

Спіраль самої ДНК - перший рівень ущільнення. Далі дві молекули кожного з гістонів H2A, H2B, H3 і H4 формують ядро білка, октамер. Подвійна спіраль ДНК робить навколо октамера два витки, в кожному - 160 основ, формуючи таким чином 10 нм **нуклеосому**, основну структурну одиницю хроматину. Суміжні нуклеосоми утримуються з'єднувальним сегментом, або т.з. лінкером, гістона H1. Довжина лінкера варіює від 15 до

100 п.н. в залежності від типу клітини. Гістон H1, що довший за інші майже вдвічі, відповідає за цілісність нуклеосомної структури.

В свою чергу, нуклеосоми запаковані в соленоїдну структуру, і ці 30-пм соленоїди утворюють великі петлі, що виступають поза центральні білки хромосом. Точки кріплення кожної петлі розташовані вздовж ДНК. Далі відбувається закручування цих петель з утворенням надзвичайно щільних одиниць – хромосом. Найбільшого ступеня ущільнення хромосоми досягають під час метафази мітозу.

В хроматині близько 87 - 90% довжини ДНК зв'язано з нуклеосомами

Типи хроматина

Розрізняють два типи хроматина в клітинах еукаріот: **еухроматин** та **гетерохроматин**.

Еухроматин, це вільно організовані активні ділянки хроматину, що зберігають деспіралізований стан хромосомного матеріалу в інтерфазному ядрі, та при фарбуванні GTG методом мають світле забарвлення. В еухроматині сконцентрована ДНК, яка в інтерфазі є генетично активною, та міститься більшість структурних генів організму. Крім того, еухроматин відрізняється здатністю до інтенсивного синтезу рибонуклеїнової кислоти (РНК) та більшим вмістом негістонових білків.

Гетерохроматин – це генетично неактивні ділянки хромосом, які протягом клітинного циклу знаходяться в конденсованому (компактному) стані. Вважається, що гетерохроматин не містить основних генів, проте може здійснювати певний контроль за їх функцією, а також за процесом мітозу та розвитком клітини. Особливістю гетерохроматинової ДНК є вкрай низька її здатність до транскрипції. На ранніх стадіях онтогенезу вміст гетерохроматину в метафазних хромосомах переважно значно нижчий, ніж на пізніх етапах розвитку, а тим більше – в зрілих клітинах.

Факультативний та конститутивний гетерохроматини

Розрізняють два типи гетерохроматину: факультативний та конститутивний. Обидва - генетично бездіяльні.

Факультативний гетерохроматин містить кодуєчу, а тому відносно консервативну ДНК, яка за певних умов в диференційованих клітинах деяких тканин може переходити в еухроматиновий стан, за якого ДНК стає транскрипційно активною і, відповідно, відбувається експресія генів, що розміщені на даній ділянці хромосоми. Проте, в таких клітинах активні близько 10 % генів, інші залишаються інактивованими.

Зазвичай факультативні гетерохроматинові ділянки наявні тільки в одній з гомологічних хромосом. Типовим прикладом є неактивна статевіа Х-хромосома у осіб жіночої статі, яка деактивується в конденсований гетерохроматиновий стан. Така гетерохроматизована Х-хромосома реєструється в інтерфазі на внутрішній поверхні ядерної мембрани як невелике (до 1 мкм) темнозатбарвлене тільце, т.з. тільце Барра.

Варто підкреслити, що за гаметогенезу та на ранніх стадіях ембріогенезу обидві Х-хромосоми є еухроматиновими та транскрипційно активними.

Конститутивний (структурний) гетерохроматин міститься в обох гомологічних хромосомах, переважно в центромєрі, теломерах, ядришковому організаторі та на дистальній ділянці хромосоми Y. Найбільша його кількість та широкий поліморфізм характерні для хромосом 1, 9, 16 і Y.

ДНК гететерохроматину цього типу є у більшості випадків некодуєчою, а тому високополіморфною й варіабельною. Зазвичай це сателітна ДНК, що складається з тандемних повторів (наприклад, HS1 (Human Satellite 1), HS2, HS3, альфа-сателіт та інш.).

За деякими даними зміни генів, розташованих на ділянках конститутивного гетерохроматину хромосоми, не призводять до змін фенотипу. Проте є роботи, які вказують на те, що зміни розмірів гетерохроматину можуть сполучатися з тяжкими порушеннями

сперматогенезу, невиношуванням вагітності, а також виникненням важких дефектів розвитку.

Єдина встановлена функція конститутивного гетерохроматину – регуляція **кросинговеру** – обміну генів між двома сестринськими хроматидами за клітинного поділу.

Факультативний та конститутивний гетерохроматини реєструються за відмінністю при фарбуванні: факультативний гетерохроматин піддається GTG-фарбуванню за Романовським — Гімза в стандартних умовах, конститутивний гетерохроматин вибірково забарвлюється цим же фарбником тільки після денатурації-ренатурації ДНК. Такий селективний метод називається С- фарбування.

Структура хромосоми

Хромосома складається з двох сестринських хроматид та центромери (первинної перетяжки), що їх з'єднує.

Центромера ділить хромосоми на два плеча: коротке - р-плече та довге - q-плече. Ділянка центромери відповідає за контакт з мікротрубочками веретена поділу й переміщення хромосоми в процесі клітинного циклу.

В центромерних районах хромосом локалізована сателітна ДНК, яка представлена блоком одиниць розміром 171 пн, що тандемно повторюються. Тяжи мономерів включають до 3 млн. пн.

Теломери – кінцеві структури лінійних хромосом, які складаються з послідовностей ДНК, що повторюються. У людини теломерні ділянки хромосом утворені тисячами повторів послідовностей TTAGGG (більш ніж 3-20 kb). Ці ділянки хромосом мають спільні з гетерохроматином властивості, а саме: наявність високоповторювальних послідовностей, здатність утворювати асоціати, інактивація генів, що потрапили в зону гетерохроматину або теломерного хроматину.

Теломери відіграють важливу роль у збереженні стабільності хромосом. Ще в 30-і роки Барбара Мак-Клінток довела, що теломери захищають хромосоми від деградації, перешкоджають теломер-теломерному злипанню хромосом і формуванню дицентриків.

Специфічні елементи теломер необхідні для розходження сестринських хроматид у мітозі й для початку реплікації ДНК. Припускають, що за певного укорочення теломер відбувається зупинка клітинного циклу та старіння клітини.

Супутники акроцентричних хромосом людини містять **регіони ядерцевих організаторів**. В цих регіонах розташована велика кількість рибосомальної РНК (рРНК). Гени рРНК часто утворюють тандемні пари, які організовані в кластери. Кожний такий кластер відповідає ядришковому організатору, яких у людини близько 10.

Центомери, теломери та ядришкові організатори є функціонально різними частинами хромосоми.

Хромосоми однієї пари називаються **гомологами**, або **гомологічними** хромосомами. В процесі мітозу на стадії метафази й прометафази хромосоми мають довжину від 2 до 11 мкм, що дає можливість проведення мікроскопічного дослідження пофарбованих індивідуальних хромосом.

Міжнародна система цитогенетичної номенклатури хромосом людини

З кожним етапом розвитку цитогенетики людини все більш гостро поставала проблема стандартизації досліджень хромосом.

У 1960 році в американському місті Денвері була прийнята уніфікована класифікація хромосом - **Standard System of Nomenclature of Human Mitotic Chromosomes**. У відповідності до цієї класифікації хромосомний набір людини (каріотип) включає 46 хромосом - 22 пари аутосом и 1 пару статевих хромосом (XX - у осіб жіночої статі и XY - чоловічої). Денверська класифікація хромосом базується на їхній морфологічній характеристиці.

Згідно з цією номенклатурою хромосоми нумеруються від 1 до 23 з урахуванням зменшення їх довжини: з 1 по 22 - аутосоми, а 23-я пара - статеві хромосоми. Найбільші хромосоми людини, що мають перші номери, в середньому у 5 разів довші за найдрібніші - 21 та 22.

Класифікацію хромосом на підставі відносної довжини та розміщення центромери запропонував Патау.

Згідно з цією характеристикою розрізняють 3 групи хромосом: *метацентричні* (центромера розташована в центрі хромосоми), *субметацентричні* (центромера дещо зміщена по відношенню до центра хромосоми) й *acroцентричні* (центромера знаходиться в дистальній частині хромосоми).

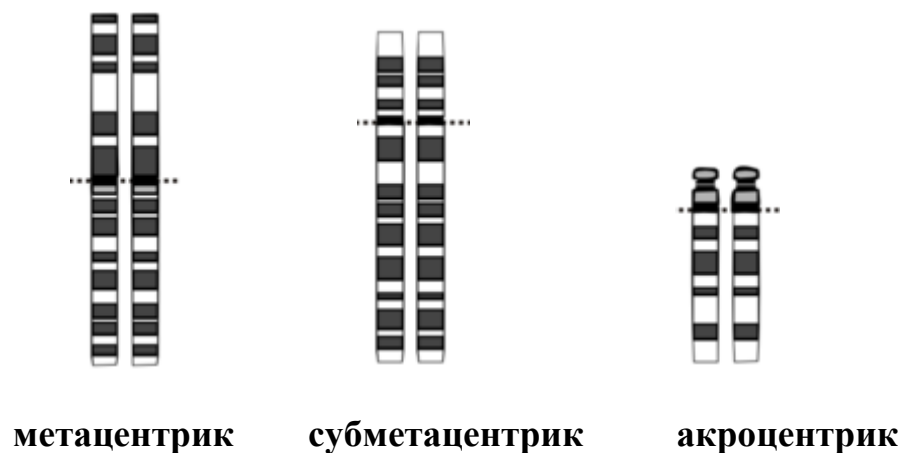


Рисунок 2. Схематичне зображення метацентричної, субметацентричної та акроцентричної хромосом

У 1963 р. на конференції у Лондоні був затверджений розподіл хромосом на групи. Всі 23 пари розподілені на 7 груп - від А до Г. Група А (хромосоми 1-3) - великі метацентричні хромосоми. Група В (хромосоми 4 і 5) - включає великі субметацентричні хромосоми. Група С (хромосоми 6-12) - середнього розміру субметацентричні хромосоми. Група D (хромосоми 13-15) - великі акроцентричні хромосоми. Група Е (хромосоми 16-18) – це короткі субметацентричні хромосоми. Група F - (хромосоми 19 і 20) - маленькі метацентричні хромосоми. Група G - (хромосоми 21 і 22) - включає маленькі акроцентричні хромосоми. Статеві Х-хромосома за

довжиною та центромерним індексом (співвідношення між довжиною короткого та довгого плеча хромосоми, %) близька до хромосом групи С, а Y-хромосома за тією ж характеристикою – до хромосом групи G.

Уніфікована класифікація хромосом людини отримала розвиток на подальших міжнародних цитогенетичних конференціях. Проте найбільшого прогресу досягнуто після впровадження методів диференційного фарбування, що викликало потребу суттєвого доповнення даної номенклатури новими принципами аналізу сегментованих хромосом. У 1971 році в Парижі на IV міжнародному конгресі з генетики людини було узгоджено єдину систему ідентифікації хромосом, яка враховувала ідентифікацію хромосом за довжиною.

З 1977 р. після конференції у Стокгольмі набула поширеності "Міжнародна система номенклатури цитогенетики людини» (International System for Human Cytogenetic Nomenclature або ISCN)

В наш час генетики усього світу використовують "Міжнародну систему номенклатури цитогенетики людини» (1995), затверджену у Мемфісі в жовтні 1994 р.

ISCN 1995 запропонувала єдині правила розпізнання конституційних (вроджених) та набутих аномалій хромосом, що базуються на результатах молекулярно-цитогенетичних досліджень.

Використання цих методів дозволило точно описати робертсонівські транслокації, перебудови із залученням цілих плечей хромосом та однобатьківські дисомії. Цей документ вперше затвердив головні принципи системи опису результатів досліджень, що виконані за методологією флюорисцентної *in situ* гібридизації (FISH).

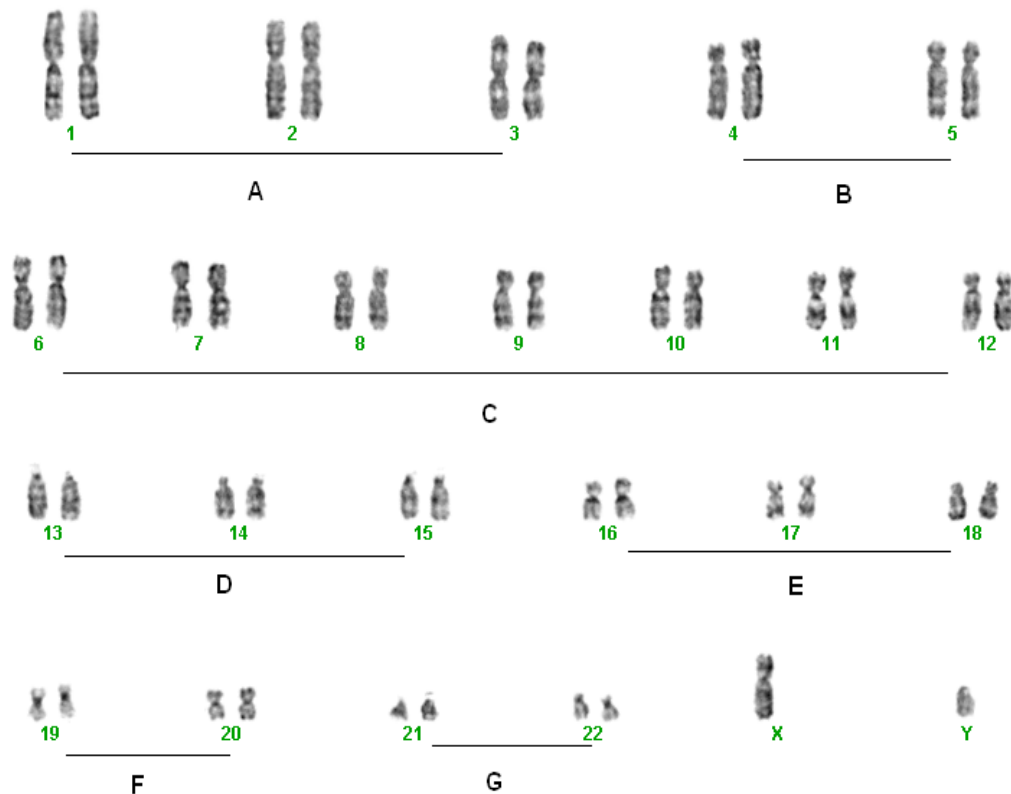


Рисунок 3. Розподіл хромосом за групами. Фарбування хромосом за GTG-методом.

Крім того, саме ISCN 1995 запроваджено нову ідеограму (схематичне зображення хромосом), в тому числі, з розподільчою здатністю на рівні 850 бендів. Ця ідеограма включає фотографії G- та R- фарбованих хромосом з розподільчою здатністю від 400 - 850 бендів.

Групова характеристика хромосом людини

Група А. Хромосоми 1, 2, 3

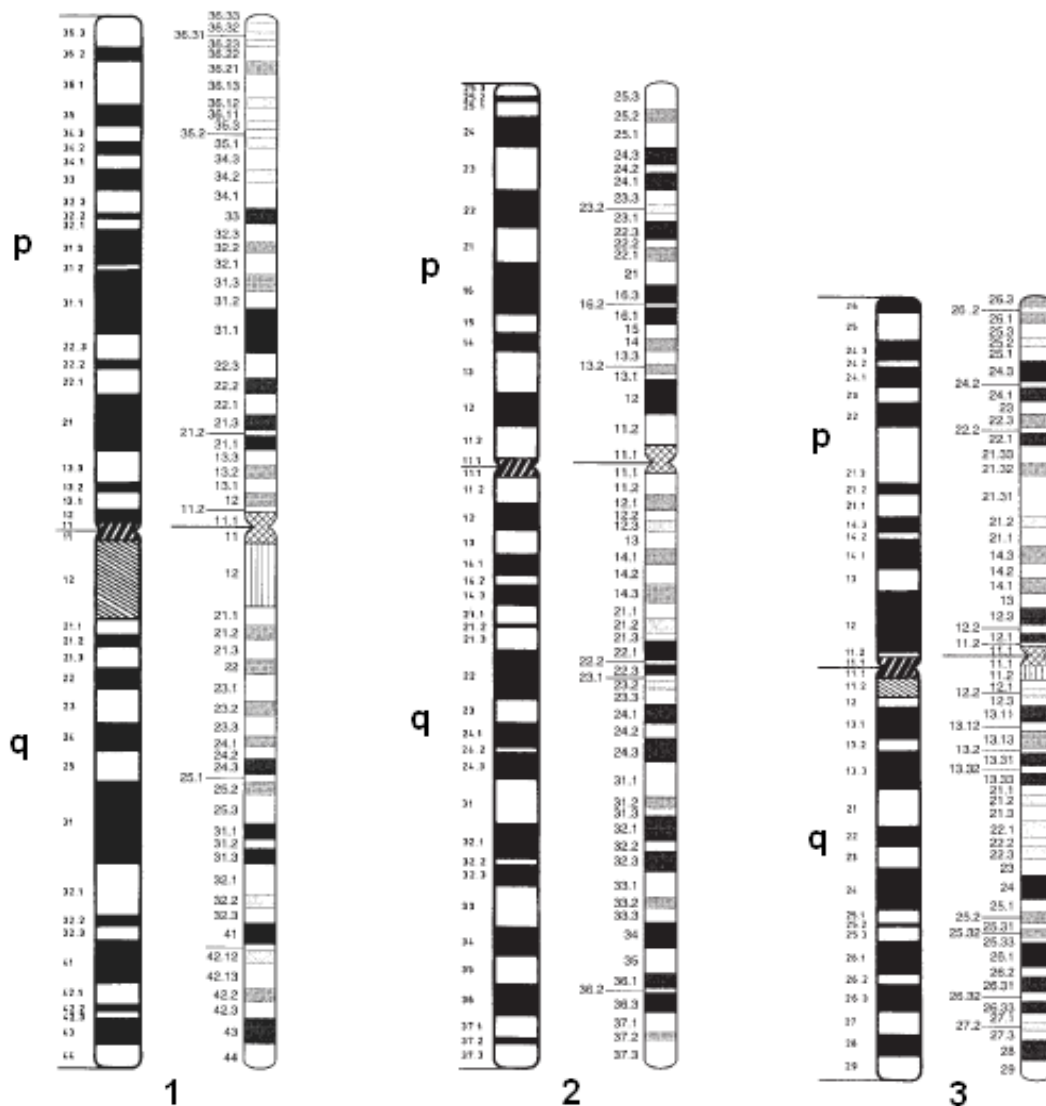


Рисунок 4. Ідеограма нормальних хромосом групи А. Зліва хромосома на стадії метафази (550 сегментів), праворуч - на стадії прометафази (850 сегментів).

Великі метацентричні та субметацентричні хромосоми. Хромосома 1 – найбільша метацентрична хромосома. Має характерну морфологію та структуру, легко ідентифікується при каріотипуванні. Центромера розташована майже посередині, центромерний індекс 48-49. В проксимальній частині q-плеча поблизу центромери часто реєструється «вторинна перетяжка».

Хромосома 2 – найбільша субметацентрична хромосома, що також відрізняється за морфологією та легко візуалізується. Центромерний індекс 38-40.

Хромосома 3 – метацентрична хромосома з центромерним індексом 45-46, проте майже на 20 % коротша за хромосому 1.

Група В. Хромосоми 4, 5

Великі субметацентричні хромосоми (центромерний індекс 24-30). При фарбуванні класичними рутинними методами не відрізняються між собою. Ідентифікація можлива тільки після диференційного забарвлення (G- та R-методи).

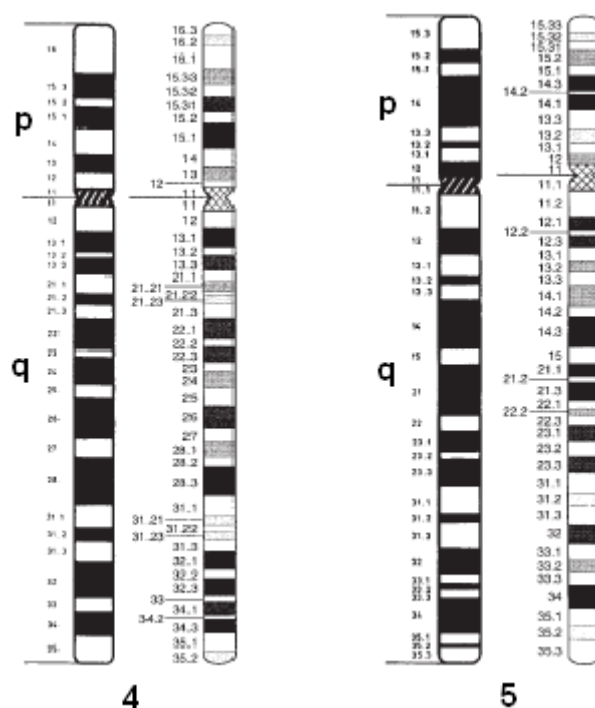


Рисунок 5. Ідеограма нормальних хромосом групи В. Зліва хромосома на стадії метафази (550 сегментів), праворуч - на стадії прометафази (850 сегментів).

Група С. Хромосоми 6 – 12

Рисунок 6. Ідеограма нормальних хромосом групи С Зліва хромосома на стадії метафази (550 сегментів), праворуч - на стадії прометафази (850 сегментів).

Середнього розміру субметацентричні хромосоми. При рутинному фарбуванні дуже важко ідентифікуються. При диференційних методах фарбування мають різний малюнок сегментації, тому відносно легко розпізнаються. Центромерний індекс варіює від 30 до 43. В хромосомі 9 в дистальній частині довгого плеча часто реєструють «вторинну перетяжку», яка не зафарбовується ні акрихіном (Q-метод), ні барвником Гімза (G-метод). Хромосоми 11 і 12 дуже схожі за малюнком сегментації, проте хр.11 більш метацентрична. До групи С відносять також статеву хромосому X, центромерний індекс якої дуже варіабельний (38 – 42).

Група D. Хромосоми 13 – 15

Великі акроцентричні хромосоми, що суттєво відрізняються від решти хромосом людини. Центромерний індекс - близько 15 – найменший в каріотипі. Довжини коротких плечей усіх трьох пар хромосом надзвичайно варіабельні та, як правило, мають супутники. Іноді супутники можуть бути дуже великими та подвоюватися (тандемні супутники). Коротке плече цих хромосом вважається подовженим (ph+), якщо воно тієї ж довжини, що і коротке плече хромосоми 18 в цій же метафазі. Великі супутники позначаються (ps+), подвійні - (pss), зменшення довжини короткого плеча зі спутниками або без них (ph-). Частота гетероморфізму гомологів в цій групі складає 3,7 % в зразках після диференційного фарбування.

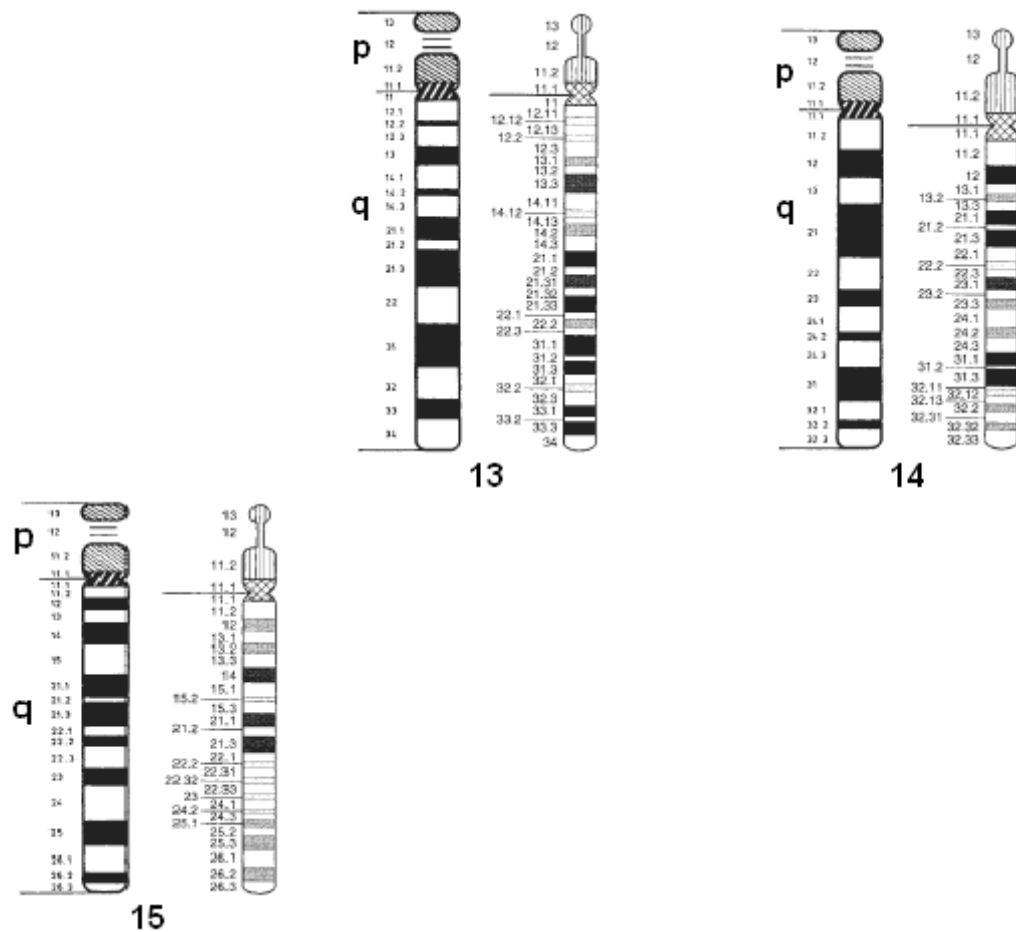


Рисунок 7. Ідеограма нормальних хромосом групи D. Зліва хромосома на стадії метафази (550 сегментів), праворуч - на стадії прометафази (850 сегментів).

Група Е. Хромосоми 16 – 18

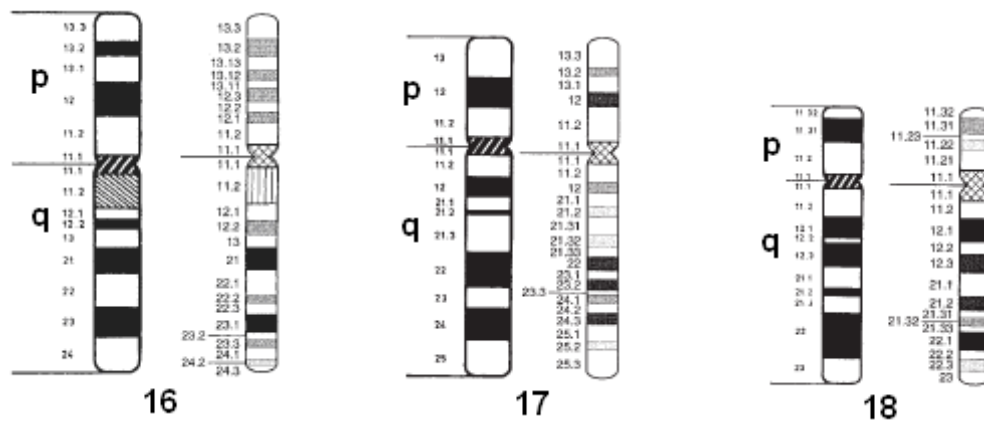


Рисунок 8. Ідеограма нормальних хромосом групи Е. Зліва хромосома на стадії метафази (550 сегментів), праворуч - на стадії прометафази (850 сегментів).

Відносно короткі метацентричні або субметацентричні хромосоми з різними центромерними індексами. Так, хромосома 16 має центромерний індекс 40. Довжина цієї хромосоми трохи більше третини довжини хромосоми 1, проте може варіювати. Хромосома 18 з центромерним індексом 26 на 5-10 % коротша за хромосому 17 та має закоротке довге плече. Центромерний індекс хромосоми 17 близько 31.

Група F. Хромосоми 19, 20

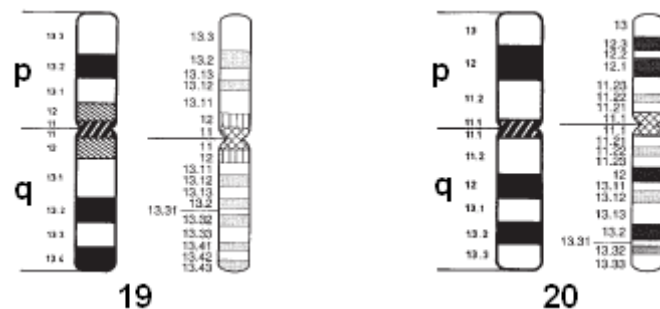


Рисунок 9. Ідеограма нормальних хромосом групи F. Зліва хромосома на стадії метафази (550 сегментів), праворуч - на стадії прометафази (850 сегментів)

Малі метацентричні хромосоми, центромерний індекс яких коливається в межах 36 – 46. Відрізняються одна від одної тільки після диференційного фарбування.

Група G. Хромосоми 21, 22

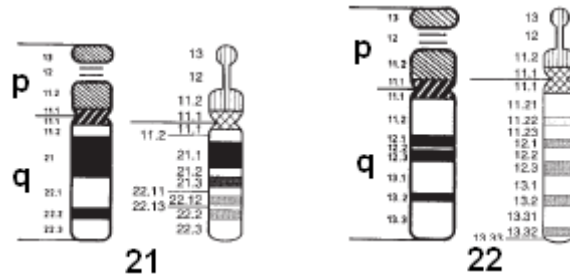


Рисунок 10. Ідеограма нормальних хромосом групи C. Зліва хромосома на стадії метафази (550 сегментів), праворуч - на стадії прометафази (850 сегментів)

Найменші акроцентричні хромосоми, центромерний індекс яких коливається в межах 13-33. Після диференційного фарбування легко розрізняються за типом сегментації. Як і хромосоми групи D, мають дуже варіабельні довжини коротких плечей, що містять ядерцевий організатор, та мінливу інтенсивність забарвлювання при використанні G-метода. Супутники також можуть бути завеликими та подвоюватися.

Статеві хромосоми (X, Y)

Статеві хромосоми, на відміну від аутосом, позначаються літерами X, Y, а відсутність однієї з них – 0 (нуль).

Стать залежить від Y-хромосоми, наявності або відсутності якої визначає чоловічий або жіночий фенотип. Жіноча стать гомогаметна, чоловіча – гетерогаметна.

Розрізняють *генетичну (хромосомну), гонадну та стать за фенотипом.*

Генетична стать визначається на стадії запліднення в залежності від того, яку хромосому (X чи Y) має сперматозоїд, що запліднює яйцеклітину.

На початку сьомого тижня ембріонального розвитку статеві залози індиферентні щодо статевої приналежності і тільки в кінці восьмого тижня відбувається активація гену SRY (Sex determining Region Y gene), що локалізований на дистальній ділянці p-плеча хромосоми Y. Ген SRY

експресує спеціальний білок, який сприяє формуванню звивистих сім'яних каналців та утворенню клітин Лейдига, що продукують тестостерон. Таким чином наявність цього гену зумовлює розвиток тестикул. За відсутності хромосоми Y гонада диференціюється в яєчник.

Термін “ *стать за фенотипом* ” відноситься до етапу формування статевих органів та вторинних статевих ознак за жіночим або чоловічим типом.

X-хромосома людини є субметацентриком середніх розмірів та морфологічно відповідає хромосомам групи C. Це функціонально активна хромосома, яка містить досить велику кількість генів, в тому числі й тих, що зумовлюють певні спадкові хвороби.

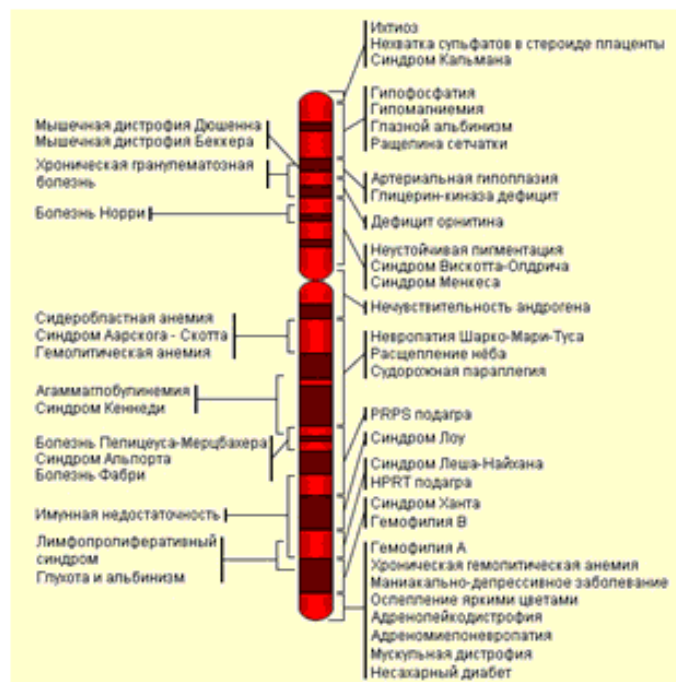


Рисунок 11. Карта X хромосоми людини

В соматичних клітинах жінок тільки одна X хромосома активна. Інактивація іншої відбувається на ранніх стадіях після запліднення з 3-го по 7-й день ембріонального розвитку. Інактивація однієї з двох хромосом має випадковий характер, а тому може бути інактивована як материнська, так і батьківська X хромосома. Усі дочірні клітини мають ту ж саму інактивовану

хромосому. В жіночих зародкових клітинах активність X хромосоми поновлюється як тільки клітина вступає в мейоз, в чоловічих – інактивується.

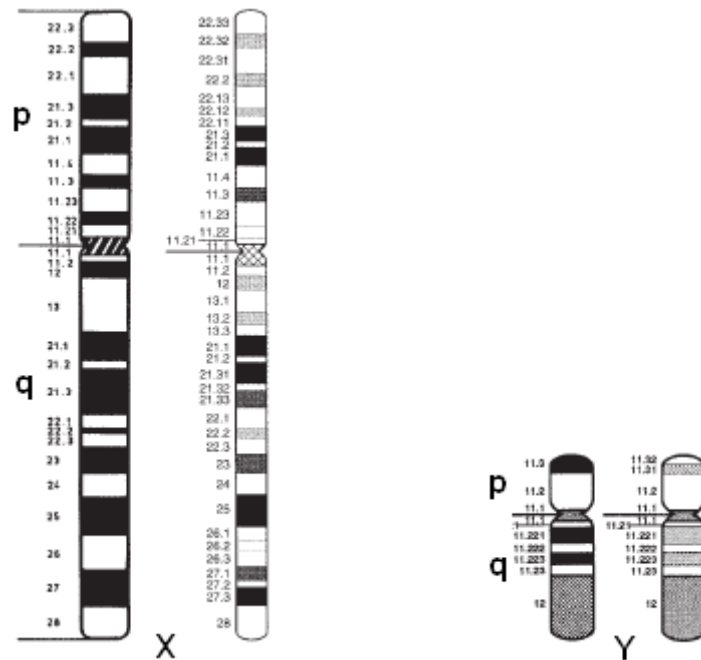


Рисунок 12. Ідеограма нормальних статевих X і Y хромосом. Зліва хромосома на стадії метафази (550 сегментів), праворуч - на стадії прометафази (850 сегментів)

Y-хромосома

Y-хромосома – найбільш варіабельна за розмірами хромосома геному людини. Зазвичай дещо більша за хромосоми групи G, а хроматиди її довгого плеча, як правило, лежать паралельно одна одній. Центромера візуалізується не чітко, супутники відсутні. Центромерний індекс коливається від 0 до 26 (в середньому ~ 16). Більша частина (~60%) довгого плеча Y-хромосоми представлена функціонально неактивним гетерохроматином, що має розмір близько 24 Mb.

Це єдина в геномі ссавців хромосома, що не працює безпосередньо на реалізацію фенотипу. Її генетична значимість пов'язана з контролем гаметогенезу, первинною детермінацією статі.

Морфологія хромосом

У відповідності до запропонованих 4-м міжнародним конгресом з генетики людини в Парижі у 1971 році системи стандартизації та схематичного зображення хромосом людини (ідеограми) кожна хромосома має чітко визначену типову морфологію

Так, центромера ділить хромосому на коротке p-плече та довге q-плече, кожне з яких розділене на певні ділянки (райони). Цей поділ позначається певними маркірувальними межовими знаками (landmarks).

Район (ділянка) - це зона, що розміщена між двома межовими знаками. Райони позначаються в напрямку від центромери до теломерних ділянок кожного плеча хромосоми. Два прилеглих до центромери райони позначаються цифрою 1, наступні більш дистальні - 2 і так далі. В свою чергу, ці райони розділені на сегменти (смуги) та субсегменти (субсмуги), які також нумеруються в напрямку від центромери до теломери .

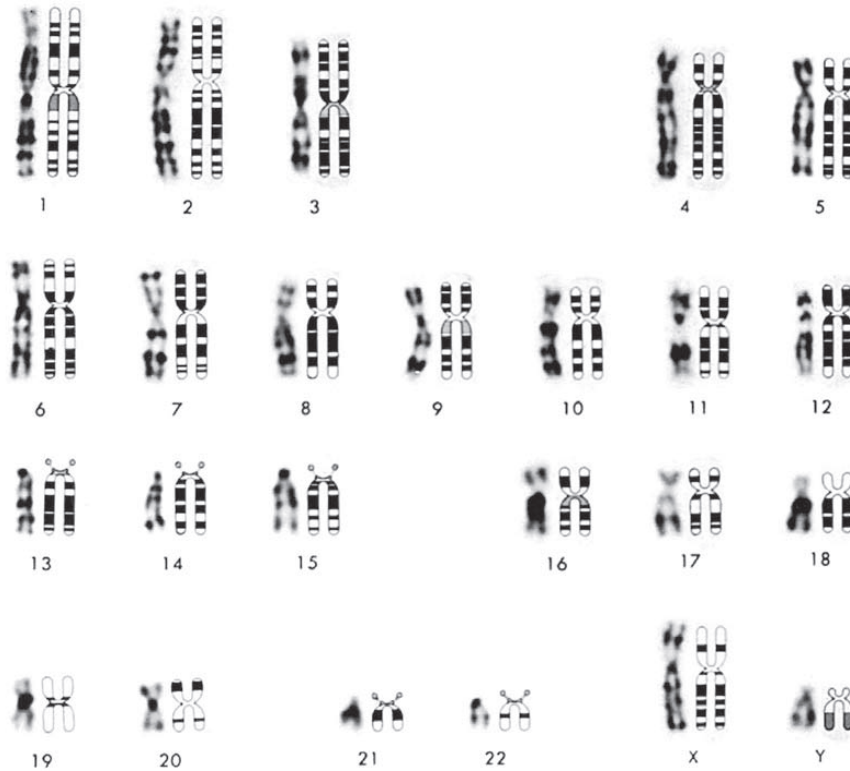


Рисунок 13. Каріотип G-фарбованих хромосом людини (ліворуч) з відповідними ідеограмами (1971 Paris Conference ideograms) (праворуч).

Сегмент (смуга) –це частина хромосоми, що чітко відрізняється від прилеглої зони за інтенсивністю забарвлення. Послідовна нумерація ділянок та сегментів дозволяє зробити ідентифікацію специфічних смуг простішою.

Таким чином, у будь-якому позначенні хромосом використовують таку послідовність запису: 1) номер хромосоми; 2) символ плеча; 3) номер зони (ділянки); 4) номер сегмента в межах цієї зони. Ці позначення записуються одне за одним без пробілів і розділових знаків. Так наприклад, термінальна смуга довгого плеча хромосоми 2 може бути записана як 2q37, тобто хромосома 2, довге плече, ділянка 3, сегмент 7. Коли сегмент поділяється на субсегменти, то після позначення ссегменту ставиться крапка, а потім іде відповідний для кожного субсегмента номер. Наприклад, 3p25.1. Для опису хромосом з високою розподільчою здатністю (500 – 800 сегментів) використовують додаткові цифри без розділових знаків, наприклад - 3p21.31.

Райони та сегменти на хромосомах проявляються після диференційного фарбування хромосом різними методами (G-, Q-, R-, C-, Ag-

). Для кожного метода характерний свій специфічний малюнок сегментації хромосом.

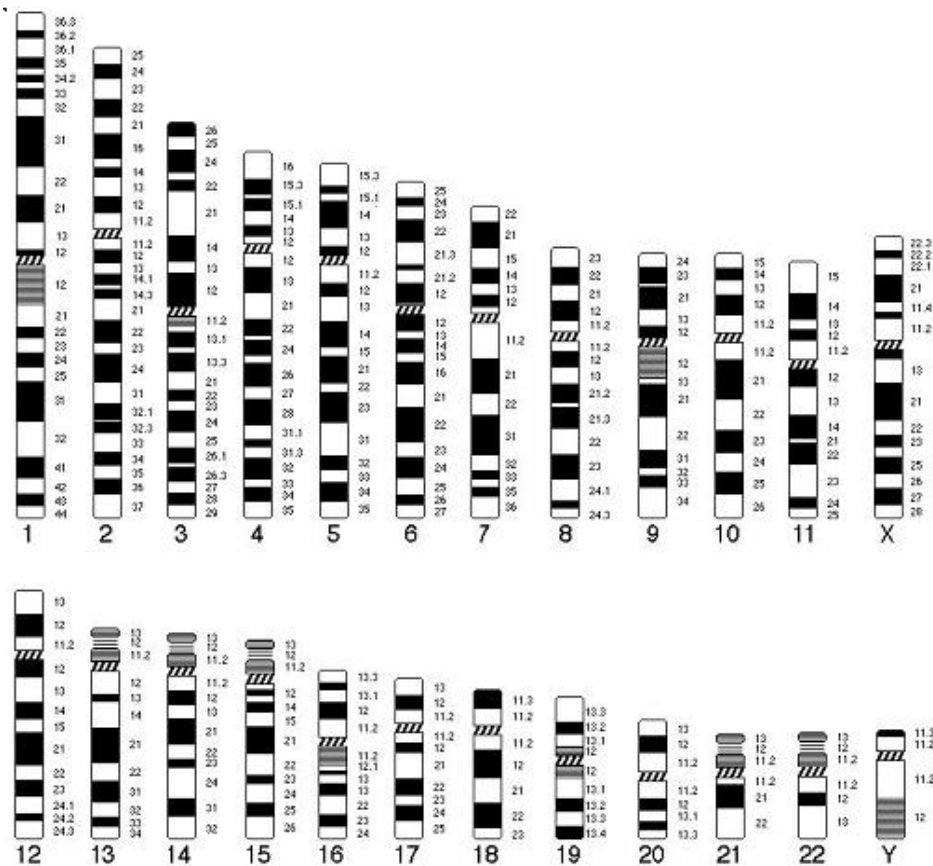


Рисунок 14. Ідеограма хромосом людини

Каріотип людини

Сукупність хромосом у людини складає хромосомний набір або каріотип.

Каріотипом також називають зображення пронумерованого повного набору пар гомологічних хромосом (каріограми), визначеного цитогенетичними методами.

Поняття «каріотип» стосується як норми, так і патології. В першому випадку говорять про нормальний каріотип, в другому – про патологічний, надбаний соматичними клітинами на етапах постнатального розвитку. Зазвичай надбані хромосомні аномалії реєструють при онкологічних захворюваннях, дії факторів фізичного та хімічного мутагенезу.

В соматичних клітинах організму людини міститься диплоїдне число (46) хромосом, в статевих – гаплоїдне (23 хромосоми).

За нормальних умов половина хромосомного набору має материнське походження, інша – батьківське.

Кожна клітина (за виключенням зрілих еритроцитів) містить 22 пари аутосом та 2 пари статевих хромосом - гомосом. Жінки є гомогаметними за статевими хромосомами та мають дві XX хромосоми, чоловіки – гетерогаметні та мають X і Y хромосоми. Гени, що локалізовані на Y хромосомі визначають стать особи.

Зміну морфології хромосом в межах нормальної варіабельності називають **поліморфними різновидами, поліморфізмом**. Цю властивість хромосом використовують в якості маркерів для популяційних досліджень, визначення початкового етапу нерозходження хромосом під час мітозу, визначення батьківства, виявлення контамінації материнськими клітинами в амніотичній рідині, визначення походження делетованих або транслокованих хромосом. Поліморфізм хромосом може бути використаний в моніторингових дослідженнях при трансплантації кісткового мозку. В якості прикладу можна привести поліморфізм великого темного гетерохроматинового блоку, розташованого нижче центромери на довгому плечі хромосоми 1.

Іноді при порушенні ембріонального розвитку можуть спостерігатись такі стани як **мозаїцизм** та **хімеризм**.

Мозаїцизм (*mos*) характеризується наявністю в тканинах (рослини, тварини, людини), клітин, що генетично відрізняються. Це відбувається, коли дві або більше клітинні лінії розвиваються в одному організмі.

З мозаїцизмом пов'язані деякі хромосомні хвороби людини, в основі яких лежать трисомії або анеуплоїдії. Так, приблизно в 2 % випадків синдрому Дауна, синдрому Клайнфельтера, 20-50 % синдрому Шерешевського — Тернера та приблизно 10 % синдрому Едвардса частина

клітин має нормальний хромосомний набір, а частина характеризується наявністю аномальної хромосоми.

Зазвичай клінічна картина синдромів за мозаїцизму менш виражена, особливо, якщо кількість аномальних клітин не перевищує 10 %.

Від мозаїцизму варто відрізняти такий стан як хімеризм.

Хімеризм (*chi*) це результат рідкісного випадку, за якого два або більше генотипа походять більше ніж від однієї зиготи. За такого стану часто реєструються змішані популяції чоловічих і жіночих клітин в одному організмі.

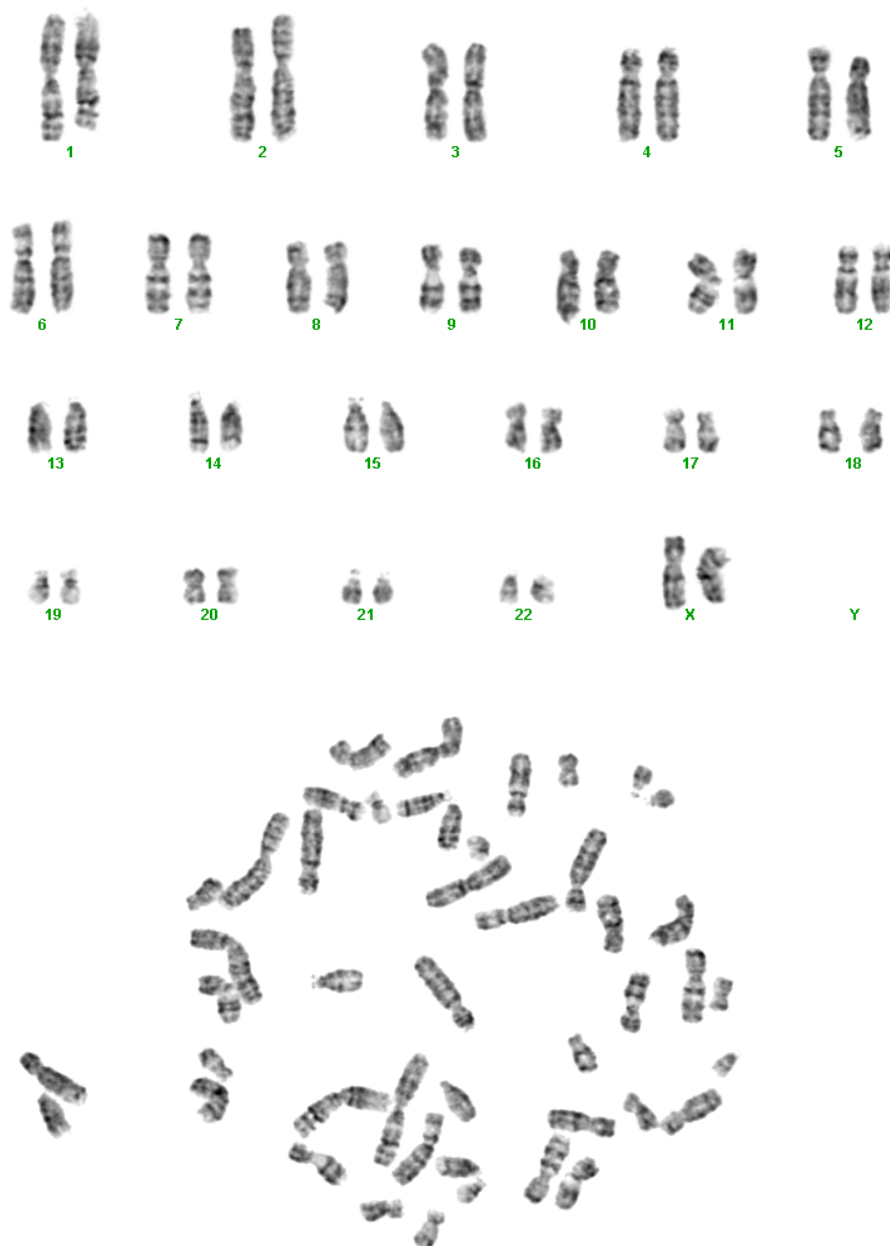


Рис. Нормальний жіночий хромосомний набір. Фарбування за GTG-методом.

Основні правила (принципи) запису каріотипу

Запис каріотипу здійснюється у відповідності до «Міжнародної системи для номенклатури в цитогенетиці людини» (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, ISCN-1995) за певними правилами.

Перш за все зазначають загальну кількість хромосом, далі через кому записують статеві хромосоми. Таким чином нормальний жіночий каріотип записується як **46,XX**, чоловічий - **46,XY**. За наявності хромосомних аномалій першими записують аномалії статевих хромосом, потім аномалії аутосом у порядку зростання хромосомних номерів (від 1 до 22). Кожна аномалія відокремлюється комою. Для опису структурних хромосомних перебудов використовують спеціальні скорочення і символи (табл.1). Наприклад, такі структурні аномалії як делеції, дуплікації, інверсії, інсерції та транслокації позначаються, відповідно, del, dup, inv, ins та t, ламкість – fra, маркерна хромосома - mar, кільцева – r.

Більшість каріотипів може бути записано з використанням, так званої “short form” (короткої системи) номенклатури. Проте для опису більш складних ушкоджень хромосом ISCN пропонує “long form” (детальну систему), за допомогою якої позначається як тип аномалії, так і детальний перелік смуг залучених до перебудови.

Основні символи та скорочення, які використовуються для запису каріотипу та його аномалій, представлені нижче.

Таблиця 1

Основні символи і скорочення для опису хромосомних аномалій

d	ace	ацентричний фрагмент
	ad	додатковий матеріал невщомого походження
	~	знак, який позначає "приблизний" інтервал
	→	знак, який позначає інтервал на хромосомі - від - до
	< >	знак, який позначає рівень плоїдності
	[]	дужки для запису кількості клітин

	()	знак для позначення в них хромосоми, що задіяна в перебудові з точками розриву
	c	конституційна аномалія
	cen	центромера
	chi	химера
	chr	хромосома
	cht	хроматида
	:	двокрапка - знак точок розриву
	::	дві двокрапки - знак точок розриву і з'єднання
	,	кома - відокремлює кількість хромосом, статеві хромосоми та хромосомні аномалії
	.	крапка – знак для позначення відділення субсмуги;
	del	делеція
novo	de	позначає хромосомну аномалію, що не була успадкована
	der	derivatna (похідна) хромосома
	dic	дицентрик
	dir	прямий
	dis	дистальний
in	dm	парні фрагменти у вигляді горизонтальної двокрапки ($\times$)
p	du	дуплікація
	e	обмін
d	en	ендоредуплікація
m	fe	жіноча стать
	fis	розходження центромер
	fra	ламка ділянка
	h	гетерохроматин
	i	ізохромосома
m	ide	позначення каріотипу в субклонах
	ins	інсерція
	inv	інверсія
l	ma	чоловіча стать
r	ma	маркерна хромосома
t	ma	материнське походження хромосоми
s	mo	мозаїк
	–	мінус – знак для позначення втрати хромосомного матеріалу
	+	плюс - знак для позначення додавання хромосомного матеріалу

or	альтернативна інтерпретація подій у каріотипі	
p	коротке плече хромосоми	
pat	батьківське походження хромосоми	
Ph	філадельфійська хромосома	
або Ph1		
prx	проксимальна ділянка хромосоми	
(?)	сумнівна ідентифікація хромосоми або хромосомної аномалії	
r	кільцева хромосома	
rcp	реципрокна перебудова хромосом	
rea	перебудова хромосом	
rob	робертсонівська транслокація	
s	позначення супутників	
sce	сестринські хроматидні обміни	
;	знак відділення аномальних хромосом із точками розриву в структурних перебудовах, які зачіпають більш ніж одну хромосому	
/	знак для відокремлення різних клонів	
t	транслокація	
tas	теломерна асоціація	
tel	теломера	
ter	термінальна ділянка хромосоми	
trc	трицентрична хромосома	
d	up уніпарентальна (однобатьківська) дисомія	чи

СЛОВІ АНОМАЛІЇ ХРОМОСОМ

Термін «числові аномалії» описує збільшення або зменшення числа хромосом. Всі такі відхилення позначаються числами з використанням знаків (+) або (-) із зазначенням тої чи іншої кількості зміненої хромосоми. Це правило не стосується хромосом X й Y, які завжди вказуються після запису числа хромосом в каріотипі. Так, запис $-7,+18$ вказує на втрату хромосоми 7 та зайву хромосому 18.

Знаки (+) або (-) можуть бути використані також для позначення додаткових копій похідних хромосом або додаткових маркерних хромосом, наприклад, $+der(6)$ або $+mar$. Крім того, ці знаки можуть позначати збільшення або зменшення довжини плеча хромосоми (p або q) та варіації довжини гетерохроматинових сегментів і супутників.

Відсутність одного з гомологів хромосом або його частини в каріотипі називається **моносомія** (повна або часткова), а наявність - **трисомія** (повна або часткова). Поліплоїдії отражаються тільки числом хромосом.

Числові аномалії із залученням статевих хромосом

Можуть бути **конституційними (вродженими)** та **набутими**. ISCN 1995 забезпечує спеціальні способи запису цих двох станів. При **вроджених анеуплоїдіях** хромосом X і Y знаки (+) або (-) в каріотипі ніколи не ставляться:

45,X - класична моносомія X або синдром Шерешевського-Тернера.

47,XXY – синдром Кляйнфельтера

47,XXX - жінка з трьома хромосомами X (синдром трисомії X)

48,XXYY – варіант синдрому Кляйнфельтера з двома хромосомами X та двома хромосомами Y.

Набуті кількісні зміни статевих хромосом зазвичай реєструються за онкопатології в клітинах пухлин і описуються за допомогою (+) / (-) знаків.

45,X,-X – таким чином записується жіночий каріотип з двома хромосомами X, але в пухлинних клітинах одна з них втрачена.

47,XX,+X - жіночий каріотип з двома хромосомами X, але в пухлинних клітинах одна X хромосома зайва.

45,X,-Y – чоловічий каріотип з однією хромосомою X і втраченою Y хромосомою в пухлинних клітинах.

48,XY,+X,+Y – каріотип чоловіка з додатковими X і Y хромосомами в патологічних клітинах.

Числові аномалії аутосом

В даному випадку для опису аномалій аутосом також використовуються (+) / (-) знаки:

47,XY,+18 - чоловік з трисомією 18

48,XX,+18,+21 - жінка з трисомією 18 та 21

45,XY,-21 - чоловік з моносомією 21

46,XY,+21c,-21 - чоловік з трисомією 21 (синдром Дауна) і втраченою хромосомою 21 в патологічних пухлинних клітинах.

Мозаїцизм та хімеризм

Для запису каріотипів при мозаїцизмі та хімеризмі застосовують скорочення “mos” та “chi”. Різні клони відокремлюються косою рисою (/), а для запису числа клітин в кожному клоні використовуються квадратні дужки. Так, наприклад, запис каріотипу mos47,XX,+21/46,XX свідчить, що у дівчинки з мозаїчною формою синдрому Дауна при аналізі 100 клітин визначено 60 клітин з регулярною трисомією хромосоми 21 та 40 клітин з нормальним жіночим каріотипом. Нормальний диплоїдний клон завжди позначається останнім. При позначенні хімерного каріотипу найбільший клон ставиться першим: chi46,XY//46,XX.

СТРУКТУРНІ АНОМАЛІЇ ХРОМОСОМ

Зміни хромосом, пов'язані з порушеннями цілістності хроматид, з подальшим перерозподілом, втратою або подвоєнням генетичного матеріалу називають **структурними хромосомними аномаліями**.

Структурні перебудови хромосом у людини зустрічаються значно рідше, ніж числові аберації, проте мають суттєву клінічну значимість, тому як можуть успадковуватись нащадками носіїв подібної аномалії.

Розрізняють два основних типи перебудов.

Перебудови в межах однієї хромосоми — **внутрішньохромосомні** аномалії (делеції, інверсії, дуплікації, інсерції), при залученні двох і більше хромосом — **міжхромосомні** аномалії (транслокації).

Ті структурні аномалії, що не призводять до втрати або надлишку хромосомного матеріалу, тобто в геномі наявні усі локуси, але їх розташування відрізняється від початкового нормального, вважають **збалансованими**. Такі перебудови можуть викликати аномальне

розходження хромосом в мейозі та призводити до порушень репродуктивної функції. Варто зазначити, що носій збалансованої перебудови в каріотипі, як правило, не має змін фенотипу, крім можливих проблем з народження здорових нащадків.

Незбалансовані аберації характеризуються втратою або подвоєнням ділянок хромосоми.

Усі види структурних аномалій, що супроводжуються тими чи іншими клінічними симптомами (за винятком порушень репродуктивної функції), можуть бути охарактеризовані як часткові моносомії, часткові трисомії або їх поєднання.

Усі хромосоми, окрім X та Y, що залучені в структурні перебудови, позначаються числами. Для опису аномалії, що обмежена єдиною хромосомою, використовуються спеціальні символи, за якими в круглих дужках записується змінена хромосома, наприклад, $r(X)$, $del(2)$, $ins(4)$, $dup(5)$. Точки розриву позначаються в дужках одразу після запису типу аномалії і хромосоми з перебудовою. Якщо до перебудови залучені дві та більше хромосом, першою записується хромосома з меншим порядковим номером. І тільки статеві хромосоми вказуються першими. Наприклад:

46,XY, $t(3;6)(p21;q23)$

46,X, $t(X;15)(q27;q13)$

Похідні (дериватні) хромосоми (der).

Структурно змінена хромосома, утворена в результаті перебудови двох чи більше хромосом, або в результаті множинних змін однієї хромосоми є дериватною.

Дериватна хромосома визначається за її центромерою.

46,XY, $der(3)t(3;6)(p21;q23)$

В цьому прикладі дериватна хромосома 3 утворена в результаті транслокації між коротким плечем хромосоми 3 з розривом в смугі p21 та довгим плечем хромосоми 6 з розривом у смугі q23. Похідна (дериватна) хромосома 3 замінила одну нормальну хромосому 3, обидві

хромосоми 6 нормальні. Цей незбалансований каріотип результат моносомії (втрати) сегменту 3p21 > pter та трисомії (надлишок) 6q23 > qter.

Додатковий матеріал невідомого походження (add)

У випадку, коли хромосома має додатковий матеріал, що приєднався до хромосомного району, а його походження не може бути встановлено за допомогою загальноприйнятих методів фарбування, для опису подібної аберації використовується скорочення “add”.

46,XX,add(17)(p13)

Додатковий матеріал невизначеного походження приєднався до смуги p13 короткого плеча хромосоми 17.

Як зазначалось вище, в структурі хромосом можуть реєструватися делеції, дуплікації, інверсії або інсерції. Частота таких структурних змін приблизно 1:2000.

Делеція — це втрата частини хромосоми, що є результатом двох розривів й одного з'єднання з втратою проміжного сегмента. Як приклад, можна навести делецію хромосоми 5 у людини, внаслідок якої формується синдром «котячого крику».

Делеція може бути термінальною, коли втрачається уся ділянка від точки розриву, та інтерстиціальною, за якої втрачається сегмент між точками розриву хромосоми. Нижче наведено приклади запису даної аномалії за правилами короткої та деталізованої системи.

Термінальна делеція

46,XY,del(1)(q32) (коротка форма запису, short form)

46,XY,del(1)(pter > q32:) (детальна форма запису, long form)

Цей каріотип описує термінальну делецію довгого плеча хромосоми 1 з локалізацією розриву в сегменті q32 з втратою ділянки, що розташована дистально від точки розриву.

Інтерстиціальна делеція

46,XY,del(1)(p21p32) (коротка форма запису, short form)

46,XY,del(1)(pter > p21::p32 > qter) (детальна форма запису, long form)

Інтерстиціальна делеція з розривом і з'єднанням (::) в смугах 1p21 та 1p32. Сегмент, що розташований між цими смугами, - делетований.

Дуплікація—це подвоєння ділянки хромосоми, в результаті чого клітина стає поліплоїдною за даним сегментом. Дуплікація може знаходитися безпосередньо за початковим сегментом хромосоми (тандем-дуплікація) або в інших її ділянках. Більшість таких перебудов летальні, а ті носії, які вижили, безплідні. Як правило, наслідки залежать від розміру аномального фрагменту.

Для запису каріотипу з дуплікацією використовують символ “dup”.

46,XY, dup(1)(p21p32) (коротка форма запису, short form)

46,XY, dup(1)(pter > p21::p32 > qter) (детальна форма запису, long form)

Пряма дуплікація сегменту між смугами 1p21 та 1p32.

За **інверсії** відбувається поворот ділянки хромосоми на 180°, а розірвані кінці з'єднуються в іншій послідовності. Якщо в інвертовану ділянку потрапляє центромера, то таку інверсію називають **перицентричною**. У випадку, коли інверсія зачіпає тільки одне плече хромосоми говорять про **парацентричну** перебудову. Гени в інвертованій ділянці хромосоми розташовуються в зворотній по відношенню до початкової послідовності.

Для запису даної аномалії використовують скорочення (*inv*)

Перицентрична інверсія

46,XY,inv(2)(p21q31)

Розрив і з'єднання локалізовані в смугах p21 (коротке плече) та q31 (довге плече) хромосоми 2. Сегмент між цими смугами з центромерою включно з'єднаний в зворотньому порядку.

Парацентрична інверсія

46,XY,inv(3)(q21q27)

Розрив і з'єднання локалізовані в смугах q21 та q27 на довгому плечі хромосоми 3.

Інсерція — тип хромосомної перебудови, що спотворює генетичну інформацію, за якої реєструється вставка сегменту ДНК розмірами від одного нуклеотиду до субхромосомного фрагменту.

46,XX,ins(3)(p21q27q32)

Така форма запису описує пряму інсерцію. Сегмент довгого плеча між смугами 3q27 та 3q32 після розриву був вбудований в коротке плече хромосоми в смузі p21 без зміни напрямку (смуга q27 розташована проксимально по відношенню до центромери в порівнянні зі смугою q32).

До **міжхромосомних** перебудов відносять **транслокації** — перенесення ділянки або цілої хромосоми на іншу негомологічну хромосому.

Збалансовані транслокації, що не супроводжуються зміною кількості генетичного матеріалу, не викликають змін фенотипу і стану здоров'я (за винятком можливого безпліддя) та реєструються у новонароджених з частотою 1:500. У випадку незбалансованих транслокацій спостерігається нестача або надлишок частини будь-якої хромосоми. Характерною особливістю цих аномалій є суттєві зміни стану здоров'я з вираженою клінічною симптоматикою. Визначаються з частотою 1:2000 новонароджених.

Розрізняють такі типи транслокацій:

1. **Реципрокні** транслокації — збалансовані хромосомні перебудови за яких відбувається взаємний обмін ділянками між негомологічними хромосомами зі збереженням генетичного матеріалу.

Нижче наведено приклад запису каріотипу з реципрокною транслокацією:

46,XX,t(7;10)(q22;q24)

Точки розриву і злиття розміщені на смугах 7q22 та 10q24. Сегменти, що розташовані дистальніше цих смуг обмінялись. В результаті транслокації загальний вміст ДНК в клітині не змінився, тому мікроскопічно це збалансована транслокація.

2. **Нереципрокная** транслокація, коли сегмент однієї хромосоми переноситься на іншу;

3. **Робертсонівські** транслокації – особливий тип транслокації, коли аномальна хромосома є результатом центричного злиття довгих плечей акроцентричних хромосом (13-15 та 21,22) з втратою коротких плечей. Замість чотирьох хромосом з двох пар утворюється три хромосоми, з яких дві нормальні, а одна представлена довгими плечами хромосом обох пар. Таким чином, в каріотипі носія такої транслокації реєструється 45 хромосом.

Саме таким чином формується транслокаційний синдром Дауна. Хворі мають типову для хвороби Дауна симптоматику, проте в їх каріотипі 46 хромосом, з них дві хромосоми 21 нормальні, а третя транслокована на хромосому групи D (за різними даними, хромосому 14 або 15). Дослідження каріотипів батьків пробанда показало, що часто фенотипово нормальні матері мають 45 хромосом та таку ж транслокацію хромосоми 21, як і дитина.

Проте, в більшості випадків носії робертсонівської транслокації не мають клінічних проявів, що пояснюється можливістю компенсації втрати коротких плечей акроцентричних хромосом функціонуванням інших генів. У носіїв робертсонівської транслокації ризик народження дитини з незбалансованими хромосомними перебудовами відносно невеликий, що пов'язано з елімінацією аномальних гамет, зигот або ембріонів.

Опис транслокації такого типу здійснюється у відповідності до номенклатури за формою запису незбалансованих транслокацій з використанням символу “der”.

Наприклад,

45,XX,der(13;14)(q10;q10)

Це каріотип з робертсонівською транслокацією між хромосомами 13 і 14. Походження центромери невідоме, а точки розриву, позначені як 13q10 і 14q10, вказують, що до перебудови залучені довгі плечі цих хромосом. Похідна (дериватна) хромосома замінила одну хромосому 13 і одну

хромосому 14. Немає необхідності вказувати відсутні хромосоми. Таким чином, каріотип містить одну нормальну хромосому 13, одну нормальну хромосому 14 і похідну хромосому $der(13;14)$. Короткі плечі хромосом 13 та 14 втрачені.

ХРОМОСОМНІ ХВОРОБИ

На сьогоднішній день патогенез хромосомних хвороб залишається нез'ясованим, навіть не зважаючи певну визначеність їх клініко-цитогенетичних характеристик. Вважається, що хромосомні аномалії викликають порушення загального генного балансу, результатом чого є декоординованість в роботі генів і розлади регуляції на всіх стадіях онтогенезу. Проте, загальної схеми розвитку складних патологічних процесів, які реалізують хромосомні аномалії у фенотип хвороби, немає.

З огляду на зміну кількості генетичного матеріалу можна зробити висновок, що патологічні ефекти пов'язані і зміною числа структурних генів, що кодують синтез білка (при трисомії їх кількість збільшується, при моносомії зменшується). Однак зміна числа алелей гена не завжди викликає пропорційну зміну продукції відповідного білка. Виявлені при даних захворювання біохімічні відхилення (зміна активності ферментів та інше) важко пов'язати фенотиповими характеристиками на органному і системному рівнях, тому як їх гени локалізовані на не залученій до пербудови хромосомі. На сьогоднішній день успішно можна лише проводити зіставлення клінічного фенотипу хвороби з цитогенетичними змінами.

Необхідно підкреслити, що усі форми хромосомних хвороб характеризуються множинністю уражень. Усього при кожній хворобі спостерігається від 30 до 80 різних порушень і відхилень від норми. Це черепно-лицеві дізморфії, вроджені вади розвитку внутрішніх органів і частин тіла, уповільнений ріст і розвиток організму, розумова відсталість та інші системні порушення. Множинні вроджені вади розвитку формуються в ранньому ембріогенезі, що й пояснює деяку спільність клінічної картини

різних хромосомних хвороб. Клінічний поліморфізм хромосомних хвороб обумовлений генотипом організму, ступенем мозаїчності за мутантними клітинами та умовами середовища. Варіації в прояві захворювання можуть бути дуже широкими: від летального результату до незначних порушень (наприклад, близько 70% випадків трисомії 21 закінчується внутрішньоутробною загибеллю, в 30% народжуються діти з синдромом Дауна різноманітною клінічною картиною). Клінічне зіставлення повних і мозаїчних форм показує, що мозаїчні форми протікають легше, що ймовірно обумовлено присутністю нормальних клітин, що компенсують генетичний дисбаланс.

Усі хромосомні хвороби пов'язані зі структурними аномаліями хромосом або зміною їх кількості та можуть бути умовно розділені на 3 великі групи:

- 1) обумовлені зміною числа хромосом;
- 2) пов'язані зі зміною структури хромосом;
- 3) пов'язані з порушеннями плідності.

Хромосомні хвороби, пов'язані з порушенням числа окремих хромосом в наборі

Представлені або повною моносомією (однієї з двох гомологічних хромосом в нормі) або повною трисомією (трьома гомологами). Повна моносомія у живонароджених характерна тільки для хромосоми X (синдром Шерешевського-Тернера), оскільки більшість моносомій решти хромосомного набору (Y хромосоми і аутосоми) гинуть на дуже ранніх етапах внутрішньоутробного розвитку та досить рідко зустрічаються навіть у матеріалі спонтанно абортів ембріонів і плодів. Слід, однак, відзначити, що у спонтанних абортів моносомія X визначається з досить високою частотою (близько 20%), що свідчить про її високу пренатальну летальність. Причина гибелі зародків з моносомією X в одному випадку і живонародження дівчаток з синдромом Шерешевського-Тернера в іншому, невідома. Існують ряд гіпотез, що пояснюють цей факт, одна з яких пов'язує

підвищену загибель Х-моносомних зародків з більш високою ймовірністю прояву рецесивних летальних генів на єдиній Х-хромосомі. Цілі трисомії у живонароджених характерні для Х, 8, 9,13,14,18,21 і 22 хромосом. Трисомії хромосом 1,5,6,11 і 19 зустрічаються рідко навіть в абортівному матеріалі, що свідчить про велику морфогенетичну значимість цих хромосом. Більш часто цілі моно-і трисомії за рядом хромосом набору зустрічаються в мозаїчному стані як у спонтанних абортусів, так і у дітей з множинними вродженими вадами розвитку (МВВР).

Клініко-цитогенетична характеристика синдромів, пов'язаних з аномаліями статевих хромосом

Синдром моносомії хромосоми Х (X0 – синдром, синдром Шерешевського-Тернера). Частота народження 1:2000-1:3000, за деякими даними -1:5000. Це єдина форма моносомії у людини, яка може бути виявлена у живонароджених.

Цитогенетична характеристика. Каріотип 45,X0. У 55% дівчаток з цим синдромом виявляється каріотип 45,X0, у 25% - зміна структури однієї з Х-хромосом (делеції довгого і короткого плеча Х хромосоми, ізо-Х-хромосоми, а також кільцеві Х хромосоми). У 15% випадків виявляється мозаїчність у вигляді двох або більше клітинних ліній, одна з яких має каріотип 45,X0, а інша - 46,XX або 46,XY. Третя клітинна лінія найбільш часто представлена каріотипом 45,X0, 46,XX, 47,XXX. У 2-5% випадків реєструється мозаїцизм 45,X0/46,XY, який характеризується широким діапазоном ознак: від типового синдрому Шерешевського-Тернера до нормального чоловічого фенотипу.

Ризик спадкування синдрому Шерешевського-Тернера складає 1 випадок на 5000 новонароджених.

Основні клінічні ознаки. Фенотип жіночий. У новонароджених у 40 % випадків відзначається лімфатичний набряк стоп, кистей рук, гіпотонія. Хворі мають типові клінічні ознаки: коротка шия з надлишком шкіри і

крилоподібними складками, вальгусна деформація стоп, гіперпигментація шкіри, низькорослість. Відставання в рості (ріст дорослих 135-145 см) реєструється у 98 % хворих. Недорозвинені статеві ознаки (статевий інфантилізм), первинна аменорея, дисгенез гонад та безпліддя в 94-99 % випадків. Для дорослих характерно низьке розташування вушних раковин, занижка лінії росту волосся, аномалії кістяка. У 20% хворих є вади серця (коарктація аорти, стеноз аорти, вади розвитку мітрального клапана), у 40% - вади нирок (подвоєння сечовивідних шляхів, підковоподібна нирка). У хворих, що мають клітинну лінію з Y-хромосомою, може розвинути гонадобластома, часто спостерігається аутоімунний тиреоїдит, підвищений ризик цукрового діабету. Інтелект страждає рідко. Для підтвердження діагнозу разом з дослідженням клітин периферичної крові проводяться біопсія шкіри і дослідження фібробластів. У більшості випадків, захворювання не позначається на тривалості життя пацієнтів.

Синдром полісомії X-хромосоми. Популяційна частота 1 на 1000 новонароджених дівчаток.

Цитогенетично виявляються форми 47, XXX, 48.XXXX і 49.XXXXX. Трисомія по X-хромосомі виникає в результаті нерозходження статевих хромосом в мейозі або при першому розподілі зиготи.

Основні клінічні ознаки. Синдрому полісомії X властивий значний поліморфізм. Зі збільшенням числа хромосоми X наростає ступінь відхилень від норми. Жінки з каріотипом 47,XXX як з повною, так і мозаїчною формою в основному мають нормальний фізичний і психічний розвиток, а інтелект - в межах нижньої межі норми. У цих жінок нерегулярний менструальний цикл і вторинна аменорея, однак вони можуть мати потомство. У жінок з тетра-і пентасомією X описані відхилення у розумовому розвитку (у 75% випадків спостерігається помірна розумова відсталість), аномалії скелета і статевих органів. Жіночий організм з мужеподібною статуєю. Можуть бути недорозвинені первинні та вторинні статеві ознаки. У деяких з них порушена функція яєчників (вторинна аменорея, дисменорея, рання менопауза). Іноді

такі жінки можуть мати дітей. Підвищений ризик захворювання на шизофренію.

Синдром хромосом XXУ (синдром Клайнфельтера) Описаний в 1942 році Н.Klinefelter та співавт. Популяційна частота 1:1000 хлопчиків.

Цитогенетичні варіанти синдрому можуть бути різними: 47,XXУ; 48,XXУУ; 48,XXXУ; 49,XXXXУ. Відзначено як повні, так і мозаїчні форми. Близько 80% хлопчиків з синдромом Клайнфелтера мають каріотип 47,XXУ, у 20% випадків реєструється мозаїцизм, при якому одна з клітинних ліній має каріотип 47,XXУ. Повторний ризик для синдрому Клайнфелтера не перевищує загально популяційні показники і становить 1 випадок на 2000 живонароджених дітей.

Основні клінічні ознаки. Фенотип чоловічий. Клініка відрізняється широкою різноманітністю і не специфічністю проявів. Хворі високого зросту з непропорційно довгими кінцівками, вираженої гінекомастією і овоłosінням за жіночим типом. У дитинстві відрізняються тендітною статуєю, а після 40 років страждають ожирінням. Слабо розвинений волосяний покрив, часом знижений інтелект. Важливими діагностичними ознаками є гіпогонадізм і гіпогеніталізм. Внаслідок гіпогонадізму слабо виражені первинні та вторинні статеві ознаки, порушений перебіг сперматогенезу. Як правило, такі хворі безплідні. Статеві рефлексі збережені, проте може відзначатися зниження статевого потягу, імпотенція. Інфантильність і поведінкові проблеми при синдромі Клайнфелтера створюють труднощі соціальної адаптації. У 15 – 20% випадків коефіцієнт інтелекту нижче 80. Взагалі, чим більше в наборі Х-хромосом, тим більше знижений інтелект.

Синдром полісомії У-хромосоми: ХУУ, ХУУУ. Популяційна частота 1 на 1000 хлопчиків.

Цитогенетично відзначені повні і мозаїчні форми.

Основні клінічні ознаки. Більшість пацієнтів за фізичним і розумовим розвитком не відрізняються від здорових. Зазвичай вони високого зросту (в середньому 186 см). Можуть бути аномалії зубів і кісткової системи. Статеві залози розвинені нормально, тому вони можуть мати нормальне потомство.

При цьому синдромі можуть відзначатися деякі особливості поведінки: схильність до агресії, асоціальність, за деякими даними -гомосексуалізм. Чим більше в наборі Y-хромосом, тим значніше зниження інтелекту.

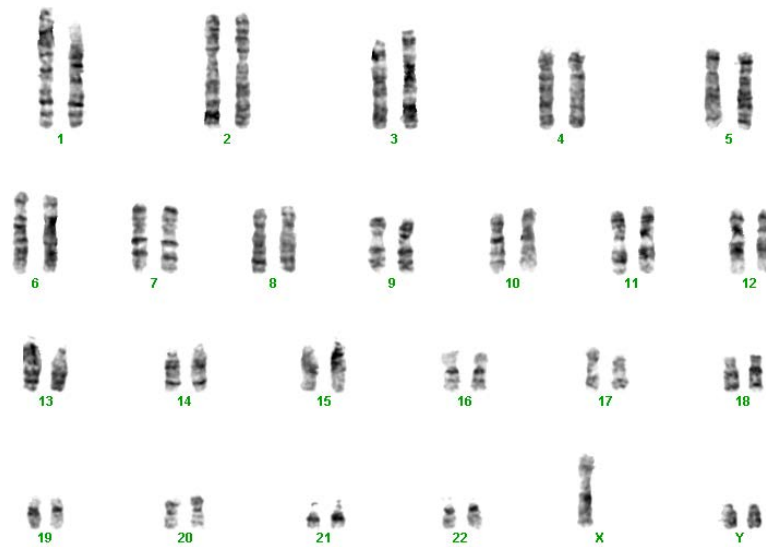


Рисунок Каріотип чоловіка з додатковою Y хромосомою, 47,XYY. GTG-фарбування.

Клініко-цитогенетична характеристика синдромів, пов'язаних з числовими аномаліями аутосом

Синдром трисомії хромосоми 8. Вперше описаний в 1962 році. Популяційна частота 1:50000.

Цитогенетична характеристика. Виникає в результаті нерозходження хромосом на ранніх стадіях бластули, крім рідкісних випадків мутацій *de novo* в гаметогенезі. Виявляються як повні, так і мозаїчні форми, які складають до 90% всіх випадків. Відмінностей за клінічною картиною таких форм немає. Не виявлено кореляції між тяжкістю захворювання і часткою мозаїчного клону.

Основними діагностичними ознаками даного синдрому є: довгий вузький тулуб, аномалії ребер та хребта, глибокі борозни долоней та стоп,

макроцефалія, мікрогнатія, вивернута нижня губа, масивний виступаючий лоб, широка спинка носа, високе акровидне піднебіння, великі відстовбурчені вуха з виступаючим протизавитком. Крім того, є аномалії скелета, що виражаються в додаткових ребрах і хребцях, закриті спинномозкові грижі в шийному і грудному відділах хребта, аплазія і гіпоплазія надколінка, коротка шия. Є множинні контрактури суглобів, клинодактилія, камптодактилія. Поширені вади сечової системи, особливо гідронефроз. Діагностують вади серця, особливо дефекти перегородок і великих судин. Інтелект у хворих знижений, відзначена затримка психомоторного і мовного розвитку. Прогноз фізичного, психічного розвитку та життя несприятливий, хоча й відзначені пацієнти у віці 17 років.

Синдром трисомії хромосоми 13 (Синдром Патау). Вперше описаний в 1960 році. Популяційна частота 1 на 7800.

Цитогенетичні варіанти можуть бути різні: ціла трисомія 13 (нерозходження хромосом в мейозі, в 80% випадків у матері), транслокаційний варіант (робертсонівські транслокації D/13 і G/13), мозаїчні форми, додаткова кільцева хромосома 13, ізохромосоми.

Основні діагностичні ознаки. Для синдрому Патау характерні: мікроцефалія, полідактилія, розщілина верхньої губи і піднебіння, низько посаджені деформовані вушні раковини, мікрогенія, флексорне положення пальців рук, опуклі нігті, поперечна складка долонна, стопа-качалка. З вад внутрішніх органів відзначені вроджені вади серця (дефекти перегородок і великих судин), незавершений поворот кишечника, дивертикул Меккеля, полікістоз нирок, подвоєння сечоводу. Спостерігається крипторхізм, гіпоплазія зовнішніх статевих органів, подвоєння матки і піхви. Глибока ідіотія. Діти, в основному, помирають у віці до 1 року, частіше в перші 2-3 місяці життя.

Синдром трисомії хромосоми 18 (Синдром Едвардса). Описаний в 1960 році. Популяційна частота становить 1 на 6500.

Цитогенетично в більшості випадків представлений цілою трисомією 18 (гаметична мутація одного з батьків, частіше по материнській лінії). Крім

того, зустрічаються і мозаїчні форми, транслокації спостерігаються дуже рідко. Критичним районом, відповідальним за формування основних ознак синдрому, є сегмент 18q11.

Основні діагностичні ознаки. Клінічних відмінностей між цитогенетичними формами не виявлено. Діти з синдромом Едвардса мають малу масу тіла при народженні. Характерними є вножинні вади розвитку, доліхоцефалія, гіпертелоризм, низько посажені аномальної форми вуха, мікрогнатія, мікростомія, скошене підборіддя. Є аномалії розвитку кінцівок: верхніх - згинальні деформації пальців, перекриття пальців, стислі пальці рук, гіпоплазія нігтів (особливо V пальця); нижніх - короткий і широкий палець стопи, типова форма стопи у вигляді гойдалки, шкірна синдактилія стоп. З внутрішніх вад слід відзначити комбіновані вади серцево-судинної системи, незавершений поворот кишечника пороки розвитку нирок, частіше гідронефроз і підковоподібна нирка), крипторхізм. Відзначається затримка психомоторного розвитку, ідіотія та імбецильність. Діти гинуть, в основному, у віці до 1 року від ускладнень, викликаних вродженими вадами розвитку.

Синдром трисомії хромосоми 21 (Синдром Дауна, СД). Вперше описаний в 1866 році англійським лікарем J.Down. Серед новонароджених реєструється з частотою 1:700 - 1:800, не має будь-якої тимчасової, етнічної або географічної різниці при порівнянні однакового віку батьків. Частота народження дітей з СД залежить від віку матері (різко збільшується після 35 років) і меншою мірою від віку батька. Повторний ризик народження дитини з синдромом Дауна у батьків з нормальним каріотипом становить близько 1%. У осіб з мозаїцизмом і носіїв збалансованої транслокації - істотно вищий. Співвідношення хлопчиків і дівчаток серед новонароджених з СД становить 1:1. Незважаючи на інтенсивне вивчення синдрому причини нерозходження хромосом до теперішнього часу чітко не визначені. Етіологічно важливими факторами вважаються внутрішнє і позафолікулярне перезрівання яйцеклітини, зниження числа або відсутність хіазм в 1-му поділі мейозу.

Цитогенетичні варіанти дуже різноманітні, але близько 95% випадків представлені простою трисомією хромосоми 21, що виникає у результаті

нерозходження хромосом в мейозі у батьків. Наявність поліморфних молекулярно-генетичних маркерів дозволяє визначити конкретного батька та стадію мейозу в якій відбулося нерозходження. У 3% хворих спостерігається мозаїцизм. В інших випадках синдром викликаний спорадичною чи успадкованою робертсонівською транслокацією хромосоми 21. Як правило, такі транслокації виникають в результаті злиття центромери хромосоми 21 та іншої акроцентричної хромосоми. Близько 50% транслокаційних форм успадковуються від батьків і 50% є мутаціями *de novo*. Критичним сегментом, відповідальним за формування основних ознак синдрому, є область 21q22.

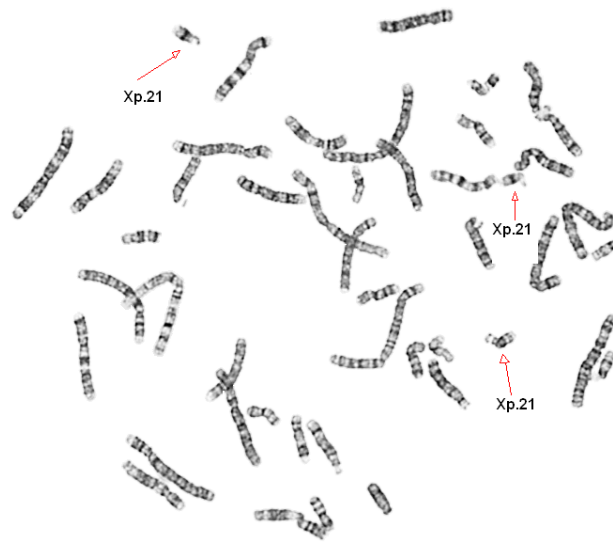


Рисунок Метафазна пластинка з трисомією хромосоми 21. GTG-фарбування.

Клінічна симптоматика СД різноманітна: це і вроджені вади розвитку, і порушення постнатального розвитку нервової системи, і вторинний імунodefіцит і т.п. Діти з СД народжуються в строк, але з помірною пренатальною гіпоплазією. Характерні симптоми, як правило, у 90 % випадків визначаються кваліфікованими педіатрами ще в пологовому будинку.

Основними діагностичними ознаками синдрому є: типове пласке обличчя, монголоїдний розріз очей, епікант, відкритий рот, макроголоссія і

аномалії зубів, короткий ніс і пласке перенісся, надлишок шкіри на шиї, короткі кінцівки, поперечна чотирьох-пальцева долонна складка (мавпяча борозна). Характерна м'язова гіпотонія в поєднанні з розхитаністю суглобів. З дефектів внутрішніх органів часто відзначаються вроджені вади серця і шлунково-кишкового тракту, які і визначають тривалість життя хворих. Ріст дорослих хворих на 20 сантиметрів нижче середнього. Розумова відсталість зазвичай середнього ступеня тяжкості. Затримка у розумовому розвитку до рівня імбецильності особливо проявляється, якщо не застосовуються спеціальні методи навчання. Діти з СД ласкаві, уважні, слухняні, терплячі при навчанні.

Вроджені вади внутрішніх органів, знижена пристосованість дітей з СД часто призводять до летального результату в перші 5 років. Наслідком зміненого імунітету і недостатності репараційних систем є лейкемії, що часто зустрічаються у хворих на синдром Дауна.

Аномалії хромосом, пов'язані з порушенням плідності

Представлені триплоїдією і тетраплоїдією, які зустрічаються переважно в матеріалі спонтанних абортусів. Відзначено лише поодинокі випадки народження дітей-триплоїдів з важкими МВПР, несумісними з нормальною життєдіяльністю. Триплоїд може формуватися як внаслідок дігенії (запліднення диплоїдної яйцеклітини гаплоїдним сперматозоїдом), так і внаслідок діандрії (зворотній варіант) і диспермії (запліднення гаплоїдної яйцеклітини двома сперматозоїдами).

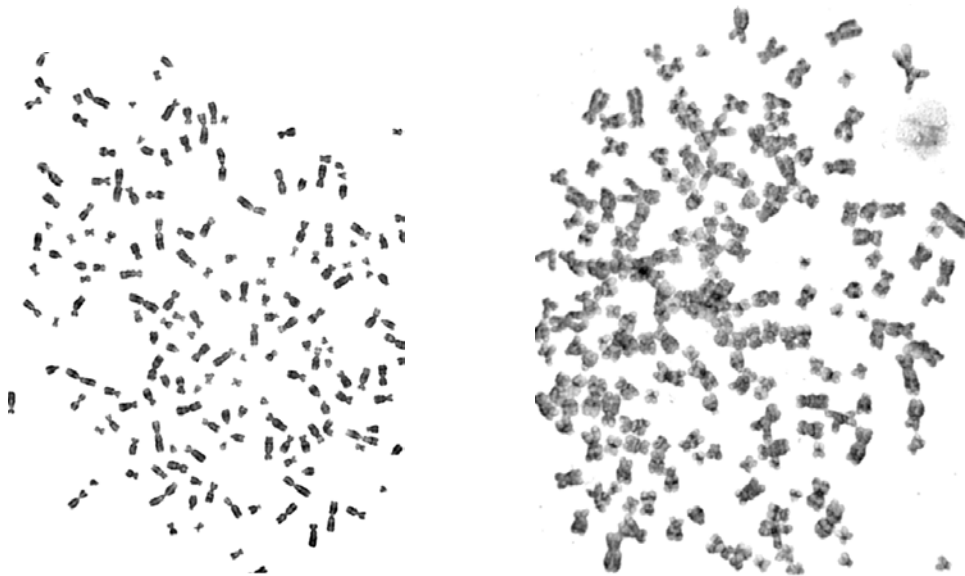


Рисунок Тетраплоїдні метафазні пластинки, GTG-фарбування

Клініко-цитогенетична характеристика синдромів, обумовлених структурними перебудовами хромосом

Хромосомні хвороби, що пов'язані з порушенням структури хромосом, становлять велику групу синдромів часткових моно- або трисомій. Як правило, вони виникають в результаті структурних перебудов хромосом у статевих клітинах батьків, які внаслідок порушення процесів рекомбінації в мейозі призводять до втрати або надлишку фрагментів хромосом, залучених до перебудови. Часткові моно- або трисомії визначені практично у всіх хромосом, але лише деякі з них формують чітко діагностовані клінічні синдроми. Фенотипові прояви цих синдромів більш поліморфні, ніж синдромів цілих моно- і трисомій.

Синдром 4p- (Синдром Вольфа-Хіршхорна). Описаний в 1965 році. Популяційна частота 1:100000. 90% випадків представлені мутаціями *de novo*, частота спадкових форм - 10%.

Цитогенетична характеристика. Обумовлений частковою делецією короткого плеча хромосоми 4. Критичної областю, відповідальною за

формування основних ознак синдрому, є сегмент 4p16. Часом реєструються кільцеві та ізохромосоми.

Основними клінічними ознаками захворювання є: низька маса тіла при народженні, мікроцефалія, дзюбовидний ніс, гіпертелоризм, мікрогнатія, маленький рот з опущеними куточками рота. Вуха великі, відстовбурчені, мочка і завиток, як правило, не виражені. Часто зустрічаються ущелини губи і піднебіння. У хлопчиків зустрічаються гіпоспадія і крипторхізм. З внутрішніх вад - полікістоз нирок і ураження серцево-судинної системи. Провідною клінічною ознакою є затримка психомоторного розвитку.

Моносомія 5p (Синдром "котячого крику"). Описаний в 1963 році. Популяційна частота 1:50000.

Цитогенетичні варіанти варіюють від часткової до повної делеції короткого плеча хромосоми 5. Для розвитку основних ознак синдрому велике значення має сегмент - 5p15. Крім простої делеції відзначені кільцеві хромосоми 5, мозаїчні форми, а також транслокації із залученням хромосоми 5p (з втратою критичного сегмента) та іншої аутосоми.

Діагностичними ознаками захворювання є: мікроцефалія, незвичайний крик чи плач, нагадує нявкання кішки (особливо в перші тижні після народження); антимонголоїдний розріз очей, косоокість, місяцеподібне лице, гіпертелоризм, широке перенісся. Вушні раковини низько посаджені і деформовані. Є поперечна долонна складка, клинодактилія, синдактилія. Розумова відсталість в стадії імбецильності. Іноді зустрічаються крипторхізм і аномалії нирок. Потрібно зазначити, що такі ознаки як місяцеподібне обличчя і котячий крик з віком згладжуються, а мікроцефалія і косоокість виявляються більш чітко. Тривалість життя залежить від тяжкості вроджених вад розвитку внутрішніх органів. Проте більшість хворих гинуть в перші роки життя.

Синдром 9p +. Описаний в 1970 році M.Rethore і співавт.

Цитогенетика синдрому різноманітна: часткова трисомія короткого плеча хромосоми 9, часом визначаються ізохромосоми 9p, незбалансовані

транслокації, але у всіх випадках є потрійний набір генів частини короткого плеча хромосоми 9.

Діагностичними ознаками захворювання є: мікробрахіцефалія, антимонголоїдний розріз очей, гіпертелоризм, анофтальмія, широкий і округлий кінчик носа, виступаюча верхня губа і верхня щелепа. Вушні раковини низько розташовані з аномальним протизавитком, вузький слуховий канал. Крім того є коротка шия з низькою лінією росту волосся, поперековий лордоз, сколіоз, поперечна долонна складка, рентгенологічно відзначається затримка кісткового віку. У 25 % хворих виявляють патологію нирок серця. Олігофренія. Прогноз життя сприятливий, 25% хворих доживають до похилого віку.

Синдром 9p-. Вперше описаний в 1973 році.

Цитогенетичні варіанти можуть бути різними: часткова делеція короткого плеча 9 хромосоми, ізохромосома 9q, незбалансовані транслокації, проте в усіх випадках спостерігається втрата сегмента 9p22.

Діагностичними ознаками захворювання є: тригоноцефалія, різко виступаючий лоб, монголоїдної розріз очей, епікант, екзофтальм, гіпертелоризм, сплюснене і широке перенісся, маленький рот з великою верхньою губою, високе небо. Вушні раковини без мочки або вона недорозвинена, зі згладженим завитком. Шия коротка, відзначений гіпертелоризм сосків. Пальці рук і ніг довгі, з додатковими згинаючими складками ; нігті широкі, опуклі, квадратної форми. У дівчаток виражена гіпоплазія малих і великих статевих губ, у хлопчиків - гіпоплазія мошонки і статевого члена. З пороків внутрішніх органів відзначено ураження серцево-судинної системи і гідронефроз нирок. Розумова відсталість в стадії імбецильності, рідше - дебільності. За характером хворі ласкаві, спокійні, слухняні. Прогноз для життя сприятливий.

Синдром 13q- (Синдром Орбелі). Описаний у 1962 році Н.Wang.

Цитогенетичні варіанти можуть бути різні. Найбільш часто зустрічається кільцева хромосома 13, рідше - прості делеції, але у всіх випадках спостерігається втрата сегмента 13q14.

Основними діагностичними ознаками захворювання є: виражена пренатальна гіпотрофія, мікроцефалія з ознаками краніостенозу; асиметрія лица; широке, виступаюче перенісся («грецький профіль»); гіпертелоризм, епікант; маленьке підборіддя. Має місце очна патологія, що включає мікрофтальмію, катаракту і страбізм. Скелетні аномалії представлені гіпоплазією 1 пальця кисті і 1 п'ястної кістки, клінодактилією. З внутрішніх вад розвитку спостерігаються ВПС у 30 % випадків, порушення повороту кишечника, гіпоплазія і полікістоз нирок. Зустрічається атрезія ануса. У хлопчиків виражений крипторхізм, гіпоспадія. Хворі характеризуються різким відставанням у фізичному і психічному розвитку. Розумова відсталість в стадії імбецильності або ідіотії. Діти з грубими вадами помирають до року, хоча відзначені пацієнти у віці старше 40 років.

Синдром кільцевої хромосоми 18. Описаний в 1962 році.

Цитогенетично представлений кільцевою хромосомою 18, можливі мозаїчні варіанти.

Основні клінічні ознаки захворювання: мікроцефалія, гіпертелоризм, страбізм, птоз, ністагм, колобома райдужної оболонки ока, сплюснена спинка носа, рот "коропа", тонка верхня губа, високе піднебіння (часто з ущелиною). Патологія внутрішніх органів зустрічається рідко. Розумова відсталість як правило важка і проявляється у 100% хворих.

Синдром 18p-. Описаний в 1963 році.

Цитогенетично характеризується делецією короткого плеча 18 хромосоми.

Основними діагностичними ознаками синдрому є: низька маса тіла при народженні м'язова гіпотонія, помірна мікроцефалія, високе чоло, гіпертелоризм, епікант, птоз, широке сплюснене перенісся, мікрогенія, широкий рот з опущеними куточками губ і випинанням верхньої губи у вигляді "полицейського кашкету", аномалії зубів, великі деформовані вушні раковини. Часто зустрічаються коротка шия, втиснута грудна клітка, пупкова і пахова грижа. Скелетні аномалії можуть бути представлені вивихом стегна, деформацією ліктьового суглоба. З пороків внутрішніх органів зустрічається

ВПС. Виявляється також дефіцит IgA. У всіх хворих відзначається затримка психомоторного розвитку, особливо страждає мовлення (афазія, дисфазія), в багатьох випадках відсутня фразова мова до 7-9 років.

Синдром 18q-. Описаний в 1964 році.

Цитогенетично представлений делецією довгого плеча 18 хромосоми.

Типовими діагностичними ознаками захворювання є: мікроцефалія, розумова відсталість, гіпоплазія середньої частини обличчя, глибоко посаджені очі, рот "коропа", профіль особи плоский або увігнутий. Характерно високе піднебіння або його ущелина, деформовані вушні раковини з атрезією або звуженням зовнішніх слухових каналів. Аномалії очей включають ністагм, страбізм, глаукому, епікант, атрофію зорових нервів. У хлопчиків відзначений крипторхізм, гіпоплазія статевого члена і мошонки, у дівчаток гіпоплазія малих статевих губ. З пороків внутрішніх органів зустрічаються пороки серця, рідше - нирок. Розумова відсталість, як правило, глибока і спостерігається в 100% випадків. Типові зміни дерматогліфіки: надлишок завитків на пальцях і поперечна долонна складка.

Синдром 21 q- (Синдром делеції довгого плеча 21 хромосоми).

Виділено в окрему нозологічну групу в 1970 році.

Цитогенетично характеризується частковою делецією довгого плеча хромосоми 21. Відзначено мозаїчні форми хромосомних порушень.

Діагностичними ознаками захворювання є: низька маса тіла при народженні, мікроцефалія, антимонголоїдний розріз очей, епікант, широке перенісся, великі низько посаджені деформовані вуха з розширеним слуховим каналом, мікрогнатія. До основних ознак відносяться також сколіоз, клинодактилія, пахова грижа, клишоногість і крипторхізм. Їз вад внутрішніх органів у 30% випадків спостерігаються вади серця та аномалії очей, реєструється патологія нирок (гідронефроз, подвоєння ниркових мисок). Відзначена різка затримка психомоторного розвитку. При грубих вадах розвитку діти помирають у перші тижні життя, хоча описані хворі у віці 50 років.

Синдром 22q- (22r).

Цитогенетичні варіанти можуть бути різними: часткова моносомія хромосоми 22, кільцева хромосома 22, і мозаїчні варіанти. У 90% випадків дані хромосомні порушення є мутаціями de novo.

Основними діагностичними ознаками захворювання є: великі виступаючі очі ("очі лані"), мікроцефалія, епікант, гіпертелоризм, ущемлення язичка і піднебіння, густі брови й вії. Крім того, наголошується дисплазія тазостегнових суглобів, клинодактилія і синдактилія. Вади внутрішніх органів не характерні. Розумова відсталість проявляється як легкою, так і вираженою олігофренією.

Клініко-цитогенетична характеристика синдромів і злоякісних новоутворень, пов'язаних з мікроструктурними аномаліями хромосом

Останнім часом клініко-цитогенетичні дослідження стали спиратися на методи хромосомного аналізу з високою розподільчою здатністю, що дозволило підтвердити існування мікрохромосомних мутацій, виявлення яких знаходиться на межі можливостей світлового мікроскопа. Незначні порушення в структурі хромосом можуть бути виявлені за допомогою цих методів хромосомного аналізу не тільки серед хворих з MBVP, але і при деяких інших синдромах. Відмінна риса цих синдромів полягає в тому, що клінічно вони були описані задовго до того, як була виявлена їх хромосомна етіологія. На сьогоднішній день з'ясовано близько 20 нозологічних форм, при яких виявлено мікроструктурні хромосомні порушення. Показано, що мікроструктурні аномалії хромосом супроводжують не тільки синдроми MBVP, але і різні гіперпластичні процеси, включаючи і злоякісні новоутворення. Більшість синдромів, пов'язаних з мікроаномаліями хромосом, зустрічається з частотою 1:50000-100000 новонароджених.

Синдром Відемана-Беквіта. Вперше описаний у 1964 році Н. Wiedeman і J. Beckwith.

Цитогенетично характеризує дуплікацією ділянки короткого плеча 11 хромосоми (11p15). У сегменті 11p15 локалізовано ген "інсуліноподібного фактору росту II типу", при дуплікації якого утворюються три його копії, що

призводить до появи таких ознак синдрому як велика вага, пупкова грижа, збільшений язик, і т.д.

Основними діагностичними ознаками захворювання є: омфалоцеле (пупкового канатику грижа), гігантизм, макроглоссія, макросомія зі збільшенням м'язової маси і підшкірного жирового шару, виступаюча потилиця і аномалії прикусу, пов'язані з гіпоплазією верхньої щелепи і відносної гіперплазією нижньої. Характерною ознакою є наявність вертикальних смужок на мочках вух. Описана патологія розвитку внутрішніх органів: дефекти міжшлуночкових перегородок, додаткова селезінка, цитомегалія кори надниркових залоз, незавершений поворот кишечника. Реєструється гіперплазія клітин Лангерганса в підшлунковій залозі. Кістковий вік випереджає паспортний. В 5 % випадків реєструються злоякісні пухлини. Психічний розвиток відповідає віку, можлива помірна розумова відсталість.

Синдром Прадера-Віллі. Описаний в 1956 р. Популяційна частота 1:15 000. Зустрічається в основному спорадично, хоча описані і сімейні випадки з аутосомно-домінантним типом успадкування.

Цитогенетична характеристика.

Перше припущення про зв'язок даного синдрому з хромосомним порушенням було зроблено ще в 1963 р. Buehler і співавт., які виявили у пацієнта з синдромом Прадера-Віллі транслокацію однієї з хромосом групи D. Після впровадження методів диференційного забарвлення хромосом було визначено, що в перебудову при даному синдромі залучена хромосома 15. В подальшому було встановлено, що більшість хворих мають різні структурні аномалії хромосоми 15, в основному мікроделеції в проксимальній ділянці довгого плеча (сегменти 15q11.2-q12). У 1986 р. Butler зі співав. при аналізі хромосомного поліморфізму гомологів хромосоми 15 виявили, що інтерстиціальна делеція при цьому захворюванні завжди зачіпає хромосому батьківського походження, що було підтверджено молекулярно-генетичними методами в 1990 році. В той же час були визначені випадки з типовими ознаками синдрому Прадера-Віллі, але без будь-яких структурних порушень

хромосоми 15. Згодом було встановлено, що у таких хворих реєструється **однобатьківська дисомія** (англ. - uniparental disomy - UPD, тобто наявність двох гомологічних хромосом від одного з батьків) хромосоми 15 материнського походження.

Пояснити цитогенетичні знахідки за синдрому Прадера-Віллі вдалося за допомогою молекулярно-генетичного аналізу критичної області хромосоми 15q11.2-q12, залученої до **імпринтингу** - епігенетичного процесу, диференційно маркуючого материнські і батьківські гомологічні хромосоми, що призводить до різного фенотипового прояву мутацій у нащадків, успадкованих від матері чи батька.

У ділянках генома схильних до імпринтингу експресується тільки один з двох алелів - батьківський чи материнський (моноалельна експресія генів), а другий алель пригнічується.

В даний час встановлено, що кандидатним геном даного синдрому є ген поліпептиду-N малого ядерного рибонуклепротеїну (англ. - Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N - SNRPN), який експресується тільки на батьківській хромосомі 15, але не функціонує на материнському гомолозі. Порушення роботи єдиного функціонуючого гена на батьківській хромосомі 15 внаслідок делеції або перебудови критичної області, що містить ген SNRPN, призводить до розвитку синдрому Прадера-Віллі.

У разі однобатьківської делеції хромосоми 15 материнського походження, обидві копії материнських генів являються неактивними, тобто має місце функціональна нулесомія по гену SNRPN, що також призводить до розвитку даного захворювання.

Основні діагностичні ознаки захворювання: слабе ворущіння плода в II триместрі вагітності, м'язова гіпотонія, розумова відсталість, нанізм, ожиріння, гіпогонадотропний гіпогонадізм, маленькі дистальні відділи кінцівок (акромікрія). Відзначаються також гіпопігментація, страбізм, мікрогнатія, доліхоцефалія, мигдалеподібний розріз очей, крипторхізм і гіпоплазія статевого члена у хлопчиків.

Синдром Енгельмана (синдром "щасливої ляльки"). Описано в 1965 р. *Цитогенетична характеристика.* Більшість хворих мають мікрodelецію 15q11-q13, але ця delеція завжди материнського походження. Виявлені також пацієнти з типовим синдромом Енгельмана без мікрodelецію, у яких виявляється однобатьківська дисомія хромосоми 15 батьківського походження.

Основними ознаками захворювання є: незвичайний і частий сміх, специфічне обличчя з гримасою посмішки, повторювані лялькові стереотипні рухи, відсутність мовлення. Є виражена розумова відсталість.

Ретинобластома. Хворі на ретинобластому, злоякісну пухлину сітківки ока, становлять 0,6-0,8 % від числа усіх хворих з онкозахворюваннями. Це перша пухлина, для якої встановлено зв'язок з хромосомною патологією.

Цитогенетично при даному захворюванні виявляється мікрodelеція хромосоми 13 q14. Крім мікрodelецію зустрічаються мозаїчні форми і транслокаційні варіанти. Описано декілька випадків транслокації сегмента хромосоми 13 на X-хромосому. В 1986 році в критичному сегменті 13q14 виявлений ген-супресор пухлини RB1, який є першим антионкогеном, виявленим у людини.

Основні діагностичні ознаки. Захворювання зазвичай починається у віці близько 1,5 років і першими ознаками є світіння зіниць, млява реакція зіниці на світло, а потім і зниження зору аж до сліпоти. Ускладненнями ретинобластоми є відшарування сітківки, вторинна глаукома.

Синдром Вільямса (обличчя "ельфа"). Описаний в 1961 році. Популяційна частота 1:10000. *Цитогенетична характеристика.* Виділяють 2 групи хворих з даними синдромом:

- класична форма з delецією 7q11, яка виявляється в 96% випадків;
- більш рідкісна форма, при якій виявляються (в основному, за допомогою молекулярно-цитогенетичних методів дослідження) delецію в хромосомах 11 і 22 - 11q13-q14 та 22q-.

Основними діагностичними ознаками синдрому є: незвичайне обличчя, епікант, набряклість вік, короткий ніс з відкритими вперед ніздрями, повні щоки, мікрогенія. Патологія внутрішніх органів включає надклапанний стеноз аорти, дефекти перегородок серця, стеноз легеневої артерії. Розумова відсталість різного ступеня, різноманітні психічні порушення, низький інтелект. З віком захворювання приймає важку форму.

Моногенні захворювання, що супроводжуються хромосомною нестабільністю

Раніше вважалося, що ДНК хромосом еукаріот досить стабільна і змінюється лише в результаті досить рідких мутаційних подій. Однак на теперішній час встановлені нові типи мінливості геному, що відрізняються за частотою і механізмам від звичайного мутаційного процесу. Одним з проявів нестабільності генома на клітинному рівні є хромосомна нестабільність.

В хромосомах людини є досить велика кількість сайт - специфічних ламких ділянок, експресія яких істотно залежить від умов культивування клітин і молекулярна природа яких тільки зараз починає з'ясовуватись.

Синдром ламкої Х-хромосоми (Синдром Мартіна-Белл)

Як правило, розриви хромосом або пробіли хроматид, що виникають з підвищеною частотою в тих чи інших конкретних хромосомних сегментах (так звані ламкі ділянки або фрагільні сайти хромосом), не пов'язані з будь-якими захворюваннями. Проте, у 1968 р. С.Lubs описав специфічний цитогенетичний маркер у хворих з розумовою відсталістю. Була визначена наявність специфічного цитогенетичного маркера, що проявлявся в окремих клітинах розривами хроматид в дистальній частині довгого плеча Х-хромосоми в сегменті Хq27.3. Пізніше було з'ясовано, що перший клінічний опис сім'ї з синдромом, в якому розумова відсталість була провідною клінічною ознакою, був описаний ще в 1943 р. англійськими лікарями Р. Martin і J. Bell.

Синдром ламкої Х-хромосоми цікавий своїм незвичним спадкуванням та досить високою популяційною частотою (1 на 1500-3000). Незвичайність спадкування полягає в тому, що тільки 80% чоловіків, носіїв мутантного гена, мають клінічні ознаки захворювання, а решта 20% як клінічно, так і цитогенетичні нормальні, хоча після передачі мутації своїм дочкам можуть мати уражених онуків. Цих чоловіків називають трансмітерами, тобто передавачами не експресованого мутантного гена, який стає експресуючими в наступних поколіннях.

Цитогенетична характеристика Синдром Мартіна-Белл характеризується ламкою (фрагільної) Х-хромосомою в сегменті Xq27.3, яка виявляється в спеціальних умовах культивування клітин в середовищі з дефіцитом фолієвої кислоти. Фрагільний сайт при цьому синдромі отримав позначення FRAXA. Крім ламкого сайту FRAXA в дистальній частині довгого плеча Х-хромосоми в даний час ідентифіковано ще 3 інших ламких ділянки - FRAXE, FRAXF і RFAXD. Перші дві пов'язані з аномаліями розвитку, а ламка ділянка RFAXD, розташована поблизу сайту FRAXA, виявляється з частотою 1-2% у нормальних осіб і може призводити до хибно-позитивної діагностики синдрому.

Основними діагностичними ознаками захворювання є: розумова відсталість, прогнатизм, широке обличчя з рисами акромегалії, великі відстовбурчені вуха, макроорхідізм в постпубертатном періоді, аутизм, гіперкінези, погана концентрація уваги, дефекти мови, більш виражені у дітей. Відзначаються також аномалії сполучної тканини з гіпер розтяжністю суглобів і пролапсом мітрального клапана. Відносно повний спектр клінічних ознак мають тільки 60% чоловіків з фрагільною Х-хромосомою, 10% хворих не мають лицевих аномалій, 10% мають лише розумову відсталість без інших ознак, а 30% хворих не мають макроорхідізма.

Молекулярний механізм мутації став зрозумілий в 1991 році, коли був охарактеризований ген, відповідальний за розвиток даного захворювання. Ген отримав назву FMR1 (англ. - Fragile site Mental Retardation 1 - ламка ділянка хромосоми, пов'язана з розвитком розумової відсталості 1 типу).

Було встановлено, що в основі клінічних проявів і цитогенетичної нестабільності в локусі Xq27.3 лежить багаторазове збільшення в першому екзоні гена FMR-1 простого тринуклеотидного повтору CGG. У нормальних людей число цих повторів в X-хромосомі коливається від 5 до 52, а у хворих їх кількість становить 200 і більше. Таке явище різкої, стрибкоподібної зміни числа CGG-повторів у хворих отримало назву експансії числа тринуклеотидних повторів. Показано, що експансія CGG-повторів істотно залежить від статі нащадка, вона помітно збільшена при передачі мутації від матері до сина. Важливо відзначити, що експансія нуклеотидних повторів є постзиготною подією і виникає на дуже ранніх стадіях ембріогенезу

7.3 Пренатальна діагностика вродженої та спадкової патології

Виявлення хромосомної патології потребує застосування клініко-генеалогічних, цитогенетичних, молекулярно-цитогенетичних (FISH) технологій та методів ДНК-аналізу.

Клініко-генеалогічний метод

Малі аномалії розвитку (МАР) або, так звані, *стигми дизембріогенезу* - це стійкі морфологічні зміни органів, що не супроводжуються порушенням їхньої функції. Висловлюється припущення, що малі аномалії - це показники порушення морфогенезу, змін ембріонального диференціювання, що відбуваються під впливом як генетичних, так й екзогенних чинників. У той же час малі аномалії розвитку виявляються й у практично здорових дітей та дорослих. За даними деяких авторів у популяції стигми дизембріогенезу реєструються в 17,3 % дітей, їхня кількість коливається від 0 до 6 (в середньому $2,3 \pm 0,08$). При цьому частіше зустрічаються такі як епікант, клинодактилія, прирощені мочки вух, плескате перенісся, деформація вушних раковин, високе піднебіння.

МАР складають близько половини усіх морфологічних ознак, що використовують в діагностиці множинних вроджених вад розвитку людини.

Умовно малі аномалії розвитку можна розділити на такі групи:

1. Альтернативні
2. Вимірювальні
3. Описові

Крім того, в залежності від локалізації, розрізняють:

- аномалії розвитку шкіри, її придатків та м'язів;
- аномалії розвитку голови та шиї;
- скелетні дизморфії (тулуб, верхні і нижні кінцівки);
- аномалії розвитку внутрішніх органів та систем;

Нижче наведено перелік основних МАР та вад розвитку, сгрупованих в залежності від локалізації.

Малі аномалії та вади шкіри та її придатків, м'язів

Шкіра	Ш	Альбінізм, меланізм, вітіліго, іхтіоз, гіперкератоз, сухість, шелушіння, невус, МПН, гемангіома, папілома, ліпома, фіброма, киста, рубці, склеродермія, аплазія, гіперрозтяжимість
Нігті	Ні	гіпоплазія, гіперплазія, аноніхія, “часове скло”, оніходистрофія
Волосся	Во	алопеція, гіпотрихоз, гіпертрихоз, гірсутизм, ріст волосся на чолі, низький ріст волосся на потилиці, ріст волосся на потилиці “кісками”, клиноподібний ріст волосся
ПЖК	П	надлишок, нестача, лімфоїдний набряк, склеродерма
М'язи	М'	гіпотонія, гіпертонус, гіпотрофія, атрофія, розходження прямих м'язів живота, функціональний дефект (скорочення)

Малі аномалії та вади розвитку голови та шиї

Черепа	Че	скафоцефалія, брахіцефалія, тригоноцефалія, оксіцефалія, мікроцефалія, гідроцефалія, сплюснена потилиця
Обличчя	Об	асиметрія обличчя, подовжене, розщелина верхньої губи, розщелина піднебіння, коса розщелина обличчя (колобома), макростомія, мікростомія, вуздечка верхньої губи, мікрогнатія, макрогнатія, короткий фільтр, довгий фільтр, плаский фільтр, широке перенісся, запале перенісся, клювоподібний, сплюснення крил носа, вивернуті ніздрі, короткий, довгий, гіпоплазія крил носа, викривлення носової перетинки, виступаюче перенісся, колобома крила носа
Важ	Ва	язик: макрогლოსія, мікрогლოსія, укорочення вуздечки

ди порожни ни рота та глотки	язика, дольчастий язик, атрофія сосочків язика, зуби: мілка порожнина рота, діастема, адентія, мікродентія, неправильне положення, неправильний ріст, неправильний прикус, дистрофія емалі, тени, неправильна форма зубів піднебіння: пласке, високе, готичне
Ву шні ра ковини	асиметрія, низьке розташування, коловушні папіломи, кругла вушна раковина, прирощена мочка, гіпоплазія мочок, гіпоплазія вушних раковин, “вухо сатира”, відстовбурчені вушні раковини, насічка на вушній раковині, дефекти зовнішнього слухового проходу
Об ласть очей та очне яблуко	монголоїдний розріз, антимонг.розріз, колобома, катаракта, гетерохромія райдужки, анірідія, мікрофтальм, екзофтальм, енофтальм, ністагм, міопія, альбінізм, меланоз, гіпертелоризм зінниць, птоз, епікант, телекант, ентропійон, гіпотелоризм зінниць косоокість
Бр ови	синофріз
Ш ия	коротка шия, кривошия, крилоподібні складки, кісти і свищі, складчата шия

Малі аномалії та вади розвитку опорно-рухового апарату

Хр ебет	кіфоз, лордоз, сколіоз, пласка спина, аномалії лопатки
Гр удна клітина	діжкоподібна, вузька та довга, кілеподібна, воронкоподібна, пласка грудна клітина, гіпертелоризм сосків, зміна кількості сосків, аномалії ребер, аномалії ключиці
Та з	дисплазія (вивих) кульшових суглобів, інфантильний таз
Ве рхні кінцівки	клинодактилія 5 пальця, порушення пальцевого ряду, полідактилія, синдактилія, брахідактилія, камподактилія, арахнодактилія, потовщення дистальних фаланг, відсутність пальців (фаланг), хондродисплазія, артрогрипоз, гіперрухливість
Ни жні кінцівки	сандалеподібна щілина на ступнях, клишоногість, стопа-качалка, плоскоступість, дорзальна флексія 1 пальця, артрогрипоз, кампомелія гіперрухливість

Малі аномалії та вади розвитку внутрішніх органів та систем

Се рцево- судинна система	декстракардія, дефекти межпередсердної перетинки, шлуночків, тетрада Фалло, незарощення Боталової протоки, коарктація аорти, стеноз легеневої артерії, стеноз аорти, правобічна дуга аорти, ПМК, ПТК
Ор гани	хронічні захворювання легень, аномалії трахеї, зміна вітвлення бронхів, аномалії легень, полікістоз, вродженна

дихання	емфізема
Ш лунково- кишковий тракт	атрезія стравоходу, пілоростеноз, атрезія кишечника, атрезія анального отвору, дивертикул Меккеля, доліхосигма, аномалія Гіршпрунга, перегин жовчного міхура, перетинка жовчного міхура, вигин жовчного міхура, кістофіброз підшлункової залози
Сечовивідна система	полікістоз нирок, підковоподібна нирка, подвоєння нирок та сечоводів, аренія однобічна, гіпоспадія, ектопія нирок та сечоводів, гіпоплазія
Статеві органи	крипторхізм, макроорхідизм, макрогенітосомія, гіпоплазія статевих губ, фімоз, гіпогонадизм, аномалії матки, гіпертрофія клітора, аномалії піхви
Грижі	пахова, пупкова, діафрагмальна

При встановленні генетичної інформації ведеться короткий запис щодо кожного члена роду з фіксацією ступеня його спорідненості з пробандом. В подальшому, використовуючи систему умовних позначень (Рис.), komponують графічне зображення родоводу.

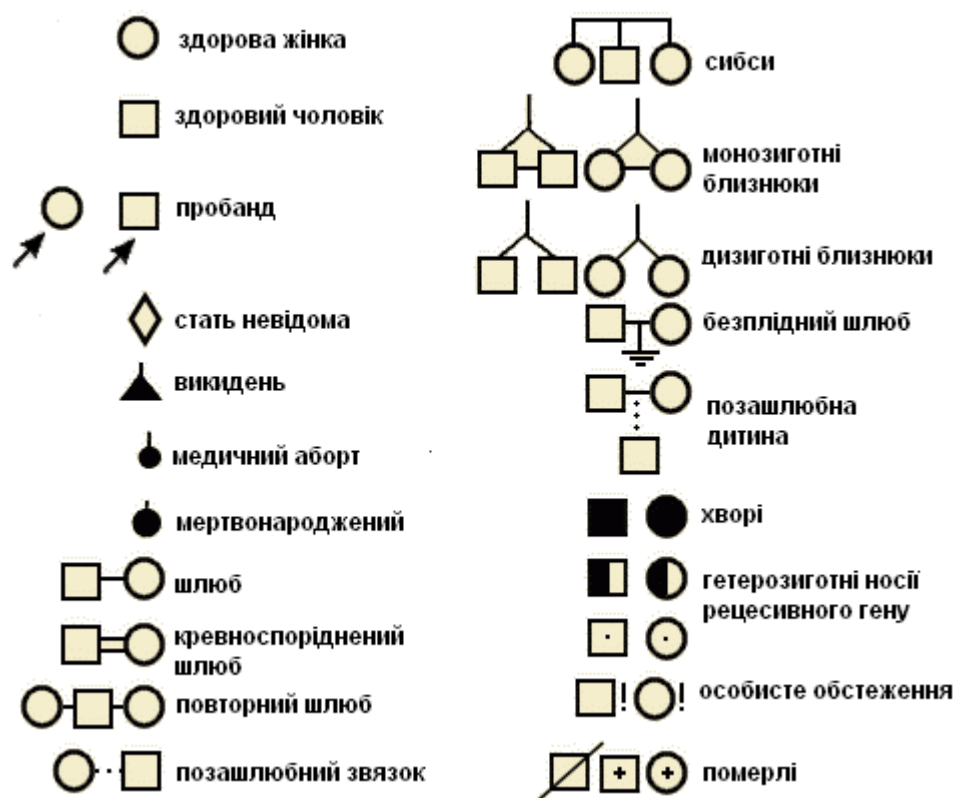


Рисунок . Система умовних позначень для складання родоводу

Графічне зображення родоводу може бути вертикально-горизонтальним або у вигляді кола (у випадку значної кількості зібраної інформації) (Рис.). Схема родоводу супроводжується описом позначень під малюнком, який називається легендою.

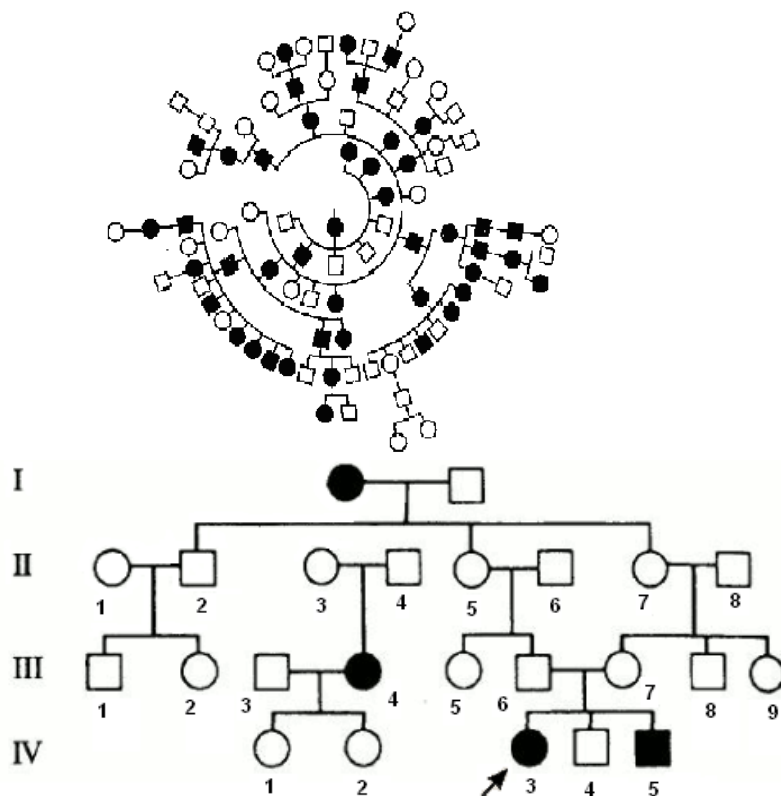


Рисунок . Типи графічного зображення родоводу.

При складанні родоводу покоління позначаються римськими цифрами зверху вниз або знизу вгору (зліва від родоводу). Нашадки одного покоління (сибси) розташовується в одному горизонтальному ряду за порядком народження (зліва направо), починаючи зі старшого. У межах одного покоління кожний член позначається арабськими цифрами, у тому числі чоловіки і жінки сибсів. Кожний член родоводу може бути позначений відповідним шифром, наприклад II—5, III—7.

Після складання родоводу починається другий етап — клініко-генеалогічний аналіз, який дозволяє визначити спадковий характер захворювання, тип його успадковування, прогноз для нащадків та ризик повторного народження дитини з даною патологією.

Застосування клініко-генеалогічного методу передбачає також ретельне клінічне, лабораторне та інструментальне обстеження, бажано, усієї родини. За необхідності призначаються додаткові діагностичні заходи, визначається прогноз перебігу захворювання та його можливі ускладнення, обирається тактика лікування.

Цитогенетичний метод

Цитогенетичний метод — це метод аналізу хромосом, що ґрунтується на мікроскопічному дослідженні їх структури і кількості.

Мікроскопічні методи дослідження почали використовувати для аналізу хромосом людини в кінці XIX століття. А вже у 1903 році В.Саттоном було введено термін «цитогенетика». В 1960 році Р. Мурхед та співавт. розробили метод культивування лімфоцитів периферичної крові для отримання метафазних хромосом людини. Проте остаточно ідентифікувати усі хромосоми людини дозволили методи диференційного фарбування хромосом, що були розроблені у 1969 - 1970 роках.

Для виявлення хромосомної аберації за допомогою диференційного фарбування структурна перебудова має охоплювати ділянку ДНК довжиною більше за 3 млн. нуклеотидів.

В той же час, для визначення порушень в хромосомному апараті, пов'язаних зі зміною числа X-хромосом, часто застосовують простий, но досить інформативний **метод дослідження статевого хроматину**. В ядрах клітин жіночого організму міститься певна кількість ядерного хроматину (генетично неактивна X-хромосома), який розташований біля ядерної мембрани і називається статевим хроматином, X-хроматином або "тілцем Бара". Як уже зазначалось вище, в клітинах жінок одна X-хромосома інактивована. Це випадковий процес і генетично пасивною може бути чи батьківська, чи материнська X-хромосома. Цей процес випадкової інактивації називають лайонізацією X-хромосоми на честь доктора медицини Мері Ф. Лайон, яка однією з перших висунула цю гіпотезу. Найзручнішими для дослідження кількості тілця Бара є ядра слизової оболонки щок. В нормі тілця статевого хроматину реєструються в 30—60 % ядер клітин здорової жінки. У чоловіків статевого хроматину немає. Відсутні тілця Бара і у жінок з синдромом Шерешевского-Тернера.

Проте, діагноз вважається встановленим тільки після проведення аналізу каріотипу та визначення хромосомних аномалій. Метод диференційного фарбування хромосом забезпечує ідентифікацію кожної хромосоми людини, що робить можливим його використання для дослідження багатьох типів вроджених аномалій, а також визначення хромосомних аберацій за злоякісної трансформації клітин.

Показання для проведення хромосомного аналізу та каріотипування:

- множинні вади розвитку;
- наявна патологія статевого хроматину;
- затримка фізичного та розумового розвитку, особливо, в поєднанні з МАР та ВВР;
- затримка фізичного та розумового розвитку в поєднанні з порушеннями формування вторинних статевих ознак та ожирінням;
- наявність в анамнезі сімей повторних спонтанних викиднів, мертвонароджених дітей, народження дітей з ВВР або хромосомними синдромами (обстежується чоловік і жінка);
- обстеження сибсів та інших родичів дітородного віку за наявності структурної перебудови у пробанда або носійство хромосомної аномалії у його батьків;
- обстеження вагітної з імовірністю народження дитини з хромосомною патологією;
- вік вагітної 35 років і більше;
- порушення репродуктивної функції нез'ясованого генезу (безплідний шлюб, первинна аменорея та т.інш.);
- визначення негативних ефектів впливу мутагенних факторів (хімічних, радіаційних, біологічних) при виконанні професійних обов'язків;
- онкогематологічна патологія.

Проведення цитогенетичного дослідження можливе з використанням прямих і непрямих методів. При застосуванні прямих методів здійснюється аналіз клітин, що безпосередньо активно діляться в організмі (біоптат кісткового мозку, біоптат ворсинчастого хоріону). Непрямі методи передбачають культивування клітин в поживному середовищі протягом певного часу, що забезпечує значну кількість метафаз. Непрямим методом досліджують лімфоцити периферичної крові, клітини амніотичної рідини,

фібробласти шкіри, клітини, отримані при біопсії хоріона, клітини з тканин абортіваних ембріонів та ін.

Методика приготування препаратів про- та метафазних хромосом передбачає такі етапи:

1. Культивування в поживному середовищі клітинного субстрату протягом певного часу (лімфоцити периферичної крові 48-72 год.).
2. Обробка клітин культури розчином колхіцину або колцеміду (відбувається блокування мітозу на стадії метафази).
3. Обробка клітин гіпотонічним розчином різних за складом та концентрацією солей (найчастіше розчин 0,55 М КСl) з метою відособлення хромосом. Гіпотонічна обробка руйнує ядерну оболонку й міжхромосомні зв'язки та сприяє вільному переміщенню хромосом в цитоплазмі.
4. Обробка клітин фіксуючою сумішшю метилового (етилового) спирту та крижаної оцтової кислоти у співвідношенні 3:1.
5. Приготування безпосередньо препаратів хромосом за допомогою нанесення на предметне скло осаду з зафіксованими клітинами.

Препарати зберігаються при кімнатній температурі або в термостаті при температурі 37 С. Забарвлення препаратів проводиться не раніше ніж за добу після приготування препаратів.

Заключний етап цитогенетичного дослідження - власне аналіз перепарату, який проводиться з використанням світлового мікроскопу, а при застосуванні Q-метода - люмінісцентного мікроскопу.

Методи забарвлення хромосом застосовують в залежності від того, який тип перебудов необхідно визначити.

Найбільш простий метод, який використовують для визначення кількісних змін хромосом, це класичний метод рутинного (суцільного) фарбування хромосом. Цей метод, за якого барвником Гімзи рівномірно профарбовується уся довжина хромосоми, з успіхом застосовувався до 70-х минулого сторіччя та дозволив з'ясувати етіологію більшості хромосомних синдромів, що характеризуються зміною кількості хромосом. В наш час рутинний метод використовують переважно для детекції кількісних аномалій каріотипу, для біологічної дозиметрії, а також для визначення специфічного сайту ламкості фрагільної X-хромосоми.

Найбільш широко вживаними методами аналізу хромосом є різні модифікації **G-методу диференційного** забарвлення хромосом (G-banding) через його високу інформативність стосовно кількісних або структурних аномалій хромосом. Застосування стандартних методів з використанням диференційного забарвлення препаратів хромосом передбачають аналіз препаратів хромосом, що містять не менше 200-400 сегментів на гаплоїдний набір.

Для виявлення прихованих делецій або уточнення складних хромосомних перебудов використовують високочутливий метод аналізу прометафазних та профазних препаратів хромосом на рівні від 550 до 800 і більше сегментів на гаплоїдний набір. Така висока розподільна здатність хромосом досягається синхронізацією культури клітин за допомогою метотрексату та 5-бромдезоксимуридину або тимідину. Особливо інформативні ці методи при цілеспрямованому дослідженні індивідуальних хромосом та їх сегментів, аномалії яких супроводжуються характерною клінічною симптоматикою.

Існують різні методики G-методу диференційного забарвлення хромосом, проте, зазвичай, використовують GTG-метод. В основі методу лежить властивість хромосом набувати специфічного забарвлення, що

формується за рахунок світлих і темних смуг по усій довжині після обробки трипсином та подальшим фарбуванням барвником Гімзи.

Дія трипсину забезпечує перехід регулярної спіралеподібної структури в нерегулярну сегментацію, що перешкоджає сприйняттю барвника Гімзи в G - негативних ділянках та посилює його в G - позитивних сегментах хромосом. Розподіл темних та світлих смуг специфічний для кожної пари хромосом. Темні смуги (G - смуги, G - бенди) формуються в місцях локалізації інтерстиціального гетерохроматину. Такі ділянки практично не містять повторів ДНК та збагачені А-Т - парами.

Препарат метафазних хромосом людини, пофарбованих за G-методом, представлено на рисунку . замінить метафазу

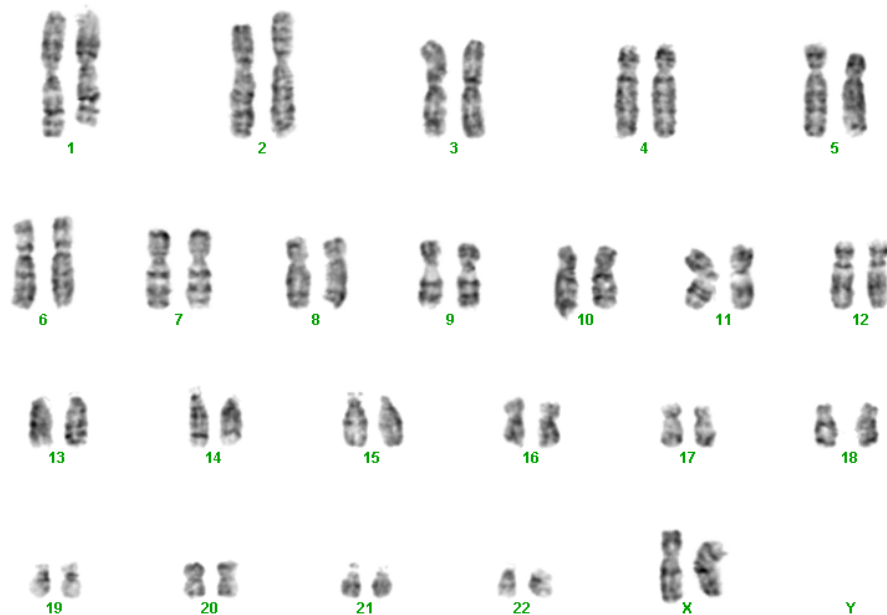


Рисунок . Препарат нормальних метафазних хромосом людини, пофарбованих за G-методом

Інші методи фарбування використовуються рідше унаслідок їх складності або вузької специфічності.

R - метод дозволяє отримати поперечну смугастість хромосом, зворотну такій при G - фарбуванні (тобто темним G - смугам відповідають

світлі R - смуги і навпаки). Препарати, отримані при R - фарбуванні, аналізують, використовуючи фазово - контрастну мікроскопію. При отриманні R - смугастості хромосом для передобробки використовують збалансований сольовий розчин Ерла при $t^{\circ} = 78 - 96^{\circ} \text{C}$, а також певних значеннях рН і часу експозиції, які відрізняються в різних методиках. Підготовка препаратів є складнішою, ніж при G - диференціальному фарбуванні, оскільки нерідко використовують передобробку $\text{Ba}(\text{OH})_2$ при 60°C або NaOH і формальдегідом. Якщо проводити фарбування за R - методом при більш низьких значеннях рН розчинів і з подовженням експозиції, забарвляться тільки теломірні райони (Т - метод).

Q - диференціальне фарбування хромосом отримують, використовуючи флуорохроми, які, збуджуючись синьо - фіолетовим світлом, імітують червоне, жовте і помаранчеве світіння. З барвників зазвичай використовують акрихін, але більш якісні препарати виходять при фарбуванні акрихін - іпритом або акрихін - пропилом; дещо гірший результат отримують при використанні похідного бібензімідазола Hoechst 33258. Сильно флуоресціюючі ділянки хромосом відповідають темним G - дискам; відмінність полягає в тому, що вторинні перетяжки хромосом 1 і 16 забарвлюються тільки за G - методом, а інтенсивність забарвлення сегментів хромосом 3, 4, 13 - 15, 21 - 22 і Y слабкіша при використанні Q - методу.

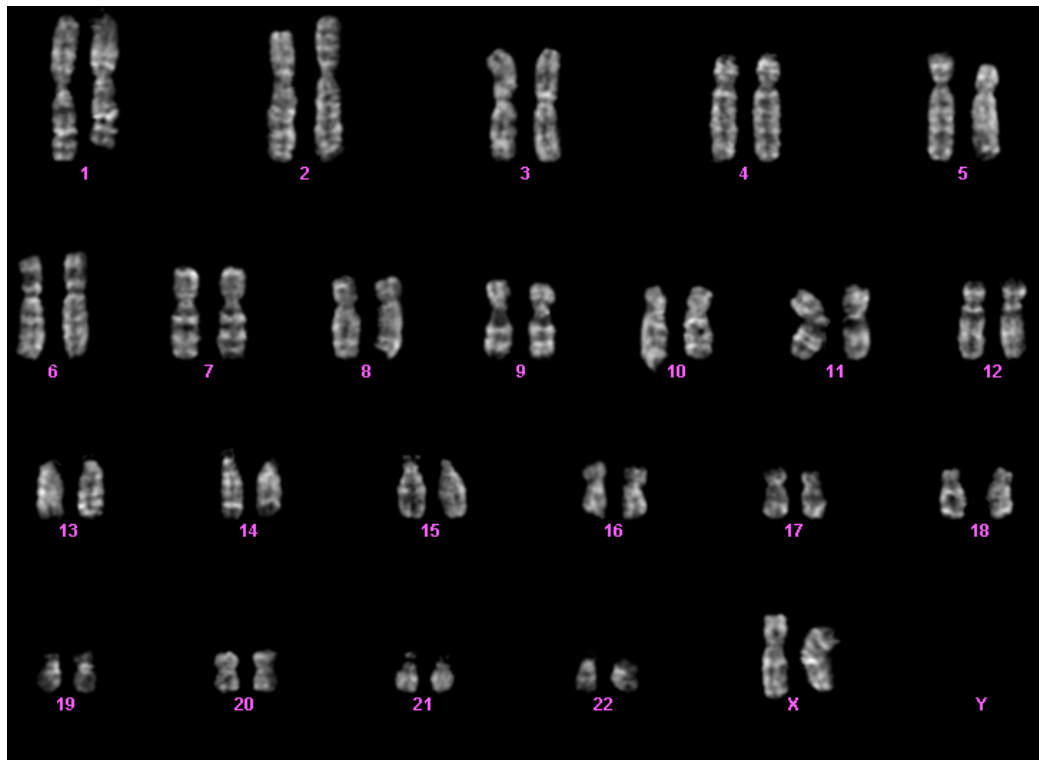


Рисунок Нормальний жіночий каріотип 46,XX. Q - диференціальне фарбування.

С-метод диференціального забарвлення. Якщо цитогенетичний препарат помістити ненадовго в луг, а потім на тривалий час залишити в розчині SSC при $t^{\circ} = 60 - 65^{\circ} \text{C}$, забарвиться тільки структурний хроматин перицентромерних районів. Цей підхід, що отримав назву **С - методу**, використовується для виявлення перицентричних інверсій. С-метод диференціального забарвлення дозволяє аналізувати лише деякі райони хромосом - ділянки так званого конститутивного гетерохроматину, локалізованого в перицентромерних областях довгих плечей хромосом 1, 9 та 16, в довгому плечі Y-хромосоми, а також у коротких плечах акроцентричних хромосом.

У випадках складних хромосомних перебудов, прихованих делецій з клінічною симптоматикою певного синдрому, пов'язаного з мікроструктурними аномаліями хромосом, наявності маркерних хромосом, необхідно додатково проводити аналіз каріотипу із залученням молекулярно-цитогенетичних методів (флюоресцентна *in situ* гібридизація, FISH).

Метод молекулярної **флуоресцентної гібридизації in situ (FISH)** заснований на здатності хромосомної ДНК утворювати стійкі гібридні молекули з відомими за нуклеотидним складом ДНК (РНК та ін) - пробами безпосередньо на препаратах фіксованих клітин, хромосом та інтерфазних ядер з подальшим виявленням результату гібридизації по мітці – флуоресцентному сигналу в очікуваному місці .

Застосування цього методу дозволило перейти від вивчення морфології хромосом до аналізу послідовностей ДНК, що входять до їх складу.

У якості досліджуваного матеріалу можна використовувати не тільки цитогенетичні препарати, але і стандартно пофарбовані мазки крові, кісткового мозку або відбитки лімфовузлів, а також архівний гістологічний матеріал, який зберігається у вигляді парафінових блоків.

Вперше in situ гібридизація була описана у 1969 році, коли у якості мітки був використаний радіоактивний ³²P. В подальшому розробка нерадіоактивних систем маркування ДНК-зондів зробила цей метод безпечним та досить простим у виконанні.

В якості ДНК-проби (ДНК-зонда) можуть бути відносно невеликі фрагменти ДНК, компліментарні тій послідовності ДНК, що аналізується. Розмір зондів може варіювати від 90-100 тис. п.н. до декількох мільйонів п.н., тому в якості мішені можуть бути не тільки окремі хромосомні ділянки, але й уся хромосома..

Ця нова методика дослідження каріотипу дає можливість об'єктивно оцінити розміри клону клітин, які несуть хромосомну аберацію, оскільки для вивчення стають доступні клітинні популяції уцілому. Метод флуоресцентної in situ гібридизації (FISH) був розроблений для виявлення конкретних послідовностей ДНК безпосередньо на цитологічних препаратах. Він дозволив перейти від вивчення морфології хромосом до аналізу послідовностей ДНК. Відповідно і зміни, що виявляються, є генетичними

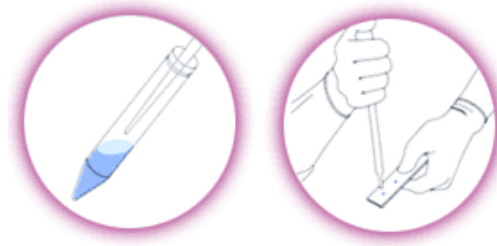
(етіопатогенетичними), а не морфологічними (фенотиповими) й відносяться до більш тонкого рівня організації спадкового матеріалу клітини.

Розрізняють прямі і непрямі методи детекції

За прямого методу ДНК-проба мітиться флуоресцентним барвником безпосередньо, за непрямого - мітиться репортерними молекулами (біотин, дігксигенін), які на препараті виявляються за допомогою інших сполук, а саме авідіном, або антитіл, що кон'юговані з флуорохромами. Незв'язана мічена ДНК відмивається, а потім проводиться детекція гібридизованого ДНК-зонда з використанням флуоресцентного мікроскопа.

Власне дослідження здійснюється в декілька етапів:

1. Отримання препаратів та їх передпідготовка (вибір ділянки для гібридизації з достатньою кількістю ядер або метафазних пластинок, які повинні розташовуватись ізольовано, без утворення конгломератів)

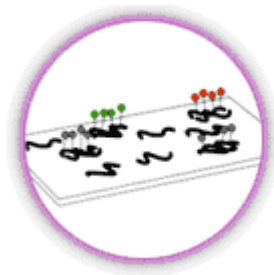


2. Попередня обробка зразка та дегідратація.

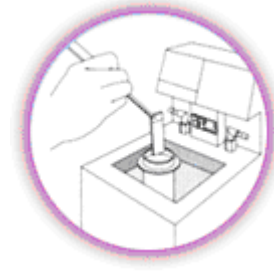


На цьому етапі здійснюється видалення залишків цитоплазматичних білків (обробка протеазами 0,005-0,01% розчин пепсину в низькомолярній соляній кислоті) та надлишку води (послідовне проведення зразків в етанолі), що дозволить краще зберегти структуру хроматину в ядрах та метафазах.

3. Денатурація (нагрівання препарату та молекулярного зонду в присутності формаміду)



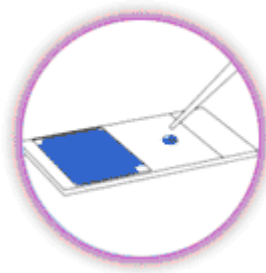
Коденатурація



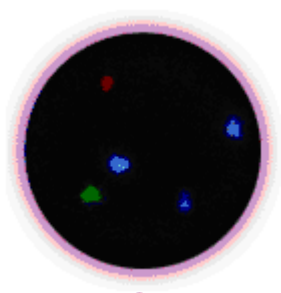
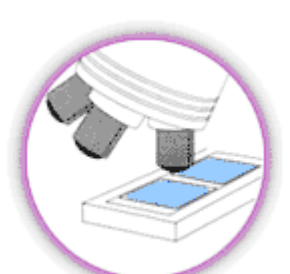
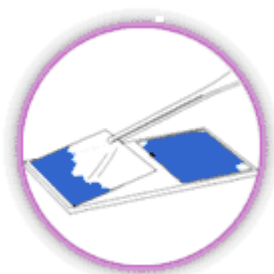
Зразок у 70%

розчині формаміду

4. Гібридизація з ДНК-пробою (проводиться в зволоженій камері за температури 37°C)



5. Детекція ДНК-зонду при проведенні мікроскопічного дослідження.



Цей етап передбачає післягібридаційну обробку зразка в сольових розчинах з подальшим контрастуванням (DAPI, PI антифейд, векташилд – в залежності від зондів, що застосовуються)

На сьогодні можна виділити декілька основних підходів, які широко застосовуються у сучасній молекулярній цитогенетиці:

- Ідентифікація матеріалу протяжних хромосомних районів та цілих хромосом;
- Детекція у певному районі конкретної послідовності ДНК;
- Аналіз порушення балансу окремих хромосомних районів;

Основні сфери застосування флуоресцентної *in situ* гібридизації (FISH):

- Клінічна цитогенетика
- Пренатальна діагностика
- Доімплантаційна діагностика
- Онкологія, онкогенетика
- Гематологія

Безперечно, як й усі інші методи діагностики, флуоресцентна *in situ* гібридизація (FISH) має свої обмеження:

- Не дає цілковитої картини каріотипу
- Виникають складності трактування результатів (хибнопозитивні сигнали, різні типи й чутливість зондів)
- Специфічність ДНК-зондів для кожної хромосомної аномалії

Враховуючи усі вище наведені обмеження методу, його високу вартість та трудомісткість, важливо дуже чітко дотримуватись показань для проведення FISH-діагностики, а саме:

1. Нормальний каріотип за наявності специфічної клінічної картини.
2. Комплексний каріотип з великою кількістю перебудов, в якому може бути замаскована аномалія, що не виявляється стандартними цитогенетичними методами (СЦМ).
3. Підозра на криптичну (мікроструктурну) аномалію, що не виявляється СЦМ.
4. Наявність специфічної клінічної картини, що змушує запідозрити захворювання, яке супроводжується певною молекулярно-цитогенетичною аномалією.
5. Замала клітинність кісткового мозку, відсутність клітин здатних до поділу або погана морфологія хромосом (дослідження пухлин з низьким мітотичним індексом).
6. Необхідність детекції нечисельних клітинних клонів з хромосомними абераціями, які не були визначені стандартними методами аналізу хромосом або визначені в одній клітині (детекція мінімальної залишкової хвороби, ранніх рецидивів).

У відповідності до своєї діагностичної характеристики ДНК-проби (зонди), що широко використовуються в цитогенетичній практиці, розподіляються на декілька груп.

Центромерні зонди (CEP – Centromere Enumeration Probe)

ДНК-зонди до **центромерних ділянок хромосом (centromeric probe, CEP)** призначені для ідентифікації центромерних регіонів хромосом та визначення кількісних порушень каріотипу. Це хромосомоспецифічні ДНК-проби, що представлені послідовностями тандемних альфа- и бета - сателітних повторів. Ці повтори локалізовані переважно в центромерних або прицентромерних гетерохроматинових ділянках хромосом, цілком або відносно специфічні до цих районів індивідуальних хромосом.

Локус- специфічні зонди (LSI – LocusSpecificIdentifier)

Локус-специфічні ДНК-зонди (Locusspecific identifiers)

гібридизуються з унікальними (неповторними) послідовностями ДНК. Локус - специфічні проби (LSI-проби) специфічні для певних хромосомних ділянок, представлених однією копією на гаплоїдний генотип. Їх розміри можуть варіювати в широких межах - від кількох тисяч до 2 млн. і більше пар нуклеотидів. Застосовуються для виявлення діагностично і прогностично значущих хромосомних аномалій при різних патологічних станах. Особливо показано застосування цих зондів для точної ідентифікації структурних перебудов - сайтів розривів хромосом при транслокації, інверсії, делеціях, інсерціях та ін.

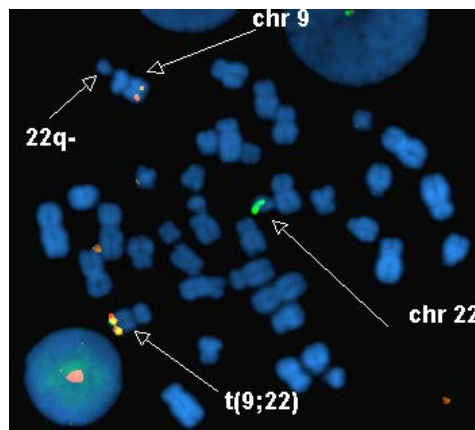


Рисунок Картина гібридизації з локуспецифічним зондом LSI BCR/ABL Dual color, Dual Fusion

Теломерні зонди (Tel – telomere specific)

ДНК-зонди до теломерних ділянок хромосом (telomeric probe) призначені для виявлення делецій та перебудов кінцевих ділянок плечей хромосом. Кожен з цих теломерних зондів покриває локус на кінці хромосоми довжиною 300 kb. Виявляються навіть дуже малі перебудови. Про їхнє значення свідчать деякі роботи, в яких вони застосовувалися при

обстеженні хворих з розумовою відсталістю. Результати цих та інших досліджень показують істотну роль т.зв. теломерних перебудов (мікроделеції, мікротранслокації) в генезі недиференційованої розумової відсталості (РВ), частота яких сягає більше 10%.

FISH є стандартом в діагностиці мікроделецій, оскільки дані порушення в більшості випадків не можна виявити за допомогою традиційної цитогенетики.

Мікроделеційні синдроми - це генетичні порушення розвитку, пов'язані з невеликими хромосомними делеціями, що зачіпають один або кілька генів.

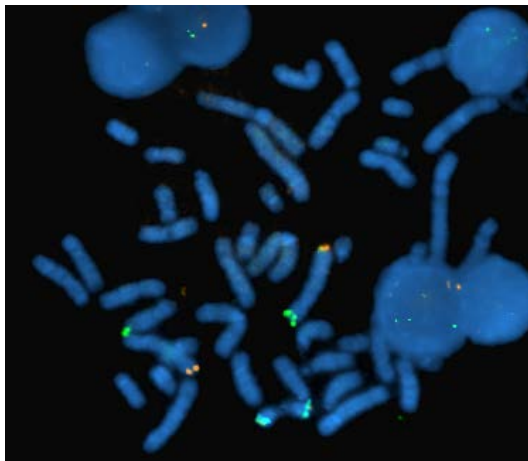


Рисунок Картина гібридизації хромосом з теломерними зондами

Цільно-хромосомні зонди або зонди повного фарбування хромосом (WCP-Whole-Chromosome-Painting)

Цільно-хромосомні зонди або зонди повного фарбування хромосом WCP-проби - зонди для повного фарбування хромосом представляють собою набір унікальних послідовностей ДНК, рівномірно розподілених уздовж всієї довжини певної хромосоми. Такі зонди (в літературі введено інша їх назва - painting-проби) використовуються тільки на метафазних хромосомах і їх застосування високоефективно в ідентифікації маркерних

хромосом і складних структурних перебудов із залученням декількох хромосом.

Якщо живі клітини недоступні або вони не діляться в культурі, тоді хромосомний аналіз провести неможливо, що нерідко трапляється в онкоцитогенетичній практиці. Для таких ситуацій відносно недавно запропонований альтернативний підхід, не заснований на використанні метафазних хромосом пухлинних клітин. Запропонований метод - **порівняльна геномна гібридизація (CGH)**, виявляє профіль змін кількості копій кожного локусу (втрата хромосом, делеції, інсерції, ампліфікації) в зразку пухлинної тканини і дозволяє картирувати ці зміни на нормальних метафазних хромосомах, тобто метод заснований на гібридизації *in situ* диференційно мічених зразків тотальної пухлинної ДНК пацієнта і референсної ДНК здорової особи.

Отже, існуючі молекулярно-цитогенетичні підходи і методи в клінічній цитогенетиці вирішують проблему точної ідентифікації будь-яких варіантів хромосомних порушень, дозволяють поставити точний генетичний діагноз з виявленням конкретної причини захворювання, що надзвичайно важливо для ухвалення правильного рішення при допологовому обстеженні плоду, а також при медико-генетичному консультуванні пробанда та членів його родини. Таким чином, сучасні генетичні технології дозволяють провести комплексне диференційно-діагностичне обстеження, яке передбачає застосування стандартного хромосомного аналізу, молекулярно-цитогенетичного та молекулярно-генетичного методів.

Питання для самоконтролю

- 1.Перелічіть загальні характеристики хромосом.
- 2.Охарактеризуйте джерела виникнення мутацій.
- 3.З якою метою використовують пренатальну діагностику?
- 4.Що таке хромосомні аберації і до чого вони призводять?
- 5.Розкажіть про медико-генетичне консультування.

6. На які питання дає відповідь цитогенетичний метод?

7. Які мутації називають геномними?

ЛІТЕРАТУРА

1. Barch M.J., Knutsen T., and Spurbeck J.L. (eds.) (1997) The AGT Cytogenetic Laboratory Manual. Raven-Lippincott, Philadelphia
2. Medical Cytogenetics/ Edited by Hon Fong L. Mark// Marcel Dekker, Inc., New York, 2000, 680C.
3. The Principles of Clinical Cytogenetics / Edited by Steven L. Gersen, Martha B. Keagle, Second Edition 2005 Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, 596 C.
4. Wojciech Gorczyca. Cytogenetics, FISH and molecular testing in hematologic malignancies /Genzyme Genetics New York, NY USA 2008 Informa UK Ltd, 319 C.
5. Raymond W. Ruddon. CANCER BIOLOGY / FOURTH EDITION 2007 by Oxford University Press, Inc., 530
6. Mitelman, F. (ed.) (1995) *ISCN (1995): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Karger, Basel.).
7. MacLaughlin and Donahoe N (2004). «Mechanisms of Disease: Sex Determination and Differentiation». New England Journal of Medicine 350: 367–378. DOI:10.1056/NEJMr022784. PMID 14736929.

8. DiNapoli L, Capel B. (2008). «SRY and the standoff in sex determination.». Molecular Endocrinology 22 (1): 1–9. DOI:10.1210/me.2007-0250. PMID 17666585.

9. Н.П.Бочков. Клиническая генетика/ учебник, М. ГЭОТАР-МЕД, 2001, 447 С.

10 Наследственные синдромы и медико-генетическое консультирование/ С.И.Козлова, Н.С.Демикова, Е.Семанова, О.Е.Блинникова //Атлас-справочник.- М.:Практика, 1996.- 416 с.

11. Геномика-медицине. Научное издание/ Под ред. Иванова В.И., Л.Л.Киселева.- М.:ИКЦ»Академкнига», 2005.-392 с .

РОЗДІЛ 8

СПАДКОВА СХИЛЬНІСТЬ ТА МУЛЬТИФАКТОРІАЛЬНА ПАТОЛОГІЯ

8.1 Генетичний поліморфізм як основа спадкової схильності

Значні успіхи в розробці новітніх біотехнологій в галузі молекулярної генетики сприяли суттєвому підвищенню рівня дослідження генетичного апарату різних біологічних систем і привели до великих успіхів в розшифровці генома людини. Зокрема всесвітні набутки дослідників з проблем медичної генетики склали основу для формування нових наукових напрямків – «фундаментальна геноміка», «генетичне різноманіття людини», «Генетична схильність і поліморфізм генів», «Етичні, правові і соціальні аспекти досліджень геному людини» та інші. Достатньо широке коло таких наукових напрямків і фактичний матеріал, отриманий дослідниками на сьогодні дозволяє віднести ХХІ сторіччя до сторіччя «генетики». Ці напрямки знайшли відображення у двох самостійних міжнародних проектах «Різномаїття геному людини» (Human Genome Diversity Projekt), який очолив американський вчений Л.Коваллі-Сфорс та проект «Зовнішнє середовище і геном людини», ("Environmental Genome Project") створеного в США за ініціативою директора Національного інституту по гігієні оточуючого середовища К.Олдена.

В наш час активно ведуться розробки даних напрямків і в Україні в інститутах Академії медичних наук. Дослідження різноманітності генома людини має фундаментальне і прикладне значення, оскільки вміщує в себе вирішення наукових проблем пов'язаних з походженням людини, виникненням рас, етногенезом, антропологією, еволюцією популяцій (фундаментальний аспект), а також направлений на визначення генетичних (генних) основ індивідуальної чутливості або резистентності індивіда до впливу шкідливих екзогенних чинників (екогенетика), лікарських препаратів (фармакогенетика), а також імуногенетично детермінованої схильності до патологічного процесу на рівні ризику виникнення конкретного захворювання (імуногенетика). Історично в ході даних досліджень виникла

уява про існування генів спадкової схильності – "predisposing genes". Що ж собою представляють "гени схильності", для чого необхідно їх вивчати, що дає таке дослідження людству? З цього приводу професор Ф. Коллінз зазначив, що кожна людина є недосконалою за своєю генетичною природою. І оскільки мутаційний процес в активній біологічній системі, якою є людина, відбувається постійно, то можуть виникнути мутації схильності до того чи іншого захворювання.

В залежності від природи провокуючого фактора їх відносять до "генів зовнішнього середовища" ("environmental genes") або до «генів-тригерів», які запускають патологічний процес за умов наявності впливу негативних екзогенних чинників.

За генетичною природою схильності до патологічного процесу розрізняють дві групи хвороб:

- ❖ **моногенні хвороби зі спадковою схильністю** характеризується тим, що схильність обумовлюється одним геном, тобто, вона пов'язана з патологічною мутацією даного гена і для свого проявлення хвороба потребує впливу зовнішнього фактора, який точно ідентифікується по відношенню до даної хвороби і який можна розглядати як специфічний;
- ❖ **полігенні хвороби зі спадковою схильністю** визначаються множинними генами, кожний з яких є скоріш нормальним, ніж патологічним тому ідентифікація цих генів є більш складною. Своє патологічне проявлення ці гени здійснюють у взаємозв'язку з комплексом факторів зовнішнього середовища. **Це мультифакторіальні захворювання.** В даному випадку відносна роль кожного з чинників зовнішнього середовища відмінна не тільки для даного захворювання але і для кожного індивідуального випадку хвороби.

Загальні відмінності свідчать про відмінність цих хвороб за генетичним аналізом і за значимістю в патології людини. **Моногенні хвороби** відносно небагаточисельні і для них застосовують методи менделівського генетичного аналізу. Їх профілактика та лікування достатньо визначені і в певних випадках є ефективними. Враховуючи важливу роль середовища в проявленні патологічного процесу, дані хвороби розглядаються як спадково обумовлені патологічні реакції на дію зовнішніх чинників. **Мультифакторіальні хвороби** складають приблизно 90% хронічних інфекційних хвороб різних систем і органів людини і їх генетичний аналіз по конкретизації внеску індивідуальних генів у співставленні з взаємодією чинників зовнішнього середовища є непростим завданням, що в свою чергу, віддзеркалюється на можливостях профілактики і ефективності лікування захворювання.

Генетично детерміновані характеристики є стійкими і мають найбільшу прогностичну цінність у клінічному аспекті щодо визначення у людини схильності до розвитку спадкових та спадковообумовлених захворювань, а також прогнозування перебігу патологічного процесу. Тобто медична наука поставила нові завдання перед «молекулярною медициною» в контексті надання допомоги пацієнту ще в доклінічному періоді з позиції профілактики, або своєчасної корекції потенційно можливої патології.

Таким чином, мова йде про спрямування практичної медицини до «предиктивної» (передбачувана), яка на відміну від лікувальної медицини має змогу передбачувати ризик виникнення того чи іншого захворювання. Концептуальну основу предиктивної медицини складають уявлення про генетичний поліморфізм. На відміну від мутацій, які призводять до патологічних змін в організмі, генетичний поліморфізм є більш нейтральним, але і він має в основі появу білкових продуктів з дещо зміненими фізико-хімічними властивостями і, відповідно, функціональною активністю.

Особливості спектрів поліморфізму різних генів в залежності від географічних умов проживання, расової (етнічної) принадності свідчать про дію природного відбору. Тобто в конкретних умовах певний поліморфізм може виступати в якості генів тригерів

(при наявності певних негативних умов індукують виникнення патологічного процесу), або протекторів (перешкоджають виникненню захворювання).

Таким чином, «гени схильності» - це мутантні гени (алелі), які є сумісними з народженням і життям в постнатальному періоді, але при дії негативних чинників середовища сприяють виникненню певного захворювання.

Саме алельні варіанти генів «схильності» складають основу таких поширених захворювань як атеросклероз, ішемічна хвороба серця (ІБС), остеопороз, діабет, бронхіальна астма, пухлини, гематологічні захворювання. Сполучення алельних генів, які задіяні в розвиток кожної хвороби отримали назву «генної сіті». **Складання генної сіті для кожного мультифакторіального захворювання, ідентифікація в ній центральних генів і генів-модифікаторів, аналіз асоціації їх поліморфізму з конкретним патологічним станом, розробка на цій основі комплексу профілактичних заходів для конкретного пацієнта і складають основу предиктивної медицини.**

На сьогодні в клінічній практиці вже застосовуються до 200 генетичних тестів ідентифікації маркерів генетичної схильності різних систем організму людини і розроблені специфічні тест-панелі для багатьох мультифакторіальних захворювань. Важливо підкреслити, що генетичне тестування проводять тільки для тих хвороб, для яких уже визначена не випадкова позитивна асоціація неповноцінного алеля з відповідною патологією і були проведені розрахунки емпіричного ризику розвитку захворювання. При цьому необхідно зазначити, що сама ідентифікація алеля, асоційованого з патологічним процесом не дає уяву про час реалізації захворювання, про важкість і перебіг патологічного процесу. Неможна також наголошувати, що особа захворіє саме цим захворюванням.

Генетичне тестування дає змогу виявити в доклінічний період саме спадкові тенденції в геномі до розвитку конкретного захворювання. Як наслідок генетичного обстеження пацієнт може отримати інформацію про існування ризику формування і реалізації конкретних захворювань і рекомендації відносно способу життя, а також лікар має можливість розробити тактику патогенетичної обґрунтованої попереджувальної терапії, наприклад, внести корекцію вродженого метаболічного дефекту. Так, призначення інгібіторів ангіотензінконвертуючого ферменту (АКФ) і антагоністів рецепторів до ангіотензину II у пацієнтів з DD-генотипом ACE (angiotensin converting enzyme), артеріальною гіпертензією і початковими ознаками ураження органів-мишенів обумовлено здібністю даних препаратів протидіяти проліферативним і пресорним ефектам ангіотензину II не тільки в судинній системі, але і в кардіоміоцитах.

Таким чином, обстеження пацієнтів відносно генетичної схильності до конкретного патологічного процесу на основі генетичного поліморфізму конкретних генетичних структур є доцільною і важливою в контексті визначення осіб групи високого ризику реалізації захворювання і має велике значення для наступного проведення своєчасної і адекватної попереджуючої терапії.

Поліморфізм генів

Поліморфною ознакою вважається моногенна ознака (Менделевська), за якою в популяції присутні не менш ніж два фенотипи (або два генотипи), при цьому жоден з них не є рідко зустрічальним (не зустрічається менш ніж 1-2%). Альтернативне поліморфізму явище – це наявність рідко зустрічальних генетичних варіантів, які умовно визначаються як моногенні ознаки (присутні в популяції менше ніж 1-2%). Історично перша поліморфна ознака була відкрита у 1900 -1901 р. Ландштейнером і Вінером при дослідженні генетичної системи еритроцитів АВО. Було визначено, що **система АВО(Н) складається з пари поліалельних генів, число яких у кожного індивіду не може бути більше двох.**

Основна речовина Н може мутувати в трьох різних напрямках

O_C, A_C, B_C :

- O_C, A_C, B_C - повна мутація;

- $A_1; A_2; A_3; A_4; A_5$ - проміжна

Наприклад, коли ми говоримо про повну мутацію відносно алеля A , ми маємо на увазі групу крові A_1 , з позицій серології, так зване A сильне (домінантний алель), коли ми говоримо про інші специфічності, зокрема про мутацію A_2 , то маємо на увазі серологічно A слабке (проміжна мутація – міnorний алель). Гени A і B є доміантними по відношенню до гену O і кодоміантними по відношенню один до одного. Ген O є рецесивним по відношенню до генів A і B . На сьогодні встановлено, що відмінності між A_1 і A_2 антигенами є якісними і кількісними. Якісні відмінності обумовлені особливостями біохімічної структури цукрів (більше розгалужена структура антигену A_1). Кількісні відмінності пов'язані зі збільшеним вмістом A детерміант на A_1 клітинах (приблизно в три рази) в порівнянні з A_2 клітинами. Частота зустрічальності варіантів антигену A в

європейської популяції складає 1:50000 досліджень, в інших расах – частіше. Щоб підкреслити великий поліморфізм антигенів системи АВО на рівні специфічності достатньо навести поліморфність варіантів антигену А (табл.).

Таблиця

Кількість А антигенних детермінант на еритроцитах осіб в залежності від варіанту антигенна А

Варіант антигену А	Число антигенних детермінант на еритроциті
A₁	810 000 – 1 170 000
A₂	160 000 – 440 000
A₃	40 600 - 118 000
A_x	7 500 – 10 500
A_{end}	2 100 – 2 700
A_m	100 - 1900
A_{el-}	100 - 1400
A_y	100 - 1900

В наступні роки були відкриті інші генетичні системи крові і послідовно досліджувався поліморфізм за поверхневими антигенами еритроцитів.

Пізніше, у 1955 р. Смітіс (Smithies) розробив методику електрофорезу в крохмальному гелі, яка дозволяла розділювати білки в підтримуванному середовищі в залежності не тільки від їх заряду, але і за молекулярною масою, тому що рухомість білкових молекул в гелі крохмалю пов'язана з термічною рухомістю молекул полісахаридів самого гелю і відстань між

сусідніми посахарідними ланцюгами постійно змінюється. Цей новий метод дозволив Смітісу дослідити і визначити поліморфізм гаптоглобіну (**Нр**, синонім **серомукоїда²**) – сироваткового білка, основна функція якого є зв'язування гемоглобіну.

Було визначено три спадкових фенотипи гаптоглобіну: **Нр 1-1**, **Нр 2-1**, **Нр 2-2**, які являють собою мономери з вельми варіабельною молекулярною масою - гаптоглобін типу **Нр1** має молекулярну масу 85 000, за електрофоретичним посуванням утворює швидко мігруючу зону і принадний особам з фенотипом **Нр 1-1**. Гаптоглобін типу **Нр2** має молекулярну масу 169 000, являє собою більш повільно мігруючий компонент і принадний особам з фенотипом **Нр 2-2**. Особи з фенотипом **Нр 2-1** мають білкову фракцію, яка вміщує обидва компоненти і за електрофоретичною рухомістю посідає середнє місце.

Пізніше було встановлено, що успадкування даного білку відбувається за кодомінантним типом. Генотип **Нр¹ Нр¹** визначає фенотип **Нр 1-1**; генотип **Нр² Нр²** - фенотип **Нр 2-2**; генотип **Нр¹ Нр²** – фенотип **Нр 2-1**. Незмінність типів гаптоглобіну впродовж індивідуального життя людини склало основу використання даної системи в судово-медичній практиці. Визначення поліморфізму гаптоглобіну мало певне значення для антропологічних досліджень, оскільки за фенотипами має відмінну поширеність у різних етнічних групах, але, в цілому, для панміктичній популяції переважним є фенотип **Нр 2-1**, що пов'язано з еволюційно селективним відбором індивідів придатних для життєдіяльності в даному екологічному середовищі. Були проведені дослідження поліморфізму гаптоглобіну в різних країнах світу і встановлено, що в різних етнічних популяціях за фенотипами гаптоглобін має різну частоту стрічання. Так, наприклад, у жителів Індії тип **Нр 1-1** зустрічається в 1,8%, у жителів Нігерії – у 53,6%. Тип **Нр 2-2** у населення Індії зустрічається в 81,7%, а у жителів Нігерії порівняно рідко – в 2-7%.

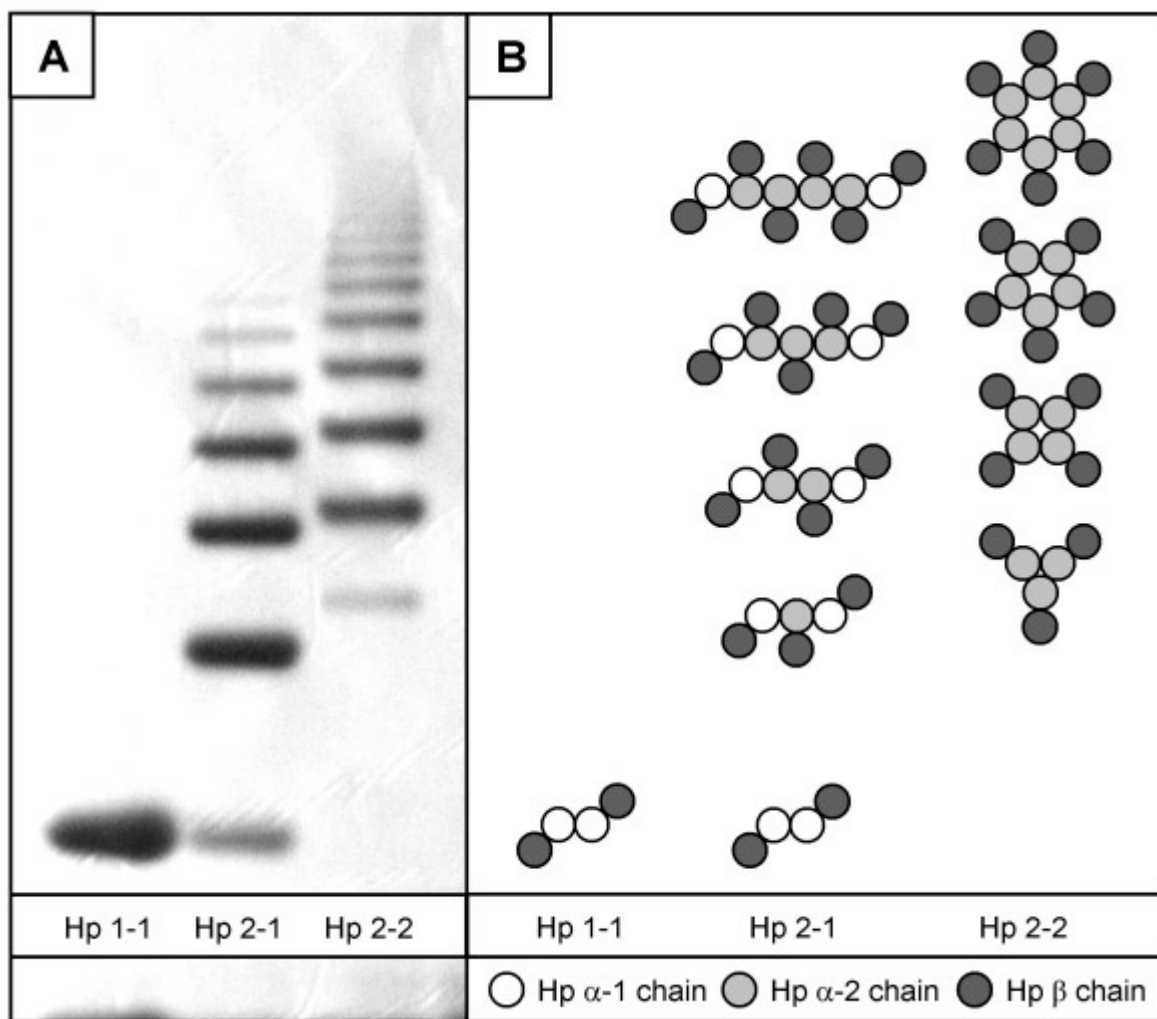


Рисунок 8.1 - Оцінка фенотипу гаптоглобіну методом електрофорезу. А: генетично детерміновані варіанти гаптоглобіну - Hp 1-1, Hp 2-1, та Hp 2-2 в 3 – 8% градієнтному поліакріламідному гелі. В: схема будови трьох фенотипів гаптоглобіну Hp 1-1, Hp 2-1, и Hp 2-2 (Gast J., 2008).

Сімейним аналізом встановлено, що діти не можуть мати такий тип гаптоглобіну, який був відсутній у їх батьків. Гени даної системи розміщені на короткому плечі хромосоми 5 і частково – на дистальній половині довгого плеча і на дистальному кінці хромосоми 18.

Далі було відкрито поліморфні форми інших сироваткових білків: імуноглобуліни (алотипи Gm Inv), Gc-компонент, трансферин Tf, ліпопротеїди (Ag, Lp, Ld), предальбумін, альбумін, швидкі і повільні постальбуміни, ферменти(холінестерази, фосфатази і інші.).

Було доказано, що генетичний поліморфізм сироваткових білків людини відповідно антигенному поліморфізму еритроцитарних систем крові обумовлений множинністю алельних генів, а також особливістю білків, ліпопротеїдів і ізоферментів сироватки або плазми. Сироваткові системи передаються спадково і, в основному, не пов'язані з іншими ісосерологічними системами, не пов'язані між собою, не залежать від віку і статі людини, тобто мають ознаки генетичних систем крові.

Генетика ізоферментів почала вивчатися з позицій генетичного поліморфізму систем крові в сукупності з біохімічними підходами ідентифікації множинних форм одного і того ж алеля. Такі електрофоретичні дослідження дозволили ідентифікувати серії алелей ізоферментів і принцип кодомінантного успадкування. Завдяки такому підходу було встановлено явище біохімічного поліморфізму. Наприклад, лише для одного ферменту Г6Ф встановлено 30 різних специфічностей, які спадкуються за кодомінантним принципом і мають різне представництво в різних популяціях. Саме застосування методу електрофорезу в комбінації з методами визначення специфічної активності ферментів сприяло активному вивченню поліморфізму ферментів, тому що ідентифікація нормального ферменту (дикого типу) і його мутантного варіанта може бути досягнена тільки шляхом локалізації ферментспецифічної біохімічної реакції в електрофоретичному середовищі (крохмальному, поліакриламідному гелях). Наприклад, кисла фосфатаза еритроцитів при рН6 розщеплює фенолфталейнфосфат на фенолфталейн і фосфат; вільний фенолфталейн фарбує гель тільки у тому місці, куди мігрував фермент. Пофарбовані ділянки розміщуються на гелі по-різному, що можна зв'язати з відповідними змінами відповідних генів. Були встановлені конкретні поліморфізми ферментів і вивчені причини їх множинності. **По суті причиною такої множинності може бути: генетично незалежні білки (МДГ з мітохондрій і цитоплазми –АсТ); гетерополімери з двох або більше поліпептидних ланцюгів (ЛДГ, КК,АДГ); генетичні варіанти (Г6Ф, АДА еритроцитів); білки, які поєднані з іншими групами (фосфорилаза а і б та глікогенсинтетаза); білки, які походять з одного поліпептидного ланцюга (родина хімотрипсинів); конформаційно різні**

форми (дезоксітімідінкіназа). Тобто, існування ізоферментів найчастіше обумовлено існуванням гетеро полімерів із двох або трьох одиниць. Синтез окремих поліпептидів закодований в окремих генах (один ген – один поліпептидний ланцюг). Якщо фермент складається із різних поліпептидів, то для кінцевої його структури потребується більш одного гена. Так, з двох видів субодиниць утворені ЛФ, КК, АДГ, ЛДГ.

Для певних ізоферментів отримані незаперечні докази різного амінокислотного складу їх субодиниць. В деяких випадках визначається більша кількість ізоферментів, ніж можна було очікувати, виходячи із кількості субодиниць в молекулі. Причиною такого явища може бути існування субодиниць в кількох конформаційних формах. Була запропонована теорія відносно якої кількість ізоферментів залежить від міжсубодиничних зв'язків, симетрії, або асиметрії мономерів. Можливі п'ять варіантів розміщення в молекулі чотирьох мономерів: тетраедричне, циклічне, *стремяподібне*, трикутне і лінійне. Найбільшу кількість контактів забезпечує тетраедрична структура. Складний антигенний поліморфізм ізоферментів склав підґрунтя для вивчення їх в імунологічному реагуванні організму людини. Історично визначали декілька типів імунологічної специфічності ферментів: *тканинна, органелярна, групова, видова*, які безумовно, неможна розглядати окремо від імуногенності і імуногенетичної детермінованості.

Однією із причин генетично обумовлених відмінностей у первинній структурі є наявність генетичних варіантів. З цим фактом пов'язане існування ізоферментів Г6Ф людини – першого ферменту пентодного циклу. Так, відомо близько 20 варіантів Г6Ф еритроцитів людини. Порівняння первинної структури нормального типу В з варіантами типу А показало, що відбувається заміна лише однієї амінокислоти. Виявлені варіанти ЛДГ, які пов'язані з генетичними змінами її Н- і М-субодиниць. Описаний навіть випадок відсутності Н-субодиниць ЛДГ у хворого діабетом. У його дітей (5 осіб) встановлено вкрай низька активність даного ферменту. Були також визначені розчинні варіанти АСТ в лейкоцитах монголоїдів (9).

Для багатьох ферментів, аналіз проведений аналогічними методами, дає можливість отримати адекватну оцінку долі поліморфних локусів. Така оцінка була отримана Харрісом і Хопкінсоном в 1972 р. Автори проаналізували данні електрофоретичних досліджень населення Європи приблизно за 70 різними локусами, які кодують ферменти. Число досліджених ферментів було менше, оскільки один фермент може складатися більш ніж з одного поліпептидного ланцюга і, тому, кодуватися більше ніж одним геном. Вважається, що ген є поліморфним, коли частота ЙОГО найбільш поширеного алеля не перевищує 0,99.

Оскільки частота гетерозигот ($2pq$) приблизно дорівнює подвійній частоті гена (q), то за такими алелями повинно бути гетерозигот біля 2% популяції. Згідно даному визначенню, 20 з 71 (28,2%) локусу є поліморфними. Така цифра не віддзеркалює всього числа поліморфних локусів, оскільки деякі варіанти можуть не ідентифікуватися електрофоретичним методом, а визначатися іншими методичними підходами (наприклад, псевдохолінестераза). Треба зазначити, що в деяких випадках розрішальна здібність метода електрофореzu є недостатньою щоби розрізнити білкові варіанти, оцінка 28,2% вважається заниженою.

Отримані дані свідчать, що навіть по одному з досліджених ферментів - кислої фосфатази еритроцитів, яка має 3 поширених алеля, більше ніж 50% популяції є гетерозиготами. Рівень гетерозиготності інших локусів є значно нижчим. Середня доля гетерозиготних особин, яка розрахована за 71 локусу, дорівнювалася 6,7% на локус. Виходячи з властивостей генетичного кода, можна зробити висновок, що тільки одна третя з усіх можливих нуклеотидних замін призводить до полярних замін амінокислот, тобто до таких замін, які обумовлюють зміни електрофоретичної рухомості [1681]. При цьому немає підстави пріорно припускати, що мутації, які призводять до неполярних замін, виникають з меншою частотою. Тому реальний рівень середньої гетерозиготності на локус, приблизно в три рази вище і складає біля 20%.

Для багатьох ферментів відомі рідкі варіанти, які є присутніми поряд з поширеними алелями, але для багатьох локусів відомі лише рідкі варіанти, а поширені – відсутні. Частота розподілення рідких варіантів залежить від величини вибірки (необхідно мати популяцію в декілька сотень осіб). Рідкими вважаються варіанти для яких частота зустрічальності не перевищувала 0,005. Вплив величини вибірки на вірогідність ідентифікації в рідких варіантів можна проілюструвати таким фактом: у випадках

визначення рідких алелей розмір вибірки складав більше 4000 тис. осіб, а для локусів в яких рідкі алелі не було встановлено, величина вибірки складала 1300 осіб.

На сьогодні високий рівень поліморфізму продемонстровано для багатьох сироваткових білків, ферментів плазми крові, еритроцитів і лейкоцитів.

Як правило генетична детермінація поліморфізму є простою: два алеля визначають два варіанти одного білка. Але відомі і складні поліморфні системи, наприклад головний комплекс гістосумісності (МНС). Множинні, взаємопов'язані локуси, які складають дану систему, локалізовані в 6-й хромосомі людини. Фізіологічна роль головного комплексу гістосумісності (системи HLA) полягає в здійсненні генетичного контролю імунного гомеостазу, тому з позицій вивчення генетичної схильності до патологічного процесу на основі поліморфізму імуногенетичних структур найважливішими є захворювання, патогенетичний субстрат яких складають саме розлади в імунотезі. ///Детально структура, функція, поліморфізм головного комплексу гістосумісності і механізми асоціативного зв'язку з захворюваннями розглянута в розділі «імуногенетика».

На сьогодні вже дана більш менш детальна характеристика поліморфних систем організму людини з позицій генетики, біохімії, фізіології. Визначено, що деякі з них демонструють поліморфізм тільки в межах однієї основної расової групи. Для інших обговорюються гіпотези відносно механізмів їх підтримання природним добром в популяціях людини, наприклад система гаптоглобінів, системи групових антигенів крові людини і генетичні поліморфізми головного комплексу гістосумісності. На користь високої генетичної індивідуальності людини свідчить той факт, що для проведення трансплантації сумісних стовбурових гемопоетичних клітин кісткового мозку або периферичної крові необхідно мати в арсеналі не менш ніж 25 000 гістотипованих за генетичними системами осіб.

Що ж таке поліморфні локуси і яка їх доля в геномі у людини.

Поліморфними вважаються гени, які представлені в популяції кількома різновидами - алелями, що обумовлює різноманіття ознак всередині виду. Різниця між алелями одного і того ж гена, як правило, представлена незначними варіаціями його "генетичного" кода. Більшість відомих поліморфізмів позначаються в замінах одного нуклеотида, або в зміні числа фрагментів ДНК, які повторюються. Поліморфізми нуклеотидних

послідовностей виявлені в усіх структурних елементах генома: екзонах, нитронах, регуляторних ділянках і інших. Але варіації, які торкаються кодуючи фрагментів генів і віддзеркалюються на амінокислотній послідовності їх продуктів, зустрічаються відносно рідко і не мають відношення до проблеми, яку ми обговорюємо. Для цієї проблеми важливими є можливі наслідки поліморфізму нитронів і 5'-кінцевих некодуєчих послідовностей. Сам аналіз даного феномена в значній мірі залежить від того, наскільки є варіабельними особисті функції білка, які кодуються різними алелями,

Локус називають поліморфним, якщо в популяції існують два або більше алеля даного локусу. Якщо один з алельних генів має дуже високу частоту зустрічальності (0.99) то дуже велика вірогідність, що за умов невеликої вибірки жодний інший алель не буде зустрічатися. Тобто, локус визначається поліморфним, якщо частота найбільш поширеного але менш 0.99. Таке розділення має досить умовний характер і в літературі можна знайти і інші критерії поліморфності. Для виміру ступеня поліморфності в популяції, як правило застосовують підрахунок середнього співвідношення поліморфних локусів і шляхом ділення їз загальної кількості на сумарне число локусів у виборці. Для такого підходу бажано мати репрезентативну за кількістю популяцію. Більш точним показником генетичної варіабельності в межах популяції є **середня очікувана гетерозиготність або генне різноманіття**. Ця величина може бути отримана безпосередньо з генних частот і в меншій мірі підвержена впливу ефектів, які пов'язані з помилкою у виборці. Генне різноманіття за даним локусом визначається за формулою:

$$h = 1 - \sum_{i=1}^m x_i^2$$

де **SUM** - сума, x_i - частота алеля **i** і **m** - загальне число алелей даного локусу.

Для будь-якого локусу **h** є вірогідністю того, що два алеля в популяції, обраних випадковим чином, будуть відрізнятися один від одного. Середнє за усіма **h** для кожного дослідженого локусу, **H**, може бути використано як оцінка ступеня генетичної варіабельності в межах популяції.

Ступені генетичного різноманіття **h** і **H** широко використовуються для даних, які отримані при електрофоретичному аналізі та аналізі рестрикційним ферментами. Але даний підхід не завжди може бути використаний для даних, отриманих при дослідженні послідовностей ДНК, тому що ступень різноманіття на рівні ДНК є дуже високою. Наприклад, коли розглядаються довгі послідовності, є вірогідність, що кожна з них буде відрізнятися від інших послідовностей за одним і більше нуклеотидом.. Тоді і **h**, і **H** будуть не інформативними, оскільки обидва дуже близьки до **1**, тобто не будуть розрізняватися між локусами або популяціями.

При роботі з ДНК більш інформативним показником поліморфізму в популяції є середнє число нуклеотидних замін на позицію між двома випадково обраними послідовностями. Така оцінка має назву – нуклеотидним різноманіттям і позначається **п**:

$$п = \text{SUM} (x_i * x_j * п_{ij})$$

де x_i і x_j - частоти послідовностей **i**-го і **j**-го типів, і $п_{ij}$ - доля нуклеотидних різниць між **i**-м і **j**-м типами послідовностей.

Як приклад вивчення нуклеотидної різноманітності на рівні послідовностей ДНК ми наводимо роботу *D. melanogaster* (*Adh*), яка була проведена для локусу, кодуєчого алкоголь-дегідрогеназу.

Вивчалися 11 послідовностей довжиною 2.379 нуклеотидів. Не приймаючи до уваги делеції і інсерції, було виділено дев'ять різних алелей, один з яких був представлений трьома, а вісім останніх - однією послідовністю. Таким чином, частоти $x_1 - x_8$ були рівні $1/11$, а $x_9=3/11$. Сорок три позиції були поліморфні. Спочатку були підраховані долі нуклеотидних різниць для кожної пари послідовностей.

Наприклад, алелі 1-S і 2-S різняться за трьома позиціями з 2.379, тобто, $p_{12} = 0.13\%$. Отримане за формулою значення дорівнює 0.007.

У 1902 р. Гаррод припустив, що порушення метаболізму, наприклад при алкаптонурії, є безумовним виразником хімічної індивідуальності організму. Саме широта генетичної різноманітності вперше була підтвердженою за допомогою електрофорезу клітинних екстрактів (без попередньої очистки ферментів), коли було визначено існування кількох структурних ізоформ для багатьох білків. Наявність ізоформ обумовлено існуванням в популяції множинних варіантів гена (алелей) даного білка. Алелі мають ідентичну локалізацію в гомологічних хромосомах. Як відомо, більшість генів в кожному організмі представлено двома алелями, один з яких успадкований від батька, а інший - від матері. Якщо обидва алеля ідентичні, то організм вважається гомозиготним, якщо різні - гетерозиготним.

В процесі еволюції різні алелі виникли від єдиного алеля-попередника як результат мутацій, частіше всього вони відрізняються один від одного заміною одного нуклеотида (місенс-мутації). Як правило, білки, які кодовані різними алелями одного гена, мають однакові функціональні властивості, тобто заміна амінокислоти нейтральна або майже нейтральна з точки зору природного відбору. Про наявність конкретних алелей судять на основі аналізу амінокислотної послідовності відповідних білків. Для багатьох генів, наприклад, **гена бета-ланцюга глобіну** є змога виділити нормальний алель - найпоширеніший в популяції. Іноді серед алелей немає

ні одного, який можна було б вважати нормальним. Надзвичайно високий поліморфізм притаманний, наприклад, гену апопротеїна (а) і гену альфаланцюга гаптоглобіна. Ген вважають поліморфним, якщо його самий поширений алель зустрічається менш ніж у 99% людей. Дане визначення віддзеркалює тільки поширеність різних алелей, а не їх функціональні відмінності.

Саме поняття поліморфізму дуже розширилося з відкриттям мінливості послідовностей ДНК. В геномах різних людей розрізняється 1 з 100-200 пар нуклеотидів, що погоджується з гетерозиготністю по 1 з 250-500 пар нуклеотидів. Сучасні методи дозволяють виявити заміни окремих нуклеотидів в кодуючих регіонах, які можуть викликати зміни амінокислотної послідовності. Поліморфізм ДНК ще більше виражений в некодуючих регіонах генома, вплив яких на експресію генів невеликий, або його немає зовсім. Окрім заміни окремих нуклеотидів в основі поліморфізму ДНК лежать вставки, делеції і зміна числа тандемних повторів. Розрізняють варіюючі за числом (довгі) тандемні повтори (мінісателітна ДНК) і короткі (тетра-, три-, ді- або мононуклеотидні) тандемні повтори (мікросателітна ДНК). Масштаби поліморфізму ДНК є такими, що між послідовностями ДНК двох осіб, (якщо вони не є однопляцеві близнюки), існують мільйони відмінностей. Ці відмінності підрозділяють на чотири категорії:

- **1. фенотипово не виражені** (наприклад, поліморфні ділянки ДНК, які використовують для ідентифікації особистості молекулярно-генетичними методами);
- **2. які викликають фенотипові відмінності** (наприклад – цвіт волосся, зріст), але не асоційовані зі схильністю до захворювання;
- **3. Які мають внесок в патогенез захворювання** (наприклад, при полігенних захворюваннях);

- 4. які відіграють основну роль в розвитку захворювання (наприклад, при моногенних захворюваннях).

При багаторічному дослідженні генетичного поліморфізму структурних білків дослідники прийшли до висновку відносно того, що більшість генів є високополіморфними. Але наукові розробки останніх років в цьому напрямку свідчать про певні сумніви відносно правильності попередніх висновків. Наприклад, при дослідженні поліморфізму білків культури фібробластів (фібробласти розділені на фракції – білки, які зв'язані з клітинними структурами і супернатант – розчинні білки) методом двомірного електрофорезу чисельність варіантів, які би відрізнялися якісно виявилась достатньо низькою.

Напроти, значно вищим був рівень кількісної мінливості, яка, як показали багаточисельні роботи також має генетичну основу. При цьому рівень як кількісної так і якісної мінливості виявився значно вищим у розчинних білків супернатанта. Відсутність якісної мінливості на сьогодні доказано не тільки для фібробластів. Для пояснення даного факту було висунуте припущення, що взаємодія структурних білків з багатьма іншими білками, які б впливали на чисельність мутацій на основі допустимих конформаційних змін є рестрикційно обмеженою. На користь цієї гіпотези свідчить факт більш високого рівня мінливості розчинних білків по відношенню до білків, пов'язаних з клітинними структурами. Більш високий рівень кількісної мінливості по відношенню до якісної мінливості свідчить про високу толерантність до мутацій не транскрибованої ДНК, тому що такі мутації, як вважається, впливають на швидкість синтезу ДНК.

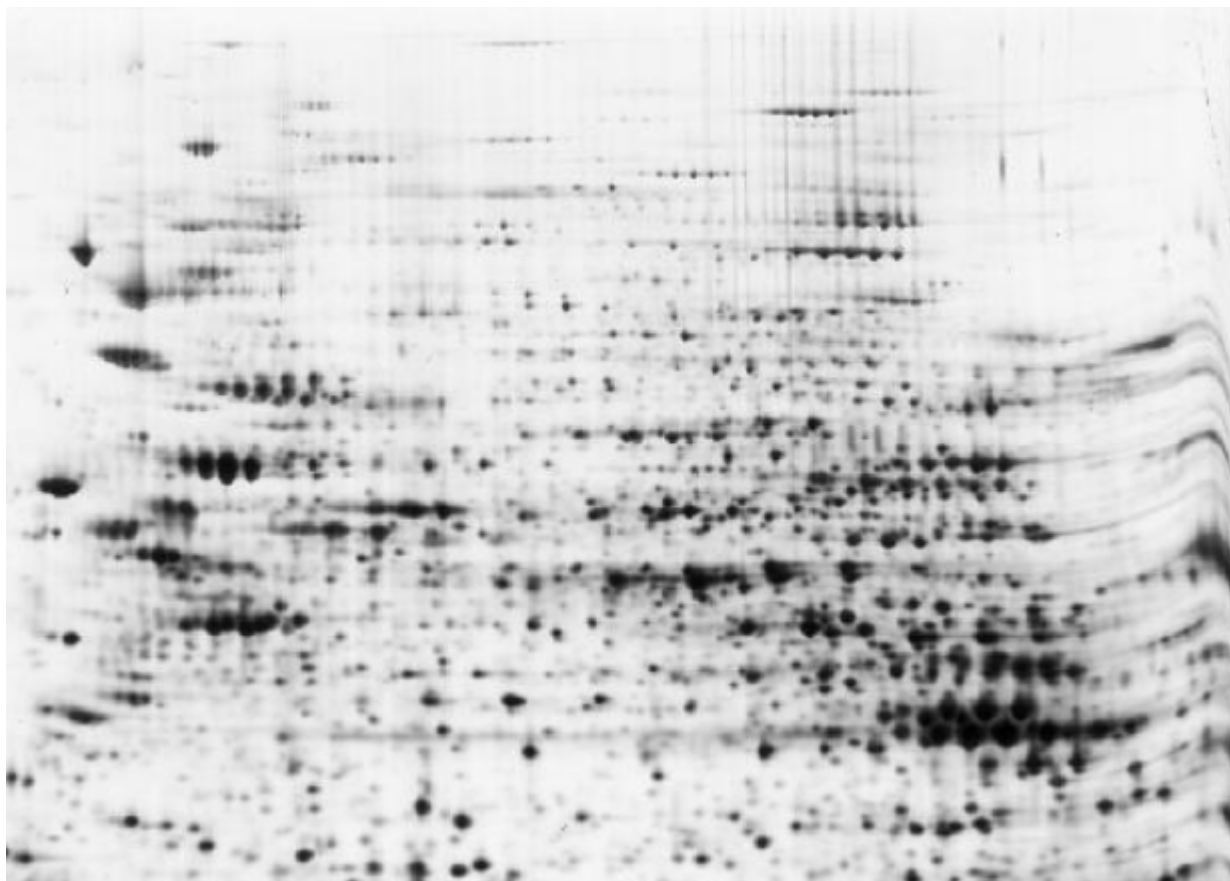


Рисунок 8.2. - Двумерная (2DE) карта белков из клеток гепатобластомы HepG2 (HEPG2_HUMAN), и положение на ней PCNA. Получено из базы данных ExPASy.org, <http://au.expasy.org/ch2d/>

8.2. Поліморфізм ДНК

Вище ми вже зазначили, що для експресуємих продуктів генів, таких, як групи крові, білки тканин і крові, є характерним високий рівень поліморфізму, але генетична мінливість на рівні ДНК є суттєво вищою. Оскільки значна частина генома, згідно сучасним уявленням, не приймає прямої участі в регуляції або кодуванні продуктів генів, мутації в цих нерегуляторних и некодуючих ділянках ДНК не мають представництва на рівні фенотипу і є селективно нейтральними.

Використання рестрикційних ферментів для картування генома людини, а також визначення послідовностей нуклеотидів у різних індивідів дозволило встановити виявило надзвичайно високу мінливість на рівні ДНК. Сімейний аналіз показав, що варіанти ДНК успадковуються відповідно законам Менделя. Таким чином, на сучасному етапі досліджень

поліморфізму дослідники мають в своєму розпорядженні зовсім інший набір генетичних

Типи поліморфізму ДНК

Встановлено, що найбільш поширеним поліморфізмом ДНК є **рестрикційний поліморфізм**. Аналіз ДНК проводять за допомогою специфічних ДНК-зондів та рестриктази. Рестрикційні фрагменти ДНК (рестрикти) розрізняють за довжиною (поліморфізм за довжиною рестрикційних фрагментів). Вони ідентифікуються за різною рухомістю після гібридизації по Саузерну.

Точкові мутації, які замінюють один нуклеотид на інший в некодуючому регіоні ДНК, зустрічаються дуже часто. Але систематичні дослідження мінливості з застосуванням великої кількості рестриктаз проводилися в досить невеликих вибірках і на сьогодні на основі даних дослідження добре вивчених областей генома - гемоглобіну, альбуміну і сегментів ДНК з невідомою функцією з різних хромосом, свідчить про те, що рівень нуклеотидної мінливості на порядок вищий ніж рівень мінливості в структурних генах, які кодують білки. Це означає, що різниця між випадково обраними хромосомами складає в середньому $V_{\text{socf}} - V_{250}$ нуклеотидів (гетерозиготність = 0,001—0,004). Більшість варіантів за довжиною рестрикційних фрагментів диморфні, тобто мають тільки два «алеля» - присутність (+) або відсутність (—) сайту рестрикції. Частота поліморфного варіанта може змінюватися від кількох відсотків до максимальної-50%.

Другий тип поліморфізму ДНК полягає в різному числі **тандемних повторів, які мають загальну центральну частину з 10-15 пар основ («міні-сателіти»)**. Ділянка хромосоми може нести різну кількість таких повторів. Виникнення поліморфізму даного типу полегшується завдяки ідентичності послідовностей нуклеотидів в повторах, що призводить до делецій і дуплікацій, які виникають в результаті нерівного кросинговеру. Довжина рестрикційних фрагментів залежить від числа повторів. Такі гіперваріабельні ділянки ДНК розташовані біля гена, який кодує інсулін, а також навколо комплексу Hb γ в хромосомі 11, зустрічаються вони і в інших

хромосомах. Оскільки даний тип морфізма ДНК виражений в різному числі повторів, гетерозиготність є поширеним явищем, а гомозиготність зустрічається дуже рідко. Дана властивість є дуже важливою для дослідження з використанням ДНК-маркерів, оскільки майже для всіх випадків варіанти є інформативними.

На основі міні-сателіта інтронної послідовності міоглобіну Джеффрі створив зонд, який розпізнає гіперваріабельну ДНК. В різних хромосомах людини виявлено багато гіперваріабельних ділянок. Рівень гетерозиготності Дослідження поліморфізму ДНК в невеликій популяції показав високий рівень гетерозиготності (майже 100%). Аналіз інбредного родоводу (54 індивіда, які відносилися до 4 поколінь), показав, що гетерозиготні смуги успадковуються згідно законам Менделя.

Поліморфізм мітохондріальної ДНК

Мітохондрії передаються тільки від матері усім потомкам; диплоїдність, мейоз і рекомбінація в даному випадку відсутні. Поліморфізм мітохондріальної ДНК є особливо важливим для популяційної генетики, за його допомогою вивчають міжпопуляційну взаємодію і еволюційну історію популяцій. Можливо, варіанти мітохондріальної ДНК не схильні до тиску відбору. Порівняння успадкованих по материнській лінії рестриктних варіантів і РНК в різних популяціях дозволяє отримати вірогідну картину їх мутаційної історії.

На сьогодні є незаперечним фактом, що використання ДНК-маркерів значно розширює як теоретичні так і практичні можливості дослідницьких розробок відносно зчеплення. Через певний час дослідники отримають великий спектр маркерів ДНК, рівномірно розподілених у геномі людини, що в свою чергу, суттєво розширить можливості по визначенню ступеню внеску різних генів в реалізацію поширених мультифакторіальних захворювань шляхом визначення сайтів головних генів, які не ідентифікуються за зчепленням. Окрім того розширюється можливості пренатальної діагностики спадкових форм пухлинних захворювань, а також можливості в судово-медичній практиці при встановленні батьківства і

ідентифікації плям крові і сперми. Відкриття на рівні ДНК по суті є революційним для генетики людини, зокрема для медичної генетики, оскільки завдяки цьому в недалекому часі геном людини буде повністю картованим.

Генетичний поліморфізм і вплив на людину факторів зовнішнього середовища

"Гени зовнішнього середовища"

Хвороби з спадковою схильністю відрізняються від генних хвороб тим, що для свого проявлення потребують ***впливу чинників зовнішнього середовища***

На сьогодні відомо вже понад 200 «генів зовнішнього середовища». Вони визначені в кожній групі ферментів, які приймають участь в процесах детоксикації. Визначені мутантні ізоформи, функція яких може бути порушена у співставленні з нормальними алелями. Багато з них мають генетичні поліморфізми які впливають на функціональну активність їх алелей. Генетичні дослідження таких генів свідчать про значні міжпопуляційні та етнічні відмінності алельного поліморфізму, що відображає умови проживання, харчування, і способу життя населення в різних популяціях світу. Так, молекулярно-генетичні дослідження розподілу алелей системи HLA в різних популяціях розширили уяву про механізм формування міжрасових і міжетнічних відмінностей - визначення алельних поліморфізмів дозволили значно наблизитись до розуміння генетично обумовленої резистентності, або чутливості до впливу ендогенних чинників у навколишньому середовищі, а також до характеристики поширення деяких хвороб на рівні популяції. Прикладом можуть слугувати дані, представлені російськими вченими (при дослідженні поширеності алельних варіантів гену HLA DRB 1*04 в 7 популяційних групах Росії. Вибір для аналізу варіантів саме цього

гену обумовлено встановленим фактом асоціативного зв'язку окремих алелей (HLA DRB 1*0401, HLA DRB1*0404 і HLA DRB1*0405) з аутоімунним захворюванням - інсулінзалежним цукровим діабетом (ІЗЦД). В той же час з алелем HLA DRB 1*0403 асоційована толерантність до захворювання. Досліджувались популяції росіян, поморів, саамів, татар, марі, тувінців, ненців. Встановлено, що в усіх популяціях, за виключенням ненців, присутня висока частота алеля HLA DRB 1*0401, але популяціях саами, тувінці, ненці, на відміну від інших популяцій присутня висока частота алеля-протектора. Саме в цих популяціях практично відсутня захворюваність ІЗЦД. Тобто, протективний ефект може бути превалюючим по відношенню до ефекту схильності.

Відомо, що в організмі людини при дії негативних чинників, наприклад, промислових забруднень, сільськогосподарських ядів, фармакологічних препаратів, хімічних отрут відбувається детоксикація цих ксенобіотиків. Процес здійснюють спеціальні ферментні системи у сукупності з мембраноасоційованими рецепторами, які регулюють їх активність – "лікарські-метаболізуючі ензими". Детоксикація, як правило вміщує в себе дві послідовні фази:

- **фаза 1** – чужорідні сполучення (канцерогени, ліки, промислові отрути та інш.), які поступають до організму активуються за допомогою ферментів сімейства цитохромів P450 або мікросомальних епоксид-гідролаз (*mEPOX*), утворюючи при цьому коротко живучі проміжні електрофільні метаболіти, які мають генотоксичні властивості;
- **фаза 2** - ці проміжні метаболіти за допомогою ферментів сімейств глутатіонтрансферази (*GSTM*), УДФ-глюкуронсульфотрансфераз (*UDF*), N-ацетилтрансфераз (*NAT*)

перетворюються в водорозчинні нетоксичні продукти і виводяться з організму.

В кожній групі таких ферментів виявлені мутантні ізоформи, функція яких може бути порушена у співставленні з нормальними алелями. В подальшому з'ясувалося, що ці функціонально неповноцінні алелі значно частіше зустрічаються у осіб з різними захворюваннями, в етіології яких важливу роль відіграють негативні екзогенні чинники. Гени, які мають такі алелі можна розглядати як "гени схильності" до конкретних патологічних станів. (таблиця 1). Так, було встановлено, що неповноцінний (нульовий алель) глутатіон-S- трансферази (фаза 2), який має протяжну делецію, представлений в гомозиготному стані майже у 40% населення Росії. Даний генотип є характерним для хворих раком легенів, хронічним обструктивним бронхітом і раком січового міхура. У осіб з таким генотипом на тлі алкоголізму частіше розвивається цироз печінки. Також відомі багато чисельні свідчення про високу схильність індивідів, гомозиготних по " послабленому" алелю гена *GSTP1*, до різних пухлин, в том числі до раку шкіри. Недавно виявили асоціативний зв'язок даного алеля з хворобою Паркінсона. Це нейродегенеративне захворювання, обумовлене вибірковою загибеллю допамінергічних нейронів в підкоркових відділах мозку, особливо часто зустрічається у людей після хронічного впливу пестицидів.

Таблиця

Гени «схильності»

Ген	Мутація / поліморфізм	Первинний дефект	Частота в популяції	Захворювання
Гени «зовнішнього середовища»				
<i>GSTM 1</i>	del	Порушення фази 2 детоксикації	40% 0/0	Рак легень, хронічний бронхіт, ендометріоз
<i>NAT-2</i>		Порушення фази 2 детоксикації	50%	Рак молочної залози
<i>mEPHX</i>	Ехон 3 Т-С Tyr-Hist	Порушення фази 1 детоксикації	6%	Хронічна обструктивна пневмонія,

				емфізема, астма
<i>P450 1A1 (CYP1A1)</i>	Exon 7 A-G Ile-Val	Порушення фази 1 детоксикації	7% 27%	Рак легень
Гени-тригери мультифакторіальних захворювань				
<i>MTNFR</i>	677 C-T (A-V)	Гомоцисеїнемія	5% M/M 57% M/+	Хвороби системи кровообігу, атеросклероз
<i>VDR-3</i>	Exon 9 T-C (I-I)	Зменшення mRNA	16% B/B	Остеопороз
<i>ACE</i>	Del 287 bp Alu intr.16	Підвищення активності ферменту	30%	Інфаркт міокарду
<i>ApoE</i>	E2, E3, E4 15% T-C Cod. 112; 158	Гіперліпопро- теїнемія	15% E2/E2	Атеросклероз
<i>CC16</i>	A38G	Порушення функції секреторного білка CC16	10% A/A	Астма
«Корисні» поліморфізми				
<i>CCR-5</i>	del 32 bp	Відсутність хемокінінового рецептору лімфоцитів	26% del/+1% del/ del	Резистентність до СНІДу

Встановлено, що ген *NAT-2* (фаза 2), відповідальний за синтез фермента *N*-ацетілтрансферази-2, сприяє виникненню рака молочної залози. Причому даний ефект знаходиться в прямій залежності від куріння жінок в постменопаузальному періоді. У жінок, гомозиготних по «повільному» алелю цього гена (повільні "ацетилятори"), куріння в молоді роки, майже в 20 разів збільшує ризик рака молочної залози. В той же час у жінок, які курять з групи швидких "ацетиляторів" такої закономірності не простежується.

Такі ж пагубні наслідки для здоров'я можуть мати і патологічні алелі генів фази 1 - цитохромів і епоксидгідролаз. Так, особи, гомозиготні за незвичайною «повільною» формою мікросомальної епоксид-гідролази (*mEPOX*), мають підвищену чутливість до дії та бачного диму, різних оксидантів і сполук з посиленою продукцією вільних радикалів. У них частіше, ніж в середньому в популяції, зустрічаються захворювання легень, наприклад обструктивні бронхіти і емфізема. У хворих на муковісцидоз

(спадкове захворювання, обумовлене мутаціями в гені хлорних каналів (*CFTR*) епітеліальних клітин) частіше уражені легені. У таких хворих наявність в геномі "повільного" алеля гена *mEPHX* суттєво підвищує ризик особливо тяжких легеневих порушень.

Існують переконливі докази, що тяжкість клінічного перебігу муковісцидозу, особливо його легеневих проявів, напряду залежить від носійства функціонально неповноцінних алелей *GSTM1* и *NAT-2*. Тобто, тестування алельного поліморфізму генів *mEPHX*, *GSTM1* и *NAT-2* у хворих на муковісцидоз, рівно як і алелей *GSTM1* и *NAT-2* у хворих на ендометріоз, можна використовувати для прогнозу клінічного перебігу і індивідуалізації раціональної терапії даних захворювань. Встановлено, що у юдей, які палять і мають делеції в генах *GSTM1* і *GSTT1*, відсутність даних ферментів підвищує ризик захворювання раком легенів приблизно у три рази по відношенню до тих осіб, у яких немає дефіциту цих ферментів. Майже в 20 разів вище ризик захворіти раком молочної залози у жінок які палять і мають дефіцит *GSTM1* і повільною формою N-ацетілтрансферази (*NAT-2*).

Таким чином, в світовій практиці накоплений вже достатньо великий фактичний матеріал відносно участі «генів зовнішнього середовища» в виникненні цілого ряду захворювань, як онкологічних (рак молочної залози, рак легенів, рак січового міхура і інш.) та неонкологічних (хронічний обструктивний бронхіт, емфізема легенів, ендометріоз, хвороба Паркінсона та інш.), що сприяло широкому обговоренню доцільності проведення популяційного скринінгу алельних варіантів генів *GSTM1* и *NAT-2*. Дослідження онкогена L-MYC показало взаємозв'язок його поліморфізму з розвитком проліферативних процесів, в основному, в легенях і в молочних залозах, а також з швидким залученням у процес метастазування лімфатичних вузлів. Продуктом гена CYP-19 є ароматаза. Як відомо, ферментний комплекс ароматази відповідає за перетворення андрогенів C19 в естрогени. Зміна активності гена CYP-19 є важливим механізмом аутокринної регуляції росту пухлини. Ідентифікація алелей генів CYP-17 і CYP-19 дозволяє прогнозувати ризик розвитку пухлин переважно в молочних залозах. Дослідження алелей гена p53 дозволяє судити про повноцінність його супресорної

функції у випадках розвитку проліферативних процесів в організмі. Розподіл алелей гена адренорецептора корелює з активністю відповідного рецептора, а підвищена андрогенна стимуляція є однією з причин розвитку раку передміхурової залози і властивість швидкого прогресування первинної пухлини.

Гени-тригери мультифакторіальних захворювань

Порушення регуляторних генетичних механізмів, які призводять до важких мультифакторіальних захворювань, можуть бути спровоковані не тільки функціонально неповноцінними алелями "генів зовнішнього середовища", але і мутаціями в структурних генах, або генах-регуляторах, які забезпечують клітинний гомеостаз. Це досить поліморфна група генів, яка отримала назву «гени- тригери» **мультифакторіальних захворювань**. До них можна віднести онкогени, багато з яких відіграють вирішальну роль в виникненні пухлин, а також гени супресори (наприклад *p53*), мутації в яких призводять до активації відповідних онкогенів і вмиканню ланцюга метаболічних реакцій, які викликають трансформацію клітин. Для багатьох таких генів вже відомі негативні алельні варіанти, які є факторами схильності до захворювання.

Так, ген рецептора вітаміну *D3* (*VDR-3*) характеризується наявністю поліморфізму в екзоні 9 приблизно 16% представників білої раси є гомозиготами за функціонально неповноцінним алелем дано гена. Саме у таких осіб часто виникає остеопороз - захворювання, обумовлене зниженням мінеральної щільності кісток, що веде до різкого збільшення вірогідності переломів. Особливо характерна така патологія для жінок менопаузального і постменопаузального періоду. Наприклад у Великобританії щорічно реєструється близько 50 тис. переломів шийки стегна і 40 тисяч переломів хребта. Не менше таких випадків зареєстровано і в інших країнах світу. Переважно такі випадки викликані патологічною ломкістю кісток, яка

пов'язана з остеопорозом. Тому велике значення має досимптоматична діагностика захворювання в контексті проведення профілактичних заходів.

Ген адренорецепторів (*AR*) – може слугувати ще одним прикладом гена-тригера мультифакторіальних захворювань. Продукт цього гена відноситься до групи ДНК-зв'язуючих білків, до яких входять і стероїдні рецептори, такі як рецептор вітаміну Д, ретинова кислота і тиреоїдний гормон. При взаємодії з тестостероном і дегідротестостероном, продукт гена *AR* приймає участь в регуляції ділення клітин в передміхуровій залозі.. Для даного гена є характерним наявність в першому екзоні поліморфізму тринуклеотидного повтору *CAG*, який кодує глютамінову кислоту. Довжина повтору коливається у різних індивідуумів в російській популяції від 8 до 31 триплета. При цьому число повторів *CAG* зворотно пропорційно активності транскрипції самого гена. Подальший аналіз показав, що особи з високою активністю гена *AR*, (тобто з низьким числом повторів *CAG*), в середньому мають більше шансів захворіти раком простати, ніж чоловіки, які мають більш протяжний *CAG*-тракт. Тестування чоловіків в доклінічному періоді відносно генетичної схильності до захворювання сприяє мінімізації ризику реалізації захворювання.

На сьогодні досить добре вивчений ген-тригер ферменту метілентетрагідрофолатредуктази (*MTHFR*), точкова мутація якого в положенні 677 *C-T* зустрічається в гомозиготному стані приблизно у 5% населення. Следствием даного поліморфізму може бути виражена гіпергомоцистеїнемія, яка, в свою чергу, має позитивну асоціацію з коронарною хворобою серця, атеросклерозом і з виникненням вроджених дефектів нервової трубки (розщеплення спинного мозку, мозкова грижа) у внутрішньоутробних плодів. Поліморфізм в гені ангіотензінконвертуючого ферменту (*ACE*), пов'язаний з делецією *Alu* послідовності в інтроні 16, зустрічається у 30% населення світу і розглядається як генетичний фактор схильності до інфаркту. Спадкова

схильність до атеросклерозу часто асоційована з гомозиготністю за алелем *E2* гена *ApoE*, який реєструється майже у 15% представників білої раси.

До числа головних факторів ризику розвитку ІХС відносять гіпертонію. Як і атеросклероз, вона є основною причиною інвалідизації і передчасної смерті. Згідно сучасним даним, на гіпертонічну хворобу страждає до 20% дорослого населення високорозвинутих країн. АГ відносять до хвороб, при яких порушується активність і взаємодія нейрогуморальних систем регуляції артеріального тиску, що призводить до структурних змін судин, особливо ці зміни характерні для клітинних мембран. Це відображається на порушенні трансмембранних потоків натрію, калію і кальцію. Кальцій активно зв'язується саркоплазматичним ретикуломом, накопичується всередині клітин і слугує для забезпечення підвищеної активності скоротливого апарату м'язових клітин судин і серця, що, в свою чергу, проявляється потовщенням стінок судин і гіпертрофією лівого шлуночка.

Перша інформація про роль спадкового фактору в реалізації АГ з'явилась на основі сімейного аналізу в 20-30-х роках ХХ століття. Було доведено, ризик реалізації захворювання пов'язаний як фактори середовища, так і спадкові фактори. Причому характер успадкування далеко не завжди можна було пояснити менделівськими закономірностями. АГ є мультифакторіальним захворюванням, основу якого складають поліморфні варіанти генів. Однак існує і ряд моногенних форм АГ.

Для визначення генетичного вкладу в розвиток мультифакторіальних захворювань було запропоновано критерій оцінки спадкової складової захворювання – ***коефіцієнт спадковості, розрахований на основі близнюкових досліджень***. Пізніше було запропоновано модель мультифакторіального захворювання, в якій виділяють два класи генів – клас головних генів і клас олігогенів/полігенів (ранжованих за вкладом в захворювання і частоті).

Передбачалось, що головні гени можна ідентифікувати за допомогою сегрегаційного аналізу, а полігени і олігогени – за аналізом нерівноваги за зчепленням. Генетичні детермінанти, що визначають зміни рівня артеріального тиску, досліджують на різних рівнях біологічної інтеграції: організменному, органному, клітинному, молекулярному, генетичному і навіть еволюційному. Запропонований підхід в теперішній час використовується при аналізі трьох генів: аддуцину (*ADD*), β 3-субодиниці G-білка (*GNB3*) і ангіотензиногену (*AGT*). Зв'язок між поліморфними варіантами гена ангіотензиногену (*AGT*) і артеріальним тиском показано на організменному (є докази взаємозв'язку між експресією гену і рівнем артеріального тиску), органному (саме в нирках підвищена активність ангіотензиногену підсилює реабсорбцію іонів Na), клітинному (базальний рівень експресії даного гена визначається його активністю в клітинах печінки і в проксимальних каналцях нирок), молекулярному (поліморфні варіанти промоторної області A(-6) і C67 асоційовані з збільшенням базальної активності білка), генетичному (у близнюків з АГ існує асоціація поліморфізму T235 (зчеплений з A(-6)) з рівнем артеріального тиску і кількістю білка плазми крові), еволюційному (гіпотеза вигідного генотипу – «thrifty genotype»).

В теперішній час основну увагу зосереджено на вивченні генетичних детермінант, які оперують в фізіологічних системах, що відповідають за підтримання кров'яного тиску. Перш за все це відноситься до ренін-ангіотензинової і кінін-брадикінінової систем.

Ген ангіотензин-перетворюючого ферменту (*ACE*, OMIM*106180) локалізований на довгому плечі 17-ї хромосоми в локусі 17q23, складається з 26 екзонів та 25 інтронів. Молекулярна вага білкового продукту гену *ACE* складає 150 кДа, первинна структура складається з 1306 амінокислот [15, 16]. Ангіотензин-перетворюючий фермент (*ACE*) кодує два ізозима. Соматичний варіант *ACE* експресується в багатьох тканинах, включаючи ендотелій, епітелій нирок та інші, тестикулярний – лише в спермі. *ACE* є ключовою ланкою ренін-ангіотензинової системи – найважливішого гуморального

регулятора артеріального тиску. Під дією цього ферменту відбувається утворення ангіотензину II – основної судинозвужуючої речовини і деградація брадикініну – важливого судинорозширюючого фактору.

В гені *ACE* відомо більше 160 поліморфізмів, однак, найбільш вивченим є інсерційно-делеційний поліморфізм, який заключається в наявності чи відсутності фрагменту ДНК довжиною 287 пар нуклеотидів в 16-му інтроні. Встановлено чітку залежність між генотипом за геном *ACE* і активністю АПФ. Мета-аналіз 29 досліджень, в яких паралельно визначались поліморфізм гену *ACE* і рівень *ACE* плазми, виявив, що рівень *ACE* при наявності DD чи ID генотипу вище в порівнянні з II генотипом на 58% і 31% відповідно. Таким чином, ефект D-алелю є кодомінантним [17- 19]. Важливо відмітити, що сам по собі ID поліморфізм не впливає на функцію білку *ACE*, але відображується на його кількості.

Встановлено, що фактором схильності до розвитку ІХС та ІМ є порушення перекісного окиснення ліпідів. Параоксаназа – це фермент плазми крові людини, що асоційований з фракцією ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ). Родина генів параоксанази включає в себе 3 гени: *PON1*, *PON2* і *PON3*. Параоксаназа – *PON1* є ліпопротеїном високої щільності, що гідролізує пероксиди. Вона захищає клітини від оксидативної модифікації і асоційована з серцево-судинними захворюваннями. Ген, що кодує параоксаназу 1 (*PON1*, OMIM*168820) локалізований на хромосомі 7, білковий продукт складається з 355 амінокислотних залишків.

Результати цілого ряду досліджень свідчать про потенційну значущість поліморфного маркеру 4a/4b гена *eNOS* в розвитку серцево-судинної патології. Гомозиготне носійство алелю 4a гена *eNOS* зустрічається рідко (генотип 4a/4a) і асоційовано з майже 2-кратним збільшенням маси міокарда лівого шлуночка (ММЛШ) у

Число вже відомих генів-тригерів мультифакторіальних захворювань на сьогодні приблизно дорівнює 50 і продовжує зростати. В останні роки ідентифіковані мутантні алелі гена *CC16*, який в гомозиготному стані є

фактором ризику виникнення астми (10% населення); мутації в гені Фактора «звертання крові», різко підвищують ризик тромбозів і алельні поліморфізми гена *TGF2*, корелюють з аномаліями внутрішньоутробного розвитку, як розщелина верхньої губи (заяча губа) і незарощування твердого неба (вовча паща).

Однак встановлено, що порівняно часті мутації структурних генів не завжди є шкідливими для організму. Іноді, вони можуть бути навіть корисними. Для ілюстрації даного положення, як правило, наводили приклад серповидноклітинної анемії в країн Середземномор'я, де мутації в глобінових генах в гетерозиготному стані слугують захистом від малярії, тоді як в гомозиготному є летальними. Даний збалансований поліморфізм нещодавно описаний і для гена муковісцидозу (*CFTR*). Експериментально доказано, що особи, гетерозиготні за мутаціями гена *CFTR*, мають властивість підвищеної несприятливості до холерного токсину. Мабуть саме цим можна пояснити факт високої частоти мутацій гена *CFTR* в популяції, незважаючи на те, що в гомозиготному стані вони призводять до тяжкого спадкового захворювання.

Нещодавно був описаний ще один варіант генного поліморфізму, який виявився асоційованим з ризиком виникнення Синдрому набутого імунodefіциту СНІД. Цей синдром провокується вірусом HIV і вважається однією з самих загрозливих інфекцій сучасності, тому що відомий стрімкий зріст її епідемії в усьому світі. Однак, було встановлено, що у певної частини інфікованого населення хвороба розвивається дуже повільно, а деякі індивіди мають до неї велику стійкість. Убуло визначено, що такі відмінності обумовлені мутацією (делецією 32 пар нуклеотидів) в гені *CCR-5*, мембранний білковий продукт якого слугує корецептором макрофаготропних штамів вірусу *HIV*. Відсутність даного білка суттєво перешкоджає у гетерозигот, або робить неможливим у гомозигот проникнення патогенного вірусу до клітини. Російські дослідники визначили частоту нульового алеля в різних популяціях Росії і країн СНГ: у росіян і татар - 25%, у узбеків - до

15%, у казахів, азербайджанців, уйгурців і тувинців - до 10%. У грузин даний алель зустрічається дуже рідко, тобто у випадках масового розповсюдження вірусу *HIV* саме ця популяція постраждає сильніше інших. Вищенаведене свідчить про принципову важливість тестування за "нульовим" алелем гена *CCR-5* для характеристики міжпопуляційних різниць чутливості в умовах можливої пандемії СНІДу. Доцільно також провести дані тести при обранні медичних кадрів в спеціалізованих диспансерах.

Розглядаючи генний поліморфізм як основу генетичної схильності, ми повинні зазначити, що багато важливих поліморфних алельних генів, які використовуються як незалежні маркери схильності до мультифакторіальної патології належать до генетичних систем крові людини, що вказує на дуже важливий механізм реалізації генетичної схильності до патологічного процесу на рівні порушень в імунному гомеостазі. Про це свідчать дослідження імунної системи у хворих багатьох нозологій, які на перший погляд не мають загально патогенезу, зокрема, серцево-судинні захворювання або онкогематологічна патологія. Але набутки медикогенетичного консультування за останні 20 років свідчать, що саме імунні порушення складають патогенетичний субстрат розвитку захворювання сумісно з генетичною компонентою схильності до конкретного патологічного процесу.

Наприклад, відомо, що основу лімфопроліферативних процесів складає неконтрольована проліферація лімфоїдних клітин, до якої залучаються лімфоцити конкретних типів і стадій розвитку. Для захворювань цієї групи характерний перебіг у формі лімфом і лейкозів. Основу лімфопроліферативних процесів досить часто складають хромосомні перебудови, або зміни експресії і мутації конкретних генів. Не дивлячись на те, що функція малигнізованих клітин частково зберігається, у зв'язку з моноклональною природою проліферації при даних захворюваннях **послаблюється ефективність імунологічного надзору**. Що це означає, що ті генетичні структури, які зазнали мутації накопичуються в організмі, оскільки імунний надзор послаблений і не відбувається розпізнавання тепер уже чужерідних за структурою і функцією клітин. Патологічні клітини накопичуються, складаючи основу пухлинного клону новоутворень. З іншого

боку відомо, що існує постійний генетичний контроль імунологічного реагування організму, який здійснює головний комплекс густосумісності і діяльність такого контролю направлена на підтримку імунного гомеостазу. Коли відбуваються відхилення в контролі імунологічних процесів, відбувається, як наслідок, відхилення від нормальних імунологічних закономірностей.

В цьому контексті особливу увагу приділяють гіпотезі згідно якої схильність до захворювань в усьому її поліморфному прояві визначається імунологічною реактивністю організму, яка, в свою чергу, контролюється Іг-генами^{1-3]}. В даному випадку локуси HLA, зчеплені з Іг-генами будуть виступати у ролі свідків асоціативного зв'язку алелей локусів Іг через функціональні зв'язки імунної системи з патологією. Так, певними дослідженнями (10) було встановлено, що ген DR3 асоційований з геном, який інгібує швидкість деградації антигену в макрофагах. Інтенсивність деградації знаходиться в зворотньому зв'язку з силою гуморальної відповіді. Насьогодні багаточисельні дослідження присвячені саме вивченню генів імунної відповіді на рівні асоціації генотипової специфічності з патологічним процесом, до якого залучені поорушення в імунному гомеостазі

Було встановлено, що ризик реалізації генетичної схильності до патологічного процесу та клінічний перебіг хронічних лімфопроліферативних захворювань (ХЛЛ, НЗЛ, ММ) на різних етапах лікування знаходиться у взаємозв'язку з молекулярно-генетичними і імуногенетичними факторами ризику формування рефрактерності до терапії, що дає підставу вважати їх прогностичними критеріями. Так, у хворих на хронічні лімфоїдні лейкозії встановлена позитивна асоціація захворювання з алелями HLA-DRB1*11, HLA-Cw*07, HLA-B*40 та алелем HLA-B*35, який вважається безумовним маркером ризику розвитку аутоімунних процесів. У хворих на ММ факторами генетичної схильності до даної патології є присутність в HLA-генотипі специфічностей HLA-Cw*06; DQB1*0501; DQB1*0601. Наявність у генотипі хворих на ММ і ХЛЛ гомозиготності за

групами генів в локусах HLA-B*, DRB1* та DQA1* є передумовою розвитку толерантності до терапії індукції незалежно від нозологічної форми захворювання.

Виходячи з позицій, що гени HLA, здійснюють контроль за імунологічною відповіддю, в першу чергу локуси HLA-DR, сприйнятливість до захворювання і перебіг патологічного процесу може бути пов'язана саме з функцією Іг- генів. Так, підвищена імунна відповідь може призводити до продукції антитіл, які перешкоджають розвитку клітинного імунітету до даного патогену. Такий же імуногенетичний механізм притаманний іншим захворюванням, патогенетичний субстрат яких складає розлади в імунному гомеостазі. ІХС. Оскільки молекули HLA відіграють центральну роль в регуляції імунної відповіді, і вже визначені механізми їх дії і спектр імуногенетичних маркерів, асоційованих з конкретними порушеннями в імунному гомеостазі, велика увага приділяється вивченню саме цих генетичних факторів схильності до різноманітним аутоімунним або інфекційним.

Таким чином, на сьогодні завдяки високим біотехнологіям дослідження генетичного контролю імунної відповіді вже досить повно описані навіть механізми за якими ці порушення відбуваються і механізми реалізації цих порушень на рівні виникнення захворювань, патогенетичним субстратом яких є порушення в імунному гомеостазі 1. Маркери системи HLA використовують в якості генетичних маркерів і інших захворювань аутоімунної природи, зокрема псоріаз, червона вовчанка ревматоїдний артрит, оскільки крім поліморфізму кодуєчих областей різних генів, поліморфні ділянки регуляторних областей також можуть бути зв'язані зі схильністю до захворювання.

Тобто, згідно сучасній уяві, система HLA, забезпечує регуляцію імунної відповіді організму на рівні взаємодії всіх імунокомпетентних клітин, шляхом розпізнавання своїх і чужерідних (в тому числі змінених

своїх клітин), запуск і реалізацію імунної відповіді, що забезпечує виживання людини на рівні індивіду і популяції в цілому в умовах дії негативних екзогенних і ендогенних чинників. Виходячи з вищезазначеного наступні розділи присвячені саме розгляданню сучасних знань в галузі імуногенетичних механізмів формування патологічних процесів на рівні мультифакторіальної патології.

8.3. Генетичний паспорт людини

Світові дані свідчать про широке застосування молекулярно-генетичних методів з метою діагностики генних хвороб, виявлення гетерозиготного носійства патологічних мутацій в сім'ях високого ризику, для досимптоматичної діагностики захворювань, а також з метою ідентифікації особистості (геномної дактилоскопії). Поступово поширюється генетичне тестування в межах предиктивної медицини. Тобто, відбувається накопичення генетичних характеристик як відносно геному конкретних індивідів, так і відносно сімейного генетичного аналізу, що призводить до формування інформаційної ДНК-бази даних, яка по суті являє собою «генетичний паспорт» для окремого індивіду, для сім'ї і для популяції в цілому. Інформація, яка закладена в цьому документі, відображає індивідуальні особливості геному, тобто особистої спадковості і дає змогу не тільки визначити генетичну схильність до того чи іншого патологічного процесу, але і надає допомогу у обранні правильного способу життя (професії, харчуванні, кліматичних умов та інше), уникнення життєвих колізій, які б негативно впливали на організм людини з позицій спадковості. «Генетичний паспорт» дозволяє також більш повно реалізувати свої вроджені генетичні здібності і складає велику цінність для нащадків з позицій генетики еволюції. Крім того, індивідуальний підхід до пацієнта з позицій визначення генетичної схильності у співставленні з інструментальними і лабораторними даними обстеження дозволяє не тільки здійснювати ранню диференційну діагностику генетично детермінованих захворювань, але і

прогнозувати ризик виникнення патологічного процесу, що розширює можливості з позицій застосування профілактичних заходів для попередження розвитку цілого спектра мультифакторіальних захворювань.

Згідно рекомендаціям ВОЗ, генетичне тестування повинно проводитись на основі добровільної згоди особи. Тобто, якщо скласти таку генетичну карту у дорослому віці, то значна частина корисної інформації відносно здоров'я дитини, генетичної схильності до конкретних захворювань, рекомендації відносно способу життя, харчування, спортивних занять, обранню професії в значній мірі буде вже загублено. Тому в майбутньому такі дослідження будуть проводити в більш ранньому віці ніж сьогодні. Актуальним є генетичне тестування для майбутніх сімей, для спортсменів-професіоналів, для вагітних жінок, для підлітків, які оберуть професію військових.

В даному аспекті цікаві дані отримані при дослідженні ключової ролі в метаболічних процесах в умовах екстремальних навантажень, в забезпеченні працездатності **ключових функціональних систем організму у співставленні з поширеністю певних поліморфізмів**. Оскільки різні алельні варіанти асоційовані з особливостями функції генів розробка персональних рекомендацій на основі генетичного паспорта спортсмена розширює можливості в оптимізації підготовки спортсмена. Дослідниками були вивчені 56 ключових поліморфних варіантів в 40 генах, розроблені тест-системи для їх аналізу у спортсменів різної спеціалізації.

Таблиця 1

**Класифікація деяких поліморфних маркерів генів
функціональних систем організму**

Гени	Поліморфізми	Функція гена, яка цікавить	Направленість

			рекомендацій
5HT2A	T102C	Психологічні особливості	Профілізація діяльності
5HTT	S/L	Психологічні особливості	спортсмена,
5HTR1A1	C-1019G	Психологічні особливості	Деятельности
CYP1A1	T6235C, A4889 G	1 фаза детоксикації	Харчування
CYP2C9	Arg144 Cys, Ile359 Le	1 фаза детоксикації	дозировки
CYP2C19	G681A	1 фаза детоксикації	медикаментів
MnSOD	Ala(-9)Val	Інактивація вільних радикалів	Харчування
MTHFR	C677T, A1298C	Обмін метионіну	
ACE	I/D	Функція серцево-судинної системи	Профілізація
AGT	M235T, T174M, G-6A	Функція серцево-судинної системи	спортсмена
GRK4	A486V	Функція серцево-судинної системи	
IL 1a, ILb	T-889C, C-511T, T3962C	Імунітет	Оптимізація
IL2	T-330G, G-166T	Імунітет	медичного

IL4	T-1098G, T-590C	Імунітет	супроводження
IL6	G-174C, G565A	Імунітет	
IL10	G-1082A, C-819T	Імунітет	
IL 12	C-1188A	Імунітет	
TNFa	G-308A, G-238A	Імунітет	
gIFN	UTR A5644T	Імунітет	
CNTF	Null mutation (G/A)	Мінеральна щільність кісткової тканини, м'язова сила	Профілізація
COL1A1	Sp I	Мінеральна щільність кісткової тканини, м'язова сила	
IGF2	Apa I (G/A	Регенерація м'язової тканини, м'язова сила	

Тобто, досить активно проводяться розробки технологій в контексті підвищення стійкості організму людини до психоемоційних та фізичних навантажень на основі дослідження генетичного поліморфізму окремих генів, які кодують різні ферменти і структурні білки. Такий генетичний паспорт для людини, зокрема для спортсмена є дуже важливим, оскільки дозволяє враховувати індивідуальні психофізіологічні особливості організму і проводити корекцію фізичних навантажень.

На сьогодні вже в багатьох діагностичних центрах світу, в тому числі і в Росії і в Україні досить широко застосовуються молекулярні методи діагностики генних хвороб для визначення сімей «високого ризику», тобто гетерозиготного носійства патологічних генів, в аспекті досимптоматичної діагностики хвороб з пізньою маніфестацією, а також для ідентифікації особистості (геномна дактилоскопія). З позицій предикативної медицини поширюється генетичне тестування генетичних поліморфізмів різних генетичних систем організму людини для визначення асоціативного зв'язку з захворюванням, що з наукових позицій розширює уявлення про генетичні механізми формування патологічного процесу і дає змогу окреслити спектр незалежних генетичних маркерів генетичної схильності до конкретних захворювань. Можна сказати, що генетичний паспорт вже існує *de facto*, а чисельність генетичних тестів, які складають його основу швидко збільшується. Важливо наголосити, що в генетичний паспорт необхідно вносити інформацію не тільки відносно генів схильності, але і дані відносно безсимптомного носійства мутацій генів найбільш часто зустрічаємих спадкових хвороб (гемофілія, муковісцидоз, фенілкетонурія та інші). Окрім того, в генетичний паспорт повинно вносити інформацію про каріотип індивіда і генотип за головним комплексом гістосумісності, що не тільки висвітлює генетичну схильність до патологій, патогенетичний субстрат яких складають порушення в імунному гомеостазі, але є обов'язковою умовою у випадках необхідності трансплантації стовбурових гемопоетичних клітин.

Ми повинні розуміти, що недостатньо проводити тільки генетичне обстеження. Наступним кроком є повноцінна висококваліфікована консультація лікаря-генетика, яка передбачає відповідні рекомендації відносно даної патології, а також відносно способу життя пацієнта. Важливим також є розробка конкретних лікувально-профілактичних рекомендацій, які направлені на запобігання реалізації захворювання.

Таким чином, на сьогодні є незаперечним фактом існування генетичної схильності до мультифакторіальної патології, основу якої складає генний поліморфізм. Індивідуальні особливості на рівні поліморфізму можуть проявлятися як фактори схильності до захворювання, або як фактори, які модифікують його клінічний фенотип. Тестування генів, асоціації алелей яких з конкретними захворюваннями вже встановлено можна вважати не тільки доцільним для предиктивної діагностики, але і перспективним в аспекті індивідуалізації терапевтичних заходів при лікуванні і можливості мінімізації ускладнень внаслідок лікування.

Питання для самоконтролю

1. Яка ознака вважається поліморфною?
2. Що таке «предиктивна» медицина і чим вона відрізняється від лікувальної?
3. Назвіть фази детоксикація ксенобіотиків. Які системи здійснюють цей процес?
4. Надайте характеристику поняттю «генетичний паспорт» людини.
5. Що таке «гени-тригери». Їх місце у формуванні патологічного процесу?

ЛІТЕРАТУРА

1. Хаитов Р.М., Алексеев Л.П. Физиологическая роль главного комплекса гистосовместимости человека // Иммунология. – 2001, №3. – с. 4-12.
2. Зарецкая Ю.М., Хамагонова Е.Г., Губарев М.И. Иммунология и иммуногенетика человека, Триада, Москва, 2002. 128 с.

3. Распределение фенотипов гаптоглобина среди населения Украины / Никольченко А.Ю., Омельченко Е.И., Гулевский А.К. и др. // Цитология и генетика . - 1997. - Т. 31. - № 1. - С. 62 – 69.
4. Данилова Е.И. Гематологическая типология и вопросы этногенеза украинского народа. - Киев, 1971. - 123 С.
5. Фогель Ф., Мотульски А. Генетика человека: В 3-х т. Т. 2: Пер. С англ.. – М.: Мир, 1990. – 336 с.
6. Garrido F. HLA and cancer// Tissue Antigens. - 1996. - Vol. 47. - P. 361-363.
7. Garrido F, Cabrera T, Concha A, Glew S, Ruiz - Cabello F, Stern P. Natural history of HLA expression during tumour development// Immunol. Today.- 1993.- Vol № 14 -10.-P. 491-499.
8. Kim IK, Bedi DS, Denecke C, Ge X, Tullius SG. Impact of innate and adaptive immunity on rejection and tolerance// Transplantation. – 2008. – V.86, N.7. – P.889-894.
9. Svejgaard A., Morling N., Platz P. et al. HLA and disease associations with special reference to mechanisms// Transplant. Proc. - 1996. - V. 28. - P. 913 - 917.
10. Прокоп О., Гёлер В. Группы крови человека: Пер. с немецкого. – М.: Медицина, 1991. – 512 с.
11. Фогель Ф., Мотульски А. Генетика человека: В 3-х т. Т. 2: Пер. С англ.. – М.: Мир, 1990. – 336 с.
12. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки. М.: Мир, 1994. Т. 2. С. 287 – 301.
13. Распределение фенотипов гаптоглобина среди населения Украины/ Никольченко А.Ю., Омельченко Е.И., Гулевский А.К. и др. // Цитология и генетика . - 1997. - Т. 31. - № 1. - С. 62 – 69.
14. Ж.М.Мінченко, О.О.Дмитренко, Д.А.Бази́ка, І.С.Дягі́ль, А.А.Чума́к, В.Г.Бєбешко. Імуногенетичні чинники в механізмах радіочутливості організму людини і ризику реалізації пострадіаційних ефектів на рівні дисфункцій і імунопоезі та формуванні соматичної патології у опромінених осіб внаслідок аварії на ЧАЕС/ в монографії „Медичні наслідки аварії на

Чорнобильській атомній електростанції// - ДІА.- Київ.-2007.- С. 413 – 422.

15. Минченко Ж.Н. Крячок И.А. Дмитренко Е.А., Шляхтиченко Т.Ю., Бебешко В.Г. Імуногенетичні аспекти формування, особливостей перебігу і ефективності лікування хворих на множинну мієлому МБ// Вісник наукових досліджень. -2005. - N 4.– С. 110-115.

16. Мінченко Ж.М., Гавриленко Т.І., Демідов С.В., Топчій Н.М. Імуногенетика. – К.: Знання, 2010. – 374 с.

9.ІМУНОГЕНЕТИКА ТА ІМУНОПАТОЛОГІЯ

Сучасна імуногенетика має два напрямки розвитку

1. Фундаментальна (теоретична) імуногенетика, яка вивчає молекулярну, біохімічну і конфірмаційну характеристики імуногенетичних структур, закономірності успадкування антигенної специфічності і роль генетичних механізмів у здійсненні імунних реакцій;

2. Прикладна (клінічна) імуногенетика, яка виічає саме антигенний поліморфізм генетичних систем крові, які забезпечують тканинну індивідуальність, порушення в імунному гомеостазі на рівні тканинної специфічності, закономірності розвитку трансплантаційного імунітету, генетичну схильність до мультифакторіальної патології, генетичну структуру конкретних популяцій, імуноконфліктні стани при трансплантації органів і тканин, при несумісних гемотрансфузіях і імуноконфліктних вагітностях.

Важко переоцінити значення нових досягнень молекулярної імуногенетики, в наслідок яких не тільки одержані прямі докази участі двох різних генів (константного і варіабельного) у кодуванні одного поліпептидного ланцюга імуноглобуліну, але й показана підроздільність варіабельного гена на просторово віддалені один від одного генні сегменти, які поєднуються у процесі дозрівання плазматичних клітин.

Імунна система є однією з найважливіших систем організму людини, головна функція якої полягає в забезпеченні розвитку й наявності імунітету. Завдяки імунній системі, тобто імунітету, організм людини стає несприйнятливим до хвороботворних мікроорганізмів (вірусів, бактерій, грибків, найпростіших, гельмінтів) і продуктів їхньої життєдіяльності.

Імунітет також захищає організм від впливу різних речовин, що несуть чужорідні властивості (наприклад, рослинні і тваринні отрути), від розвитку пухлинних клітин, у т.ч. злоякісних і від наслідків безлічі несприятливих факторів (зовнішніх і внутрішніх). Крім того, імунітет визначає кінцевий результат трансплантації органів і тканин, у т.ч. переливання крові, контролює внутрішньоутробний розвиток плода й процеси старіння.

Сутність будь-якої імунної відповіді полягає в розпізнаванні й елімінації з організму чужорідних речовин антигенної природи, що екзогенно проникають (мікроорганізми), так і ендогенно утворюються (вірусоінфіковані клітини; клітини, модифіковані ксенобіотиками, старінням; пухлинні клітини й ін.). Захист організму від чужорідних речовин здійснюється гуморальними і клітинними факторами вродженого і придбаного імунітету, що складають єдиний функціональний комплекс, доповнюючи один одного і знаходячись у постійному контакті і взаємодії.

У функціонуванні імунної системи, як і в будь-якій іншій системі організму, можуть виникнути порушення, що ведуть до розвитку захворювань, характерних, насамперед, для цієї системи. До таких порушень відносяться :

- неправильне розпізнавання чужих і своїх антигенів, що веде до розвитку аутоімунних процесів;
- гіперергічна або перекручена імунна відповідь, що веде до розвитку алергійних захворювань;

- нездатність розвивати нормальну імунну відповідь, що веде до розвитку імунодефіцитів

Таким чином, з одного боку, імунітет спрямований на підтримку генетичної сталості внутрішнього середовища організму, а також його цілісності й індивідуальності, з іншого – саме генетичний контроль (система HLA) розвитку імунологічного реагування обумовлює силу, напрямок і термін імунологічного реагування організму людини на будь який чужерідний антиген. Коли порушується генетичний контроль імунної відповіді не відбувається елімінація несумісних антигенних структур, що може призвести до накопичення останніх і утворення патологічних клонів клітин – пухлинних клонів. Крім того, порушення генетичного контролю імунної відповіді сприяє викривленню імунологічних реакцій в організмі людини і формування різних видів імунопатій.

Недостатність гуморального імунітету

Даний стан виявляється в порушенні продукції антитіл одного (IgA-селективна агаммаглобулінемія) або декількох класів. При цьому зміст антитіл у сироватці крові може знижуватися або залишатися в межах норми (у цьому випадку до деяких антигенів буде вироблятися недостатня кількість антитіл).

Антитіла не виробляються або виробляються в недостатній кількості, тому вони не зв'язують антигени (бактерії або їхні токсини) і не знешкоджують них.

Захворювання, в основі яких лежить недостатність гуморального ланцюга імунітету: X-зчеплення агаммаглобулінемія, загальний імунодефіцит, що варіює, селективний IgA-дефіцит.

Х-зчеплена агаммаглобулінемія

Хворіють тільки хлопчики (по тій же причині, по якій тільки вони страждають гемофілією). При даній патології відсутні В-клітини і плазмоцити (клітини, що виробляють антитіла), у сироватці крові можна знайти лише один вид імуноглобулінів - IgG, та й той у дуже малих кількостях (10% від норми). Тимус і Т-клітини функціонують, як у здорових.

Клініка: до 9 - 12 місячного віку захворювання не виявляється, тому що немовлята одержують захисні антитіла від матері, але після закінчення цього періоду діти починають постійно хворіти на пневмонію, гнійничковими захворюваннями шкіри й ін., від яких і вмирають.

Загальний імунодефіцит, що варіює

Хворіють переважно хлопчики. При цій патології спостерігається переважне порушення продукції IgG і IgA (не виробляються або виробляються в недостатній кількості антитіла до антигенів клітинної стінки бактерій), хоча може бути відзначена деяка неповноцінність Т-клітинного ланцюга імунітету.

Клініка: люди з даною патологією часто страждають захворюваннями, викликаними бактеріями.

Селективний IgA дефіцит

Дана патологія зустрічається досить часто (1 : 500 - 1 : 800), страждають особи як жіночої, так і чоловічої статі. Селективний (тобто вибірковий) IgA дефіцит виявляється недостатнім виробленням антитіл класу А, що

відповідають за місцевий імунітет на слизистих оболонках організму (слизова рота, трахеї, бронхів, кишечника, піхви, уретри і т.д.), тобто не дають мікроорганізмам пробратися через ці природні епітеліальні бар'єри.

Клініка: люди з даною патологією частіше інших хворіють хронічними легеневиими інфекціями, тому повинні вживати відповідних заходів для попередження їхнього розвитку.

Недостатність клітинного імунітету

Виявляється порушенням розмноження і диференціювання Т-лімфоцитів. Порушується робота Т-лімфоцитів, а отже і синтез антитіл, тому що Т-лімфоцити являються керівниками стосовно В-лімфоцитів (вони дають останнім вказівку про початок і припинення вироблення антитіл; нема Т-лімфоцитів - не працюють В-лімфоцити).

Захворювання, в основі яких лежить недостатність клітинної ланки імунітету: синдром DiGeorge, синдром оголених лімфоцитів і ін.

Синдром DiGeorge

Даний синдром зустрічається у хлопчиків і дівчаток з однаковою частотою. У хворих дітей відзначають вроджені порушення з боку серця і великих судин, гіпокальцимічну тетанію (судороги), що виникає через недорозвинення паращитовидних залоз (вони беруть участь у регуляції обміну кальцієм в організмі), відсутність нормального тимусу, може бути порушення слуху.

При синдромі DiGeorge вміст імуноглобулінів у сироватці крові знаходиться в межах норми, але продуктивність антитіл (особливо IgA і IgG) у відповідь на введення в організм антигену (бактерій, їхніх токсинів)

знижена. Вміст лімфоцитів у крові нормальний, але майже усі вони є В-клітинами (Т-лімфоцитів дуже мало).

Прогноз захворювання залежить від того, наскільки розвинена виличкова залоза (тимус). Незважаючи на те, що вона недорозвинена, за рахунок неї може забезпечуватися постачання організму Т-клітинами, а отже і робота В-клітин (вироблення антитіл).

Синдром оголених лімфоцитів

Даний синдром зустрічається у хлопчиків і дівчаток з однаковою частотою. При цій патології порушується диференціювання CD4 Т-клітин (Т-хелпери, що дають "наказ" В-клітинам синтезувати антитіла). Т-хелперів у сироватці крові багато, але вони функціонально не активні. Тому організм стає сприйнятливий до багатьох інфекцій.

Комбінована недостатність гуморального і клітинного імунітету

У цю групу входять захворювання при яких порушується проліферація (розмноження) і диференціювання В- і Т-лімфоцитів. Для цих станів характерне зниження концентрації в крові Т-клітин і імуноглобулінів (антитіл). Крім того, дану патологію часто супроводжують інші вади розвитку.

Недостатність фагоцитозу

Причиною даної патології є порушення проліферації (розмноження), диференціювання, хемотаксису (у даному випадку - "хемотаксис" - це рух клітин у напрямку до того, що вони будуть фагоцитувати [поїдати]) нейтрофілів і макрофагів і самого процесу фагоцитозу. У трохи спрощеній

формі це можна представити у вигляді схеми: нейтрофіли і макрофаги погано фагоцитують бактерії => бактерії розмножуються => організм стає сприйнятливим до інфекцій.

Недостатність комплементу

Комплемент - група білків, які циркулюють у сироватці крові і беруть участь у "підготовці" бактерій і їхніх токсинів до фагоцитозу, а також у безпосередньому руйнуванні мікроорганізмів. Недостатність комплементу приводить до того, що організмові стає важче боротися з мікроорганізмами, і він стає схильний до розвитку важких інфекційних захворювань (аж до сепсису). Недостатність комплементу може розвиватися вдруге, наприклад при системній червоній вовчанці.
Добавити з розділу колмплементу.

Оцінка імунного статусу при імунодефіцитах

Як уже відзначалося, вивчення імунного статусу при імунодефіцитах повинно включати вивчення кількості і функціональної активності основних компонентів імунної системи, що відіграють головну роль у протиінфекційному захисті організму. До них відносяться фагоцитарна система, система комплементу, Т- і В-системи імунітету. Методи, застосовувані для оцінки функціонування цих систем, умовно розділені Петровим Р. В. із співавт. (1984) на тести 1-го і 2-го рівнів. За даними цих авторів, тести 1-го рівня є орієнтованими і спрямовані на виявлення грубих дефектів в імунній системі; тести 2-го рівня є функціональними і спрямовані на ідентифікацію конкретної "поломки" в імунній системі. Ми відносимо до тестів 1-го рівня методи, спрямовані на ідентифікацію того продукту функціонування відповідної системи імунітету, що визначає її

антимікробний ефект. Тести 2-го рівня є додатковими. Вони істотно збагачують інформацію про функціонування відповідної системи імунітету.

До тестів 1-го рівня для оцінки фагоцитозу відноситься визначення:

- абсолютного числа нейтрофілів і моноцитів;
- інтенсивності поглинання мікробів нейтрофілами і моноцитами;
- здатності фагоцитів убивати мікроби.

Процес фагоцитозу складається з декількох етапів: хемотаксису, адгезії, поглинання, дегрануляції, кілінгу і руйнування об'єкту. Їхнє вивчення має визначену значимість в оцінці фагоцитарного процесу, тому що існують імунодефіцити, зв'язані з наявністю поломок практично на кожному етапі. Головним підсумком роботи нейтрофілу і моноциту є кілінг і руйнування мікроорганізму, тобто завершений фагоцитоз. Для оцінки кілінгу можна рекомендувати визначення утворення активних форм кисню в процесі фагоцитозу. Якщо немає можливості визначати активні форми кисню за допомогою хемолюмінесценції, про утворення супероксидного радикала можна судити по відновленню нітросинього тетразолію. Але в даному випадку варто пам'ятати, що кілінг мікробів у фагоциті здійснюється за допомогою як киснезалежних, так і кисненезалежних механізмів, тобто визначення активних форм кисню не дає повної інформації про цей процес.

До тестів 2-го рівня оцінки фагоцитозу можна віднести визначення:

- інтенсивності хемотаксису фагоцитів;
- експресії молекул адгезії (CD11a, CD11b, CD11c, CD18) на поверхневій мембрані нейтрофілів.

До тестів 1-го рівня оцінки В-системи імунітету можна віднести визначення:

- імуноглобулінів G, A, M у сироватці крові;
- імуноглобуліну E у сироватці крові;
- визначення відсотку й абсолютної кількості В-лімфоцитів (CD19, CD20) у периферичній крові.

Визначення рівня імуноглобулінів - це як і раніше важливий і надійний метод оцінки В-системи імунітету. Його можна вважати головним методом діагностики усіх форм імунодефіцитів, зв'язаних з біосинтезом антитіл.

До тестів 2-го рівня оцінки В-системи імунітету можна віднести визначення:

- субкласів імуноглобулінів, особливо IgG;
- секреторного IgA;
- співвідношення капа- і лямбда-ланцюгів;
- специфічних антитіл до білкових і полісахаридних антигенів;
- здатності лімфоцитів давати проліферативну відповідь на В-(стафілокок, ліпополісахарид ентеробактерій) і Т-В-(мітоген лаконоса) мітогени.

Визначення субкласів IgG представляє велику діагностичну цінність, тому що при нормальному рівні IgG можуть бути дефіцити по субкласам імуноглобулінів. У таких людей у ряді випадків спостерігаються імунодефіцитні стани, що виявляються в підвищеній інфекційній захворюваності. Так, IgG2 є субкласом імуноглобуліну G, що переважно містить антитіла проти полісахаридів інкапсульованих бактерій (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*). Тому дефіцит, зв'язаний з IgG2, а також з IgA, веде до підвищеної захворюваності респіраторними інфекціями. Порушення в співвідношенні субкласів IgA і в співвідношенні капа- і лямбда-ланцюгів також можуть бути причиною імунодефіцитних станів. Важливу інформацію про стан гуморального

імунітету дає визначення антитіл до бактеріальних білкових і полісахаридних антигенів, тому що ступінь захисту організму від даної конкретної інфекції залежить не від загального рівня імуноглобулінів, а від кількості антитіл до її збудника. Особливо наочно демонструють це дані, що свідчать про те, що розвиток хронічних синуситів і отитів залежить тільки від дефіциту IgG3-антитіл до *Moraxella catarrhalis* у таких хворих. Іншим наочним прикладом важливості визначення специфічних антитіл можуть служити дані, що доводять, що в осіб, які страждають частими інфекційними процесами дихальних шляхів, при нормальному рівні всіх класів імуноглобулінів істотно знижений титр антитіл до *Haemophilus influenzae*.

Цінну інформацію про стан гуморального імунітету можна одержати не тільки при визначенні рівня імуноглобулінів, їхніх субкласів або антитіл до визначених антигенів, але і шляхом вивчення їхніх функціональних властивостей. До них у першу чергу варто віднести таку властивість антитіл, як афінність, від якого в значній мірі залежить міцність взаємодії антитіл з антигеном. Продукція низькоафінних антитіл може вести до розвитку імунодефіцитного стану. Нами було доведено, що в осіб, часто і довгостроково страждаючими захворюваннями дихального тракту, при нормальному рівні імуноглобулінів, трохи підвищеному рівні антитіл до пептидоглікану *St.aureus*, *Str.pneumoniae*, *Br.catarrhalis*, афінність антитіл до цих мікробів істотно знижена.

Важливою функціональною властивістю є опсонізуюча активність імуноглобулінів. Як уже відзначалася, нейтрофіл - це центральна фігура в захисті організму від позаклітинних мікроорганізмів. Однак виконання ними цієї функції в значній мірі залежить від опсонізуючої активності сироватки крові, де імуноглобулінам і компонентам належить ведуча роль у цій активності. При дослідженні 30 хворих з бактеріємією, викликаною грамнегативними бактеріями, було встановлено, що нейтрофіли цих хворих мали знижену здатність до кілінгу *E.coli*. Це

залежало тільки від нездатності сироватки крові хворих до опсонізації, тому що додавання до нейтрофілів цих хворих сироватки здорових донорів цілком відновлювало здатність нейтрофілів до кілінгу *E.coli*.

Під час оцінки В-системи імунітету можна рекомендувати тести 1-го рівня визначення числа В-лімфоцитів і рівня імуноглобулінів. Тому що останні є головним кінцевим продуктом В-клітин і це дозволяє оцінити В-систему імунітету як з кількісної, так і з функціональної сторони. Такий підхід поки важко здійснити у відношенні до Т-системи імунітету, тому що головним кінцевим продуктом Т-лімфоцитів є цитокіни, а системи для їхнього визначення поки ще мало доступні практичним лабораторіям клінічної імунології. Проте оцінка функціональної активності Т-системи імунітету представляє задачу виняткової важливості, тому що вона може бути знижена, іноді навіть істотно, при нормальній кількості Т-кліток і їхній субпопуляції. Методи оцінки функціональної активності Т-лімфоцитів досить складні.

Найпростішим з них, на наш погляд, є реакція бласт-трансформації з застосуванням двох основних Т-мітогенів: фітогемагглютиніну і конканаваліну А. Проліферативна відповідь Т-лімфоцитів на мітогени знижена практично при всіх хронічних інфекційно-запальних процесах, зловиясних захворюваннях, особливо кровотворної системи; при усіх видах імунодепресивної терапії, при СНІД і при всіх первинних Т-клітинних імунодефіцитах.

За допомогою скринінг-тестів можна виявити наступні види ПІД:

- Х-зчеплену агаммаглобулінемію;
- загальну варіабельну імунологічну недостатність (ЗВІН);
- гіпер-IgM-синдром;
- селективний дефіцит IgA;
- важкий комбінований імунодефіцит;

синдром Віскотта-Олдрича;

- дефіцити в системі комплементу.

Особливим, на наш погляд, є питання про застосування шкірних проб у діагностиці Т-клітинних імунодефіцитів. Як уже відзначалося, за рекомендацією закордонних фахівців і відповідно до рекомендацій експертів ВОЗ вони застосовуються в якості скринуючих або тестів 1-го рівня для оцінки Т-системи імунітету. Це зв'язано з двома обставинами. По-перше, шкірні проби - це найпростіші й у той же час інформативні тести, що дозволяють оцінити функціональну активність Т-лімфоцитів. Позитивні шкірні тести з деякими мікробними антигенами з великим ступенем ймовірності дозволяють виключити наявність у хворого Т-клітинного імунодефіциту. По-друге, рядом західних фірм розроблені системи для постановки шкірних проб, що включають основні антигени для визначення Т-клітинного імунітету. Це дозволяє в строго контрольованих умовах оцінити функціональну активність Т-системи імунітету.

Оцінка імунної системи в людей з ознаками ВІД може зустріти ряд труднощів, і насамперед зв'язаних з оцінкою причинно-наслідкових відносин. Нерідко ті зміни, що реєструються при аналізі параметрів імунної системи, є наслідком, а не причиною патологічного процесу. Так, в осіб, які часто і довгостроково хворіють (ЧДБ) респіраторними інфекціями, рівень антитіл до основних бактеріальних збудників цих інфекцій різко підвищений. Аналогічна ситуація спостерігається в хворих на СНІД, що мають інфекційні ускладнення з боку респіраторного тракту. Природно, що підвищення титрів антитіл до збудників респіраторних інфекцій як у хворі групи ЧДБ, так і в хворих СНІД є наслідком активації імунної системи в результаті інфекційно-запального процесу в респіраторному тракті. Ще одні труднощі, з яким лікар може зіштовхнутися при оцінці імунного статусу в хворих із хронічними інфекційно-запальними процесами, - це вибір адекватного методичного підходу і вибір

адекватного матеріалу для дослідження. Хоча досягнення теоретичної і клінічної імунології важко переоцінити і лікар-імунолог має у своєму розпорядженні великий набір сучасних методик для визначення стану імунної системи, усе-таки варто визнати, що ми усе ще мало знаємо про функціонування імунної системи в цілому. Недостатньо вивчений взаємозв'язок між розвитком тих або інших захворювань і порушенням різних ланок імунітету. Тому нерідко при використанні стандартних методів оцінки фагоцитозу, Т- і В-систем імунітету в хворих із хронічними інфекційно-запальними процесами лікар не одержує переконливої інформації про порушення імунітету. Так, наприклад, при визначенні імунного статусу по зазначеним вище параметрам у хворих із хронічними захворюваннями придаткових навколо носових пазух ми не виявили істотних відхилень. Разом з тим виявилось, що в таких хворих мається дефект по синтезі IgG3-антитіл до *Branhamella catarrhalis*, і це є головною причиною розвитку основного патологічного процесу. Як уже відзначалося, в осіб, що страждають частими інфекційними захворюваннями бронхолегеневого апарату, підвищений титр антитіл до збудників цих захворювань. Виявилось, що афінність цих антитіл у значної частини хворих істотно знижена. А низькоафінні антитіла малоефективні в елімінації збудника з організму, і це може бути однією з причин хронічного перебігу інфекційного процесу. Можна привести багато таких прикладів. В усіх цих випадках є клінічно визначені ознаки порушення імунної системи, але вони не завжди переконливо підтверджуються за допомогою імунолабораторних методів дослідження.

Пропонуємо розглядати хронічні, рецидивуючі, що важко піддаються традиційному лікуванню інфекційно-запальні процеси всіляких локалізацій, що виявляються в дорослих хворих, як прояв вторинного імунодефіцитного стану, незалежно від того, виявлені чи ні зміни в імунній системі за допомогою використаних у даній лабораторії тестів; тобто розглядати в даних випадках ВіД як чисто клінічне поняття. У нас

немає ніяких сумнівів, що наявність хронічного інфекційно-запального процесу є наслідком якоїсь поломки в одному або декількох компонентах імунної системи, що здійснюють захист організму від інфекції. І якщо ці поломки не виявлені, те це могло бути, як тільки що вказувалося, наслідком неадекватного методичного підходу, використання неадекватного матеріалу для дослідження або неможливістю ідентифікувати наявну поломку на даному етапі розвитку науки. Типовим прикладом останнього положення може служити LAD-синдром, що полягає в порушенні експресії молекул адгезії на фагоцитарних клітинах. Його виявлення стало можливим тільки завдяки виникненню гібридної технології і появі моноклональних антитіл.

У той же слід усвідомити, що в основі розвитку спонтанної форми ВІД повинні лежати якісь конкретні причини. Щоб розглянути ці причини, доречно ще раз згадати, що імунітет людини є складною багатокомпонентною системою й у захисті організму від інфекції беруть участь фактори як вродженої резистентності, так і придбаного імунітету. На ранніх етапах розвитку інфекційного процесу - у перші 96 годин - захист організму від інфекційного агента здійснюється сукупністю неспецифічних факторів імунітету, а саме: системою комплементу, білками гострої фази, монокінами, фагоцитами, природними кілерами і т.д. Можливо, що дефект однієї з цих систем може якийсь час не виявлятися клінічно у вигляді підвищеної інфекційної захворюваності, тому що всі інші компоненти імунітету знаходяться у нормальному функціональному стані і компенсують цей дефект. Однак відбуваються з часом і під впливом різних несприятливих факторів зміни в цих компенсаторних компонентах, нехай навіть не дуже значні, вони можуть давати кумулятивний ефект, що веде до фенотипового прояву первинного дефекту і розвитку підвищеної захворюваності. Можна припустити, що в основі багатьох, а може бути практично і всіх клінічних форм ВІД, що виявляються в дорослих у вигляді підвищеної інфекційної захворюваності, лежить первинна імунологічна

недостатність якогось компонента імунної системи, компенсована до певного часу за рахунок нормальної або високої функціональної активності інших компонентів цієї системи. Підтвердженням такої можливості може служити загальна варіабельна імунна недостатність, що найчастіше виявляється в хронічних, рецидивуючих інфекціях бронхолегеневого апарату і придаткових пазух носа. Для цього захворювання є характерним зниження рівня всіх класів імуноглобулінів. У ЗВІН існує два піки: перший пік розвивається між 6-10 роками, другий - між 26-30 роками, причому до розвитку захворювання ці хворі є практично здоровими людьми. Мається чимало доказів того, що дефект гуморального імунітету в хворих ЗВІН має генетичне походження. Отже, цей дефект до визначеного часу був компенсований за рахунок нормальної або підвищеної функціональної активності інших компонентів імунної системи, що забезпечують захист організму від інфекції.

Крім КЛІУНІА мається ряд хвороб, що відносяться до ПІД, але іноді виявляються клінічно в дорослому віці. До них відносяться селективний ІgА-дефіцит, дефіцит субкласів ІgG, дефіцит системи комплементу. Описано випадки первинного прояву в дорослих форм ПІД, типових тільки для дитячого віку. До них відносяться дефіцит аденозиндезамінази, синдром Віскотта-Олдрича, Х-зчеплена агаммаглобулінія. Як правило, у цих випадках відстрочене настання симптомів захворювання є результатом наявності в даного індивідуума помірного генетичного дефекту. Але не можна виключити і компенсаторної корекції первинного дефекту за рахунок інших компонентів імунітету. Їхня зміна згодом і дозволяє клінічно проявитися первинному імунодефіциту, нехай навіть існують легкі дефекти імунної системи.

Застосування імуномодуляторів при імунодефіцитах

Імуномодуюча терапія є неефективною або малоефективною при ПІД. Основні методи їхнього лікування - це антимікробна і заміщена терапія. За кордоном застосовується реконструктивна терапія, що полягає в

пересадженні хворим дітям кісткового мозку. Також інтенсивно розробляються методи генної терапії.

Застосування імуномодуляторів більш виправдане і доцільне при ВІД. Призначення останніх повинне завжди проводитися на підставі клінічного й імунологічного обстеження. У залежності від результатів цього обстеження можна виділити дві групи людей:

- як такі, що мають клінічні ознаки порушення, що мають імунітету в сполученні з виявленими за допомогою імунологічних методів конкретними змінами його параметрів;
- як такі, що мають клінічні ознаки порушення імунітету без зміни параметрів імунітету.

Головним критерієм при призначенні імуномодуляторів є клінічна картина. Імуномодулятори можна (або доцільно) використовувати в комплексній терапії хворих як першої, так і другої груп. Виникає питання, які конкретно імуномодулятори варто призначати при наявності ознак ВІД? Особливо гостро це питання встає в хворих без виявлених відхилень в імунній системі. Для того щоб відповісти на це питання, варто коротко розібрати основні механізми антиінфекційного захисту, тому що основним проявом імунодефіцитів, як уже відзначалося, є підвищена інфекційна захворюваність. Першочергова мета застосування імуномодуляторів у хворих з ознаками ВІД - це підвищення антиінфекційної резистентності організму.

Умовно всі мікроорганізми можна розділити на позаклітинні і внутрішньоклітинні. Головними ефекторними клітинами в боротьбі з позаклітинними збудниками є нейтрофіли. Їх поглинальна і бактерицидна функції різко підсилюються в присутності комплементу і IgG, а також при їхній активації фактором некрозу пухлин - (ФНП), інтерлейкином-1 (МУЛ), МУЛ-6 і іншими цитокінами, що продукують макрофаги, НК-клітинами і Т-лімфоцитами. Головними ефекторними клітинами в боротьбі

з внутрішньоклітинними збудниками є макрофаги, NK-клітини і Т-лімфоцити. Їх антибактеріальні і цитотоксичні властивості різко підвищуються під впливом інтерферонів, ФНО, і інших цитокінів, що продукуються після активації антигенами збудника цих же трьох популяцій клітин. Першою клітиною, з якою зустрічається збудник, що переборов слизові або шкірні покриви, є тканинний макрофаг. Макрофаг, який захопив мікроб, активується і синтезує ряд монокінів, що підвищують функціональну активність нових моноцитів/макрофагів, нейтрофілів і NK-клітин. Цей макрофаг, розщепивши за допомогою своєї ферментної системи мікроорганізм, представляє його антигенні детермінанти Т- і В-лімфоцитам, ініціюючи тим самим розвиток гуморальної і клітинної відповідей і продукуючі деякі цитокіни, необхідні для їхнього розвитку.

Як поглинальна, так і антибактеріальна активність фагоцитарних клітин залежить від функціональної активності Т-лімфоцитів і, конкретно, від їхньої здатності продукувати цитокіни, що озброюють ці клітини. Тому імуномодулятори з переважним впливом на Т-лімфоцити і індукуючи в них синтез таких цитокінів будуть стимулювати функціональну активність нейтрофільних лейкоцитів і клітин ММС, тобто активувати антиінфекційний захист організму. До імуномодуляторів, що діють на Т-систему імунітету, відноситься ряд препаратів, отриманих з тимусу великої рогатої худоби, а також їхній родоначальник - тактивин. До імуномодуляторів останнього покоління з таким ефектом відносяться мієлопід (його фракція МП-1) і імунофан. Якщо розглядати макрофаг як центральну клітину в активації імунної системи, то при застосуванні імуномодуляторів з переважним впливом на цю клітину ми здійснюємо активацію імунної системи, що умовно можна позначити ту, що йде від центра до периферії. Застосовуючи імуномодулятори з переважною дією на Т-систему імунітету, ми здійснюємо активацію імунітету в напрямку, зворотному природному рухові активаційного сигналу, тобто мова йде про

відцентрову активацію. В остаточному підсумку починає рухатися вся імунна система, у результаті чого підвищується антиінфекційний захист організму. Величезна клінічна практика показує, що обидва види активації імунітету можуть з успіхом застосовуватися в комплексному лікуванні хворих з ВІД. Особливо наочним прикладом є застосування імуномодуляторів для лікування хірургічних інфекцій, що можуть бути типовим прикладом індукованої форми ВІД.

Практично всі препарати, що впливають на імунітет і дозволені до медичного застосування (левамізол, продігіозан, пірогенал, нуклеїнат натрію, діуцифон, тактивін, тимоген і ін.), були використані для лікування цих інфекцій, і усі вони в цілому показали непогані клінічні результати. В даний час лікар-імунолог має великий вибір імуномодуляторів для лікування ВІД, і тільки після застосування в клінічній практиці в остаточному підсумку будуть відібрані найбільш ефективні препарати, що, як аспірин, серцеві глікозиди, антибіотики й ін., надовго ввійдуть в арсенал лікаря-імунолога. Як правило, при хронічних інфекційно-запальних процесах у стадії загострення лікар призначає антибіотики. В цих випадках є доцільним також одночасне призначення імуномодуляторів. При одночасному застосуванні антибіотика і імуномодуляторів досягається більший терапевтичний ефект, чим при їхньому роздільному введенні.

Антибіотик знищує або пригнічує функціональну активність збудника; імуномодулятор прямо (поліоксидоній, лікопід, міелопід) або опосередковано (тактивин, имунофан і ін.) підвищує функціональну активність фагоцитів, підсилюючи їхній бактерицидний ефект. По збуднику захворювання наноситься подвійний удар, за рахунок чого і досягається велика ефективність комплексного лікування.

9.1 Генетичні системи крові людини

Загальна характеристика

Історично дослідження структури, функцій, специфічності, спадкового наслідування генетичних систем крові започатковано з відкриття групових ізоантигенів еритроцитів. В 1901 році Лайндштейнером і Вінером була відкрита перша генетична система крові АВО, завдяки чому класична імунологія отримала новий фундаментальний напрямок у вивченні механізмів формування і реалізації імунної відповіді на чужорідні агенти різного походження, яка отримала назву - науки про ізоантигени і антитіла організму людини. Великий внесок в цю галузь імунології зроблено вітчизняними вченими, зокрема І.І.Мечніковим, який ще в 1900 році розробив цілу програму в дослідженні антигенних властивостей еритроцитів, що дало змогу підтвердити його погляд на імунітет як на загально біологічну властивість організму, а не як окрему функцію захисту від інфекції. Ще в той час в його лабораторії були отримані перші специфічні сироватки – антилейкоцитарні. Фактично, ці результати дали змогу вченим висунути припущення відносно можливості знайти специфічні антитіла для будь-якої категорії клітин. З 1958 року, коли французький дослідник Ж.Доссе відкрив і описав перший антиген гістосумісності Мас, почалась нова наукова епоха класичної імунології - вивчення імунофенотипу і антигенної специфічності імунокомпетентних клітин. Саме завдяки швидкому розвитку біотехнологій і дослідницької роботи багатьох лабораторій в різних країнах, була підтверджена гіпотеза про генетичну детермінованість антигенів гістосумісності, яка має певну організацію – кожний з генів, який складає комплекс гістосумісності, має своє функціональне представництво на клітинній мембрані у вигляді антигена гістосумісності з певною специфічністю. Були висвітлені нові аспекти механізмів антигенного диференціювання на рівні некомпітованих і частково компітованих гемопоетичних клітин.

Насьогодні відомо, що антигенне диференціювання не обмежується виключно форменими елементами крові, а розповсюджується і на всі інші клітини організму, наприклад: сперматозоїди, сироваткові білки, секрети та ін. Тому, обмежувати поняття антигенного диференціювання організму виключно „групами крові” не є точною характеристикою цього явища.

Наявність внутрішньовидового біохімічного антигенного диференціювання притаманне не тільки організму людини. Це явище має загально біологічний характер. Антигенні відмінності всередині виду свідчать в певній мірі про те, що самі види продовжують розвиватися еволюційно у відношенні своєї біохімічної антигенної структури, створюючи велику різноманітність внутрішньовидових антигенних властивостей. Ми не маємо підстав для сумнівів в тому, що причиною створення внутрішньовидових біохімічних ознак антигенних структур є чинники зовнішнього середовища. Під впливом останніх склалися різноманітні антигенні структури, які закріплювались спадково і передавались нащадкам.

Сьогодні, вже за сучасною номенклатурою еритроцитарних антигенів, розробленою і оприлюдненою Міжнародним товариством переливання крові, (ISBT) понад 250 груп крові, які об'єднані в 25 систем. І кожна з цих систем є поліморфною.

Таблиця

Перелік систем антигенів еритроцитів

Назва системи	ISBTсимвол	Номер системи	Кількість антигенів
1	2	3	4
ABO	ABO	001	4
MNS	MNS	002	43
P	P1	003	1
Rh	RH	004	48
Lutheran	LU	005	19
Kell	KEL	006	24
Lewis	LE	007	6

Daffy	FY	008	6
Kidd	JK	009	3
Diego	DI	010	21
Yt (Cartwright)	YT	011	2
Xg	XG	012	1
Scianna	SC	013	4
Dombrock	DO	014	5
Colton	CO	015	3
Landsteiner-Wiener	LW	016	3
Chido-Rodgers	CH/RG	017	7
1	2	3	4
Hh	H	018	1
Kx	KX	019	1
Gerbrich	GE	020	7
Cromer	CROM	021	11
Knops	KN	022	8
Indian	IN	023	2
Ok	OK	024	1
Raph	RAPH	025	1
JMH	JMH	026	1
I	I	027	1
Globoside	GLOB	028	1
GIL	GIL	029	1

Згідно номенклатури ISBT (табл.4.1) системам антигенів еритроцитів призначені трьохзначні номери від 001 (система ABO) і далі в залежності від року відкриття. Всі антигени всередині системи також мають трьохзначні номери. Таким чином, при ідентифікації антигену певної системи еритроцитів для позначання використовують шестизначний номер: перші три цифри – номер системи антигенів; другі три цифри – порядковий номер

антигену саме в системі. Нова номенклатура антигенів даних систем не відмінняє загальноприйняте літерне позначання антигену. **Основною ознакою антигенів еритроцитів в системі є загальність генів, які їх контролюють. Було доведено, що мозаїка специфічностей антигенних детермінант групових антигенів знаходиться в безпосередній залежності від генетики групових антигенів. Тобто, спектр специфічностей ізольованих антигенів залежить від алельності системи. Алельність системи, в свою чергу, обумовлена генетикою групових антигенів, згідно якої гени еритроцитів можуть зазнавати мутації.**

Якщо мутація поодинокі – це система двох алельних генів: Kell, Daffy, Kidd;

Множинні мутації – ознака системи, яка утворена парою алельних генів – ABO;

Є системи, які утворені декількома алельними парами: MNSs, Rh-Hr.

Генотип груп крові є інтерпретацією фенотипу еритроцитів, оскільки самі еритроцити генотипувати неможливо в зв'язку з тим, що **еритроцити не мають ядра. В зв'язку з цим серологічні тести виявляють наявність саме антигенів.**

Відомо, що гомозиготними вважаються індивіди з двома ідентичними генами, а гетерозиготними є індивіди з двома різними генами. Дані терміни не використовуються по відношенню до еритроцитів тому, що вони характеризують генетичну ситуацію. При характеристиці гомо- або гетерозиготності для еритроцитів прийнято говорити: „еритроцити від осіб, які є “А гомозиготами” і не можна казати – “гомозиготні еритроцити А”. За номенклатурою гени, які кодують еритроцитарні антигени позначаються тими ж символами, але курсивом. Наприклад, ген, який кодує антиген **D**, позначається ***RHD***. Серед генетичних систем еритроцитів є система **Xg**, антигени якої на відміну від усіх інших систем кодуються генами, розташованими не на аутосомах, а на статевій X хромосомі, тому ці групові антигени називають зчепленими зі статтю.

Даний розділ присвячений розгляду антигенного поліморфізму клітин крові людини, зокрема генетичних систем еритроцитів, який відіграє важливу роль в забезпеченні стабільності імунного гомеостазу. Саме інтенсивність антигензалежного антитілогенезу, авидність продукованих антитіл, ступінь ізосенсибілізації організму характеризують імунологічні порушення, викликані ізоімунізацією до тканинних антигенів. Тобто, імуногенетичні аспекти поліморфізму генетичних систем крові вміщують в себе і ізосерологічну характеристику продукованих антитіл, що є необхідною умовою оцінки специфічності і активності антитілогенезу з позицій загальної імунології. Оскільки антигени генетичних систем крові є в імунологічному розумінні повноцінними антигенами, то розглядати закономірності імунологічного реагування організму людини на екзогенне втручання інорідних агентів є загальним і для повноцінних антигенів іншого походження.

Таким чином, імунологія ізоантигенів і ізоантитіл виникла в тісному зв'язку з розвитком загальної імунології і стала її розділом вивчення якого базується на основних категоріях імунологічних понять – антигени, антитіла, специфічність і інші, які мають виключне значення при дослідженні ізоантигенного диференціювання організму людини.

2.2. Ізоантигени і ізоантитіла

Поняття „**антиген**” було сформульовано Deutsch, 1899, яке з того часу стало загальноприйнятим. За даним поняттям **антиген є речовиною, яка має дві основні властивості: здатність викликати утворення антитіл поза шлунково-кишковим трактом і здатність з'єднуватись з антитілами.**

Антигени, яким властиві саме ці якості мають назву **повноцінних антигенів**. Антигени, які мають лише здатність до з'єднання з антитілами мають назву – **неповноцінних**. Виходячи з цього поняття, всі антигени груп крові людини є **повноцінними антигенами**.

Згідно законам класичної імунології імунологічне реагування організму на чужорідний агент відбувається на рівні двох тісно пов'язаних між собою ланок імунного гомеостазу – на рівні клітинного реагування і на рівні синтезу специфічних антитіл. Сама поява антитіл є, по суті, заключним етапом цілої низки клітинних, міжклітинних і молекулярних взаємодій, які відбуваються в певній послідовності.

Схематично цей процес можна представити таким чином:

- *розпізнавання антигену Т-клітинами і перехід останніх в активований стан;*
- *взаємодія Т-х-клітин з антигенпрезентуючими В-клітинами;*
- *проліферація активованих В-лімфоцитів і диференціювання останніх в антитілосинтезуючі клітини;*
- *синтез специфічних антитіл;*

Таким чином, синтез специфічних антитіл є заключним етапом імунологічного реагування організму і класифікований як **гуморальний імунітет**.

В даному розділі ми розглядаємо виключно імуногенетику основних генетичних систем крові, але повинні мати на увазі, що ізоантигенне диференціювання організму не обмежується лише форменими елементами крові, а розповсюджується і на інші клітини, наприклад: сперматозоїди, тканини органів, білки сироватки крові, різні секрети і екскрети – слину, шлунковий сік, жовч, амніотичну рідину. **Розрізняють повноцінні і неповноцінні антигени.**

Повноцінні антигени за хімічною природою є білками (за винятком протамінів і гістонів), які мають виражені основні властивості, а також желатину, білка, який є продуктом гідролізу колагену. При гідролітичному розчепленні білків, а також рацемізації (обробки лужними розчинами) вони втрачають свою здібність викликати продукцію антитіл. Амінокислоти антигенних властивостей не мають. Окрім білків повноцінними антигенами є високомолекулярні вуглеводи – полісахариди. Ліпіди, які відокремлені від білків, мають властивості **неповноцінних антигенів**.

Ще дослідженнями Ландштейнера та інших дослідників було показано, що специфічність антигену визначається не всією білковою молекулою, а лише певною її частиною, яка є активною хімічною групою і відповідає саме за специфічність. Ця група була визначена як **детермінантна група**, або **антигенна детермінанта**.

У білкових антигенів функцію антигенних детермінант несуть різні комбінації амінокислот, у комплексних – вуглеводи. Так наприклад, у детермінанти антигену Н важливу функцію виконує 1-фукоза, в детермінанті групового антигену А цю функцію несе N-ацетилгалактозамін, в детермінанті В – d-галактоза. Таким чином, антигенні детермінанти можуть бути різними за хімічним складом і структурою.

Роботами Landsteiner було також показано, що антигенна детермінанта може бути отримана штучно при йодуванні, хлоруванні і діазотуванні білкових антигенів, але за даних умов отримані білки представляють собою антигени з новими специфічними детермінантними групами

Можливе отримання **кон'югованого антигену**. Наприклад, якщо до метанілової кислоти приєднати білок коней, остання починає виконувати в ньому функцію антигенної детермінанти. Антитіла, отримані до такого кон'югованого антигену, будуть реагувати з будь-яким білком, до якого приєднана метанілова кислота. Дана кислота сама по собі, без кон'югації з білками, також може реагувати з відповідними антитілами і нейтралізувати їх, але без зовнішнього прояву цієї реакції. Зовнішньо ця імунологічна реакція може бути визначена лише у випадку сполучення з будь-якою високомолекулярною речовиною, наприклад, ліпідом, або полісахарідом. Такий комплекс антигенної детермінанти має назву – **гаптен**. Наявність в гаптені антигенної детермінанти обумовлює високу специфічність антигену в різних імунологічних реакціях, але за відсутністю білка, гаптен сам не може викликати продукцію антитіл, тобто, він є **неповноцінним антигеном**. Приєднання до гаптена білка (в даному випадку цей білок має назву „шлепер” - носій) додає йому властивості повноцінного антигену.

Антигенність різних речовин неоднакова. Вона залежить від природи саме антигену, імуногенних властивостей виду і індивідуальних особливостей організму. Основу імунологічного реагування організму складає саме поняття чужерідності по відношенню до антигену. Чим більш проявлена неспорідненість до антигену, тим скоріше і активніше продукуються специфічні антитіла. Це добре проілюстровано на прикладі видового співвідношення: отримати ізоімунні антитіла у антропоїдної мавпи по відношенню до сироваткових білків людини дуже складно, тоді як від кроликів їх отримати досить легко.

Специфічність групових антигенів визначають полісахариди, з яких саме і побудовані їх антигенні детермінанти. Строма кожного еритроциту вміщує в себе велику кількість різних антигенів і за структурою і за специфічністю. Так, на поверхні еритроцитів знаходяться гетерогенні антигени, тобто загальні для людини і для тварин; знаходяться також і видоспецифічні антигени, зокрема, ідентичні сироватковим білкам; строма еритроцитів представлена великою кількістю ізоантигенів внутрішньовидових групоспецифічних ознак людини. Їх кількість значно перевищує кількість вже визначених специфічностей, різні сполучення яких і дають досить велику кількість біохімічних структур, які притаманні людині.

Розміщені антигени на поверхні еритроцитів не за єдиним принципом, що і робить необхідним застосування в дослідженнях різних методів ідентифікації, зокрема, в певних випадках проведення попередньої обробки еритроцитів пепсинами.

Нездатність організму продукувати антитіла до антигенів, специфічні детермінанти яких є ідентичними до антигенних детермінант самого організму є твердо встановленим правилом. Організм може синтезувати ізоантитіла тільки при умові відсутності у нього антигенної детермінанти, яку несе антиген.

Але, на сьогодні представлена достатня кількість фактів, які свідчать про можливість викривлення імунологічних реакцій і утворення антитіл по відношенню до антигенів особистих клітин і тканин. Це явище відносять до

розряду патологічних станів. Вважається, що здоровий організм не має клонів клітин, які продукують антитіла проти особистих компонентів. Реакцію можна назвати аутоімунною, якщо імунокомпетентні клітини впливають на нормальні компоненти організму.

Інколи в організмі можуть з'явитись нові клони клітин, які починають продукувати антитіла до власних антигенів, тобто аутоантитіла, які і складають причину аутоагресивних захворювань. Як приклад добре вивчених патологій можна навести надбану гемолітичну анемію. Відомо, що коли особисті антигенні речовини піддати впливу вірусів, бактерій, лікарських препаратів, фізико-хімічних чинників, то можливе виникнення антитіл до цих змінних комплексів. Відносно певних генетичних структур крові, зокрема еритроцитів, вважається, що неушкоджені еритроцити не можуть мати ауто антигенних властивостей.

Мають місце також інші гіпотези. Наприклад, деякі автори вважають, що продукція аутоантитіл здійснюється не як результат реагування організму на аутоантигени, а внаслідок надлишкової продукції глобулінів (оскільки антитіла є білками глобулінової природи) з властивостями аутоантитіл, які можуть з'явитися в організмі людини і в нормальних умовах, але в невеликій кількості.

Вважають за можливе також, що вплив екзогенних і ендогенних чинників може стати причиною змін у біосинтезі білків, зокрема - γ -глобулінів, які набувають властивості з'єднуватись як з різними клітинними елементами самого організму (аутоантитіла), так і з клітинними елементами інших здорових осіб (ізоантитіла). Деякі антитіла з'являються в плазмі людини без явного контакту з відповідним антигеном. Існує декілька поглядів на це питання: одні автори вважають, що такий контакт відбувається непомітно, інші вважають, що такі антитіла є генетичними елементами, титр яких дорівнює титру антигенів.

Успадкування антигенної специфічності антигенів еритроцитів усіх генетичних систем здійснюється за кодомінантним типом, загальний принцип якого наведений на рис. :

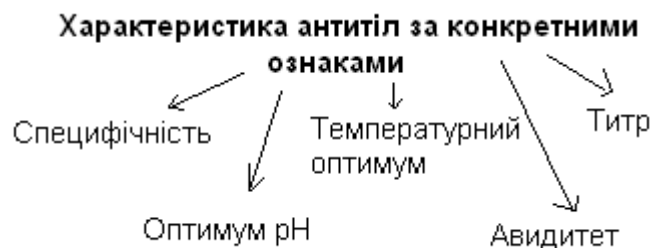
Під полігенією розуміють наявність декількох неалельних близькозчеплених генів, які контролюють ізогенні ознаки (на рис. A1, B1, C1 або A2, B2, C2).

У випадку кодомінантного успадкування, сполучення поліморфізму і полігенії створює набір фенотипових ознак, які визначають індивідуальність осіб виду (на нижній частині рисунку для простоти розуміння наведено спадкування лише двох полігенних і двох поліморфних генів). Схема демонструє проявлення індивідуальності потомства за гено- і фенотипом.

Антитіла

Антитіла являють собою сироваткові білки глобулінової природи, які мають здатність утворювати специфічні комплекси з відповідними антигенами.

Антитіла характеризують за конкретними ознаками:



Специфічність, в силу якої антитіла можуть фіксуватись тільки на відповідних антигенах.

Авидитет (спорідненість), який характеризує швидкість фіксації на відповідному антигені і силу серологічної реакції. Вірогідність дисоціації комплексу антиген-антитіло зворотно пропорційне їх авидитету.

Температурний оптимум є відмінним для конкретних антитіл. Окремі з них діють лише при низькій температурі (холодові); інші при температурі тіла (теплові). Максимальна температура, при якій антитіла зберігають свою активність визначає їх термічну амплітуду.

Оптимум рН;

Титр – найбільше розведення сироватки, яка вміщує антитіла, при якому ще їх дія може бути визначена.

Антитіла розрізняють за механізмом їх взаємодії з антигенами. Так, антитіла, які нейтралізують токсини бактеріального, тваринного, або рослинного походження мають назву **антитоксини**, а антитіла, які мають здібність осаджувати антигени – **преципітини**. **Аглютинінами** називають антитіла, які мають здібність викликати аглютинацію мікробів, еритроцитів і інших клітин крові і організму. Розрізняють багато варіантів антитіл, які розчиняють корпускулярні елементи: **гемолізینی, бактеріолізینی, цитолізینی та інші**. **Гемолізینی** зустрічаються значно рідше ніж аглютиніни, їх дія проявляється в лізисі клітини. **Опсоніни** сприяють фагоцитозу еритроцитів лейкоцитами.

За механізмом синтезу розрізняють природні і ізоіmunні антитіла: характерною серологічною ознакою **природних антитіл** є той факт, що їх температурний оптимум є нижчим за температуру тіла. На практиці це має велике значення, оскільки при ідентифікації таких антитіл їх титр буде тим вище чим більше температура реакції буде наближатись до 16 °С. Тобто це і є холодові антитіла.

Класичним прикладом природних антитіл є ізогемаглютиніни. За нормальних умов в крові людей повинні бути присутні антитіла до антигенів системи АВО. Їх відсутність вважається генетичною ознакою, яка наслідується від батьків. У осіб групи АВ викликати продукцію даних антитіл неможливо. Специфічність цих антитіл значно вище ніж специфічність ізоіmunних антитіл проти антигенів еритроцитів при імунізації тварин. Інколи, також, можна зустріти антитіла до антигенів систем MN; P; Le^a і Le^b, а також до анти-Н.

Ізоіmunні антитіла відрізняються в серологічному відношенні від **природних** тим, що їх температурний оптимум дорівнює температурі тіла (теплові антитіла). Прикладом ізоіmunних антитіл в межах генетичних систем крові можуть слугувати аглютиніни анти-резус, лімфоцитотоксини, тромбо- і лейкоагглютиніни.

Диференціювання антитіл за серологічною характеристикою: на початку імунної реакції на антигенну стимуляцію з'являються антитіла, які здатні реагувати незалежно від характеру середовища (**повні антитіла**). У випадку продовження сенсibilізації серологічні ознаки антитіл змінюються - з'являються антитіла, які здатні викликати аглютинацію лише в певному середовищі (сироватка, плазма, альбумін, сік акації, декстран, желатин). У сольовому середовищі такі антитіла фіксуються на еритроцитах, але не викликають їх аглютинації (сенсibilізують еритроцити). Саму аглютинацію вони можуть здійснювати при умові обробки еритроцитів протеолітичними ферментами. Такі антитіла мають назву **неповних**.

Розрізняють **гетероантитіла** - продукуються виключно до еритроцитів тварин іншого виду; **ізоантитіла** - продукуються до еритроцитів певних групових антигенів; **аутоантитіла** – специфічні групові ізоантитіла, які продукуються до ізоантигенів особистих еритроцитів; **неспецифічні** антитіла – продукуються до всіх видів еритроцитів.

Хімічна природа антитіл

За хімічною природою і імунобіологічними властивостями всі антитіла відносяться до класу імуноглобулінів. У білковому спектрі крові глобуліни являють собою грубодисперсні системи білків на відміну від тонкодисперсних – преальбумінів, альбумінів, швидких і повільних постальбумінів.

В нормальних умовах співвідношення тонкодисперсних і грубодисперсних білків збалансоване. При електрофоретичному розділенні сироватки крові здорових осіб на протеїнограмі ідентифікується від 18 до 25 білкових фракцій, які розрізняють за електрофоретичним посуванням, за молекулярною вагою, за розміром білкових молекул, за коефіцієнтом седиментації за хімічною структурою, за кількістю. Наприклад, найшвидша фракція білкового спектру має коефіцієнт електрофоретичного просування RT-2.47, належить до α 1-глікопротеїдів, розміщується у преальбуміновій

зоні, кількість білка складає від 2.5 до 4.5 %. Далі йде альбумін, слідом - α_1 - α_2 -глобуліни. Далі - трансферин - RT-1.0, який відноситься до швидких β -глобулінів і має константний коефіцієнт рухомості, відносно якого і ідентифікуються інші білкові фракції за електрофоретичною рухомістю.

Слідом розташована фракція швидких посттрансферинів, яка утворена β_1 фракцією IgA; далі розташовані повільні посттрансферини – які представлені фракціями швидких імуноглобулінів G, M, A; далі представлені α_2 -макроглобуліни і β_1 -ліпопротеїди. Електрофоретична рухомість зменшується вже в ділянці швидких імуноглобулінів RT=0.62, а останні фракції мають RT– 0.05.

В умовах гіперімунізації організму природний баланс між тонкодисперсними білками і грубодисперсними порушується, що спричиняє не тільки зміни в імунному гомеостазі, але і в білковому обміні. Процес продукції антигензалежних імуноглобулінів за суттю відображає процес продукції антиген залежних антитіл. Однак, сам процес нарощування кількості грубодисперсних глобулінів відбувається за рахунок різних глобулінових фракцій і відрізняється в кожному окремому випадку динамікою, швидкістю, інтенсивністю і стабільністю. Як правило, даний процес супроводжується продукцією нормальних неантигензалежних імуноглобулінів. При цьому відбуваються зміни в концентрації окремих класів імуноглобулінових молекул, в залежності від того, за якими серологічними ознаками продукуються антитіла.

Існує думка, що ізо- і аутоімунні антитіла у різних індивідів мають різну білкову структуру, яка в тій чи іншій мірі, пов'язана з усіма білковими фракціями, і фракції альбуміну, напевно, приймають участь в формуванні ізоімунних антитіл.

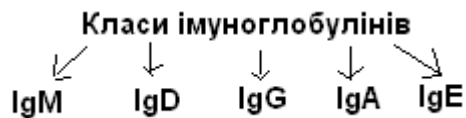
Вище ми вже розглянули серологічну характеристику антитіл:

- ❖ *повні* (здатні реагувати незалежно від характеру середовища;
- ❖ *неповні* (сироватка, плазма, альбумін, декстран, желатин).

Розглянемо розвиток серологічних ознак у динаміці. За класичною схемою імунної відповіді на початку ізоімунізації проявляються аглютеніни

(повні антитіла), які здатні реагувати з форменими елементами крові, зокрема з еритроцитами, безпосередньо, незалежно від середовища. У випадку продовження сенсibilізації серологічні ознаки антитіл змінюються і з'являються гіперімунні антитіла, які мають здатність реагувати лише в певному середовищі і при певних умовах (неповні антитіла). В усіх випадках проявлення сенсibilізації організму супроводжується перерозподілом рівнів білків в ізольованих класах імуноглобулінів.

Останнім часом ідентифіковані п'ять класів імуноглобулінів:



Імуноглобуліни розрізняються за фізико-хімічними властивостями: розмірами молекул, зарядом, амінокислотним складом, вмістом вуглеводів, коефіцієнтом седиментації, середньою концентрацією у сироватці, терміном напіврозпаду.

Молекули імуноглобулінів мають властивість широкої гетерогенності не тільки між класами, але і в межах окремих класів (ізотипи). За електрофоретичною рухомістю імуноглобуліни зустрічаються в усіх фракціях білків нормальної сироватки, хоча існують певні генетичні відмінності між молекулами імуноглобулінів.

В імунологічному аспекті імуноглобуліни є біфункціональними:

- функція з'ясування з с антигеном,
- функція з'ясування з тканинами організму, з клітинами імунної системи (фагоцитами), з першим компонентом комплементу (C1g) при активації даної системи за класичним шляхом.

Методом рентгеноструктурного аналізу визначена структура імуноглобулінів. Встановлено, що основна структурна одиниця імуноглобулінової молекули складається з двох важких і двох легких ланцюгів, які з'єднані між собою дисульфідними зв'язками. Молекула Ig

кожного класу має свій характерний тип важкого ланцюга: IgG(γ), IgM(μ), IgA(α), IgD(δ) IgE(ϵ).

Всередині певних класів також існують різні варіанти важких ланцюгів, що обумовлює розділення на підкласи. Наприклад, IgG має підкласи - G1 (66%), G2(23%), G3(7%), G4(4%), кожний підклас має відповідні важкі ланцюги γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 , які за імунохімічною характеристикою визначаються як γ ланцюги, але мають певні імуногенетичні відмінності. Імуноглобулін IgA має два підкласи – A1(α_1) і A2(α_2). Дослідження серологічної характеристики (специфічності, авидитету, активності) антитіл в залежності від приналежності до певного підкласу імуноглобулінів показало, що при направленій активній імунізації, згідно з законами класичної імунології, першими проявляються повні антитіла IgM. Проте, у випадках наявності предсенсibilізації організму, або внаслідок формування імунологічної пам'яті за умов попередньої ізоімунізації організму, можливий факт синтезу специфічних антитіл IgG вже впродовж першого тижня імунізації.

IgG(γ) – головний ізотип імуноглобулінів нормальної сироватки людини, який складає 70-75 % загальної кількості імуноглобуліну організму людини. Це чотирьох ланцюговий мономер з коефіцієнтом седиментації 7S. Молекулярна маса його становить 146 кДа. (рис.)

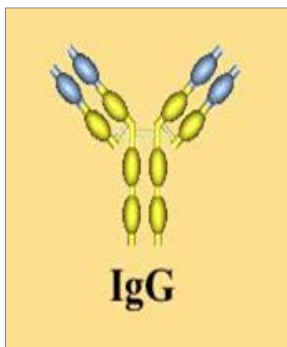


Рис. Схематична будова імуноглобуліну IgG.

Молекули IgG рівномірно розподілені між *внутрішньосудинним* і *зовнішньосудинним* пулом молекул і складають більшість антитіл вторинної імунної відповіді. Існує залежність продукції різних ізотипів імуноглобулінів IgG в залежності від причин ізоімунізації (направлена імунізація специфічним антигеном, або імуноконфліктна вагітність).

В першому випадку переважно продукуються молекули IgG 1, 2, в другому – IgG 2, 4. В медичній практиці саме молекули імуноглобулінів класу G мають переважне значення, оскільки за розміром вони мають здатність проходити через біологічні бар'єри, зокрема через плаценту, чим, з одного боку, забезпечують захист дитини, з іншого викликають небезпеку сенсibiliзації плода і розвиток гемолітичної хвороби у випадку імуноконфліктної вагітності. Крім того, титр специфічних антитіл цього класу має переважне значення при ізоімунізації організму людини будь-яким антигеном, а також обумовлює активність препаратів, виготовлених з імуноглобулінової фракції крові.

IgM(μ), складає 10 % від загального пулу молекул (**рис.**).

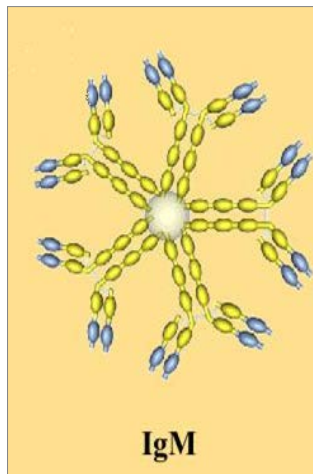


Рис. Схематична будова імуноглобуліну IgM.

Молекула представляє собою пентомер основної чотирьохланцюгової одиниці з молекулярною масою 146 кДа. Найчастіше розташовується в серединосудинному пулі імуноглобулінів.

Цей клас імуноглобулінів вважають первинними антитілами при первинній імунній відповіді, як у випадку проникнення складних за антигенним складом мікроорганізмів, так і під час імунізації тканинними антигенами.

IgA(α) - це мономер чотирьохланцюгової одиниці (80 %) (рис.) і складає — 15-20 % від загального пулу молекул.

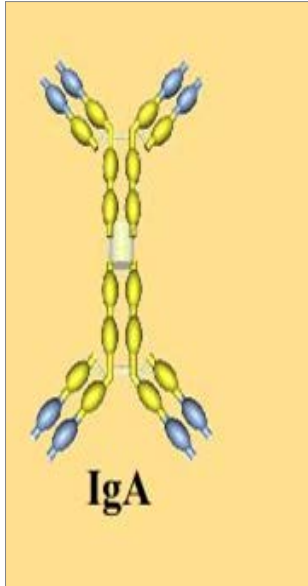


Рис. Схематична будова імуноглобуліну IgA.

В сироватці інших ссавців IgA має полімерну структуру, найчастіше як димер чотирьохланцюгової одиниці. IgA презентує головний клас імуноглобулінів серозно-слизових секретів (слина, молозиво, молоко, а також виділень слизової оболонки легенів і сечостатевої системи). Секреторні імуноглобуліни sIgA представлені димерною формою з коефіцієнтом седиментації 11S, молекулярною масою 385 кДа і представлені ізотипами A1(α 1) і A2(α 2).

IgD(δ) – чотирьохланцюговий мономер (рис.), коефіцієнт седиментації 7S, кількісно дорівнює менш ніж 1 % від загального пулу молекул, але щільно представлений на мембрані В-клітин. Імунобіологічна роль достатньо не визначена, але вважається, що саме ці молекули активно приймають участь в антигензалежному диференціюванні лімфоцитів.

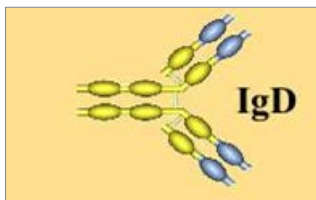


Рис. Схематична будова імуноглобуліну IgD.

IgE(ϵ) – чотирьохланцюговий мономер (рис), має дуже малу кількість в загальному пулі молекул, представлений на поверхні мембрани опасистих клітин і базофілів, а також IgE сенсibiliзованих клітин слизових оболонок носової порожнини, бронхів і кон'юктиви. В світовій медичній практиці визнана пріоритетна роль IgE в патогенезі алергічних хвороб.

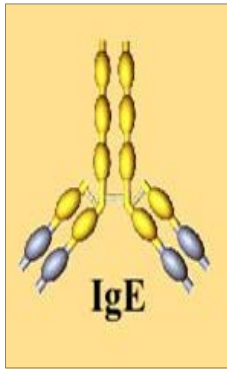


Рис. Схематична будова імуноглобуліну IgE.

2.4 Імуноглобулінова структура антитіл

Структуру антитіл складає основна чотирьохланцюгова одиниця (мономер) імуноглобулінової молекули. **(рис.)**

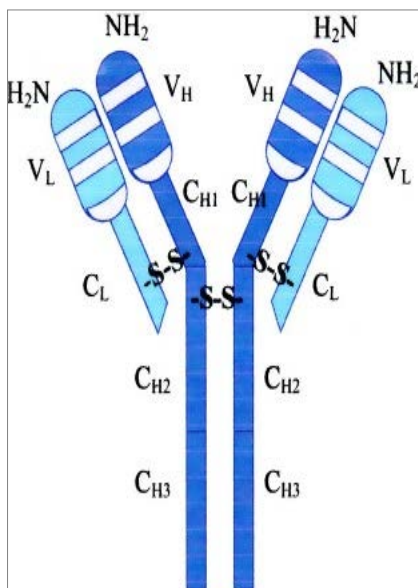


Рис. Схематична будова антитіл.

Імуноглобулінова молекула має поліпептидні ланцюги двох різних типів: легкі L (light) і важкі – H (heavy). Менші за розміром L ланцюги мають мол. масу 25 кДа і однакову структуру для всіх класів. H- ланцюги мають мол. масу 50-77 кДа і структурно різні у різних класах і підкласах імуноглобулінів. Поліпептидні ланцюги утримуються разом за рахунок ковалентних і нековалентних зв'язків.

Легкі ланцюги (L) існують у двох ізотопових формах – капа (κ) і лямбда (λ). В молекулі імуноглобулінів можливо поєднання пар різних типів важких і легких ланцюгів, але в кожному випадку обидва ланцюги повинні належати до одного типу. Вони складаються з двох регіонів(областей):

С-кінцева область, яка є однаковою для ланцюгів усіх типів (за винятком деяких алотипових і ізотопових варіантів) та утворена приблизно

107 амінокислотними залишками. Вона названа константною C_L – ділянкою (constant light chain).

N-кінцева область ланцюга має багато варіантів амінокислотної послідовності, внаслідок чого отримала назву –варіабельної V_L області (variable light chain). Слід зазначити, що N-кінцева послідовність як для легких (L) так і для важких (H) ланцюгів імуноглобуліну G1, відносно якого наведена ілюстрація, притаманна варіабельності, тому ці області отримали назву відповідно V_L і V_H . Усі інші частини молекули мають відносно стабільну структуру — константну - C.

Константна частина важкого ланцюга має три структурно відокремлені області — C_H1 , C_H2 , C_H3 . Варіабельні і константні області є стабілізованими внутрішньоланцюговими дисульфідними зв'язками (червоний колір) і утворюють стабільні глобулярні структури – домени. Антигензв'язуючі центри молекул імуноглобуліну утворені варіабельними доменами V_L і V_H . Відрізок важкого ланцюга між доменами C_H1 і C_H2 має назву „шарнірної” області, яка дозволяє обом антигензв'язуючим центрам функціонувати незалежно один від одного.

Антитільна специфічність Ig визначається послідовністю амінокислот в V-регіонах легких і важких ланцюгів. Синтез кожної константної ділянки як важких, так і легких ланцюгів, кодується певним геном.

В якості можливих джерел різноманітності структур, які мають властивості розпізнання антигену, визначені:

- *множинність гаметних генів V-регіонів,*
- *соматичний мутагенез,*
- *соматичні рекомбінації між сегментами, які утворюють повний V-ген,*
- *генні конверсії,*
- *вставки додаткових нуклеотидів.*

Великий поліморфізм генів, які кодують варіабельні ділянки імуноглобулінів, забезпечує поліморфізм специфічних антитіл. Поліморфізм специфічних антитіл, в свою чергу, забезпечує імунологічну підтримку імунного гомеостазу організму людини.

Порушення поліморфізму імуноглобулінових структур антитіл призводить до порушень в імунному гомеостазі, які проявляються імунодефіцитними станами і класифіковані як моноклональні гамапатії. Причиною виникнення моноклональних гамапатій є продукція моноклональних імуноглобулінів (парапротеїнів) замість поліморфних імуноглобулінів.

Моноклональні імуноглобуліни (парапротеїни)

Моноклональні імуноглобуліни є продуктом секреції одного клону В-лімфоцитів, або плазматичних клітин і представлені пулом структурно гомогенних молекул. Вони мають важкі ланцюги одного класу (субкласу) і легкі ланцюги одного типу, а також ідентичний ідіотип (активний центр) та підгрупу V-доменів.

Продукція моноклональних імуноглобулінів призводить до суттєвих змін змін в імунному гомеостазі і, як наслідок, реалізації певних патологічних станів, які за конкретними категоріями класифікують як моноклональні гамапатії.

Таблиця

Характеристика моноклональних гамапатій

Категорії моноклональних гамапатій	Характер патології
В-клітинні злоякісні C(Ig) більш 25 г/л	Множинна мієлома, макроглобулінемія Вальденстрема Плазмоцитома, лімфома, хронічний лімфолейкоз, хвороба важких ланцюгів
В-клітинні доброякісні C(Ig) більше 25 г/л	Моноклональні гамапатії неясного генезу
імунодефіцитні стани дисбалансом Т- і В-	Первинні (синдроми Віскотта-Олдрича, Ди Георге, Незелефа, важкого комбінованого імунодефіциту)

ланок імунної системи C(Ig) менш 2.5 г/л	Вторинні (вікові, які викликані застосуванням імунодепресантів, або є супутніми онкологічним захворюванням нелімфоїдної природи) Перебудова імунної системи після пересадки гемопоетичних стовбурових клітин Антигенна стимуляція в ранньому онтогенезі (внутришньоутробна інфекція)
Гомогенна імунна відповідь C(Ig) менш 2.5 г/л	Бактеріальні інфекції Аутоімунні захворювання, такі як кріоглобулінемія, системна червона вовчанка, ревматоїдний артрит і інші

Таким чином, аналіз структури, синтезу, динаміки продукції специфічних антитіл, як заключного (проявленого) етапу імунологічного реагування організму в контексті характеристики антитіл з позицій генетики, біохімії, біофізики, молекулярної біології, значно розширює нашу уяву відносно їх структури, біологічної функції, а також відносно механізмів реалізації імунологічних реакцій в біологічній системі.

Багаторічний досвід дослідників в цієї галузі свідчить також про необхідність розглядати серологічні аспекти антитілогенезу у взаємозв'язку з протейногенною функцією організму, зокрема на рівні стану імуноглобулінового спектру, оскільки було встановлено наявність структурної гомології антитіл з молекулами імуноглобулінів, а також певної гомології імуноглобулінів з молекулами антигенів гістосумісності. Враховуючи той факт, що обидва типи молекул здійснюють імунологічне реагування організму людини на вторгнення екзогенних і ендогенних чужорідних агентів, можна, з певною мірою застережливості, зробити висновок про загальне еволюційне призначення цих молекул.

Питання для самоконтролю

1. Розкажіть про хімічну природу і імунологічні властивості повноцінних і неповноцінних антигенів
2. Сформулюйте за імунологічною класифікацією поняття гуморальний імунітет.
3. Охарактеризуйте докладно процес імунологічного реагування на рівні синтезу специфічних антитіл.
4. Що ви знаєте про компоненти молекули визначають специфічність групових антигенів?
5. За якими ознаками розрізняють антитіла?
6. Яку хімічну природу мають антитіла?
7. В чому полягає імунологічна біфункціональність імуноглобулінів?
8. Що представляє собою основна структурна одиниця імуноглобулінової молекули?
9. Розкажіть про можливі джерела різноманітності структур, які мають властивості розпізнання антигену.
10. Яку будову мають моноклональні імуноглобуліни?
11. Категорії моноклональних гамапатій.

ЛІТЕРАТУРА

1. Шахович В.Н. Общая биология. Блок-схемы, таблицы, рисунки: Учеб. пособие. – М.: Книжный Дом, 2006. – 112 с.
2. *Иммуногенетика* и эволюция/ Стил Э. Дж., Линдли Р. А., Бландэн Р. В., Кузнецова О . В. (пер. с англ.), Животовский Л. А. (ред.). - М.: Мир, 2002. - 237с.
3. Пальцев, Михаил Александрович. *Иммуногенетика* человека и биобезопасность/ М. А. Пальцев, Р. М. Хаитов, Л. П. Алексеев. – М.: Медицина, 2007. – 143 с.

4. Хаитов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. - М: "Медицина", 2000. - С. 79-80, 131-134.
5. Дранник Г.Н., Дизик Г.М. Генетические системы крови человека и болезни. - К.: Здоров'я, 1989. - 200 с.

РОЗДІЛ 9.2

ГЕНИ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ

Імуноглобуліни – це група білків з деякими загальними особливостями структури, які продукують антитілоутворюючі клітини, мають антигенну специфічність, тобто – здатність взаємодіяти з антигенами (чужорідними для організму речовинами). Багатомільйонна різноманітність молекул імуноглобулінів пов'язана, перш за все, з специфічністю їх антитіл (АТ). В даному розділі ми будемо розглядати геномну структуру молекул цих білків, генетичний контроль продукції імуноглобулінів і закономірності об'єднання генетичних елементів в єдиний функціонуючий ген імуноглобуліну.

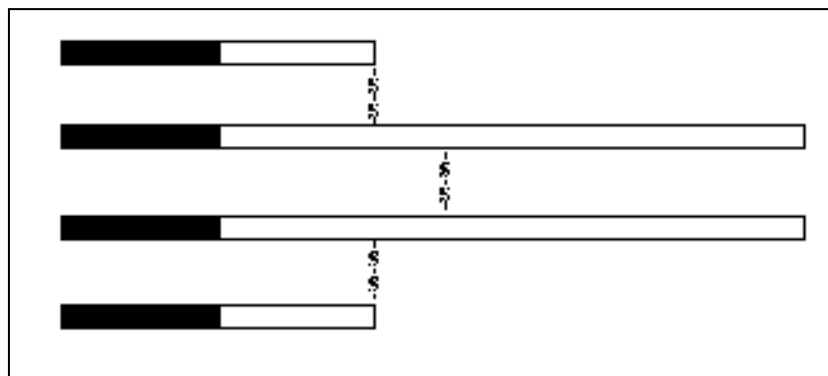


Рисунок 1. Схема будови молекули імуноглобуліна

Загальні структурні властивості імуноглобулінів, характерні для всіх молекул (рис.1), полягають у наступному:

1. Молекула імуноглобуліну складається з чотирьох поліпептидних ланцюгів двох типів (L і H).

2. H- і L- ланцюги мають суттєві відмінності у первинній структурі: якщо порівнювати їх між собою, то обидва L- ланцюги у складі окремої молекули ідентичні один одному за структурою; відповідно і обидва H- ланцюги мають однакову послідовність амінокислот.

3. У функціональному відношенні кожний поліпептидний ланцюг молекули АТ можна поділити на дві частини: варіабельну (V) і постійну (C). До V частини відноситься 110-120 N-кінцевих залишків поліпептидних ланцюгів, а інші залишки складають C-частину ланцюга.

4. В межах V-частини виділяють три райони, названі гіперваріабельними. Саме в них містяться амінокислотні залишки, які беруть участь у побудові антигензв'язуючого центра (АЗЦ).

5. V-частину L-ланцюгів можна розбити на два сегменти : V-сегмент і J-сегмент, а V-частину H-ланцюгів можна розбити на три сегменти: V-, D- і J-сегмент. Ці сегменти були відокремлені при аналізі характеру амінокислотних замін, а згодом виявилось, що кожний з них кодується окремою ділянкою ДНК.

6. Поліпептидні ланцюги молекули мають доменну організацію. Кожен домен містить біля 110 амінокислотних залишків, які мають один внутрішньоланцюговий дисульфідний зв'язок, і всі домени мають певну гомологію в первинній структурі та подібну просторову організацію.

7. Існує два типи L-ланцюгів: χ - і λ -. Відмінності в амінокислотній послідовності між χ - і λ -ланцюгами складають біля 60%. Слід підкреслити, що такі великі відмінності є як у V-, так і в C-частині L-ланцюгів. При локалізації генів L-ланцюгів на хромосомах виявилось, що χ - і λ -гени знаходяться на різних парах негомологічних аутосом.

8. На відміну від L-ланцюгів, H-ланцюги можуть бути ідентичними по V-частині, але відмінності в будові їх C-частин можуть доходити до 70%. За характером амінокислотної послідовності C-частини імуноглобуліни поділяються на п'ять класів: IgM, IgA, IgJ, IgD і IgE. Відповідні ділянки H-ланцюга позначаються грецькими буквами: μ , α , γ , σ , ϵ .

9. В середині H-ланцюгів знаходиться ділянка, що одержала назву шарнірної. Вона містить велику кількість залишків проліну, які запобігають утворенню регулярної вторинної структури. Тут же знаходяться залишки цистеїну, що утворюють дисульфідні зв'язки між H-ланцюгами. Можливо,

саме шарнірна ділянка молекули забезпечує її гнучкість і координовану передачу сигналу від антиген-зв'язуючої частини молекули до її ефectorної частини. Якщо всі домени-молекули імуноглобулінів мають між собою певну структурну і просторову подібність, то шарнірна ділянка не гомологічна з жодною ділянкою поліпептидних ланцюгів імуноглобуліну.

10. АЗЦ (активний центр антитіла, який комплементарно взаємодіє з антигенною детермінантою (епітопом)) молекули АТ будується завдяки взаємодії двох поліпептидних ланцюгів – одного L- і одного H-ланцюга. Основна роль у побудові АЗЦ відіграють гіперваріабельні ділянки обох ланцюгів.



Рисунок 2. Поздовжня упаковка β -листіків у константному домені легкого ланцюга імуноглобуліну α . Зліва представлена докладна картина білка; райдужна забарвленість (від синього до червоного) показує хід ланцюга, від N- до C-кінця. На топологічній схемі (в центрі рисунка) підкреслені «грецькі ключі». На рисунку праворуч подано вид на білок «знизу» (з торців структурних сегментів). Прямокутники – торці β -тяжів. Хрестик відповідає N-кінцю сегмента (тобто він «іде від нас»), точка — його C-кінцю (тобто він «рухається до нас»). Хід петель, які сполучають структурні сегменти, показаний чорною лінією, якщо петля повернута до нас, і світлою, якщо вона знаходиться на протилежній стороні укладки. Така схема дозволяє найпростіше представити колінеарну упаковку цих сегментів

(b-тяжів). Крім того, вона дозволяє побачити просторову будову «грецьких ключів» і помітити, що два існуючих «ключа» у просторі організовані по-різному.

Багато років тому австралійський вірусолог та імунолог Ф. Бернет сформулював теорію «Одна клітина – одне антитіло». Гіпотеза достатньо швидко була блискуче підтверджена, але тільки нещодавно став зрозумілим молекулярно-генетичний механізм створення індивідуального «обличчя» молекул АТ. Виявилось, що в індивідуальній лімфоїдній клітині із багатьох сотень генів імуноглобулінів активним є тільки мінімальний набір генів, необхідний для синтезу одного L-ланцюга і одного H-ланцюга. Різноманітність молекул АТ (10^7) утворюється за рахунок того, що в різних лімфоїдних клітинах активуються різні гени імуноглобулінів і, відповідно, популяція лімфоїдних клітин гетерогенна за специфічністю.

Таким чином, різноманітність молекул АТ на рівні цілого організму поєднується з суворою індивідуальністю молекул АТ, котрі синтезуються в межах даного клону лімфоїдних клітин. Вибір конкретних генетичних елементів, які «утворюють» функціонуючі гени імуноглобулінів в певній лімфоїдній клітині є, напевне, випадковим. Більш того – далеко не всі поєднання генетичних елементів приводять до утворення функціонально активних генів імуноглобулінів. Але молекулярно-генетична «машина» працює таким чином, що врешті-решт реалізуються всі закладені в неї можливості і організм забезпечується певним набором АТ.

Структурна організація генетичних елементів, які контролюють утворення імуноглобулінів

Генними сегментами домовимось називати ті ділянки ДНК, які перебувають в ембріональному недиференційованому стані. Як буде зазначено далі, «зібраний» V-ген імуноглобуліну утворюється шляхом поєднання на рівні ДНК ділянок, котрі знаходяться далеко одна від одної.

Поєднання цих ділянок відбувається тільки в лімфоїдних клітинах, а в клітинах печінки, нирок і інших тканин, як і в ембріональній ДНК, генні сегменти імуноглобулінів існують розрізнено.

V-геном L-ланцюга ми будемо називати ген, що зібраний із V- і J-сегментів, а V-геном H-ланцюгів - ген, зібраний із V-, D- і J-сегментів. С-гени в процесі диференціювання лімфоїдних клітин перебудові на рівні ДНК не піддаються. Змінюватись можуть лише ділянки ДНК за межами структурної частини С-генів.

V-сегменти

V-сегменти контролюють утворення п-кінцевих ділянок поліпептидних ланцюгів. Рахунок амінокислотних залишків починається завжди з N-залишка «зрілого» поліпептидного ланцюга, що секретується клітинами. Але при трансляції мРНК імуноглобуліну в гетерологічних безклітинних системах виявилось, що первинний продукт трансляції більш довгий, ніж зрілий ланцюг, і має з N-кінця екстрапептид, що одержав назву **лідируючого**, або **сигнального**. Цей пептид піддається швидкому внутрішньоклітинному відщепленню; відповідно до цього ген V-сегмента має окремий екзон, який контролює утворення лідируючого пептиду. На межі екзон/інтрон у генів імуноглобулінів виявлені ті ж сигнальні послідовності для сплайсингу мРНК, що і у інших генів еукаріотів, а саме 5'-екзон /GT-інтрон-AG-екзон/ - 3'. Не зважаючи на великі відмінності в структурі лідируючих екзонів різних V-сегментів, всі вони містять саме цей кодон, що є останнім кодоном лідируючого екзону і не формує своїми двома нуклеотидами сигнал для сплайсингу.

На відміну від однозначності даних про розміри V-сегментів, питання про кількість V-сегментів остаточно не вирішено.

Розмір V-сегмента, враховуючи лідируючий екзон і інтрон між двома екзонами, становить у середньому 500 нуклеотидних пар, але відстань між сусідніми V-сегментами набагато більша – в середньому 15000 пар. У тих випадках, коли вдавалося виділити фрагменти ДНК, які несуть одночасно два V-сегменти, незмінно виявлялося, що сусідні V-сегменти належать до однієї

V-підгрупи і мають суттєву гомологію не тільки у своїй структурній частині, але і в міжгенних просторах. Звідси випливає, що V-сегменти однієї підгрупи зібрані до одного класу. Припускається, що V-сегменти однієї підгрупи виникли шляхом тандемних дуплікацій одного початкового предкового гена, а їх подібність між собою не тільки у структурній, але й міжгенній частині дозволяє цим сегментам шляхом рекомбінації обмінюватись генетичним матеріалом.

J-сегменти

На рівні поліпептидного ланцюга J-сегмент об'єднує V-сегмент з С-частиною ланцюга. На генному рівні J-сегменти являють собою окремо розташовані ділянки ДНК. Відстань від комплексу V-сегментів невідома, але відносно С-генів їхнє положення точно локалізовано. Найближчий до С-гену J-сегмент χ -ланцюгів миші розташований на відстані 2,6 тис. пар основ, а для Н-ланцюгів імуноглобулінів миші відстань між J_H - і C_H -сегментами становить 6,5 тис. пар.

J-сегментам звичайно надаються порядкові номери у напрямку 5' - 3', тобто найближчий до С-гену J-сегмент буде мати найбільший номер.

J-сегменти L-ланцюгів кодують ділянку поліпептидного ланцюга розміром в 13 амінокислотних залишків. Довжина J-сегментів залишається незмінною для всіх видів, що досліджувалися (миші, щурі, людина), і для обох типів L-ланцюгів імуноглобулінів миші, але якщо у χ -ланцюгів J-сегмент поліпептидного ланцюга охоплює амінокислотні залишки з 96 по 108, то λ -ланцюгів з 98 по 110-й. Відстань між J сегментами χ -ланцюгів, як правило, становить в середньому 300 пар основ.

Різні види тварин відрізняються за кількістю J-сегментів χ -ланцюгів, але тут треба враховувати не тільки загальну кількість J-сегментів, але і наявність так званих псевдогенів. **Псевдогенами називаються ділянки ДНК, які мають певну структурну подібність з істинними генами, але з якихось причин не здатні реалізуватися на рівні поліпептидного ланцюга.** До цих причин відносяться:

- 1) відсутність сигналів для сплайсингу на 3' кінця J-сегмента;

- 2) наявність стоп-кодону в межах структурної частин;
- 3) спотворені фланкуючі послідовності, що не допускають об'єднання V- і J- сегментів;
- 4) структурна подібність псевдогенів істинним J-сегментам може бути такою віддаленою, що ніколи не виявиться на рівні поліпептидного ланцюга.

На відміну від подібності розмірів і міжгенних відстаней J-сегментів χ -ланцюгів, J-сегментів H-ланцюгів мають за обома ознаками суттєві відмінності: один з них – псевдо ген, два інших кодують ділянку H ланцюга розміром в 15 амінокислотних залишків і ще два – в 17. Ще більша різноманітність спостерігається серед J_H -сегментів імуноглобулінів людини. Тут з дев'яти J_H -сегментів три відносяться до категорії псевдогенів, сегменти J1 і J2 кодують ділянку ланцюга в 17 амінокислотних залишків, J3 і J4 – в 15, J5 – в 16 і J6 – в 20.

D-сегменти

D-сегменти, як ділянки ДНК, що кодують певні відрізки H-ланцюгів, були виявлені в 1981 році в результаті цілеспрямованих пошуків. Припустили, що існують окремі генетичні елементи, які контролюють утворення невеликого за розмірами пептиду, який відіграє важливу роль у побудові АЗЦ, оскільки цілком входить в 3-тю гіперваріабельну ділянку. Але, як з'ясувалось, головна відмінність D-сегментів від інших генетичних елементів імуноглобулінів полягає не в їх малих розмірах, а в тому, що жоден із D-сегментів не здатний за своєю структурою реалізуватися в послідовність амінокислот у тому вигляді, в якому він існує в ембріональній ДНК. Цей висновок впливає вже із самих розмірів D-сегментів. До сьогоднішнього дня встановлена нуклеотидна послідовність 10 D-сегментів і, напевно, існують ще, як мінімум, ще 4 D-сегменти H-ланцюгів імуноглобулінів миші.

Всі D-сегменти можна розділити на 3 родини. Довжина структурної частини становить, відповідно, 10, 11 і 17 пар основ, тобто, в жодному випадку немає числа, кратного трьом. Більш того, на рівні поліпептидного ланцюга довжина D-сегментів може досягати 9 амінокислот, а може

складатися і з одного амінокислотного залишку. Нині вже зрозуміло, що D-сегменти найбільш піддаються генним перебудовам і здатні об'єднуватись не тільки з V- і J-сегментами H-ланцюгів, але і між собою.

Не зважаючи на свої невеликі розміри, D-сегменти займають ділянку ДНК, як мінімум, в 60 тис. пар основ, а відстань між сусідніми D-сегментами складає від 5 до 10 тис. пар.

C-гени

C-гени (коднують константні області важких і легких ланцюгів імуноглобулінів) контролюють утворення сталих частин L- і H-поліпептидних ланцюгів імуноглобулінів. Вже з самої номенклатури зрозуміло, що C-частина ланцюга у межах даного типу, класу або підкласу імуноглобулінів лишається незмінною за своєю будовою. Роз'яснимо це положення на прикладі χ -ланцюгів імуноглобуліну миші. Існує 300 V-сегментів χ -ланцюгів і 4 J-сегмента. Комбінацією цих двох генетичних елементів утворюється щонайменше 12000 варіантів V-частин капа-ланцюгів, але всі вони мають однакову кінцеву половину поліпептидного ланцюга (залишки 109-215) і, відповідно, до цього в геномі миші, щура і людини виявлено єдиний C капа-ген.

C-гени L-ланцюгів імуноглобулінів не містять інтронів і не зазнають жодних перебудов у процесі диференціації лімфоїдних клітин. Щодо λ -генів, то вони не одиничні: у миші чотири C λ -гени імуноглобулінів і шість – у людини. До цього часу не з'ясовано, з чим пов'язана багатоманітність C λ -генів.

Гени λ - і χ -ланцюгів, як з'ясовано, локалізовані на різних негомологічних аутосомах, і, відповідно, V і J сегменти χ -ланцюгів проявляються тільки разом з C χ -геном; це також справедливо для λ -ланцюгів. Таким чином, перебудови генів L-ланцюгів, що приводять до їх об'єднання та експресії, відбувається тільки в межах даної хромосоми, причому не зареєстровано жодного випадку міжхромосомного обміну генами імуноглобулінів. В результаті λ - і χ -поліпептидні ланцюги можна легко відрізнити не тільки за C-частиною, але за V-частиною ланцюга. В процесі

диференціювання лімфоїдних клітин одні й ті самі генетичні елементи, що формують V_H -ген, можуть проявлятися в комбінації з різними C_H -генами.

Екзон-інтронна структура C_H генів є поки що єдиним прикладом відповідності між генними і поліпептидними рівнями організації. Як відомо, поліпептидні ланцюги імуноглобулінів складаються із доменів, що мають певну структуру і просторову організацію. На рівні генів кожному домену відповідає окремий екзон і, якщо у μ -ланцюгів на один домен більше, ніж у γ -ланцюгів, то і на генному рівні у C_H -гена буде додатковий екзон. Окремий екзон існує також і для шарнірної ділянки, котра не має гомології з доменами Н ланцюгів.

Таким чином, здатність одного і того ж V_H -гена об'єднуватись з різними C_H -генами вносить додаткову різноманітність в імунну відповідь, залежно від класу імуноглобулінів утворення АТ може призвести до інших наслідків.

Закономірності об'єднання генетичних елементів в єдиний функціонуючий ген імуноглобуліну

Принципова відмінність генів імуноглобулінів від всіх інших генів еукаріотів полягає у тому, що функціонуючий ген імуноглобуліну «збирається по цеглинах» з окремих ділянок ДНК. У процесі диференціації лімфоїдних клітин даний V-сегмент якимось чином фізично відокремлюється від того району ДНК, де він знаходився раніше (тобто в ембріональній ДНК), та опиняється у зовсім новому для себе оточенні (поруч з J-сегментом, у випадку L-ланцюгів імуноглобулінів, або D-сегментом для H-ланцюгів). Природно, що цей процес проходить не механічно, а за допомогою якоїсь ферментативної системи. Наразі ферменти, що «займаються» перенесенням генних сегментів не виділені, але відомі послідовності ДНК, які можна розглядати як сигнальні. Саме ці сигнальні послідовності ДНК, які є

універсальними для V, D і J сегментів генів H і L ланцюгів, вносять певний порядок у складний процес перебудови генних сегментів.

У випадку V-сегментів сигнальні послідовності йдуть безпосередньо (або через одну-дві основи) за останнім кодоном перед структурною частиною J-ДНК. На відміну від них, структурна частина D-сегменту має сигнальні послідовності з обох сторін.

Генні сегменти розташовані на одній і тій же хромосомі і мають потенційну здатність до поєднання. Мають різну довжину між сигнальними послідовностями. Відстань у 12 пар основ приблизно відповідає одному оберту подвійної спіралі ДНК, а відстань у 23 пари – двом виткам. Звідси виникло припущення, що існують два різні ферменти (або дві субодиниці одного ферменту), один із яких впізнає сигнальні послідовності, що розташовані на відстані одного оберту один від іншого, а другий фермент (або субодиниці) – на відстані двох витків. Можна вважати, що один фермент (або ферменти) вилучає V-сегмент з його місця, а інший фермент (або ферменти) сам (або за допомогою першого ферменту) проводить об'єднання двох раніше різних генних сегментів в єдиний V-ген. При цьому сигнальні послідовності видаляються з ДНК і 3'-кінцева ділянка V-сегмента стикається з 5'-кінцевою ділянкою J-сегмента.

Правило 12/23

Структура сигнальних послідовностей генних сегментів імуноглобулінів наведена нижче:

Генний сегмент	Сигнальні послідовності
V_{χ}	3' (7) - (12) - (9) 5'
V_{λ}	3' (7) - (23) - (9) 5'
V_H	3' (7) - (23) - (9) 5'
J_{χ}	5' (9) - (23) - (7) 3'
J_{λ}	5' (9) - (12) - (7) 3'
J_H	5' (9) - (23) - (7) 3'

Спочатку правило 12/23 було встановлено на початку для генів L-ланцюгів. Потім виявилось, що у V- і J- сегментів H-ланцюгів відстань між сигнальними послідовностями однакова – 23 пари. Виходячи з цього виникло припущення, що D-сегмент (тоді ще не знайдений) повинен мати відстань між гепта- і нонамерами у 12 пар основ, причому з обох сторін D-сегмента, а не з однієї. Припущення повністю підтвердилось.

Дослідження у галузі генетики імуноглобулінів проводяться, як правило, на трьох рівнях: 1) вивчається структура генних сегментів імуноглобулінів у недиференційованому стані, для чого використовують ДНК сперми або тканин таких органів як нирка або печінка; 2) вивчається структура перебудованих генів імуноглобулінів в диференційованих лімфоїдних клітинах, мієломних, гібридомних або нормальних В-лімфоцитах, виділених на флуоресцентному сортувальнику клітин; 3) вивчається структура поліпептидних ланцюгів імуноглобулінів, синтез яких визначається генами, що досліджуються.

Структурні дослідження на вказаних трьох рівнях дуже швидко дозволили зробити висновок: багатоманітність V-генів у диференційованих клітинах і, відповідно, багатоманітність поліпептидних ланцюгів суттєво вища, ніж кількість V-сегментів в ембріональній ДНК. Певний вклад в цю багатоманітність вносять соматичні мутації. Але постійно діючим генератором багатоманітності є процес об'єднання розрізнених ембріональних генних сегментів в єдиний V-ген, що експресується у диференційованих клітинах.

Диференціація В-лімфоцитів за генами імуноглобулінів

В індивідуальній лімфоїдній клітині синтезуються гомогенні за структурою молекули АТ (згідно теорії Бернета «Одна клітина – одне антитіло»). Це визначається тим, що з декількох сот генетичних елементів,

потенційно здатних брати участь у побудові генів імуноглобулінів, реально експресується тільки така кількість генетичних сегментів, яка необхідна для синтезу одного індивідуального L-ланцюга і одного H-ланцюга.

Механізм подібної вибіркової експресії легко собі уявити, якщо його розглядати в межах одного комплексу генних сегментів імуноглобулінів. Так, можна уявити, що об'єднання V_χ -сегмента з одним із J_χ -сегментів в даній лімфоїдній клітині запобігають об'єднанню з будь-яким іншим V_χ -сегментом в тій же клітині. Справа в тому, що V_χ -сегмент «переноситься» до J_χ -сегмента разом з ділянкою ДНК, котра межує з структурною частиною V_χ -сегмента з 5'-кінця. Довжина цієї ділянки точно не відома.

Довжина структурної частини V-сегмента складає біля 500 пар основ, в район J-сегментів переноситься ділянка ДНК завдовжки приблизно 1000 нуклеотидів. Разом з цим вся ділянка геному, в якому розташовані J_χ -сегменти займає біля 1500 пар основ, і введення в цю ділянку фрагмента ДНК завдовжки в 1000 пар нуклеотидів призводить до повторних змін.

Таким чином, сам процес складання V-гена визначає диференціювання в межах даного комплексу генних сегментів імуноглобулінів. Однак, крім цього типу диференціації, в межах родини генів імуноглобулінів здійснюється вибір ще за двома параметрами: за негомологічними хромосомами, де локалізовані гени χ - і λ -ланцюгів, і за гомологічними хромосомами.

Фенотипово диференціювання за негомологічними χ - і λ - хромосомами визначається за синтезом відповідних L-ланцюгів і, як правило, в індивідуальній лімфоїдній клітині спільний синтез χ - і λ -ланцюгів не відзначається. Феномен алельного виключення полягає в тому, що в одній лімфоїдній клітині не виявляються повноцінні продукти активності генів імуноглобулінів, розташованих на гомологічних хромосомах. Це відноситься як до L-, так і до H- ланцюгів. Алельне виключення є унікальним феноменом для генів імуноглобулінів, оскільки звичайно в одній клітині проявляються обидва алельних гена, як, наприклад, у випадку гемоглобінів або антигенів гістосумісності.

Встановлено, що гени, які кодують альфа- і бета-ланцюги гемоглобіну, дивергували один від одного приблизно півмільярда років тому, а їх попередник і міоглобін відокремились один від одного на кількাসот мільйонів років раніше. Потім відбулися подальші дуплікації і їх дивергенція в межах даної родини генів. Внаслідок цього виникли гени, які несуть певні функції і такі, що не мають конкретних функцій – псевдо гени (відмічено грецькою літерою γ).

Гени імуноглобулінів розташовані на трьох парах аутосом, а в результаті диференціації із шести хромосом диплоїдної клітини експресуються гени тільки двох аутосом. Виявилось, що в основі цієї вибіркової активності лежить той же самий процес складання гена, який визначає в межах одного комплексу генних сегментів імуноглобулінів.

Якщо імовірність появи функціонально активного V-гена на одній гомологічній хромосомі достатньо низька, то це зразу ж пояснює, наприклад, феномен алельного виключення. Для цього достатньо припустити, що складання V-гена на гомологічних хромосомах відбувається незалежно, а отже, поява клітини з двома активними алельними V-генами визначається як добуток двох низьких частот і тому повинна бути дуже рідкісною подією. Так само можна пояснити і вибіркового прояв в одній клітині χ - і λ - генів. Разом з тим існують певні закономірності прояву генів імуноглобулінів під час індивідуального розвитку: **спочатку активуються гени H-ланцюгів, потім χ - і в останню чергу λ -ланцюгів.** Але і цей порядок визначається не регуляторними факторами, а кількістю генетичних сегментів, які беруть участь у побудові V-гена: чим вище це число, тим вища вірогідність генних перебудов.

Розглянемо експериментальний матеріал, покладений в основу наведеної точки зору про ймовірний характер диференціації лімфоїдних клітин за генами імуноглобуліну.

1. Об'єднання на одній з χ -хромосом спричиняє до утворення послідовності із зсувом рамки зчитування через делеції одного нуклеотиду першого кодону Jсегмента.

2. Процес V-J об'єднання іде з великою кількістю помилок: кількість некоректних перебудов збільшується через існування псевдогенів і псевдосигнальних послідовностей.

3. У складі J_h-сегментів імуноглобулінів миші є псевдоген, у якого відсутня сигнальна послідовність для сплайсингу, тому об'єднання з ним будь-якого V_h-сегмента не може привести до утворення послідовності, яка транскрибується.

4. У половині випадків вибіркова експресія тільки однієї із хромосом пов'язана з тим, що на іншій хромосомі (або хромосомах) перебудови взагалі не відбулися, або генні сегменти С-ланцюгів знаходяться в ембріональному, недиференційованому стані.

Отже, враховуючи багатомільярдність популяції лімфоїдних клітин, її постійне самооновлення, легко прийти до висновку, що генні перебудови призводять до появи все нових і нових варіантів АТ, що, в свою чергу, як кінцевий результат підтримання імунного гомеостазу людини при дії екзогенних і ендогенних негативних чинників має позитивний характер.

Питання для самоконтролю

1. Що таке псевдо гени? Які механізми їх виникнення?
2. Що таке феномен алельного виключення?
3. Де розташовані гени імуноглобулінів?
4. Охарактеризуйте Правило 12/23.
5. Що називають генними сегментами ДНК?
6. Охарактеризуйте будову молекули імуноглобуліну.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология / Пер. с англ. В.И. Кандрора, А.Н. Маца, Л.А. Певницкого, М.А. Серовой. - М.; Мир, 2000. - 581 с.
2. Ярилин А.А. Основы иммунологии. - М.: Медицина, 1999. - 608 с.
3. Вершигора А.Е. Общая иммунология: Учеб пособие. - К. Вища школа, 1989. - 736 с.
4. М. Якобисяк. Імунологія/Переклад з польської за ред. проф. В.В. Чоп'як. - Вінниця: НОВА КНИГА, 2004. - 672 с.
5. А.А. Воробьева, А.С. Быкова, А.В. Караулова. Иммунология и аллергология - Москва: Практическая медицина, 2006. - 288 с.: ил.
6. Г.Н. Дранник. Клиническая иммунология и аллергология. - М.: ООО «Полиграф плюс», 2006. - 482 с.: ил.

9.3. Молекулярна структура і функції головного комплексу гістосумісності

Загальна характеристика

Головний комплекс гістосумісності (ГКГ) – це група генів і кодованих ними антигенів клітинної поверхні, основною біологічною функцією яких є здійснення генетичного контролю імунної відповіді на рівні розпізнавання чужерідної спадкової інформації і підтримання імунного гомеостазу. Дана сукупність генів ГКГ існує у всіх хребетних (МНС – Major Histocompatibility Complex). У людини головний комплекс гістосумісності позначається «HLA»: Human leukocyte Antigens (людські лейкоцитарні антигени), адже антигени вперше були визначені у лейкоцитів.

Перший лейкоцитарний антиген було ідентифіковано Ж.Доссе у 1952 році. Подальші дослідження дозволили вченому висловити припущення відносно того, що саме лейкоцитарні антигени є фактором, який дозволяє відрізнити власні тканини від тканин організму іншої людини. Пізніше перший ідентифікований антиген даної системи був позначений як HL-A2. Після початкових публікацій Ж.Доссе значна кількість вчених-біологів (генетиків, імунологів та гематологів) присвятили свої дослідження новому науковому напрямку, який тоді отримав назву «імуногематологія». Так, голандським дослідником van Rood було визначено специфічність сироваток жінок, які багато разів народжували дітей. Під час таких дослідів брали зразки сироваток з клітинами від 100 донорів. Групування сироваток аналогічної специфічності дозволило виділити першу систему лейкоцитарних антигенів – групу 4 (4a, 4b). Припущення van Rood відносно двохалельного поліморфізму даної системи отримало подальший розвиток і призвело до відкриття, що саме ці алелі філогенетично є структурами, з яких, шляхом еволюційних мутацій, виникли усі антигенні детермінанти сублокусу HLA-B.

Міжнародні кооперативні дослідження розпочалися у 1964 році, коли Р.Тerasaki і Mc Clelland запропонували уніфікований лімфоцитотоксичний тест для ідентифікації серотипів молекул HLA. Незважаючи на досить коротку історію розвитку знань стосовно структури, функції і геномної організації системи HLA, на сьогодні дана система є найбільш вивченою і систематизованою не тільки у людини, але і у тварин. Під час вручення Нобелівської премії Ж.Доссе зазначив, що вивчення цієї системи є яскравим прикладом світового гуманітарного співробітництва, оскільки в даному випадку не потрібно було навіть патентувати дослідницькі результати. Були створені спеціальні міжнародні програми по дослідженню системи HLA з обов'язковим обговоренням на робочих нарадах. За даною програмою дослідники різних країн використовують єдині сертифіковані методи досліджень і тест-реагенти. Наслідком цієї співпраці є все зростаюча кількість ідентифікованих та систематизованих HLA алелей (в 1991р. – 150; в 1998 р.– 472; в 2005 р. – 1900 алелей).

Таким чином, HLA є високополіморфною системою. В межах кожного локусу визначена велика кількість різних специфічностей генів (рис. 6.1.1), які відрізняються між собою за амінокислотною послідовністю.

Генетичний поліморфізм системи HLA	
■ HLA-A: 506	HLA-DRA: 2
■ HLA-B: 872	HLA-DRB1: 525
■ HLA-C: 274	HLA-DQA1: 25
	HLA-DQB1: 66
	HLA-DPA1: 15
	HLA-DPB1: 114

Рис. 6.1.1. Генетичний поліморфізм системи HLA. На рисунку наведено кількісний склад специфічностей в межах кожного локусу.

Номенклатура генів системи HLA і кодованих ними антигенів затверджується комітетом ВОЗ. Позначення HLA антигенів складається зі знака всієї системи, локусу, до якого відноситься антиген, номера антигену. Якщо генетична позиція антигену не встановлена остаточно і він не має офіційної номенклатури ВОЗ, то перед його порядковим номером ставиться символ «w» (наприклад, Cw5).

В межах системи можуть відбуватися перехресні генетичні реакції, які роблять можливим реагування імунних сироваток певної специфічності не тільки з антигенами тотожної специфічності, але і з іншими детермінантами тієї ж алельної серії. Такі перехреснореагуючі імунні сироватки поєднані в Cross-reactive groups (CREG – крег). На сьогодні є декілька гіпотез, які пояснюють існування даного факту: специфічність HLA має походження від загального первинного пулу public-специфічності, наприклад, Bw6; існування крегів пов'язано з розщепленням складних антигенів на більш вузькоспецифічні – спліти, що вдалося встановити з використанням моноклональних антитіл. В таких випадках позначення попередньої специфічності вказують у дужках, (наприклад, HLA-A23(9)). Найбільш прогресивною моделлю даного явища вважається модель комплекс-комплекс, яка передбачає, що не тільки трансплантаційний антиген є комплексним, але і сама імунна сироватка вміщує антитіла, які вступають в реагування як з специфічними детермінантами, так і з схожими за структурою детермінантами.

В середині 80-х років, з розвитком ДНК-технологій (перш за все полімеразно ланцюгової реакції – ПЛР), стала можливою ідентифікація кількох варіантів алельних генів, що з одного боку розширило можливості визначення генно-фенотипових ознак особи, а з іншого – були визначені антигенні специфічності, які не мають серологічного еквіваленту. З'явилися певні розбіжності при трактовці результатів фенотипування у співставленні з генотипуванням. Наприклад, серотип HLA-A2 має більш ніж 25 алелей (рис. 6.1.2).

Система HLA: фенотип і генотип		
HLA-ФЕНОТИП	HLA-ГЕНОТИП	
HLA-A 2	HLA-A*0201	HLA-A*0208
	HLA-A*0202	HLA-A*0209
	HLA-A*0203	HLA-A*0210
	HLA-A*0204	HLA-A*0212
	HLA-A*0205	HLA-A*0213
	HLA-A*0206	HLA-A*0214
	HLA-A*0207	HLA-A*0215

Рис. 6.1.2. Порівняння фенотипу(серотипу) і генотипу HLA-A2 за номенклатурою

Деякі інші серотипи, також мають більшу кількість алелей за специфічністю. Даний факт дає підставу говорити про алельні і антигенні типи HLA. Тому надалі ВОЗ було запропоновано змінити серологічну структуру номенклатури системи HLA: спочатку буквами позначають ідентифікований ген, а потім цифрами вказують номер алелю. Ген, який кодує антиген HLA-A2, позначають як HLA-A*0202. Символ «*» вказує, що для фенотипування використовувався молекулярно-генетичний метод. Цифри, які йдуть за першими двома, вказують на специфічний алельний номер. Оскільки навіть методи молекулярно-генетичного типування мають різну ступінь встановлення специфічності (від групи генів до безпосередньо алеля), то один і той самий фенотип, в залежності від чутливості методу гістотипування, може мати різні числові позначення.

Наприклад, специфічність за серологічним гістотипуванням HLA-A28 (серотип) відповідає специфічності алельних генів (low resolution) HLA-A*68; - (high resolution) HLA-A*6801 (рис. 6.1.3).

Запис результатів HLA-типування:
Фенотип
HLA A 2, 28 ; B 27,35; (w4,6); Cw 2,4; DR15, 17 ; DRw 51,52 ; DQ1,2
Генотип (low resolution)
HLA A*02, 68 ; B* 27, 35; C* 02, 04; DRB1* 03 , 15; DRB3* ; DRB5* DQA1*01,02; DQB1*01,02
Генотип (high resolution)
HLA A*0201, 6801; B*2704, 3507; C* 0201; 0402; DRB1*0301, 1502; DQA1*0101, 0201; DQB1*0101, 0202
Гаплотип
1. A*0201; B*2704; C* 0201; DRB1*0301; DQA1*0101; DQB1*0101
2. A* 6801; B*3507; C*0402; DRB1*1502; DQA1*0201; DQB1*0202

Рис. 6.1.3. Порівняльна характеристика специфічності імуногенетичних маркерів системи HLA за сучасною номенклатурою в залежності від методів ідентифікації

За хімічною структурою антигени HLA є глікопротеїдами, які знаходяться на поверхні клітин і кодовані групою щільно зчеплених генів 6-й хромосоми. Антигени даної системи не тільки відіграють важливу роль в регуляції імунної відповіді, але і представляють собою сильні антигени.

Генний комплекс має 3500 тис. пар нуклеотидів ДНК. Подібно іншим видам тварин, для людини є характерним наявність всіх основних класів МНС, зокрема – HLA-I і HLA-II, HLA-III, які відрізняються за генетичною і структурною організацією розподілу в тканинах і функціями.

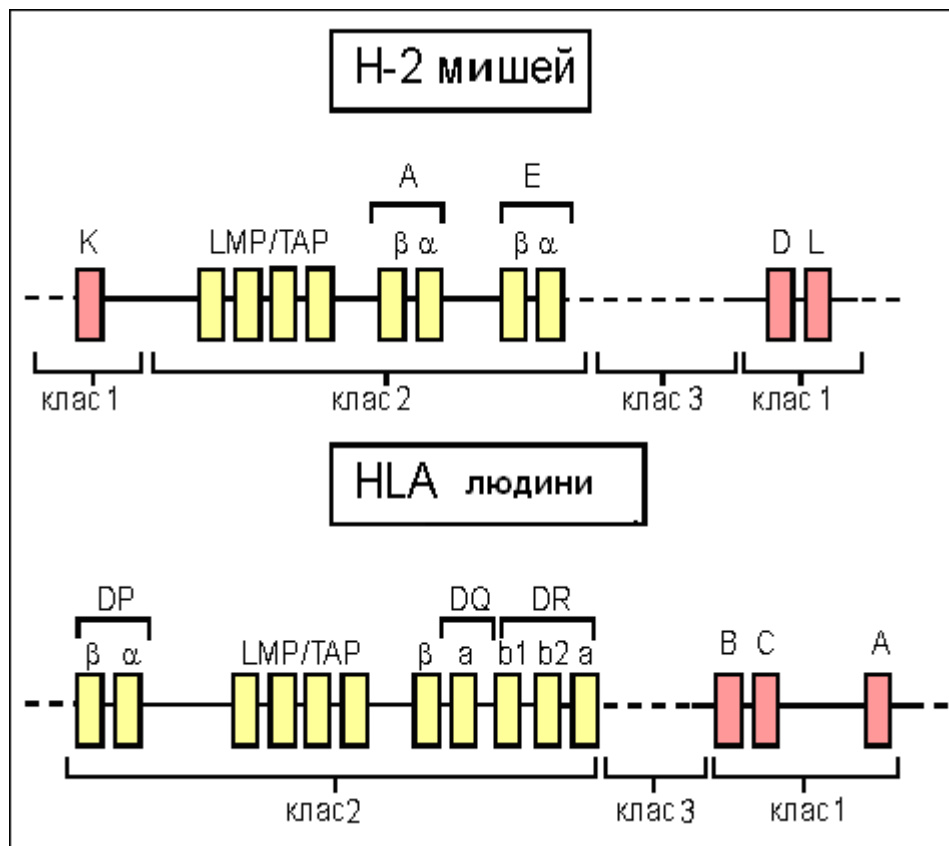


Рис. 6.1.4. Геномна організація головного комплексу гістосумісності у мишей і людини

Слід зазначити, що на тому ж кінці хромосоми розміщені і гени, які кодують еритроцитарні систем груп крові P та Chido/Rodgers (Ch/Rg), малік-ензим (ME-1), фосфоглюкомутаза-3 (PGM3), супероксиддисмутаза (SOD-2), пепсиноген5 (PG5), гліюксалазу (GLO), пропердин-фактор, компоненти комплементу(C2,C4,C8) та інші.

На сьогодні визначені і вивчені три класи антигенів гістосумісності:

- ❖ ***Антигени (HLA) класу I*** - необхідні для розпізнавання трансформованих клітин цитотоксичними Т-лімфоцитами. Антигени I класу експресовані на поверхні усіх адровміщуючих клітин і тромбоцитів.
- ❖ ***Антигени (HLA) класу II*** – забезпечують взаємодію між Т-лімфоцитами і макрофагами. Антигени II класу присутні на поверхні B-лімфоцитів, активованих T-лімфоцитів, моноцитів, макрофагів і на дендритних клітинах.
- ❖ ***Комплекс MHC класу III***, розміщений в межах групи генів MHC, або тісно зчеплений з нею, контролює деякі компоненти комплементу: C4 і C2, а також фактор В, який в більшості представлений у плазмі крові а не на поверхні клітин.

6.2 Молекулярна структура антигенів MHC

Методами рентгеноструктурного аналізу з'ясована структура HLA молекул I та II класів і просторова організація молекул MHC (рис. 6.2.1).



Рис. 6.2.1. Структурна організація молекул I та II класів системи HLA

Молекули головного комплексу гістосумісності I класу є гетеродимерами, які складаються з двох поліпептидних ланцюгів: важкого α -поліпептидного (46kD) і легкого β -поліпептидного (12kD) ланцюгів. Важкий ланцюг складається з приблизно 340 амінокислотних залишків, які формують внутрішньоклітинну частину, що утворює три домени: альфа1, альфа2 і альфа3, трансмембранний сегмент і цитоплазматичний хвостовий домен.

Кожний зовнішньоклітинний домен сформований 90 амінокислотними залишками, які можна відокремити від клітинної поверхні шляхом обробки папаїном. Два зовнішні домени (α_1, α_2) містять сахаридні ланцюги і характеризуються поліморфністю, що полягає саме у відмінності між молекулами МНС I класу, які походять від різних осіб і кодовані різними алелями. Третій зовнішньоклітинний домен (α_3) як і два інших також утворює петлю та знаходиться ближче до клітинної мембрани, і, подібно до β_2m , з яким він зв'язаний, нагадує будову ділянки тяжких ланцюгів антитіл. Він не має поліморфності. Тяжкий ланцюг кодується 8 екзонами. Перший екзон кодує сигнальну послідовність, що усувається ще в плазматичній сітці.

Другий, третій і четвертий екзони кодують домени від $\alpha 1$ до $\alpha 3$, а екзони з п'ятого по восьмий – внутрішньомембранні і внутрішньоклітинні відрізки. У клітинній мембрані молекули МНС I класу можуть утворювати тетраметри (α і 4 $\beta 2m$), що сприяє полегшенню хрестоподібному зв'язування. ТСР-рецепторів, які розпізнають презентовані через них антигени.

Легкий β -ланцюг являє собою β_2 -мікроглобулін, який складається з зовнішньоклітинного домену, котрий вміщує 100 амінокислотних залишків, є продуктом гена, що локалізовано на 15 хромосомі, і приймає участь в реалізації функції молекул I класу. β_2 -мікроглобулін не має трансмембранної ділянки і утримується на мембрані за рахунок не ковалентного зв'язку з альфа3-доменом. Він легко видаляється з клітини і його визначення в крові і сечі використовується для діагностики певних захворювань.

Встановлено, що у молекул I класу домени $\alpha 1$ і $\alpha 2$ збудовані з однієї меліси α і чотирьох стрічок β . Разом вони утворюють рівчак, дно якого становить структура гофрованого аркуша, який складається з восьми протибіжних стрічок β , а його краї утворені обома гелісами α . Цей рівчак міститься на β_2 мікроглобуліні і домені $\alpha 3$, які знаходяться між ним і клітинною мембраною. Власне цей рівчак є місцем локалізації Т-пептидів (антигенів), презентованих Т-лімфоцитами. Рівчак вміщує шість заглибин, які називають кишнями. У ці кишні входять бокові ланцюги амінокислот антигену, презентованого молекулою МНС. Амінокислоти, чий боковий ланцюг входить в ці кишні називають якірними. Конкретна молекула МНС потребує зв'язати в кишнях свого рівчака 2–3 якірні амінокислоти даного антигену для ефективності його зв'язування і презентації Т-лімфоциту. Домени $\alpha 1$ і $\alpha 2$, які утворюють даний рівчак, мають властивість розпізнаватись не тільки аутогенними Т лімфоцитами, але і чужорідними (галогенними) цитотоксичними Т-лімфоцитами, наприклад, у випадках відторгнення трансплантату

Молекули МНС II другого класу також складаються з двох ланцюгів α і β , які з'єднані між собою не ковалентними зв'язками. Ці ланцюги мають подібну будову. Ланцюг α має масу близько 33 *kDa*, а ланцюг β – близько 29 *kDa*. Зовнішньо клітинна частина (N-кінцева) в обох ланцюгах збудована з двох доменів. Короткий внутрішньомембранний відрізок містить 23, а зовнішньомембранний – 8–15 амінокислот. Зовнішні домени ($\alpha 1$ і $\beta 1$) утворюють рівчак, подібний до того, який утворюють домени $\alpha 1$ і $\alpha 2$ тяжкого ланцюга молекул МНС I класу. Його дно теж утворюють вісім протибіжних стрічок β , а краї утворені двома гелісами α . Рівчак вміщує шість кишень. У ці кишені також входять бічні ланцюги амінокислот антигенів, презентованих молекулою МНС II. Поліморфність молекул МНС II класу обумовлюється переважно доменами $\alpha 1$ і $\beta 1$. Домени $\alpha 2$ і $\beta 2$ подібні до доменів стабільних ділянок тяжких ланцюгів імуноглобулінів. Молекули МНС II мають схильність до утворення димерів. До складу такого димеру входять два ланцюги α і два ланцюги β .

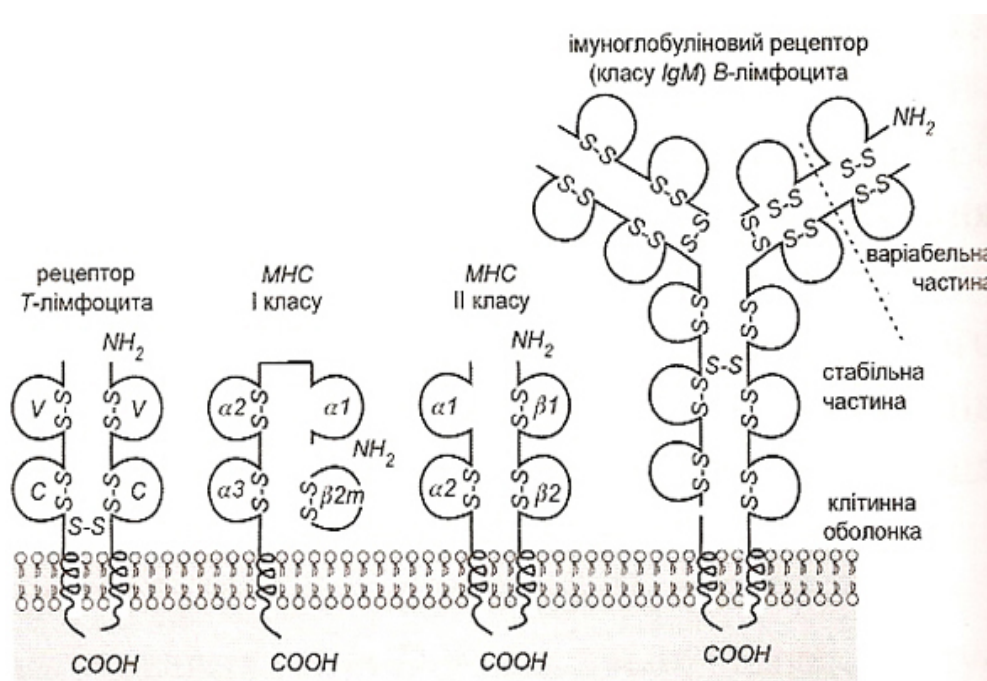


Рис. 6.2.2. Схематична структура молекул головного комплексу гістосумісності.

6.3 Структура генів і синтез молекул МНС

Головний комплекс гістосумісності у людини, як і у мишей, містить в собі три групи генів:

- *гени, які контролюють молекули I класу* (H-2K, H-2D і H-2L у мишей і HLA-A, HLA-B, HLA-C у людини);

- *гени, які контролюють молекули II класу* (альфа- і бета-ланцюги молекул A і E у мишей і DP, DQ, DR у людини). До цієї ж групи генів відносяться LMP і TAP, вони контролюють відповідні білки, які приймають участь в процесі утворення комплексу антигенного пептиду з молекулами МНС. Крім того, до регіону HLA-D відносяться гени HLA-LMP і HLA-TAP. Низкомолекулярні білки, які контролюються даними генами, приймають участь в підготовці чужеродного антигену до презентації Т-клетинам.

- *гени III класу* є відповідальними за синтез одного з компонентів системи комплементу, фактора некроза пухлинти- α і β , ферментів, які беруть участь в синтезі гормонів.

Успадкування генетичної варіабельності ознак на рівні специфічності системи HLA відбувається за кодомінантним типом.

Молекулярна організація ділянок генів I класу ГКГ

Гени I класу (у миші і людини) складають *мультигенні родини середнього розміру*. Аналіз 9×10^5 космідних клонів, які представляють геномну бібліотеку лімфобластоїдної лінії людини LCL 721, виявив щонайменше 17 генів I класу. В геномі мишей лінії BALB/c виявлено 36 генів I класу. Як показує аналіз гібридизації за Саузереном, кількість генів I класу може варіювати у популяції.

Відомо 2 види генів I класу. Перший вид, так звані класичні гени I класу, який кодує трансплантаційні АГ. До них відносяться гени K, D, L

локусів H-2 ділянок 17-ї хромосоми миші і A, B, C локусів HLA ділянок 6 –ї хромосоми людини. Продукти цих генів експресовані на поверхні всіх ядровміщуючих клітин організму, причому, гетерозиготи мають подвійний набір АГ. Трансплантаційні АГ мають великий поліморфізм, який немає аналогів.

У лабораторних мишей знайдено щонайменше 56 алелей для локусу H-2K і 45 алелей для локусу H-2D. Згідно попередніх оцінок, в популяції диких мишей для цих локусів є не менше 100-200 алелей. Встановлено існування 20, 50 і 8 алелей для генів HLA-A, -B, -C, відповідно. Будь-яка дана комбінація на одній хромосомі визначає унікальний H-2- або HLA-гаплотип; теоретично можливе число гаплотипів дуже велике. Поліморфізм АГ гістосумісності визначає біологічну індивідуальність особини, і, напевно, безпосередньо зв'язані з функціями цих молекул.

Другий вид генів I класу більш багаточисельний, ніж перший вид, і значно менш вивчений. В миші ці гени знаходяться на 17 хромосомі в ділянці Qa-Tla, розташованій дистально до H-2 ділянки. У людини частина цих, так званих, неklasичних генів I класу, розташована на 6 хромосомі дистально до A-локусу, а частина – на інших хромосомах. Ряд неklasичних генів I класу кодують АГ, які характеризуються обмеженим поліморфізмом, обмеженим розподіленням в тканинах і невідомою функцією. Qa- і Tla-АГ миші виявлені тільки на гемопоетичних клітинах, причому деякі з них з'являються тільки на певних стадіях розвитку. Внаслідок мутації, яка торкається екзону 5 (кодує трансмембранну частину молекули), деякі з цих АГ декретуються. У людини Tla-подібні АГ виявлені на деяких популяціях Т-лімфоцитів, Т-лейкемічних клітин і клітин островків Лангерганса. На відміну від ГКГ мишей, де виявлена висока гомологія в послідовностях між Qa-, Tla- і H-2 генами, між класичними і неklasичними генами I класу людини виявлено дуже значну різницю в нуклеотидній послідовності.

Для більшості неklasичних АГ I класу людини і миші в наш час невідомі ані типи клітин, ані стадії диференціювання, на яких може проходити їх експресія. Конститутивна експресія цих генів в

трансформованих L-клітинах, можливо, дозволить провести виділення і дати характеристику цих генів, та встановити їх біологічні функції.

Ряд генів ГКГ I класу (як класичні, так і не класичні) є псевдогенами. Ці гени мають високу гомологію по нуклеотидній послідовності з функціональними генами I класу, що свідчить про їх загальне еволюційне походження, однак, через накопичення мутацій вони стали дефектні по експресії. Перші 2 гени I класу HLA, для яких була встановлена повна нуклеотидна послідовність, являються псевдогенами. Клон LN-11A має багато завчасних термінуючих кодонів і мутацію, яка викликає зсув рамки зчитування в порівнянні з послідовностями, які відповідають функціональним екзомам відомих функціональних генів. Клон рHLA 12,4, ймовірно, також не може кодувати класичний АГ I класу через мутації, які викликають заміну цистеїну в положенні 164 на фенілаланін, що виключає можливість утворення структурно важливого дисульфідного зв'язку всередині другого позаклітинного домену.

Таблиця 6.3.1

Гени HLA

Назва гена	Властивості
HLA-A	кодує ланцюг α I класу
HLA-B	кодує ланцюг α I класу
HLA-C	кодує ланцюг α I класу
HLA-E	
HLA-F	
HLA-G	
HLA-H	псевдоген
HLA-J	псевдоген
HLA-K	псевдоген
HLA-L	псевдоген
HLA-DRA	кодує ланцюг α DR
HLA-DRB1	кодує ланцюг β 1 DR
HLA-DRB2	псевдоген
HLA-DRB3	кодує ланцюг β 3 DR
HLA-DRB4	кодує ланцюг β 4 DR
HLA-DRB5	кодує ланцюг β 5 DR
HLA-DRB6	псевдоген
HLA-DRB7	псевдоген

HLA-DRB8	псевдоген
HLA-DRB9	псевдоген
HLA-DQA1	кодує ланцюг α DQ
HLA-DQB1	кодує ланцюг β DQ
HLA-DQA1	експресія невідома
HLA-DQB2	експресія невідома
HLA-DQB3	експресія невідома
HLA-DOB1	кодує ланцюг β DO
HLA-DMA	кодує ланцюг α DM
HLA-DMB	кодує ланцюг β DM
HLA-DNA	кодує ланцюг α DN
HLA-DPA1	кодує ланцюг α DP
HLA-DPB1	кодує ланцюг β DP
HLA-DPA2	псевдоген
HLA-DPB2	псевдоген
TAP1	кодує білок, який транспортує пептиди до цитоплазматичної сітки
TAP2	кодує білок, який транспортує пептиди до цитоплазматичної сітки
LMP2	кодує білок, подібний до протеаз
LMP7	кодує білок, подібний до протеаз

Регіон системи HLA, що охоплює гени молекул МНС I класу, містить гени тяжких ланцюгів HLA – A, B, C. Натомість, ділянка D, яка містить гени для молекул МНС II класу, має більш складну структуру (рис. 6.3.2). У цій ділянці знаходяться гени як для α –ланцюгів, так і для β -ланцюгів молекул МНС II класу. Два близько розташовані гени кодують ланцюг α *HLA-DP* і два гени кодують ланцюг β *HLA-DP*, натомість ***DPA2*** і ***DPB2*** є псевдогенами, тобто вони не підлягають транскрипції.

Гени ***DQA2*** і ***DQB2*** не виглядають як псевдогени, але і досі не виявлено їх продуктів, які вони кодують. З двох генів DQ, обидва є поліморфними. Оскільки у молекул МНС II класу ланцюг α , кодований в одній хромосомі, може зв'язуватись з ланцюгом β , кодованим в будь-якій з двох хромосом і навпаки, то у гетерозиготи за генами HLA-DQ можуть зустрічатися чотири різні молекули HLA-DQ.

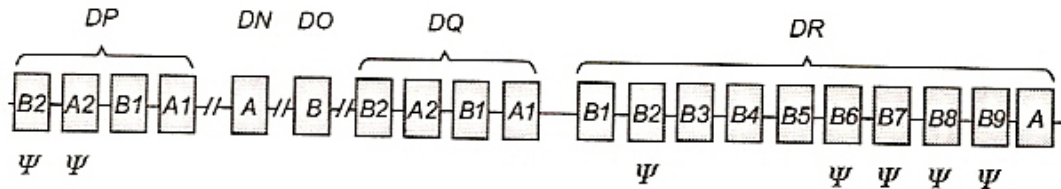


Рис. 6.3.2. Схема району D системи HLA. Літерою ψ позначено псевдо гени (недіючі гени).

Стосовно генів **HLA-DR** ситуація є складнішою, оскільки в хромосомі може бути дев'ять генів, які кодують ланцюг β – від **DRB1** до **DRB9**. Ген **DRB2** і гени від **DRB6** до **DRB69** є псевдогенами. Нетиповим вважається той факт, що кількість генів **DRB** є різною у різних організмів. Це призводить до того, що змінюється кількість варіантів молекул **HLA-DR** у одної особини. За певних умов можуть з'явитись нетипові молекули МНС II класу шляхом зв'язування ланцюгів **-DR α** з **-DR β** . У ділянці **D** знаходяться також гени для вказаних білків, що транспортують пептиди, які потім зв'язуються з молекулами МНС I класу. Встановлено, що поліморфність генів МНС, які кодують молекули II класу стосуються також і промоторів, що може призвести до формування алель них відмінностей рівня тканинної експресії цих молекул.

Для ідентифікації генів I класу були широко використані системи трансфекції – експресії генів. Гени I класу трансфікували за допомогою Са-фосфатної преципітації за присутності маркерного гена тимідинкінази у мішені, Ltk⁻ клітини, дефектні за ендогенною тимідинкіназною активністю. Клітини з Ltk⁺-фенотипами піддаються селекції за допомогою середовища ГАТ. Експресію трансфікованих генів можна встановити за допомогою АТ, які розпізнають АГ-клітинної поверхні. В наш час за допомогою цього підходу вдалося ідентифікувати і структурно охарактеризувати ряд генів I класу людини (HLA-A₃, -A₂, -A₂₄, -B₇, -B₂₇, -B_{w58}, -C_{w3}) і миші (H-2K, D, L, Tla, Qa-23).

Особливістю молекулярної організації генів I класу на хромосомах миші є їх розташування у вигляді кластерів близько розташованих генів, які виявляються при клонуванні в космідах.

На відміну від миші, у людини всі неklasичні гени I класу розташовані на одній хромосомі. Крім того, ці гени розташовані на значному віддаленні один від одного, і при клонуванні в космідах лише в деяких випадках один клон містить більше одного гена. Через це в наш час вдалося скласти приблизну карту локалізації лише для класичних генів I класу: центромера - HLA - B - HLA - C - HLA - A - теломера з відстанню між B-C і C-A 0,1 сМ і 0,7 сМ відповідно. При цьому локус A включає 4 гени, один з яких функціональний, на ділянці протяжністю 60 т.п.н., локус B - 2 гени (1 - функціональний) на ділянці 40 т.п.н., локус C - мінімум 2 гени (1-функціональний). Більшість неklasичних генів I класу розташовані у напрямку до теломери від A-локусу. Точна локалізація цих генів буде розрахована, напевне, найближчим часом з використанням методу гелелектрофорезу в пульсуючому полі.

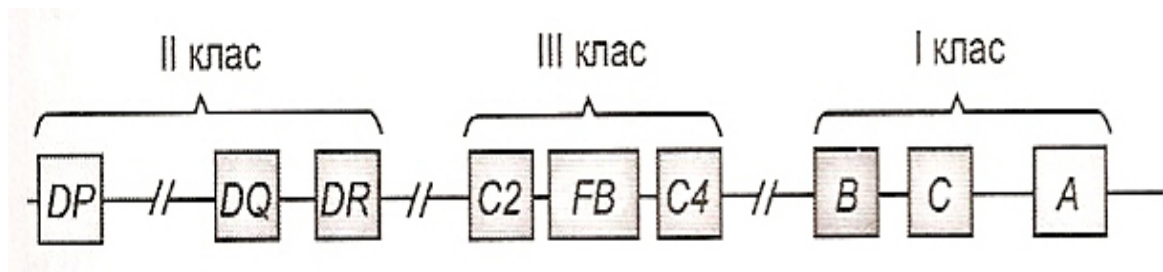


Рис. 6.3.4. Схема генетичної карти HLA системи гістосумісності людини

Структура генів I класу

В наш час встановлена структура наступних функціональних генів I класу миші: K^{β} , K^d , K^kL^d , $Qa(27,5)$, D^b , D^d ; у людини: HLA-A₃, -A₂, -A₂₄, -B₇, -B₂₇, -B_{w58}, -C_{w3}. Всі вивчені гени I класу мають схожі розміри (біля 5 тис. п.о.) і подібну екзон-інтронну організацію, яка повністю відповідає доменам

трансплантаційних АГ. До екзону E_1 , який кодує сигнальний гідрофобний пептид розміром 20-24 залишки, є також 7 екзонів, з яких чотири – E_2 - E_5 – відповідають позаклітинним доменам α_1 , α_2 , α_3 і трансмембранній гідрофобній ділянці. Останні три екзони E_6 - E_8 кодують цитоплазматичну частину АГ І класу і 3'-нетранслюючу ділянку (біля 420 п.н.) і трохи відрізняються у різних генів І класу.

Екзони E_6 - E_8 кодують цитоплазматичні сегменти всіх вивчених АГ гістосумісності миші, а також АГ HLA- A_3 , $-A_2$, $-A_{24}$, $-B_7$, $-B_{27}$, $-B_{w58}$, $-C_{w3}$. В генах В-локусу (HLA- B_7 , $-B_{27}$, $-B_{w58}$) цитоплазматична частина кодується тільки двома екзонами E_6 і E_7 , а екзон E_8 не використовується через наявність додаткового термінуючого кодона в інтроні 7. В двох охарактеризованих псевдогенах людини екзон E_8 містить тільки 3'- нетранслюючу послідовність, однак, в гені рHLA-12,4 частина цитоплазматичного кодона (перші 7 АК залишків) кодується п'ятим трансмембранним екзоном (іншими словами, в цьому гені відсутній інtron між 5 і 6 екзонами).

Екзони та інтрони різних генів І класу за розмірами практично однакові, окрім інтрона між екзонами E_3 і E_4 , який відрізняється по довжині у генів різних локусів. 3'-нетранслююча ділянка складається з двох ділянок – високогомологічної послідовності довжиною 310 п.о. і повністю негомологічної послідовності розміром 110 п.о., які вміщують один або два сигнали поліаденілування ААТААА. Елементи промотора відрізняються у різних генів І класу миші. В якості компонентів промотора для РНК-полімерази II використовують послідовності ТАТААА і ССААТ, розташовані на відстанях 30 і 50 п.о. від 5'- ділянки ініціації транскрипції (–30 і –50). В генах І класу людини використовують послідовності ТСТААА замість ТАТААА і послідовність ССААТ, розташовані на таких же відстанях. Лише ген C_{w3} має повністю іншу структуру промотора: послідовність ТСТГАА на ділянці –30 і послідовність ССААТ на відстані 118 (замість – 50).

Наявність декількох екзонів, що кодують цитоплазматичну частину АГ гістосумісності, вказує на можливість альтернативних способів сплайсингу

мРНК АГ І класу, аналогічних сплайсингу мРНК C_{μ} -генів імуноглобулінів. Ця властивість добре вивчена у випадку генів І класу миші. Порівняння 3'-кінцевих послідовностей кДНК, які відповідають С-кінцевим ділянкам молекул Н-2L^d (клони рН-21 і рН-211), Н-2K^b (клон рН-202), Н-2D^b (клон рН-2^d-1) і гена 27,5 припускає можливість, щонайменше, трьох способів сплайсингу мРНК (рис.6.3.6):

1) з вилученням інтрона 7, що приводить до включення цитоплазматичних доменів всіх трьох екзонів (рН-21, рН- 2^d-1);

2) зі збереженням інтрона 7 (рН-211). В цьому випадку екзон 8 не експресується, адже інтрон 7 вміщує термінуючий кодон;

3) з використанням акцепторного сайту, який знаходиться в інтроні 7 на відстані 27 нуклеотидів від акцепторного сайту, який використовується в гені Н-2L^d. Це приводить до збільшення розміру екзона 8 за рахунок його подовження з 5'- кінця, як це має місце в генах Н-2К (рН-202).

Аналіз послідовностей кДНК, які представляють транскрипти І класу із Т-лейкемічних клітинних ліній, виявив наявність транскриптів, що нагадують послідовності HLA-A₂₄, але відрізняються делецією послідовності, що відповідає екзону 5. Оскільки даний екзон кодує трансмембранний сегмент, його делеція корелює з наявністю значної кількості розчинного АГ A₂₄, який продукується даною клітинною лінією. З бібліотеки кДНК мишей лінії SWR/I (галотип q) виділені клони кДНК в яких відсутній екзон 5. Відповідні мРНК також могли б кодувати розчинні форми трансплантаційних АГ. Можливо, сплайсинг, що призводить до утворення таких мРНК, проходить таким же чином, як і в імуноглобулінових мРНК, коли одному і тому ж гену відповідають 2 різні з С-кінцевої частини поліпептидних ланцюги – секретуєма і мембранна форми Н-ланцюга.

Існує припущення, що С-кінцева гетерогенність молекул трансплантаційних АГ і кодування цитоплазматичного домену трьома екзонами зв'язані зі структурним і функціональним підрозділом цієї частини молекул, необхідними для здійснення різних ефекторних функцій. На

користь цього припущення свідчать також дані про специфічне фосфорилування різних ділянок цитоплазматичного домену АГ І класу.

Поліморфізм генів І класу

Як зазначалося вище, висока ступінь поліморфізму є рисою, за якою відрізняються класичні АГ І класу. Для кожного локусу Н-2 і HLA ідентифіковано багато алелей, і всі ці алелі проявляються в популяції з високою частотою. Аналіз АК послідовності, отриманої прямим секвенуванням білків або через нуклеотидну послідовність, дозволив виявити варіабельність АК послідовності для декількох серологічно визначених алелей К і D локусів Н-2 комплексу і А, В, С локусів HLA-комплексу. Аналіз показує, що різниця між алелями менша, ніж між продуктами різних локусів. Так, порівняння повних послідовностей трьох алелей А-локуса (A_3 , A_2 , A_{24}), трьох алелей В-локуса (B_7 , B_{27} , B_{w58}) і одного алеля С-локуса (C_{w3}) виявляє наступні розходження в послідовностях: А/А (7-8,8; середнє 8,2%); В/В (8,9-11,5; середнє 9,7%); А/В (13,8-18,5; середнє 16%); А/С (17,3-19,6; середнє 18,6%); В/С (14,3-15,8; середнє 15,2%).

Порівняння всіх послідовностей АГ І класу виявляє високу варіабельність в перших двох позаклітинних – α_1 і α_2 – а також в трансмембранному і цитоплазматичному доменах. Якщо порівнювати тільки алелі, то варіабельність спостерігається переважно в α_1 і α_2 доменах. За допомогою дослідів з трансфекції рекомбінантних генів показано, що етапи, які розрізняються алло-антитілами, локалізовані переважно в цих двох доменах. В середині α_1 і α_2 доменів є ділянки підвищеної варіабельності: між АК залишками 62-80, 91-99, 153-160, 193-198, а також високо консервативні ділянки: 13-62, 117-143. Розташування цих гіперваріабельних і консервативних ділянок приблизно однакове у антигенів І класу різних видів тварин. За допомогою синтетичних пептидів показано, що гіперваріабельні ділянки вміщують алло- антигенні детермінанти.

Окрім серологічного поліморфізму існує поліморфізм, який не виявляється антитілами, однак визначаються цитотоксичними Т-

лімфоцитами або за допомогою біохімічних методів. Такий поліморфізм описаний для антигенів HLA-A₂, -B₂₇, H-2K^b. Встановлено, що варіантні K^b-молекули вміщують амінокислотні заміни у вказаних вище гіперваріабельних ділянках α_1 і α_2 доменів.

Отож, аналіз АК послідовності підтвердив, що алелі, які визначені серологічно, являються генетичними алелями. Цей висновок підтверджується також аналізом нуклеотидної послідовності, яка примикає до генів I класу. Так, різниця нуклеотидної послідовності між генами, які кодують серологічні алелі A-, B-локусів, лежить в діапазоні 3-5%, в той час, як різниця між генами, які належать різним локусам, складає 12-18%. Крім того, рестриктні карти фланкуючих ділянок генів, які кодують серологічні алелі, також виявляють високу ступінь гомології, що характерно для істинних алелей. Різниця в нуклеотидній послідовності між генами B- і C-локусів (12,2% між B₇ і C_{w3}) менша, ніж між генами A- і B-, A- і C-локусів (17,3% між A₃ і B₇; 16,5% між A₃ і C_{w3}). Це відповідає генетичній спорідненості B- і C-генів, що може відображати близьке еволюційне взаємовідношення.

Порівняння гомології послідовностей між екзонами і інтронами різних генів I класу HLA показує, що різниця в послідовності між інтронами лише на декілька процентів переважає різницю між екзонами, як між алелями, так і в випадку генів різних локусів. Наприклад, у випадку алелей A-локуса різниця між екзонами складає 3,2%, а між інтронами – 4,9%; при порівнянні генів, які належать трьом локусам (A₃, B₇, C_{w3}) різниця між екзонами складає 13,3%, а між інтронами – 15,4%.

Різниця між інтронами H-2-генів обумовлена нуклеотидними замінами і делеціями розміром від 1 до 20 п.о. Якщо брати до уваги тільки нуклеотидні заміни, то гомологія інтронів >90%. Як вже відмічалось, перші 310 п.н. 3'-нетранслюючих ділянок також високогомологічні (96-98% гомології).

Таким чином, висока консервативність некодуючих послідовностей характерна для генів I класу. Висловлено припущення, що гомологія послідовностей інтронів служить основою гомологічних рекомбінацій між

неалельними членами мультигенної родини, що забезпечують генерацію поліморфізму всередині родини генів ГКГ.

Існування великої мультигенної родини, яка виявляє високу ступінь гомології послідовностей між неалельними членами родини, і, в той же час, надзвичайно високий поліморфізм, щонайменше – в ряді локусів, здається на перший погляд парадоксальним. Це ускладнення можна подолати, припустивши існування генетичного механізму, що включає одночасний обмін блоками нуклеотидних послідовностей, в доповнення до дії механізму випадкових точкових мутацій, який буде призводити до неалельного розходження послідовностей. В цьому випадку, якщо обмінювана послідовність буде або розміром рівною або перевищувати розмір гена, це буде призводити до підвищення гомології між різними локусами. Якщо ж одинична обмінювана структура по розмірам менша за ген, це призведе до утворення мозаїчних генів, що, в свою чергу, призведе до поліморфізму.

Можливі наступні генетичні механізми, що включають обміни блоків нуклеотидів в родині генів I класу ГКГ: нерівний кросинговер, гомологічні рекомбінації і міжгенна конверсія. Механізм нерівного кросинговеру можливо відбувався в еволюції генів I класу. Міжгенні обміни цього типу можуть викликати збільшення або зменшення кількості генів. Є прямі молекулярні докази різниці кількості генів I класу в різних гаплотипах мишей, а також попередні дані про популяційну різницю кількості генів I класу. Взаємозв'язок, що спостерігається між гомологією послідовностей неалельних генів і їх хромосомним оточенням знаходиться у відповідності з участю механізму нерівного кросинговеру. Такі міжгенні обміни послідовностей можуть відповідати за гомологію послідовностей між неалельними генами. Є докази участі гомологічної рекомбінації в еволюції гена A_{w69} . Аналіз нуклеотидної послідовності показує, що гомологічна рекомбінація між генами A_2 і A_{w68} в положенні між другим екзоном і другим інтроном веде до утворення *in vivo* гібридного гена (A_{w69}), який нагадує A_{w68} на 5'-кінці і A_2 на 3'-кінці.

Детальний аналіз заміन нуклеотидів в послідовностях генів І класу ГКГ показує, що ці заміни розподілені не рівномірно, а кластиризуються в певних ділянках E_2 і E_3 екзонів, що співпадають, як правило, з декількома ділянками гіперваріабельності АК послідовності. В генах І класу HLA найбільш суттєвою такою ділянкою являється ділянка, яка кодує АК залишки 76-83. В цій області послідовність A_{24} унікально відрізняється від інших послідовностей А-локуса, маючи 8 замін на 21 основу (4 в першому положенні і 4 в другому положенні кодона), які ведуть до 7 замін АК залишків в області 76-83. Зокрема ця послідовність є в алелях В-локуса B_{w58} і B_{w27k} , і в псевдогені рHLA 12,4. Інші випадки кластеризації нуклеотидних різниць між алельними генами А- і В-локусів включає області 2-го і початку 4-го екзонів, кодуючи відповідно, АК залишки 62-74 і 276-286. Ці дані вказують на наявність міжгенної конверсії, яка веде до поліморфізму шляхом переносу блоків послідовностей. Свідчення на користь цього механізму було отримане також при вивченні генів І класу *vt* 1 – мутантів миші.

Мутація *vt* 1 призводить до заміни послідовності $Arg^{155} - Leu^{156}$ (ACA-CTC) на $Tyr^{155} - Tyr^{156}$ (TAT-TAC), тобто потребує одночасної заміни п'яти основ підряд. Послідовність $Tyr^{155} - Tyr^{156}$ знайдена в тому ж положенні в молекулі Н-2L^d. Амінокислотні заміни у багатьох інших *vt*-мутантів – це також кластеризовані заміщення, які потребують багатьох замін основ, причому ці кластеризовані заміни можуть бути виявлені в тих же положеннях в інших молекулах І класу.

Відомо, що тільки гени, гомологічні один одному, можуть обмінюватися ДНК за допомогою механізму конверсії. Оскільки родина генів І класу ГКГ вміщує 20-40 генів, володіючих високим ступенем гомології як в кодуючих, так і в некодуючих областях, ймовірність участі механізму конверсії генів досить висока. Джерелом нової інформації можуть служити неалельні гени І класу, включаючи псевдогени. Той факт, що кластеризовані заміни основ в генах І класу спостерігаються тільки в екзонах, припускає участь мРНК в процесі генетичного обміну.

Слід зазначити, що консервативність АК послідовності α_3 домену узгоджується з особливостями мутацій в E_4 -екзоні. Порівняння частоти мутацій в кожному із трьох положень кодонів показує, що в 4 екзоні мутації проходять переважно в третьому положенні: 51,7% замін в E_4 -екзоні при порівнянні алелей А-локусу і 77,4% замін в E_4 -екзоні при порівнянні всіх алелей. В інших екзонах заміни розподілені рівномірно. Оскільки заміна в третьому положенні в $\frac{3}{4}$ випадків веде до консервації АК залишка, заміна в 3 положенні в E_4 -екзоні узгоджується з консервативністю амінокислотної послідовності в α_3 -доміні, який бере участь у взаємодії з неполіморфним легким ланцюгом і є результатом дії механізму негативної селекції.

Молекулярна організація I- і D-ділянок ГКГ миші і людини

Гени, що кодують антигени II класу (Ia-антигени), розміщені в I-області H-2комплексу і D-області комплексу HLA. На відміну від генів I класу, гени, що кодують обидві субодиниці антигенів II класу (α і β), входять до складу ГКГ та відносяться до II класу.

На основі рекомбінаційного аналізу конгенних ліній мишей I-область ділиться на два локуси – I-Ф і I-E, які кодують добре вивчені високо поліморфні антигени II класу і скорочено позначаються як А- і Е-молекули. Ці молекули знайдені на поверхні В-лімфоцитів, активованих Т-лімфоцитів, моноцитів, макрофагів і дендритних клітин лімфоїдних органів. Останнім часом отримані прямі докази того, що Ia-антигени виконують свою функцію шляхом прямого зв'язування антигену і утворення на поверхні клітин молекулярного комплексу, котрий потім розпізнається Т-клітинами за допомогою відповідного рецептора.

Аналіз за Саузерном геномних ДНК миші за допомогою проб кДНК, показав, що гени II класу утворюють невелику, в порівнянні з генами I класу, родину. В геномі мишей BALB/c відкрито тільки два гена α -ланцюгів і шість генів β -ланцюгів. Для визначення розміщення генів в I-області був використаний метод «проходження по хромосомі». За допомогою цього методу були виділені 19 космідних клонів, які перекриваються. В I-області знайдено 8 генів: $A_{\beta 3}$, $A_{\beta 2}$, A_{β} , A_{α} , $E_{\beta 1}$, $E_{\beta 2}$, $E_{\beta 3}$, E_{α} . Приблизно в середині

клонованої області знаходиться ген E_{α} , який був картований в субрайоні I-E. Аналіз первинної структури гена $A_{\beta 2}$ показав, що кодована ним амінокислотна послідовність дуже близька послідовності домену β_2 . на даний час невідомо чи є ці гени, а також ген $E\beta 3$, функціональними.

В результаті «проходження по хромосомі» між генами $E_{\beta 1}$ і E_{α} не були знайдені послідовності, які відповідають локусам I-B і I-J, котрі раніш постулювались в I-області на основі серологічних даних. Єдина ділянка ДНК, яка не була досліджена і, яка могла б містити відповідні гени, знаходиться на 3'-кінці гена $E_{\beta 1}$. Однак, приймаючи до уваги розміри цієї ділянки (3,4 т.п.н.), таке припущення малоймовірне. Можливо, гени I-J знаходяться поза I-областю, а їх експресія знаходиться під контролем регуляторного елемента, який кодується в цій області.

HLA-D ділянка, щонайменше, в три рази більша за I-ділянку і побудована складніше: вона містить чотири локуси – DP, DZ/DO, DQ і DR, причому кожен локус містить як мінімум 1 α - і 1 β -ген. Ця карта не є остаточною, і наступні дослідження можуть внести зміни до її складу. Крім того, знайдені розходження в D-області в популяції. Встановлено, що DR-локус відповідає E-локусу, DQ – A-локусу. DP-локус не має аналогів в H-2 комплексі. Продукти DZ/DO-локуса на сьогодні не ідентифіковані.

Найбільш вивченим локусом є HLA-DP, довжина якого складає 100 т.п.о. і містить дві пари α/β -генів, α - і β -гени організовані в орієнтації голова до голови, причому відстань між промоторами двох експресованих генів $DP_{\alpha 1}$ і $DP_{\beta 1}$ складає лише 2 т.п.у. (8'). Ці гени були секвеновані і детально вивчені. $DP_{\beta 1}$ ген має типову структуру генів II класу. Існують данні про різні способи сплайсингу цих генів в різних гаплотипах, які ведуть до різних цитоплазматичних доменів. Функція цитоплазматичних доменів невідома. Два інших гени а – $DP_{\alpha 2}$ і $DP_{\beta 2}$ – можливо, являються псевдогенами .

Про ділянку DZ/DO існує дуже мало конкретної інформації. На сьогодні, за даними гель-електрофорезу в пульсуючому полі, локалізовані два гени - DZ_{α} і DO_{β} . Цей метод також показав, що DZ_{α} -ген зчеплений з DP-областю, а DO_{β} - DX-DQ. Додатковим доказом того, що DO_{β} –ген

локалізований між DP і DQ, є те, що мишиний ген II класу I-A_{β2}, з котрим він найбільш гомологічний, локалізований між I-A_{β3} і I-A_{β1}. Встановлено також, що відстань між генами досягає декількох т.п.н. Це означає, що ці два гени не являються парою α/β. Дійсно, показано, що ці два гени експресуються незалежно один від одного.

Область DQ, як і DP, містить дві пари α/β-генів. Існує припущення, що вони розміщені в послідовності: центромера DX-DQ, DQ_α- і DQ_β-гени та експресуються, однак до сих пір відсутні докази експресії другої пари - DX_α і DX_β.

DR-область була досліджена рядом груп. У більшості галотипів існує два експресованих DR_β-гени і декілька псевдо генів і тільки DRI має один експресуємий ген [81]. Один DR_β-ген відповідає серологічно визначеному DR-типу (DRI-14), а інший – типам DRw₅₂ і w₅₃. Охарактеризовані два псевдогени, один з яких складається з окремого β₁ екзона, котрий трохи відрізняється від DR_β, однак ідентифікується як DR_β по фланкуючій послідовності. Ці псевдогени можуть виступати в якості донорів при конверсії генів і, таким чином, не є повністю нефункціональними.

Структура генів II класу

На даний час повністю або частково встановлена структура наступних генів II класу миші: A^d_a (97), A^k_a (98), A^d_β (99,100), A^k_β (99), A^b_β (78, 99), E^d_a (101), E^k_a (102), E^d_β (103), - і людини DP_a (104, 105), DZ_a (105), DQ_a (92, 93, 104, 105), DQ_β (90,91), DR_a (106), DR_β (80, 81, 84, 107-109). Як і у випадку генів I класу, екзон-інтронна організація генів II класу повністю відповідає доменній організації білків.

Аналіз нуклеотидної послідовності α- і β-генів підтверджує відповідність генів DR і DQ локусів людини генам E та A локусів миші.

Як вже було зазначено, α-гени значно розрізняються за ступенем поліморфізму. Відносно механізмів генерації поліморфізму, то сьогодні існує багато даних про існування обміну генетичною інформацією між алелями одного або різних локусів II класу за допомогою гомологічного кросинговеру

або конверсії генів. Вважається, що основним механізмом генерації поліморфізму DR алелей є міжгенна конверсія.

Запропонована схема еволюції α - і β -генів, згідно якої первісна дуплікація/ї призвели до утворення щонайменше 4 α -генів, які в результаті дивергенції привели до 4 локусів DP, DZ/DO, DQ і DR. Дуплікації, що пройшли пізніше заклали початок розділу DP α 1/ α 2 і DX α /DQ α . Приблизно в той же час йшла і дуплікація β -генів, у вигляді пар α/β , як припускається для DX α/β і DQ α/β . Наступні дуплікації β -генів привели до різних β -генів. Порівняння карт D-області і I-області показує, що вони подібні (з урахуванням делеції у миші області DP α -DZ α).

Відносно генів, які кодують молекули МНС III класу людини, відомо, що вони є теж поліморфними. Деякі алелі генів однакові у людини, шимпанзе і горили.

Дисбаланс алельних зв'язків HLA (linkage disequilibrium).

Це явище на сьогодні є нез'ясованим. Якщо алель X гена A поширений в гаплотипах даної популяції з частотою 10%, а алель B – з частотою 20%, то легко підрахувати, що приблизно в 2% гаплотипів будуть присутні обидва алелі. Однак комбінації певних алелей у більшості випадків є невинновим. **Саме різницю між очікуваною і реальною комбінацією даних алелей і називають дисбалансом зв'язків.**

Таке невинновке поєднання алелів двох різних генів може бути позитивним або від'ємним (негативним). Це явище може стосуватися не тільки двох, але і багатьох алельних сусідніх генів. Інколи це явище називають «розщепленим гаплотипом». Прикладом може бути комбінація алелів, що кодують молекули *HLA-A1*, *-B8*, *-DR3*. Цей гаплотип представлений найчастіше у кавказькій популяції. Він часто співпадає з делецією генів *C4A* та *21 OXA* і алелем s- фактора B.

Частота появи алеля *HLA*A0101* тяжкого ланцюга *HLA-A1* становить близько 16%, а алеля *HLA*B0801* тяжкого ланцюга *HLA-B8* – близько 9%.

Припускають, що у випадку дуже близько розташованих генів дисбаланс з'єднання може виникати через те, що алелі ще не «перемішалися» в популяції, тому що вони пізно з'явилися у розвитку виду. Але у більшості випадків підстав для такого ствердження немає.

Слід зазначити, що особи з молекулами специфічності **HLA-A1, -8, -DR3**, які кодовані генами з сильним додатнім дисбалансом, частіше від інших страждають аутоімунними захворюваннями. **Цей факт підтверджує що продукти МНС класу II мають вирішальне значення в патогенезі аутоімунних захворювань.** В зв'язку з цим проводяться наполегливі спроби зв'язати аутоімунні хвороби з генами імунореактивності, які контролюють відповідь на певний аутоантиген або на будь-який можливий етіологічний агент. Можливо цей факт розглядати з позицій феномену генетичної рестрикції, коли в результаті спільності окремих епітопів антигенів **HLA** - комплексу з одного боку і деяких вірусів і мікробів з іншого (феномен мімікрії) імунна відповідь на ці збудники не розвивається. В інших випадках, навпаки, в основі патології може бути трансформація окремих епітопів HLA при їх взаємодії з антигенами збудників, в результаті чого має місце імунна відповідь проти особистих HLA антигенів, що призводить до розвитку аутоімунних процесів.

Такі механізми не є єдиними для асоціацій між алелями МНС і захворюваннями людини. Так, гени **МНС класу II** виконують функцію генів імунної відповіді: їх продукти мають різну властивість зв'язування того чи іншого антигену, що і визначає характер (рівень) імунної відповіді на антиген – від патологічно високого до повної відсутності.

6.4 Сучасні методи типування системи HLA

HLA-діагностика або тканинне типування – це дослідження головного комплексу гістосумісності людини на рівні специфічності антигенних структур або алельних генів. В попередніх розділах ми докладно розглянули сучасні уявлення відносно молекулярної структури і геномної організації

ГКГС, а також головної фізіологічної функції системи HLA – генетичної регуляції імунної відповіді. Тому, в галузі прикладної імуногенетики, ідентифікація ізольованих специфічностей має велике значення для багатьох клінічних дисциплін, зокрема для трансплантології, трансфузіології і гематології, для диференційної діагностики ризику реалізації генетичної схильності до патологічного процесу на рівні різних нозологічних форм захворювання, для акушерства і гінекології в аспекті репродуктивної функції організму. Тобто, за допомогою HLA-діагностики можливо вирішувати різноманітні завдання - біологічна ідентифікація (HLA-тип успадковується разом з генами батьків), визначення спадковості до розвитку певних захворювань, асоційованих з генами головного комплексу гістосумісності (хвороба Бехтерева, цукровий діабет, циліакія, розсіяний склероз та інші), а також діагностика деяких форм безпліддя, пов'язаних з особливостями HLA-антигенів подружжя. HLA-діагностика застосовується з метою підбору донорів для пересадки органів та тканин, при цьому проводиться порівняння результатів HLA-типуювання тканин донора і реципієнта.

HLA-типуювання передбачає ідентифікацію специфічності антигенів і аналіз поліморфізму HLA-системи. Виділяють дві різні за принципом групи методів типуювання. Серологічний, клітинний та біохімічний методи характеризують продукти головного комплексу гістосумісності (ГКГ) — молекули, експресовані на мембрані клітини. Методи другої групи — молекулярно-біологічні — визначають алелі HLA безпосередньо з геномної ДНК. У клінічній практиці HLA-типуювання найбільш розповсюджені серологічний та молекулярно-біологічні методи на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР, PCR-polymerase chain reaction).

Серологічні методи

Відомо, що ГКГ охоплює багато генів, які відрізняються найбільшою поліморфністю з дотепер відкритих. Знання будови і функції молекул МНС є однією з умов розуміння перебігу імунної відповіді. Молекули ГКГ є

глікопротеїнами. Розрізняють молекули головного комплексу гістосумісності I, II і III класів, відмінні як за будовою, так і за функцією. Молекули ГКГ I класу присутні на поверхні всіх ядерних клітин. Натомість молекули ГКГ II класу присутні переважно на В-лімфоцитах, макрофагах, дендритних клітинах, клітинах Лангерганса, клітинах епітелію тімусу та на активованих Т-лімфоцитах.

Для ідентифікації молекул (антигенів) HLA застосовують в основному серологічні і цитологічні методи. Серологічні методи полягають у виявленні молекул HLA на клітинах (переважно лімфоцитах) із застосуванням сироваток, що взяті в осіб, які не мають даних алелів HLA. Ці сироватки беруть у :

- жінок, які багато разів народжували;
- осіб, яким часто переливали кров;
- деяких реципієнтів алогенних трансплантатів;
- спеціально сенсibiliзованих осіб.

Тепер для ідентифікації цих антигенів застосовують також моноклональні АТ.

Значним кроком у розвитку технології HLA-типування була заміна аглютинації лейкоцитів лімфоцитотоксичним тестом з використанням кролячого комплекменту. Серологічні методи засновані на ідентифікації молекул ГКГ, експресованих на мембрані (а саме — їх епітопів), за допомогою специфічних антитіл. На практиці серологічне HLA-типування проводять на вилучених клітинних популяціях. Оскільки основними носіями антигенів ГКГ є лімфоцити, суспензію Т-лімфоцитів використовують для визначення антигенів I класу, а суспензію В-лімфоцитів - для визначення антигенів II класу.

З метою вилучення необхідних клітинних популяцій з периферичної крові людини використовують або центрифугування в градієнті щільності ($\rho=1,077$), або імуномагнітну сепарацію. Вважається, що перший спосіб в деяких випадках може привести до хибнопозитивних результатів. Другий

спосіб є більш специфічним – при цьому більше 95% клітин залишаються життєздатними.

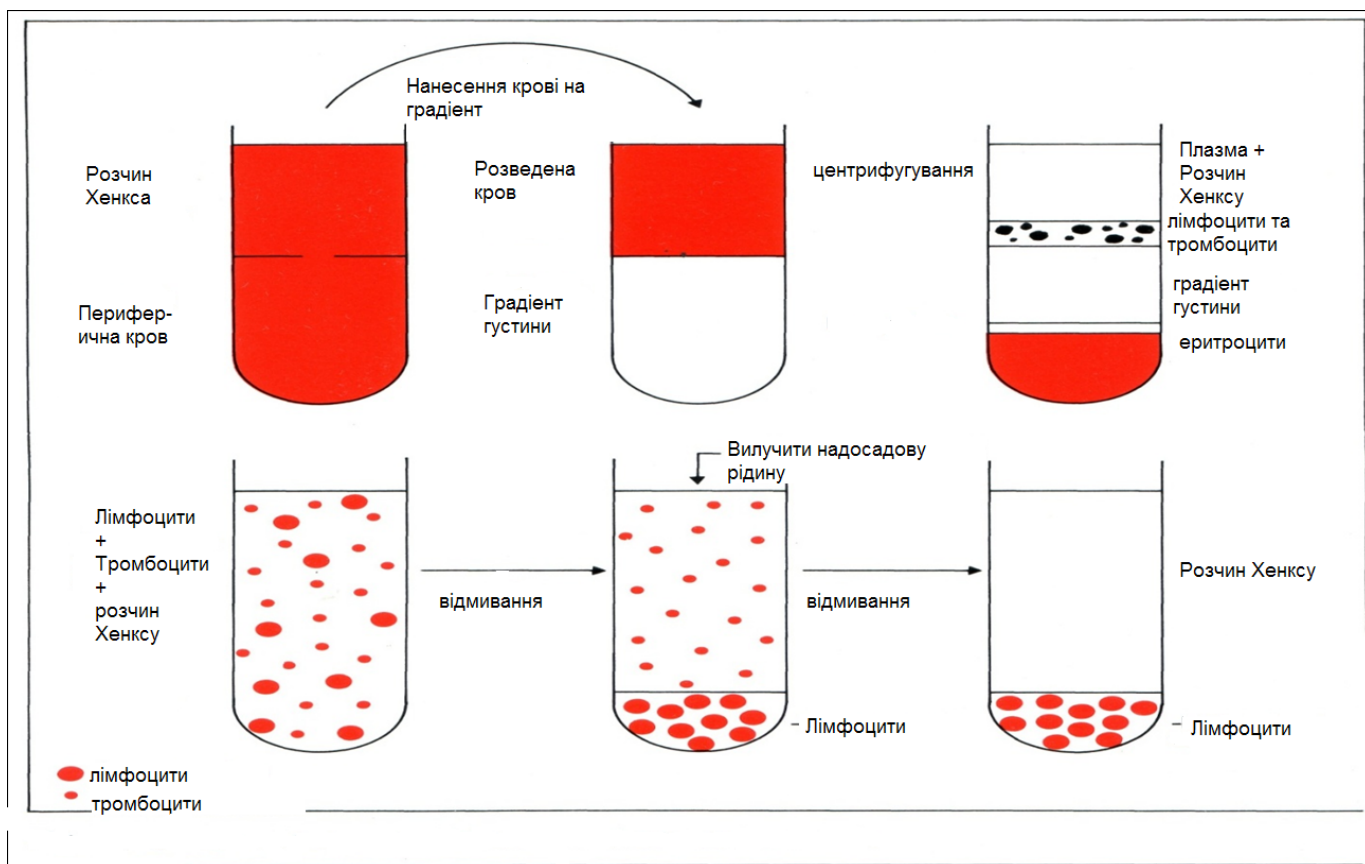


Рис. 6.4.1. Схема вилучення клітинних популяцій з периферичної крові людини за допомогою градієнта щільності

Серологічні типи молекул HLA визначають у тесті комплементзалежного лізису лімфоцитів (КЛЛ), де живі клітини інкубують з панеллю сироваток, які містять специфічні антитіла до різних алельних варіантів антигенів HLA I або II класів антитілами, у присутності комплементу. В разі наявності відповідного серотипу (а саме — відповідної послідовності амінокислот в α -ланцюгах антигензв'язуючого регіону та відповідної її конформації) специфічне приєднання антитіл до зв'язаних з клітинною мембраною молекул HLA спричиняє локалізоване пошкодження оболонки лімфоциту.

Молекули ГКГ II класу (HLA-DR, -DQ і -DP) ідентифікують у змішаній культурі лімфоцитів, оскільки вони стимулюють проліферацію

лімфоцитів, які не мають антигенів, кодованих конкретними алелями. Таку проліферацію в основному стимулюють молекули HLA-DR.

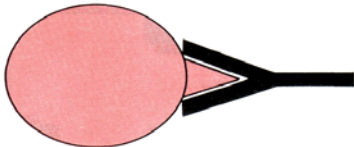
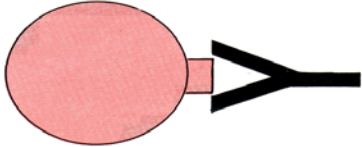
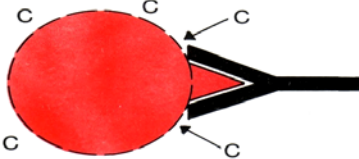
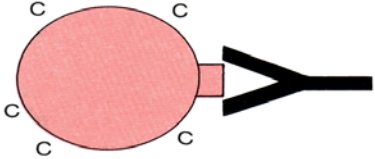
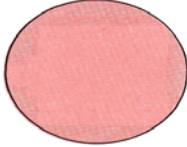
Етапи проведення КЛЛ тесту	Позитивна реакція	Негативна реакція
HLA-антисироватка (АТ) + суспензія лімфоцитів (АГ) (АТ-АГ реакція)		
Комплемент-залежний лізис клітин		
Еозин (фарбування клітин) + фіксація формаліном		

Рис. 6.4.2. Етапи проведення тесту комплемент залежного лізису лімфоцитів

Оцінюють КЛЛ-тест за допомогою флуоресцентної мікроскопії: при позитивній реакції спостерігають червону флуоресценцію, при негативній – зелену. При фазово-контрастній мікроскопії позитивну реакцію визначають за фарбуванням ядер загинених клітин. Результат HLA- типування виводять з урахуванням специфічності прореагувавших сироваток та перехресно реагуючих груп антигенів, інтенсивності реакції цитотоксичності аналізують за стандартною 8-бальною шкалою.

Серологічне HLA-типування — це надійний і добре відтворюваний метод, його недоліком є те, що він залежить від експресії молекули HLA на мембрані клітини. Це стає на заваді типуванню при слабкій або зовсім відсутній експресії, наприклад – при лікуванні кортикостероїдами. У пацієнтів з онкогематологічними захворюваннями, успадкованими дефектами диференціювання та визрівання клітин та хворих після терапії

цитостатиками та/чи імунодепресантами відмічено зниження кількості, або навіть повна відсутність клітин, необхідних для проведення КЛЛ. Ще одна проблема серологічного типування полягає в тому, що для багатьох алелів, визначених молекулярно-біологічними методами, не існує специфічних алоантитіл. Наприклад, з більш як 100 описаних HLA-DRB1 алелів тільки 18 визначаються серологічно, тобто мають відповідні серотипи.

2. Молекулярно-біологічні методи

Молекулярно-біологічні методи, або типування HLA з геномної ДНК чи РНК, були започатковані завдяки виділенню генів I та II класу HLA, на основі детального вивчення їхньої структури та визначення послідовностей нуклеотидів алелей цього регіону. Сучасні молекулярні методи HLA-типування використовують стандартизовані специфічні зразки, які реагують не з антигенами на поверхні лейкоцитів, а безпосередньо з ДНК і прямо вказують на те, які алелі присутні в пробі. Молекулярні методи не потребують живих лімфоцитів – будь-яка ядромістка клітина організму може слугувати матеріалом для аналізу.

Основою молекулярно-генетичного HLA-типування є метод ПЛР. На першому етапі використання методу слід вилучити геномну ДНК з цільної крові, лейкоцитарної суспензії, тканин. На другому етапі зразок ДНК копіюють – ампліфікують в пробірці з використанням праймерів (короткої одноланцюгової ДНК), специфічних до певного HLA-локусу. Кінці кожного з пари праймерів повинні бути абсолютно комплементарними унікальній послідовності, тотожній конкретному алелю, інакше – ампліфікація буде неможливою.

Після проведення ПЛР, в ході багаторазового копіювання, виходить велика кількість фрагментів ДНК, яку можна оцінити візуально. Для цього реакційні суміші піддають електролізу або гібридизації, та за допомогою програмного забезпечення або спеціальних таблиць визначають, відбулась специфічна ампліфікація чи ні. Результат HLA-типування надається у формі детального звіту на генному та алельному рівнях.

Спочатку для типування HLA з геномної ДНК використовували складні методи, що потребували багато часу й коштів, наприклад – метод визначення поліморфізму фрагментів ДНК за допомогою рестриктивних нуклеаз.

Метод визначення поліморфізму довжини рестриктивних фрагментів ДНК за допомогою рестриктаз (ПДРФ, RFLP – restriction fragment length polymorphism). Це перший метод аналізу ДНК, у якому фрагменти геномної ДНК, вирізані рестриктивними нуклеазами, розділяють методом електрофорезу в агарозному гелі, де фрагменти різної довжини (заряду) виявляють різну рухливість і переміщуються в електромагнітному полі на різні відстані. Візуалізація і оцінка можлива після гібридизації фрагментів з радіоактивно міченими зондами ДНК у порівнянні із зразками раніше ідентифікованих типів. ПДРФ дає більшу кількість помилок типування, ніж нові молекулярно-біологічні методи, засновані на принципі ПЛР.

Методи типування HLA на основі ПЛР. ПЛР з міченими специфічними за своєю послідовністю олігонуклеотидами (ПЛР-СПО,) та ПЛР зі специфічними за своєю послідовністю праймерами (ПЛР-СПП) займають головне місце в лабораторній діагностиці гістосумісності для алогенної трансплантації нирок та кісткового мозку.

ПЛР з міченими, специфічними за своєю послідовністю олігонуклеотидами (ПЛР-СПО, PCR-SSO sequence-specific oligonucleotide). Спочатку в ПЛР-СПО ампліфікують ділянки матричної ДНК окремих генів HLA регіону. Продукти ампліфікації фіксують на нейлоновій мембрані і гібридизують зі специфічними за своєю послідовністю, хімічно або радіоактивно міченими олігонуклеотидами. Розпізнання конкретного алелю засноване на тому, що при достатньому виборі олігонуклеотидів позитивна гібридизація має місце лише тоді, коли певний олігонуклеотид комплементарний до відповідної послідовності нуклеотидів на ампліфікованих продуктах матричної ДНК.

При наявності достатньої кількості специфічних праймерів та олігонуклеотидів метод СПО дозволяє ідентифікувати всі відомі алелі локусу. Майже для всіх відомих генних локусів системи HLA вже існують добре відпрацьовані протоколи СПО. Однак СПО-технологія не дозволяє проводити HLA-типування на рівні окремих алелів. Максимальна розподілювальна здатність методу – від низького до середнього.

Використання цього методу для типування I класу ще тільки починається.

ПЛР зі специфічними за своєю послідовністю праймерами (ПЛР-СПП, PCR-SSP sequence-specific primer; синоніми: алельспецифічна ампліфікація, система ампліфікації рефрактерних мутацій). Принцип ПЛР-СПП полягає в тому, що ампліфікація специфічного продукту в ПЛР відбувається лише тоді, коли 3'-кінець праймеру комплементарний до цільової послідовності матричної ДНК. Одна єдина відмінність між послідовностями нуклеотидів матричної ДНК та відповідного праймеру заважає ампліфікації в ПЛР, що зумовлює високу специфічність методу СПП в ідентифікації алелів. Для контролю ампліфікації до кожної проби додається ще одна пара праймерів. Вона забезпечує утворення продукту ПЛР при будь-яких умовах ампліфікації, незалежно від типу HLA. Це так званий внутрішній контроль.

Розподілювальна здатність цього методу залежить від виду та позиції різних пар нуклеотидних основ і можливості їхнього використання для ПЛР. На відміну від методу СПО ідентифікація окремих алелів відбувається вже на основі ампліфікації і гібридизація не потрібна. Розпізнання окремих алелів чи їх груп відбувається при порівнянні специфічних продуктів реакції ампліфікації за допомогою електрофореza в агарозному гелі, де продукти ПЛР розділяють за їх довжиною (зарядом) і візуалізують в ультрафіолетовому випромінюванні.

Вагомою перевагою СПП-технології є здатність проводити типування як на низькому (на рівні окремих груп генів), так і на високому рівні (на рівні окремих алелів, визначаючи точковий алельний поліморфізм).

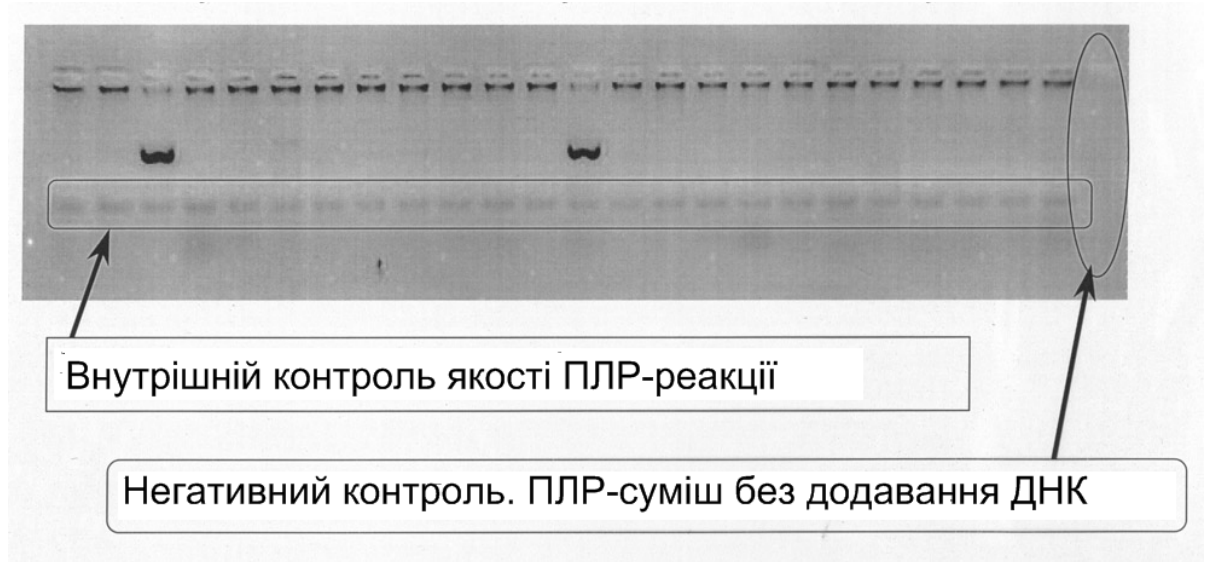


Рис. 6.4.3. Результати детекції продуктів ампліфікації молекулярно-генетичного типування системи HLA I класу локусу A.

Метод визначення поліморфізму фрагментів ДНК за допомогою рестриктивних нуклеаз на основі ПЛР (ПЛР-ПФРН). У ПЛР-ПФРН після ампліфікації ділянки ДНК зі специфічним екзоном окремі алелі чи групи алелів розпізнають на основі розщеплення продуктів ампліфікації рестриктивними нуклеазами. Розділення алель-специфічних фрагментів за їх довжиною та їх аналіз здійснюють методом електрофорезу в агарозному гелі.

Визначення поліморфізму конформації одониткового ланцюга ДНК (ПЛР-ПКОЛ). Полімеразна ланцюгова реакція з використанням принципу ПКОЛ полягає в тому, що електрофоретична рухливість окремих ланцюгів ДНК після ампліфікації залежить від розбіжностей у послідовності нуклеотидів. ПЛР-ПКОЛ використовують переважно для типування і порівняння двох алелів або двох індивідумів.

Аналіз гетеродуплексів (ПЛР-АГ). У разі наявності в реакції ампліфікації багатьох алелів під час реасоціації комплементарних ланцюгів ДНК у ході ПЛР гібридизуватися можуть не тільки гомологічні, тобто ДНК-

ланцюги одного алелю — гомодуплекс, але й комплементарні ланцюги двох різних алелей, які складають гетеродуплекс. Утворення конкретного гетеродуплексу залежить від довжини відповідних ланцюгів ДНК та характеру і кількості різних пар нуклеотидів. Розрізнення гомо- від гетеродуплексів відбувається методом електрофорезу, коли завдяки різним розмірам та/чи різному заряду продукти гібридизації переміщуються в поліакриламідному гелі на різні відстані. Синоніми ПЛР-АГ — ДНК Crossmatching та Fingerprinting.

Типування HLA на основі секвенування. Типування HLA на основі прямого визначення послідовності нуклеотидів (секвенування, sequencing) на відповідних ділянках ДНК, попередньо ампліфікованих у генспецифічній чи алельспецифічній ПЛР, надає найточніший доказ наявності окремого алелю чи комбінації алелів. З розвитком відповідної апаратури секвенування використовують як еталонний метод у типуванні HLA. При цьому один чи кілька екзонів спочатку ампліфікують в ПЛР, потім очищують продукти реакції і піддають прямому секвенуванню. Зараз в автоматизованих системах для секвенування використовують метод обриву ланцюга за Sanger. При цьому ДНК-залежна реакція подовження за допомогою ДНК-полімерази припиняється при приєднанні одного з чотирьох різних флюоресцентно мічених дезоксинуклеотидів до комплементарної ділянки матричної ДНК. Аналіз мічених продуктів реакції елонгації відбувається в спеціальній камері з агарозним гелем.

Одержану в ході секвенування нову послідовність нуклеотидів порівнюють з відомими послідовностями алелей з банку даних і таким чином ідентифікують їх або, якщо послідовність ще не відома, додають до банку даних після відповідної перевірки. Секвенування HLA-генів вже використовують в клінічній лабораторній діагностиці при пошуку неродинних гістосумісних донорів для пацієнтів, що потребують трансплантацію кісткового мозку.

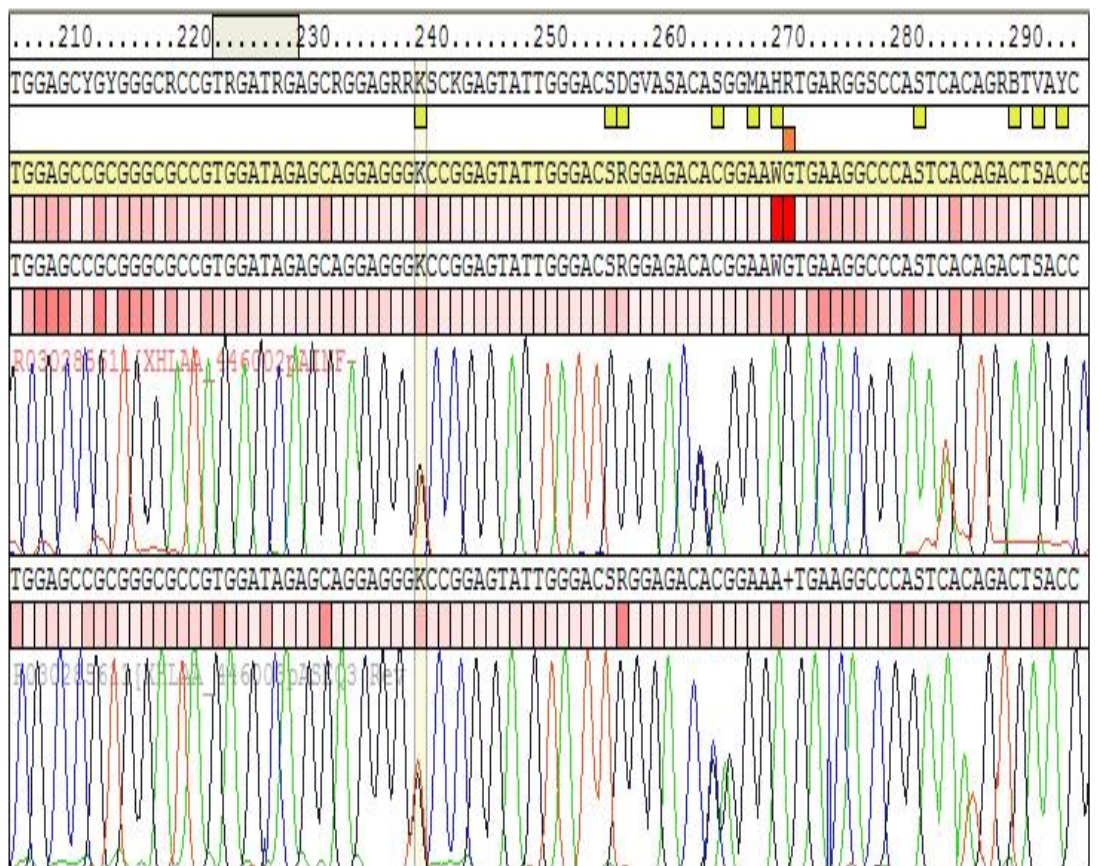


Рис. 6.4.4. Фрагмент результату секвенування локусу DRB1 II класу HLA-системи

У клінічній лабораторній діагностиці гістосумісності для пересадки нирок та кісткового мозку найбільший вжиток знайшли методи СПО, СПП та секвенування на основі ПЛР. Перший з них завдяки високій автоматизації, великій пропускній здатності та відносно низькій собівартості вважається більш прийнятним для створення кріо-сховищ пуповинної крові, реєстрів донорів кісткового мозку, крупних трансплантологічних і онкологічних центрів. Недоліком методу є невисока розподільова здатність.

Основною перевагою СПП-метода є можливість проводити типування на низькому, середньому та високому рівнях. За розподільчою здатністю цей метод прирівнюється до секвенування, але значно дешевший за собівартістю і менш складний у виконанні. Недоліком СПП HLA-типування є тривалість проведення методу і потреба у відносно великій кількості ДНК для аналізу.

Секвенування для визначення HLA-генотипу є еталонним методом в рутинній лабораторній діагностиці трансплантаційних центрів. Недоліком методу є висока собівартість та складність виконання.

Інші методи на основі ПЛР використовують для вирішення окремих нестандартних проблем клінічної діагностики та наукових питань.

Питання для самоконтролю

1. Назвіть можливі генетичні механізми, які включають обміни блоками нуклеотидів в родині генів I класу. ГКГ
2. Надайте структурну характеристику генів миші і людини.
3. Назвіть хромосомну локалізацію генів I і II класів комплексів H-2 і HLA
4. Надайте структурну характеристику класичним, некласичним генам і псевдо генам?
5. За яким типом відбувається успадкування генетичної варіабельності ознак на рівні специфічності системи HLA?
6. Скільки груп генів містить в собі головний комплекс гістосумісності у мишей, і у людини?
7. Що являють собою антигени HLA за хімічною структурою?
8. На яких клітинах експресовані антигени I; II; III класів головного комплексу гістосумісності людини. Які імунологічні функції вони виконують?
9. Назвіть основні методи ідентифікації антигенної специфічності молекул HLA.
10. Охарактеризуйте схему еволюції α - і β -генів головного комплексу гістосумісності людини.

ЛІТЕРАТУРА

9. Зарецкая Ю.М., Абрамов В.Ю. Новые антигены тканевой системы человека. - М.: Медицина, 1986. - 176 с.
10. Зарецкая Ю.М. Клиническая иммуногенетика . - М.: Медицина, 1983. - 208 с.
11. Фогель Ф., Мотульски А. Генетика человека: В 3-х т. Т. 2: Пер. С англ.. – М.: Мир, 1990. – 336 с.
12. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки. М.: Мир, 1994. Т. 2. С. 287 – 301.
13. Клиническая иммунология и аллергология Под ред. Г. Лолора-младшего, Т.Фишера, Д.Адельмана. Пер. с англ. – М., Практика, 2000, -806 с.
14. Зарецкая Ю.М., Хамагонова Е.Г., Губарев М.И. Иммунология и иммуногенетика человека, Триада, Москва, 2002. 128 с.

9.4 Лімфоцити Т і В

Багато видів клітин різного походження виконують спеціалізовану функцію імунної відповіді і розглядаються в класичній імунології як **імунокомпетентні клітини**.

-В і Т лімфоцити експресують на своїй поверхні антигензв'язуючі рецептори і інші молекули, необхідні для виконання різноманітних функцій ;

- **Т-клітинна** відповідь потребує подавання антигенів антигенпрезентуючими клітинами; **В-клітини** здатні розпізнавати нативні антигени, непродесовані і непрезентовані іншими клітинами;

Т-лімфоцити мають субпопуляційний склад і різні функціональні субпопуляції проявляють хелперну, супресорну або цитотоксичну активність; **Еозінофіли, базофіли, тучні клітини і тромбоцити** приймають участь в запальних процесах;

Лімфоцити - це єдині клітини організму, здатні специфічно розпізнавати і розрізняти різні антигени і відповідати активацією на контакт з певним антигеном.

Лімфоцити є представниками групи незернистих лейкоцитів, що характеризуються специфічним співвідношенням ядерно-цитоплазматичного матеріалу: великі, округлої форми ядра на фоні незначного об'єму базofilної цитоплазми, яка огортає ядро на зразок персня.

У крові людини кількість лімфоцитів становить в нормі близько 20-35%. В залежності від розмірів розрізняють малі (діаметром 5-7 мкм), середні (діаметром 7-10 мкм) і великі (діаметром понад 10 мкм) лімфоцити. Останні зустрічаються лише у крові новонароджених і малолітніх дітей, а у крові дорослих подібна форма лімфоцитів в нормі відсутня. Загалом у крові здорової дорослої людини присутні наступні типи лімфоцитів: 1) малі світлі лімфоцити; 2) малі темні лімфоцити; 3) середні лімфоцити; 4) плазмоцити.

Характерною особливістю лімфоцитів є те, що за умов значної морфологічної подібності цим клітинам властива виразна функціональна гетерогенність, яка забезпечує активну участь лімфоцитів у реакціях як клітинного, так і гуморального імунітету.

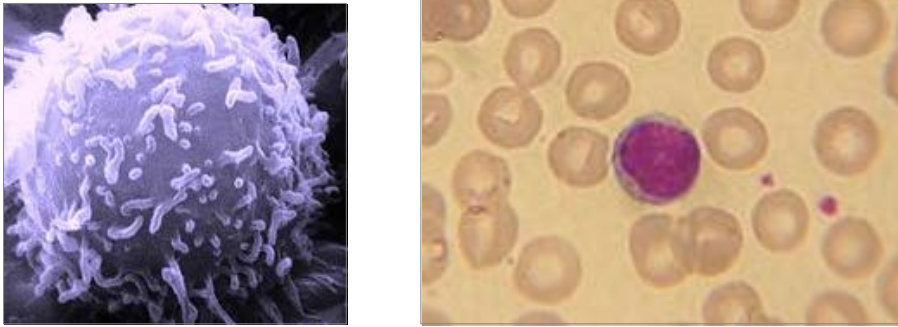


Рис. 7.2.1 Морфологічна характеристика лімфоцитів

Тривалий час вважали, що лімфоцити людини утворюються у лімфоїдній тканині, на відміну від решти клітин крові. І хоча присутність лімфоцитів у мієлоїдній тканині засвідчувалась вченими неодноразово, достатньої уваги цьому факту не надавали. Знаходження лімфоцитів у червоному кістковому мозку пов'язували з їх здатністю пересуватись з лімфоїдної тканини у кров, а звідти у мієлоїдну тканину. І дійсно, незначна частина присутніх тут лімфоцитів потрапила у мієлоїдну тканину саме таким шляхом. Однак згодом, сучасними методами, зокрема радіоавтографією, було доведено походження значного відсотка лімфоцитів з червоного кісткового мозку, з клітини-попередника лімфоцитів. У червоний кістковий мозок стовбурові лімфоїдні клітини надходять на ранніх стадіях ембріогенезу з ембріональної печінки. Ще раніше частина стовбурових клітин з печінки висівають у центральні органи імунної системи, де дають початок величезним популяціям Т- і В-лімфоцитів.

Лімфоцитопоез починається із диференціації стовбурових клітин крові і, в залежності від особливостей генезу, розрізняють Т- і В-лімфоцити. Т-лімфоцитами називають гетерогенну групу клітин, дозрівання яких

відбувається в тимусі та які забезпечують існування в організмі клітинного імунітету.

В-лімфоцити значною мірою забезпечують гуморальний імунітет організму, оскільки синтезують специфічні антитіла (імуноглобуліни); крім того, вони впливають на активність деяких Т-лімфоцитів, беручи, таким чином, участь у реакціях клітинного імунітету.

Т-лімфоцити

Диференціювання Т-лімфоцитів починається в період ембріонального розвитку. У ембріонів хребетних попередники лімфоцитів виявляються спочатку в жовтковому мішку, а після його атрофії - в ембріональній печінці. У постембріональному періоді попередники лімфоцитів знаходяться в більшій кількості - в кістковому мозку і в меншій мірі - в селезінці. З жовткового мішка, печінки і кісткового мозку попередники клітин мігрують в тимус, де перетворюються на Т-імунокомпетентні клітини. У тимусі створюється особливе мікрооточення за рахунок тимічного епітелію, що впливає на диференціювання Т-лімфоцитів.

Пре-Т-лімфоцити в кістковому мозку предетерміновані і їх диференціювання в Т-клітини може бути індуковане різними чинниками. Суть цих змін полягає в морфологічній реорганізації цитомембрани, що супроводжується появою нових антигенів і організацією специфічної сигнальної системи.

Попередники тимоцитів спочатку мігрують у субкапсулярну зону тимуса, а надалі послідовно переміщуюються в кортикальну зону, де перетворюються на незрілі кортикальні (до 90% клітини тимуса) тимоцити (фермент термінальну дезоксинуклеотидилтрансферазу (*TdT*) - специфічний маркер кортикальних тимоцитів) і в медулярну зону, де перетворюються на зрілі медулярні тимоцити, що становлять близько 10% клітин тимуса.

Дозрівання і проліферація тимоцитів відбувається під впливом гормонів, що продукуються епітелієм тимуса: **тимозину, тимопоетину,**

тимусного гормонального чинника, тимостимуліну та сироваткового тимусного чинника. Вони дозрівають по мірі переміщення з кортикальної зони тимусу в мозкову.

Процес проліферації лімфоцитів в тимусі протікає дуже інтенсивно, але не всі клітини мігрують з вилючкової залози у вигляді Т-лімфоцитів: більшість з них там же гине. Вважають, що причиною їх гибелі служить приєднання антигену до антигенспецифічного рецептора цих клітин. В тимусі немає чужорідних антигенів, от чому цей механізм може служити для видалення Т-лімфоцитів, здатних реагувати з аутоструктурами організму, тобто захищати його від аутоімунних реакцій. Більш ніж 95% тимоцитів знищуються в результаті їх позитивної та негативної клональної селекції. Спочатку відбувається позитивна селекція: в кортикальній зоні тимусу відбираються тимоцити, що несуть низькоафінні Т-клітинні рецептори і взаємодіють з поверхневими молекулами кортикальних епітеліальних клітин (з їх МНС II, презентуючими пептидами). Потім відбувається негативна селекція: в медулярній зоні тимусу тимоцити, що підлягли позитивній селекції, знищуються у випадку експресії ними Т-клітинного рецептору з підвищеною афінністю до власних антигенів. Цей процес відбувається в результаті високоафінної взаємодії Т-клітинного рецептора тимоцитів з поверхневими комплексами МНС II та пептид антигенпрезентуючих клітин (дендритні клітини та модулярних епітеліальних клітин тимусу).

Після дозрівання в тимусі Т-лімфоцити з потоком крові поступають в лімфоїдні органи і заселяють тимусзалежні зони вторинних лімфоїдних органів та бар'єрних тканин де залишаються тривалий часу і де завершується останній етап їх антигенезалежного диференціювання. Специфічна взаємодія з антигеном служить початком процесу диференціювання в зрілі і триваложивучі клітини, що становлять велику частину рециркулюючих Т-лімфоцитів.

Таким чином, попередники Т-лімфоцитів заселяють тимус, там проліферують і перетворюються на Т-лімфоцити, а потім мігрують в тимусзалежні зони периферичних органів імунної системи, де

відбувається завершення диференціювання Т-лімфоцитів в зрілі у функціональному відношенні субпопуляції Т-хелперів, Т-супресорів і Т-кілерів, які набувають здатності до специфічної активації.

Т-клітини пам'яті здатні тривалий період часу (декілька років) зберігати інформацію про той антиген, з яким вони контактували. При повторній зустрічі з даним антигеном Т-клітини пам'яті забезпечують швидке розгортання процесів вторинної відповіді імунної системи, перешкоджаючи тим самим розмноженню і поширенню антигену в організмі.

Багато років в імунології існувала ситуація, коли було відомо, що Т-лімфоцити мають на поверхні рецептор для антигену, схожий з антитілами на В-лімфоцитах, але було незрозуміло, наскільки ідентичні ці молекули. Питання було зняте в 1983-1984 рр., коли застосування моноклональних антитіл і зондів ДНК дозволило точно встановити, що і на молекулярному і на генетичному рівні Т-клітинний рецептор (*TCR - T cell receptors*) є унікальним.

Рецептор Т-лімфоцита має характерну для суперсімейства імуноглобулінів структуру, а саме, поліпептидні ланцюги, що складаються з доменів, сполучені дисульфідними зв'язками. Молекула рецептора має 2 основні ланцюги: α і β (90% Т-лімфоцитів крові), або в окремих випадках – γ і δ (1-10%), що складаються з 2 доменів кожна.

Незвичність рецепторних білків полягає в тому, що кодуючі їх гени розташовані на хромосомі не поряд, а через деякі проміжки і для поєднання відповідних генів відбувається вирізання лежачих між ними сегментів ДНК, а потім і РНК. Цей процес, відомий як перебудова генів, відбувається тільки в Т-лімфоцитах, тоді як у всіх інших клітинах гени залишаються в нефункціональному стані зародкової лінії. Перебудова генів спостерігається в індивідуальному Т-лімфоциті, що забезпечує йому унікальний рецептор і, як наслідок, унікальну антигенрозпізнавальну здатність.

(*TCR - T cell receptors*) — Т-клітинний рецептор. Складається з одного α - (ММ 50000 Да) і одного β - (ММ45 000 Да) ланцюгів, кожен з яких має зовнішній (варіабельний) та внутрішній (константний) домени,

внутрішньомембранну і цитоплазматичну коротку ділянки. На ранній стадії ембріонального розвитку, а також в деяких органах (кишечник, шкіра) Т-лімфоцити можуть мати альтернативні рецептори з γ - і δ -ланцюгами та розпізнавати інші антигени в порівнянні з α - і β -Т-лімфоцитами. Середня кількість TCR на Т-лімфоциті складає $\sim 5 \times 10^4$.

CD3 — молекулярний комплекс, що складається з 3 ланцюгів: γ - (ММ 25000), δ - (ММ 20000) і ϵ - (ММ 20000), який відіграє істотну роль у всіх функціях Т-клітин. TCR, CD3 і сигнальні дволанцюгові молекули ($\zeta\zeta$ і $\zeta\eta$) разом утворюють комплекс, що взаємодіє з антигеном (МНС + пептид). Ця взаємодія веде до активації клітини, принаймні, через два внутрішньоклітинні процеси, що залучають тирозинкіназу і фосфоліпазу С, що в результаті приводить до проліферації клітини і вивільнення цитокінів.

CD4 — одноланцюгова поверхнева молекула (ММ 60000) Т-хелпера, що бере участь в його взаємодії з молекулами МНС II класу.

CD8 — поверхнева молекула більшості цитотоксичних Т-лімфоцитів. Бере участь у взаємодії з молекулами МНС I класу. CD8 людини складається з 2 однакових ланцюгів. Підкреслюючи тісний зв'язок з TCR, молекулами CD4 і CD8 називають ко-рецепторами.

CD2, CD28, LFA-1 — три з багатьох адгезивних молекул, що підтримують контакт Т-лімфоцита з антигенпрезентуючими клітинами або В-лімфоцитами. Особливу роль відіграє молекула CD28, що розпізнає молекулу B7 як істотний ко-стимулятор Т-клітинної активації. Вважається, що за відсутності ко-стимуляції Т-клітина набуває стану невідповідності, який має значення при розвитку аутореактивності.

На поверхні цитоплазматичної мембрани клітин імунної системи, у тому числі і Т-лімфоцитів існують особливі молекули, які служать їх маркерами (табл. 1).

Табл. 7.2.1. Найважливіші молекули на поверхні зрілих Т-лімфоцитів

Молекули	Їх ліганди	Функції

TCR (α/β)	Антигенний епітоп + МНС	Розпізнавання і зв'язування комплексу
CD3 (α,β)		Асоційований комплекс трансдукції сигналу
LFA-2 (CD2)	LFA-3 (CD58)	Адгезія, активація, рецептор еритроцитів барана
CD4 або CD8	МНС I або II кл.	Корецептор: зв'язує МНС-молекули
CD5	CD72 на В-клітинах	Скевенджер - рецептор, активація продукції IL-2 та експресії IL-2R
LFA-1 (CD11a/CD18)	ICAM-1 (CD54)	Адгезія, активація
CD28 CTLA-4	B7.1 (CD80) B7.2 (CD86)	Адгезія, активація продукції IL-2 і експресії IL-2R
CD40L	CD40 на В-клітинах	Активація, індукція переключення синтезу Ig на інший ізотип В- клітинами
CD45R A, B		Експресований на наївних Т-клітинах
CD45RO	CD22 на В-клітинах	Експресований на активованих Т-клітинах і Т-клітинах пам'яті
CD44	CD58	Хомінг-рецептор в лімфовузлах
CD69	?	Активація проліферації і продукції цитокінів через Ca^{2+} опосередкований

		механізм
L-селектин (CD62L)		Хомінг рецептор

T-лімфоцити - це об'ємна за складом група клітин, яка походить від поліпотентної стовбурової клітини кісткового мозку, а дозріває і диференціюється в тимусі з попередників. На частку цих клітин припадає близько 75% всієї лімфоїдної популяції. Загальним маркером T-лімфоцитів є CD3, а також рецептор до еритроцитів барана. Залежно від будови T-клітинного антигенного TCR-рецептора (α -, β - або γ - δ -), а також функціональної спрямованості популяцію T-лімфоцитів розділяють на окремі групи (субпопуляції).

Професійно T-лімфоцити також розділяють на дві субпопуляції: імунорегулятори та ефектори. Регуляцію імунної відповіді (що в основному активує) виконують T-хелпери. T-супресори забезпечують гальмування розвитку імунної реакції (супресія). Ефекторну функцію здійснюють цитотоксичні лімфоцити. У організмі T-лімфоцити забезпечують клітинні форми імунної відповіді (гіперчутливість сповільненого типу, трансплантаційний імунітет, протипухлинний імунітет і т. д.), визначають силу і тривалість імунної реакції. Їх дозріванням, диференціюванням і активністю управляють цитокіни.

Лімфоцити Т і В

Багато видів клітин різного походження виконують спеціалізовану функцію в імунній відповіді і розглядаються в класичній імунології як **імунокомпетентні клітини**.

-В і Т лімфоцити експресують на своїй поверхні антигензв'язуючі рецептори і інші молекули, необхідні для виконання різноманітних функцій;

- **Т-клітинна** відповідь потребує подавання антигенів антигенпрезентуючими клітинами; **В-клітини** здібні розпізнавати нативні антигени, не процесовані і не презентовані іншими клітинами;

Т-лімфоцити мають субпопуляційний склад і різні функціональні субпопуляції проявляють хелперну, супресорну або цитотоксичну активність; **Еозінофіли, базофіли, тучні клітини і тромбоцити** приймають участь в запальних процесах;

Т-хелпери (Тх) - CD4⁺ (або Т-індуктори) - субпопуляція Т-лімфоцитів, які виконують регуляторну функцію. На частку цих клітин припадає близько 55 % всієї популяції Т-лімфоцитів. На їх цитоплазматичній мембрані розташовані молекули CD4, а також α -, β - TCR до антигену, представленого в комплексі з МНС II класу. За допомогою специфічного рецептора Т-хелпер аналізує інформацію, що представляється йому АПК.

Рецепція антигена Т-хелпером, тобто аналіз його чужерідності - це складний процес, що вимагає високої точності, чому сприяє безліч чинників:

- молекула CD3 у комплексі з TCR;
- ко-рецепторні молекули CD4, що мають спорідненість до молекулярного комплексу МНС II класу;
- молекули адгезії, що стабілізують міжклітинний контакт;
- рецептори, що взаємодіють з ко-стимулюючими чинниками АПК (CD28, CD40L).

Продуктивна рецепція стимулює Т-хелпер до вироблення широкого спектру цитокінів, за допомогою яких він управляє біологічною активністю клітин, залучених в імунну відповідь.

Встановлена гетерогенність популяції Т-хелперів. Активованій CD4⁺ Т-лімфоцит (**Тх0**) диференціюється в одного з своїх попередників: **Тх1** або **Тх2**. Це диференціювання є альтернативним, його напрям визначають цитокинові стимули. **Тх1** або **Тх2** - хелпери розрізняються лише функціонально - по спектру продукованих цитокінів.

Тх1 – продукує IL-2, IL-3, IFN- γ , TNF та ін. протизапальні цитокіни, які стимулюють проліферацію цитотоксичних Т-лімфоцитів і активують макрофаги, а також необхідні для розвитку клітинної імунної відповіді, гіперчутливості сповільненого типу та імунного запалення.

Tx2 - продукує IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 і ін. протизапальні цитокіни, які стимулюють проліферацію, диференціювання В-лімфоцитів, а також синтез антитіл (особливо класу IgE) і підтримують гуморальну імунну відповідь, та гіперчутливість негайного типу. Диференціювання у бік Tx2-типу потенціюють γ - δ - Т-клітини, базофіли, тучні клітини та еозинофіли, що синтезують IL-4 і IL-13.

У організмі підтримується баланс **Tx1 / Tx2**. Він необхідний для розвитку адекватної імунної відповіді. Самі клітини знаходяться в конкурентних взаємовідносинах, вони гальмують клональний розвиток один одного. Цитокіни, що виділяються Tx1, пригнічують активність Tx2, і навпаки.

Tx3 – секретують TGF β . Ця субпопуляція клітин є супресорами імунної відповіді.

T-супресори - **CD4⁺25⁺; CD8⁺HLA-DR⁺** – субпопуляція регуляторних Т-лімфоцитів, здатних індукувати супресію імунної відповіді і пригнічувати активацію інших лімфоцитів, опосередковуючи домінуючу імунологічну толерантність. Вона може бути як корисна (запобігання аутоімунним захворюванням), так і шкідлива (пригнічення протипухлинної відповіді) для організму. Т-супресори регулюють самі різні форми гуморальної і клітинної імунної відповіді, включаючи гіперчутливість сповільненого типу, проліферацію цитотоксичних лімфоцитів і проліферацію антигенспецифічних лімфоцитів.

Клітини, генетично запрограмовані для супресорної активності, відповідають на продукти генів МНС класу II (CD4) і МНС класу I (CD8).

На даний час описано велику кількість супресорних Т-клітин, що мають відмінні особливості:

6. **Tc1 (CD4⁺)** - клітини індуктори Т-лімфоцитів/супресорів, самотійно не проявляють супресивних властивостей. Антигенспецифічний фактор TcF1, який вони виділяють, складається з α -TCR або β -TCR ланцюгів і може індукувати появу Tc2-лімфоцитів;

7. **Tc2 (CD4⁺ або CD8⁺)** - супресорні ефекторні Т-клітини зв'язують антиген та секретують фактори, що інактивують Т-хелпери;

8. **Tс3** – це антигензв'язуючий, несучий ідіотип ефекторний Т-супресор, що викликає супресію реакцій ГСТ;

9. **Т-супресори** ($CD4^+CD25^+$) розпізнають молекули (продукту) МНС І та експресують фактор транскрипції FOXP-3. Основним знаряддям пригнічення імунної відповіді $CD4^+ CD25^+$ вважається продукція імуносупресорних цитокінів IL-10 і TGF- β .

10. **Т-супресори**, що розпізнають молекули (продукту) МНС ІІ класу та запобігають проліферації клітин у відповідь на антиген або супресуючий секрецію антитіл антигензв'язуючими В-клітинами;

11. **Т-супресори** - розпізнають ідіотип і зв'язуються з ним, чим і супресують секрецію антитіл В-клітинами, що несуть відповідні антигенні детермінанти;

12. **Контрсупресорні Т-клітини**. Вони запобігають інактивації Т-хелперів супресорними ефекторними Т-клітинами. Про ці клітини відомо небагато: вони специфічні по відношенню до антигену і відіграють важливу роль в розвитку імунологічної пам'яті при активній супресії.

В цілому, на сьогодні виділяють вже більше 10 типів Т-клітин, а в майбутньому належить виявити ще більшу їх різноманітність. Проте у будь-якому випадку слід пам'ятати про те, що у різних класів Т-клітин антиген розпізнають різні рецепторні молекули.

Т-цитотоксичні – $CD8^+28^+$ (ЦТЛ) – субпопуляція Т-лімфоцитів-ефекторів. На їх частку приходить ~ 25% всієї популяції Т-лімфоцитів. На цитоплазматичній мембрані ЦТЛ визначається молекула CD8, а також α - β -TCR до антигену в комплексі з МНС І класу. У рецепції беруть участь молекула CD3, у комплексі з TCR, і ко-рецепторними молекулами CD8, тропні до МНС І класу. ЦТЛ розвиваються з попередників, які активуються комплексом антигену і молекул МНС-І класу, проліферують і дозрівають під дією IL-2, а також факторами диференціювання, що продукуються Т-хелперами.

ЦТЛ аналізують клітини власного організму у пошуках зміненої, тобто відмінної від власної, структури комплексу антиген - МНС I класу. Клітини мутантів, клітини уражені вірусом, а також клітини алогенного трансплантату несуть на своїй поверхні такі ознаки генетичної чужерідності і тому вони є мішенню для ЦТЛ.

ЦТЛ усувають клітини-мішені шляхом антитілонезалежної клітинно-опосередкованої цитотоксичності, для чого синтезують ряд токсичних субстанцій: білок - **перфорин** (осмотичний лізис (некроз)), серинові протеази - **гранзими** (ферментативний апоптоз) і фермент - **гранулізин** (апоптоз, мітохондріальне пошкодження).

ЦТЛ володіють величезним біологічним потенціалом, за короткий термін вони можуть знищити декілька типів мішеней клітин, витрачаючи на кожну ~ 5 хвилин. Ефекторну функцію ЦТЛ стимулюють T_H1-хелпери, хоча у ряді випадків їх допомога не потрібна.

ЦТЛ забезпечують в організмі антитілонезалежну клітинно-опосередковану цитотоксичність, формування Т-клітинної імунологічної пам'яті і ГСТ. Активовані ЦТЛ синтезують IFN- γ , TNF, а також IL-4 і IL-5, стимулюють макрофаги та потенціюють імунне запалення.

T-хелпери 1 типу (CD4+) та цитотоксичні T-лімфоцити (CD8+) беруть участь у клітинній імунній відповіді. Антигенпрезентуючі клітини після процесингу поглиненого антигену представляють ЦТЛ чужерідні (мікробні) пептиди в комплекс із МНС I класу. ЦТЛ за допомогою свого рецептора – TCR та корецептора CD8 розпізнають мікробний пептид та МНС I класу. Ця взаємодія стабілізує CD40L Т-лімфоцита та CD40 АПК. Основним цитокіном клітинної імунної відповіді є IL-12, який стимулює ріст та диференціацію CD4 T_H0 (у бік T_H1), CD8+ ЦТЛ та НК, а також індукує продукцію IFN- γ Т-лімфоцитами і НК, пригнічує апоптоз T_H1. Під дією IL-2 відбувається проліферація ЦТЛ. ЦТЛ впізнають клітини-мішені, що інфіковані, наприклад вірусами: на клітинах-мішенях експресуються мікробні пептиди в комплексі з МНС I класу, що розпізнаються TCR та корецептором CD8+ цитотоксичного Т-лімфоцита. Активовані диференційовані ЦТЛ викликають загибель клітин-

мішеней з участю перфोरину, гранзимів, гранулізинів, Fas-рецепторів та TNF.

В-лімфоцити

Диференціювання В-лімфоцитів відбувається в червоному кістковому мозку (або у бурсі Фабрицієвої сумки в клоаці птахів), де вони потрапляють під вплив стромальних клітин кісткового мозку, дендритних клітин, макрофагів та цитокінів. Дозрівання В-лімфоцитів відбувається у дві фази: антигеннезалежне та антигензалежне. Перша фаза антигеннезалежного дозрівання починається з стадії про-В-клітин. На цьому етапі гени імуноглобулінів знаходяться в неперебудованій формі (в «зародковій конфігурації»), але вже експресовані гени RAG-1, RAG-2 та TdT. На поверхні клітин з'являються неваріабельні компоненти В-клітинного рецептора (BCR) — димери Ig α и Ig β (CD79a та b) та CD19 — найперші пан-В-клітинні (тобто присутні на всіх В-клітинах) маркери. На цій стадії ростовими факторами служать фактор стовбурових клітин та IL-7. На етапі пре-В-I (великих пре В) відбувається зближення сегментів D та J V-генів H-ланцюгів, тобто реалізується перший етап реоранжировки цих генів. В цей час на поверхні клітини з'являється молекула — попередник імуноглобуліна — псевдо L-ланцюг, який вміщує продукти неваріабельних генів V_{преВ} та λ 5. До моменту формування повноцінного (VDJ) V μ -гена псевдо-L-ланцюг на поверхні пре-В-II зв'язаний з білками p130 і p35/p65.

Перехід на стадію малих пре-В-клітин (пре-ВII) пов'язаний з завершенням перебудови V μ -гена та експресією μ -ланцюга. Останній з'являється одночасно у вільній формі в цитоплазмі клітини та в складі мембранного проторецептора у сполученні з псевдо-L-ланцюгом. При цьому ослаблюється експресія генів RAG-1, RAG-2 та TdT, яка знову підсилюється, що служить початком перебудови генів L-ланцюгів. Починаючи зі стадії малих пре-В і до повного дозрівання В-клітин, на поверхні цих клітин присутні загальні В-клітинні маркери — CD20 и CD72. Ростовим фактором служить IL-7. На стадії малих пре-В відбувається перебудова генів L-

ланцюгів, яка завершує процес генетичних претворень в лімфоцитах В-ряду. При цьому в кожній конкретній клітині перебудовується і експресується один тип L-ланцюгів — лише κ або лише λ причому число κ^+ В-клітин майже в 10 разів перевищує чисельність λ^+ В-клітин. Наслідком реаранжировки генів L-ланцюгів є експресія останніх в складі повноцінного мембранного IgM в сукупності з іншими допоміжними молекулами рецепторного комплексу. Поява на поверхні клітини сформованого BCR говорить про перехід клітин В-ряду на стадію незрілої В-клітини. Завершння генетичних перетворень в генах BCR знаходить відображення у заключній зупинці експресії генів RAG-1 та RAG-2. На цьому етапі розвитку руйнується приблизно 85—90% незрілих В-лімфоцитів, вірогідно, внаслідок негативної селекції — руйнування аутоспецифічних клонів. Таким чином чисельність дозріваючих В-клітин лише в 10 раз перевищує число про-В-клітин, що першочергово вступили на шлях В-лімфопоезу.

Процес антигеннезалежного розвитку В-клітин завершується експресією IgD-рецептора, який співіснує з IgM-рецептором. IgM^+IgD^+ -клітини позначають як зрілі В-лімфоцити. Експресія IgD-рецептора стає можливою завдяки переключенню С-генів, тобто прилеглий до V-гену $\text{C}\mu$ -ген виключається з процесу транскрипції і замість нього зчитується наступний за ним $\text{C}\delta$ -ген.

Після зв'язування В-клітини з антигеном починається друга антигензалежна фаза диференціювання. Відбуваються подальші переключення С-генів рецептора та послідовне виникнення на поверхні В-лімфоцитів рецепторів, що відносяться до різних підкласів IgG, потім — до IgE та IgA.

Активация В-лімфоцитів та їх диференціювання у антитілоутворюючі плазматичні клітини є основою гуморальної імунної відповіді. В-лімфоцит відіграє роль антигенпрезентуючої клітини. BCR розпізнає антиген, і клітина поглинає його. Після процесингу (розщеплення поглиненого антигену до низькомолекулярних пептидів та вбудовування їх в МНС II класу) В-лімфоцити представляють утворений комплекс T_H2, який взаємодіє з ними рецептором TCR та корецептором CD4. T_H2 експресує

CD40L, який зв'язується з CD40 на В-лимфоциті, і клітини активуються комплексом CD40+, CD40L. Відбувається проліферація В-лімфоцитів. Під впливом інтерлейкінів (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 та ін.) експресивних Тх-2, відбувається переключення імуноглобулінових генів В-лімфоцитів, які синтезують імуноглобуліни різних класів.

Вирішальну роль у контролі розвитку клітин В-ряду відіграє кістковомозкове мікрооточення — клітини стромы та молекули міжклітинного матриксу, з якими клітини В-ряду контактують завдяки мембранним інтегринам, а також близькодійчі гуморальні фактори. Для розвитку В-клітин і формування їх клональної структури важливі сигнали, що подають цитокіни, які виробляються клітинами стромы кісткового мозку. Уже зазначалось, що IL-7 служить основним ростовим та диференційним фактором на стадіях про-В (наряду з фактором стовбурових клітин) та пре-В; можливо, IL-7 визначає диференціювання клітин у напрямленні В-лімфоцитів. Виживанню і розвитку В-лімфоцитів на ранніх стадіях сприяють фактор стовбурових клітин, а також IL-3. Навпаки, IL-1 і IL-4 віднімають ростову дію IL-7 на преВ-клітинах. В той же час IL-1 сприяє експресії генів імуноглобулінів, а IL-4 підвищує виживання преВ-клітин (у відсутності IL-4 вони піддаються програмованій загибелі — апоптозу). TFR β пригнічує як ростовий, так і диференціальний ефекти IL-7. Здійсненню диференціювання пре-В-клітин сприяє також інтерферон γ .

В-лімфоцити несуть частину поверхневих маркерів, спільних з іншими клітинами: рецептори для імуноглобулінів (FcR), для компонентів комплемента (CR1), антигени гістосумісності (МНС I та II класів). Унікальними поверхневими маркерами В-лімфоцитів є: імуноглобулінові антиген-розпізнавальні рецептори (поверхневі імуноглобуліни), деякі кластери диференціювання (CD) і рецептори В-клітинних мітогенів.

Найважливіші молекули на поверхні зрілих В-лімфоцитів

Молекули	Їх ліганди	Функції
IgR (H + L)	Епітоп антигену	Розпізнавання антигену
IgR (CD79a + b)		Асоційовані сигнал-трансдукційні молекули
CD19, CD20		Додаткові сигнал-трансдукційні молекули
FcγR II (CD32)	Fc фрагмент IgG	Зв'язування IgG у складі імунних комплексів або агрегатів
FcεR II (CD23)	Fc фрагмент IgE	Існує в розчинній формі. Є IgE-зв'язуючим фактором. Бере участь в регуляції синтезу IgE.
CR2 (CD21)	C3d, EBV	Опосередковує активацію В-клітин
MHC II класу	CD4 на Т-клітинах	Бере участь в презентації антигена
CD40	CD40L на Т-клітинах	Індукує перемикання синтезу Ig на інший ізотип: IgM (IgG)
B7.1 (CD80) B7.2 (CD86)	CD28 на Т-клітинах CTLA-4 на Т-клітинах	Костимулюючі молекули забезпечують другий сигнал активації В-лімфоцитів
LFA-1(CL11a/CD18)	ICAM-1(CD54)	Адгезійні молекули
LFA-3 (CD58)	LFA-2 (CD2)	Сигнал-трансдукційні молекули

В-клітинний антиген-розпізнавальний рецептор (IgR) складається з мембранної форми IgD або IgM і асоційованих з ними гетеродимерів CD19 і CD20, що експресовані на всіх В-лімфоцитах. З IgR в мембрані В-лімфоцитів асоційовані дві трансмембранні молекули CD79a і CD79b, що беруть участь в трансдукції сигналу, в якій беруть участь і інші молекули В-клітинної поверхні: CD19, CD20. З інших кластерів диференціювання для зрілих і вступаючих в активацію В-лімфоцитів характерні наступні: CD21 - CR2 рецептор для C3d-фракції комплемента і вірусу Епштейна-Барр (EBV); CD23 - FcRII низькоафінний рецептор для IgE; CD40 - рецептор CD40L-ліганда, що

опосередковує антиген-залежне диференціювання В-клітин і перемикання на синтез іншого ізотипу імуноглобулінів; CD80 (B7) - костимулююча молекула для отримання другого сигналу активації від Т-лімфоцитів через CD28. Для виконання функції антиген-презентуючих клітин В-лімфоцити конститутивно експресують МНС II класу і костимулюючі молекули B7.1 (CD80) і B7.2 (CD86), експресія яких посилюється при їх активації. Всі зрілі В-лімфоцити експресують низькоафінні рецептори FcRII (CD32) для скріплення IgG у складі імунних комплексів або в агрегатах. Якщо Fc-фрагмент IgG у складі імунного комплексу зв'язується з CD32, а антиген у складі цього ж імунного комплексу зв'язується з IgR на тій же В-клітині, то вона інактивується, тобто, CD32 може опосередковувати негативну регуляцію В-лімфоцитів.

В-лімфоцити можуть відповідати проліферацією на дію ряду мітогенів, зокрема на дію ліпополісахариду бактерій (ЛПС). Однак у якості стандартного В-клітинного мітогену, як правило, використовують рослинного походження «pokeweed mitogen» (PWM), який з найбільшою постійністю індукує проліферацію В-лімфоцитів.

Близько 5×10^7 В-лімфоцитів залишають кістковий мозок щодня. Цього достатньо, щоб повністю відновити популяцію периферичних В-лімфоцитів за 4 - 5 днів. Зрілі В-лімфоцити виходять в кров і починають рециркулювати через периферичні лімфоїдні тканини. Близько 85% В-лімфоцитів, що знов утворилися, складають короткоживучі клітини, тривалість життя яких не перевищує 10 днів. Менша частина (близько 14%) мають середню тривалість життя 4 - 6 тижнів. Близько 1% всіх В-лімфоцитів складають В-клітини пам'яті, які можуть жити роками і десятиліттями. Поверхневі імуноглобулінові рецептори В-лімфоцитів пам'яті належать до різних ізотипів за винятком IgM і IgD. Вони локалізуються переважно в периферичних лімфоїдних органах і експресують високий рівень CD44, що опосередковує хомінг лімфоцитів в тканині. Особливістю В-клітин пам'яті є здатність швидко відповідати на зустріч з причинним антигеном проліферацією, диференціюванням в плазматичні клітини і швидким

перемиканням на синтез IgG, IgA або IgE, які продукуються цими клітинами у великих кількостях і характеризуються високою афінністю. Для розвитку повноцінної імунної відповіді (вторинної) буває досить меншої дози антигена. В-лімфоцити пам'яті чутливіші до дії активуючих цитокінів - продуктів Т-хелперів.

Щоб уникнути загибелі при проліферації і диференціюванні в зародкових центрах, В-лімфоцит повинен одержати одночасно два сигнали активації: від антиген-розпізнавальних рецепторів при «зшиванні» поверхневих імуноглобулінів антигенним комплексом і від взаємодії CD40 з лігандом CD40L на Т-лімфоцитах. Після цього йде диференціювання В-лімфоцитів в плазматичні клітини або в клітини пам'яті. Всі ці процеси контролюються відповідними цитокінами. Спочатку В-лімфоцити активуються антигеном за участю IL-4, потім вони проліферують у відповідь на IL-5 і перетворюються на плазматичні клітини під дією IL-6, який дає термінальний сигнал диференціювання В-лімфоцитів.

В-лімфоцити пам'яті (CD27⁺) – довгоживучі клітини, що несуть на своїй мембрані IgG та IgA чим і відрізняються від звичайних В-лімфоцитів, що несуть IgM або IgM/D. Мають молекулу CD27, яка в результаті взаємодії з молекулою CD70 транслює сигнали, що сприяють проліферації та диференціюванню В-лімфоцитів в плазматичні клітини. В-лімфоцити пам'яті, стимульовані антигеном, прямують в червоний кістковий мозок, де вони перетворюються в антитілотворючі плазматичні клітини.

При порушеннях диференціювання В-лімфоцитів розвиваються імунодефіцити, що проявляється нестачею або відхиленнями в спектрі синтезованих імуноглобулінів. Клітинний імунітет відносно зберігається, але із-за пригнічення механізмів антиідиотипічної регуляції, можливі аутоімунні синдроми.

Таким чином, лімфоцити є головними клітинами імунної системи. Вони забезпечують специфічність імунної відповіді на конкретні антигени. Це досягається завдяки присутності на їх поверхні антигенрозпізнавальних рецепторів.

9.5. Фактори регуляції активності імунної відповіді

Цитокіни (від грец. *cyto* – клітина, *kinos* – рух) – медіатори білкової та небілкової природи, що секретуються переважно активованими клітинами імунної системи і забезпечують ріст, проліферацію та диференціювання багатьох клітин. Вони є обов'язковими чинниками здійснення ендогенної регуляції всіх ланок імунної системи, гемопоезу, запалення і міжклітинних взаємодій для реалізації механізмів неспецифічної реактивності чи специфічного імунітету. Деякі цитокіни запускають запрограмовану клітинну загибель – апоптоз. Цитокіни секретуються клітиною-продуцентом у вільній формі або експресуються у зв'язаній формі з мембраною клітини. Для здійснення своїх функцій цитокіни з'єднуються зі специфічними рецепторами клітин-мішеней, які регулюють експресію того чи іншого рецептора на своїй мембрані що контролює дію цитокінів. У відповідь на дію цитокіна клітина може експресувати ряд інших цитокінів – цитокіновий каскад. До цитокінів відносять інтерферони (ІФН), інтерлейкіни (ІЛ), фактори некрозу пухлин (ФНП), колонієстимулюючі фактори (КСФ), фактори росту, хемокіни.

Цитокіни діють за різними механізмами:

Інтракринний – дія цитокінів всередині клітини-продуцента; зв'язування цитокінів із специфічними внутрішньоклітинними рецепторами.

Аутокринний – дія цитокіна на клітину яка його секретує (ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-18, ФНПа – аутокринні фактори для моноцитів/макрофагів).

Паракринний – вплив цитокінів на близько розташовані клітини і тканини.

Ендокринний – дія цитокінів на відстані від клітин-продуцентів .

Деякі цитокіни плюрипотентні, тобто такі, що впливають на різноманітні клітини, а інші специфічні – вибірково впливають на окремі клітини.

Цитокіни мають ряд особливостей:

- цитокіни, які продукуються більш ніж одним типом клітин;

- одна клітина може продукувати більш ніж один цитокін;
- один цитокін може діяти на кілька типів клітин;
- кілька цитокінів можуть індукувати однакову функцію у конкретному типі клітин.

Умовно, за біологічною дією цитокіни розділяють на 5 груп:

- 1 – прозапальні цитокіни: ІЛ-1, ІЛ-2, ІЛ-6, ІЛ-12, ІФНа, γ , ФНП;**
- 2 – протизапальні: ІЛ-4, ІЛ-10;**
- 3 – фактори росту та диференціювання – ТФР;**
- 4 – гемопоетичні колонієстимулюючі фактори (М-КСФ, Г-КСФ, ГМ-КСФ);**
- 5 – фактори росту мезенхімальних клітин – фактор росту фібробластів.**

Для цитокінів характерна системна дія, від їх сполучення і послідовності залежить кінцевий біологічний ефект.

Інтерлейкіни – поліпептиди, які синтезуються лімфоїдними та нелімфоїдними клітинами і впливають на функціональну активність імунокомпетентних клітин та відповідають за міжклітинні взаємодії між лейкоцитами. На сьогодні відомо понад 30 інтерлейкінів.

ІЛ-1 (ендогенний піроген, лімфоцитактивуючий фактор) – є одним із основних регуляторів імунної та запальної відповіді, який діє на майже всі типи клітин. Молекулярна маса – 17,5 кД. Головними продуцентами ІЛ-1 в організмі є моноцити/макрофаги. Разом з тим, ІЛ-1 здатні продукувати й інші клітини: астроцити, фібробласти, натуральні кілери (НК), кератиноцити, дендритні та ендотеліальні клітини.

Існує 2 форми ІЛ-1: ІЛ-1 α і ІЛ-1 β , які кодуються різними генами і відрізняються біологічною активністю, але зв'язуються з одним і тим же рецептором. ІЛ-1 α підсилює протипухлинний імунітет, а ІЛ-1 β підсилює регенерацію тканин і стимулює у онкологічних хворих розвиток метастазів. На поверхні клітин-мішеней експресується 2 типи рецепторів до ІЛ-1: з

молекулярною масою 80 кД (на Т-лімфоцитах, кератиноцитах, гепатоцитах, фібробластах) та 68 кД (на В-лімфоцитах, макрофагах). Існує ІЛ-1- рецептор-антагоніст (ІЛ-1-Ra) – синтезується моноцитами, макрофагами, нейтрофілами і гепатоцитами. ІЛ-1-Ra зв'язується з CD121 Т-лімфоцитів і не активує клітини-мішені. Баланс між ІЛ-1 та ІЛ-1-Ra важливий для захисту організму від інфекцій.

ІЛ-1 впливає на:

- тимоцити: посилює їх проліферацію (з ІЛ-7)
- Т-лімфоцити: посилює експресію рецепторів для ІЛ-2, збільшує експресію ІЛ-2, ІЛ-4, ІФН- γ , ГМ-КСФ. Під впливом ІЛ-1 під час презентації антигенного пептида макрофагами Т-лімфоцитам хелперам 1 типу, останні починають продукувати ІЛ-2. ІЛ-1 індукує проліферацію Т-лімфоцитів тільки за умови, якщо знаходиться на поверхні мембрани моноцитів/макрофагів, в зв'язаному, шляхом міжклітинного контакту, з мембраною вигляді. Розчинна секреторна фракція ІЛ-1 проліферації лімфоцитів не запускає;
- В-лімфоцити: стимулює проліферацію, експресію рецепторів ІЛ-2, антигенів головного комплексу гістосумісності (МНС);
- макрофаги: стимулює фагоцитоз, хемотаксис, цитотоксичність, експресію антигенів МНС, продукцію простагландину E2 (ПГЕ2), тромбоксана A2. Стимулює секрецію ФНП, ІЛ-6;
- природні кілери: посилює цитотоксичність, експресію рецептора для ІЛ-2, синтез ІФН γ ;
- нейтрофіли: опосередковано посилює хемотаксис і дегрануляцію;
- базофіли та тучні (опасисті) клітини: індукує вивільнення гістаміну.

ІЛ-1, зв'язаний з мембраною кератиноцитів, приймає участь в представленні антигену в епідермісі шкіри людини.

Крім того, ІЛ-1 викликає підвищення температури тіла, активуючи:

- гепатоцити до утворення білків гострої фази запалення;
- фібробласти – посилює проліферацію, викликає синтез ІЛ-6, КСФ, ІФН- β , ПГЕ2;

- ендотелій – стимулює проліферацію, індукує прокоагулянтну активність (синтез тромбопластину, ПГЕ).

Сильними індукторами ІЛ-1 є ліпополісахарид та ФНП- α .

В нормі концентрація ІЛ-1 в плазмі чи сироватці крові 0-5 пг/мл (1-10 пг/мл в супернатанті активованих моноцитів). При запальних реакціях чи аутоімунних реакціях вміст цитокіну зростає до 200 пг/мл.

ІЛ-2 (фактор росту Т-клітин) – продукується переважно активованими Т-лімфоцитами, зокрема Т-хелперами 1 типу. Лише невелика його кількість продукується Т-кілерами/супресорами. Після активації антигеном Т-лімфоцити набувають здатності відповідати на ІЛ-2 і подальша їх проліферація без нього стає неможливою. ІЛ-2 зв'язується з клітинами через рецептор для ІЛ-2, що складається з трьох ланцюгів: α -ланцюг (CD 25), β -ланцюг (CD 122) і γ -ланцюг (CD132).

ІЛ-2 індукує проліферацію Т-хелперів-1, цитотоксичних Т-лімфоцитів. Стимулює синтез імуноглобулінів В-лімфоцитами, підсилює функцію НК і моноцитів, стимулює продукцію γ -ІФН, ФНП, ІЛ-6, ІЛ-8. Відновлює порушену УФ-випромінюванням здатність макрофагів до презентації антигенів, підвищує радіорезистентність Т-лімфоцитів. Сприяє дозріванню антигенспецифічних лімфокінактивованих кілерів (LAK). Препарати ІЛ-2 спричиняють ефективний захист у ряді пухлин.

Підвищення рівня ІЛ-2 спостерігається при лейкозах, аутоімунних порушеннях, в ранньому періоді СНІДу, у хворих з міокардитами.

Зниження рівня ІЛ-2 спостерігається після важких оперативних втручань, хіміотерапії, опіків, тяжких інфекцій.

ІЛ-3 (колонієстимулюючий фактор, поліпоетин) – продукується Т-лімфоцитами і стовбуровими клітинами, а також тканиновими базофілами, епітеліальними клітинами тимуса. Стимулює проліферацію та диференціювання поліпотентних попередників гемопоетичних клітин. Підтримує ріст та виживання попередників тучних клітин, необхідний для прояву активності базофільних клітин. Посилює проліферацію В-клітин. У

сукупності з Г-КСФ підсилює продукцію нейтрофілів, а разом з еритропоєтином – еритроцитів.

ІЛ-4 (В-клітинний стимулюючий фактор) – протизапальний цитокін продукується в основному Т-хелперами 2 типу, а також тучними клітинами та стромальними клітинами кісткового мозку. Головна функція ІЛ-4 полягає у переключенні синтезу IgG1 на синтез IgG4 і IgE. Разом з іншими цитокінами сприяє проліферації тканинових базофілів. Підсилює проліферацію В-лімфоцитів та експресію рецептора до Fc фрагменту IgE на базофілах. Посилює проліферацію тучних клітин і фібробластів. ІЛ-4 є кофактором проліферації кістково-мозкових попередників гемопоезу. Підвищує експресію МНС II класу на неактивованих В-лімфоцитах і макрофагах. Стимулює проліферацію Т-хелперів 2 типу і Т-цитотоксичних клітин. Посилює алоантигенспецифічну клітинну цитотоксичність.

ІЛ-4 пригнічує продукцію ІЛ-1β, ФНП-α, ІЛ-6, ІЛ-8. Цей інтерлейкін має сильний антагоністичний ефект до ІФН-γ. Пригнічує генерацію цитотоксичних лімфоцитів, НК та протипухлинну активність макрофагів. Інгібує проліферацію CD4+, CD8+ Т-лімфоцитів. Пригнічує активацію моноклеарних фагоцитів та стимульовану ІЛ-2 індукцію ефektorних клітин, В-лімфоцитів, протипухлинних моноцитів/макрофагів.

ІЛ-5 (еозинофільний фактор) – протизапальний цитокін. Продукується Т-хелперами 2 типу. До функцій цього цитокіну належить індукція подальшої прогресії по клітинному циклу після стимуляції В-лімфоцитів ІЛ-4, посилення проліферації В-клітин прямою та опосередкованою дією. Індукує диференціацію, активацію і хемотаксис еозинофілів, підвищує їх життєздатність. Підвищує продукцію IgE і експресію рецептора до нього на еозинофілах. Підсилює продукцію IgA.

Підвищення рівня ІЛ-5 в крові викликає еозинофілію.

ІЛ-6 – прозапальний цитокін – продукується різними типами клітин: макрофагами, Т- і В-лімфоцитами, фібробластами, ендотеліальними, епідермальними і мікрогліальними клітинами, хондроцитами, остеоцитами. На неактивованих Т-лімфоцитах і активованих В-лімфоцитах для ІЛ-6 є 2 типи

рецепторів: високоафінний та низькоафінний. Стимулює проліферацію тимоцитів, В-лімфоцитів, активує попередники цитотоксичних лімфоцитів, гранулоцитів і макрофагів. Індукує диференціацію В-лімфоцитів у антитілоутворюючі клітини. Підсилює продукцію гепатоцитами білків гострої фази. Сприяє проліферації та диференціюванню Т-лімфоцитів. Посилює активність НК.

Забезпечує взаємозв'язок імунної, нервової та ендокринної систем. Індуктором продукції ІЛ-6 є ІЛ-1, а також ІФН, ФНП, ліпополісахарид і віруси. ІЛ-6 стимулює ріст кератиноцитів і диференціацію нервових клітин, а також виділення кортикотропіну гіпофізом. ІЛ-6, разом з ІЛ-11, кардіотрофіном-1, циліарним нейротрофіном і онкостатином, належить до родини нейропоетинів, які підтримують виживання нейронів.

ІЛ-6 може бути співвідповідальним за розвиток деяких патологічних станів і хвороб. Вважається, що він індукує проліферацію мезангіальних клітин при мезангіальному проліферативному гломерулонефриті. Підвищення його рівня в сироватці крові спостерігається при ревматоїдному артриті, причому спостерігається підвищення концентрації ІЛ-6 і в синовіальній рідині. Вже сьогодні з успіхом застосовують антитіла проти ІЛ-6 для полегшення проявів ревматоїдного артрити. Досить давно встановлено, що ІЛ-6 є фактором росту для плазмоцитів і деяких клітин гібридами, які походять від В-лімфоцитів. Висока чутливість цих гібридом до пікограмових (на мл) концентрацій ІЛ-6, навіть, може застосовуватись для його виявлення. На жаль, ІЛ-6 є апокринним і парактинним фактором росту мієломи людини. Підозрюють, що ІЛ-6 бере участь у поліклональній активації В-лімфоцитів при СНІДі, а також те, що він є одним з факторів росту для клітин саркоми Капоші, яка є частим злоякісним новоутворенням, що розвивається при цій хворобі.

Нещодавно були отримані докази участі ІЛ-6 у патогенезі інфаркту міокарда. ІЛ-6 є основним медіатором синтезу білків гострої фази при цьому захворюванні. Крім того, високий рівень ІЛ-6 у хворих з гострим інфарктом міокарда має прямий кореляційний зв'язок з С-реактивним білком.

ІЛ-7 – продукується фібробластами, ендотеліальними клітинами, Т-лімфоцитами, клітинами кісткового мозку і стромальними клітинами тимуса. ІЛ-7 є важливим фактором росту та диференціації як про-, так пре-В-лімфоцитів, а також тимоцитів. ІЛ-7 може індукувати появу ЛАК-клітин.

ІЛ-8 – низькомолекулярний прозапальний цитокін, який синтезується активованими ендотеліальними клітинами, моноцитами, фібробластами, кератиноцитами, гепатоцитами та іншими клітинами. ІЛ-8 – є хемоаттрактантом для нейтрофілів, макрофагів, лімфоцитів і еозинофілів. Викликає міграцію нейтрофілів і базофілів у вогнище запалення і їх дегрануляцію, виділення супероксидного радикала. Сприяє трансміграції макрофагів через ендотелій. Стимулює ангиогенез.

ІЛ-9 – продукується Т-лімфоцитами, зокрема Т-хелперами 2 типу. Стимулює проліферацію Т-лімфоцитів і базофілів. Підсилює ефект ІЛ-4, що відповідає продукції IgE і IgG4.

ІЛ-10 – супресорний фактор – протизапальний цитокін. Продукується переважно Т-хелперами 2 типу, а також CD8⁺ цитотоксичними лімфоцитами, макрофагами і дендритними клітинами. Стимулює проліферацію В-лімфоцитів, тимоцитів та тучних клітин. Пригнічує функцію Т-хелперів 1 типу, НК, моноцитів/макрофагів, знижуючи синтез ІЛ-1, ІЛ-2, ІЛ-8, ІФН- γ і ФНП. Таким чином ІЛ-10 вважається важливим регуляторним фактором імунної відповіді, оскільки він пригнічує клітинний імунітет (Т-хелперами-1) стимулюючи гуморальну відповідь (Т-хелперами-2).

ІЛ-11 – тромбоцитарний фактор – продукується фібробластами і стромальними клітинами кісткового мозку. Основна функція – стимуляція тромбоцитопоезу (особливо в поєднанні з ІЛ-3).

ІЛ-12 - прозапальний цитокін, продукується В-лімфоцитами, моноцитами/ макрофагами, дендритними клітинами. Рецептори до нього експресуються на активованих CD4⁺ Т-клітинах, CD8⁺ і НК. Сприяє диференціації наївних Т-хелперів в Т-хелпери 1 типу, НК і цитотоксичних Т-лімфоцитів. Стимулює хемотаксис ефекторних кілерних клітин. Підвищує продукцію ІФН- γ Т-лімфоцитами і НК. Синергічний по відношенню до ІЛ-2 в

генерації LAK. Підвищує цитотоксичну активність Т-клітин. Регулює баланс Т-хелперів-1 і Т-хелперів-2 (індукує Тх-1 і пригнічує Тх-2). Підсилює диференціацію і дозрівання В-лімфоцитів, стимульованих ІЛ-2. Посилює диференціювання та дозрівання В-лімфоцитів, стимульованих ІЛ-2.

ІЛ-13 – протизапальний цитокін, продукується активованими Т-хелперами 2 типу. За функціями подібний до ІЛ-4, але не впливає на ендотеліальні клітини. Підвищує синтез ІЛ-4 посилюючи його ефекти: підвищує проліферацію В-лімфоцитів, синтез IgE і IgG4, експресію CD23 і молекул МНС II класу на мембрані В-лімфоцитів. Знижує функцію моноцитів/макрофагів, та пригнічує продукцію ними прозапальних цитокінів.

ІЛ-14 – продукується фолікулярними дендритними клітинами і Т-лімфоцитами. Рецептори до нього експресуються на В-лімфоцитах. Підвищує проліферацію В-лімфоцитів. Пригнічує синтез імуноглобулінів.

ІЛ-15 – продукується моноцитами/макрофагами. За біологічною активністю схожий на ІЛ-2, тому здатний зв'язуватись з рецептором для ІЛ-2. ІЛ-15 підтримує проліферацію та життєздатність Т-лімфоцитів і НК. Забезпечує дозрівання Т-лімфоцитів в тимусі та антигеннезалежну диференціацію Т-лімфоцитів і стимулює їх ріст. Індукує LAK-активність. Рецептори активованих CD8⁺ Т-лімфоцитів мають підвищену активність до ІЛ-15. Фізіологічна роль його полягає в стимуляції швидкої реакції факторів природного імунітету, оскільки він може індукувати активацію і ранні проліферативні стимули для клітинних елементів природного імунітету.

ІЛ-16 – синтезується CD8⁺ Т-лімфоцитами, клітинами мікроглії мозку, еозинофілами. Рецептором для нього є молекула CD4, і тому він діє на всі клітини, які мають цю молекулу на своїй поверхні (Т-лімфоцити, моноцити, еозинофіли). ІЛ-16 є одним з найсильніших хемотаксичних факторів для еозинофільних гранулоцитів. Діючи на Т-лімфоцити, він посилює експресію рецептора для ІЛ-2 і молекул МНС-II класу. Одночасно ІЛ-16 гальмує проліферацію цих клітин. Багато даних вказує на те, що ІЛ-16 може знайти застосування у лікуванні СНІДу, бо він пригнічує реплікацію ВІЛ у Т-лімфоцитах.

ІЛ-17 – продукується активованими Т-лімфоцитами, зокрема CD4+ Т-клітинами і НК. Стимулює секрецію цитокінів: ІЛ-6, ІЛ-8, Г-КСФ, ПГЕ2. Підвищує експресію ICAM-1, стимулює активність фібробластів та проліферацію Т-лімфоцитів. Бере участь в реакціях відторгнення трансплантанта. Підвищений синтез ІЛ-17 Т-хелперами є характерною ознакою у хворих на контактний дерматит.

ІЛ-18 – регуляторний цитокін. Синтезується активованими макрофагами і гепатоцитами. Стимулює синтез Т-лімфоцитами ІФН- γ , макрофагами – ІЛ-1, ІЛ-8 і ФНП. Активує НК. Інгібує активність Т-хелперів 2 типу.

ІЛ-19 (гомолог ІЛ-10) – декретується в основному моноцитами. Регулює активність макрофагів і знижує активність Тх-1 і Тх-2.

ІЛ-20 (гомолог ІЛ-10) – продукується в основному кератиноцитами. Рецептори до ІЛ-20 експресуються в тканинах різних органів – головного мозку, легень, шлунку, підшлункової та щитоподібної залоз, яєчників і сім'яників, матки, м'язів, в лімфоцитах крові і кістковому мозку.

ІЛ-10 приймає активну участь у запаленні шкіри. Його синтез підвищений при псоріазі.

ІЛ-21 – продукується Т-лімфоцитами і тучними клітинами. Відіграє важливу роль в регуляції гемопоезу і в імунній відповіді. Сприяє проліферації Т- і В-лімфоцитів та НК. Підсилює продукцію імуноглобулінів.

ІЛ-22 (гомолог ІЛ-10) – продукується активованими Т-лімфоцитами при гострому запаленні.

ІЛ-23 – продукується активованими дендритними клітинами. Індукує проліферацію CD4+ Т-лімфоцитів пам'яті і продукцію ними ІФН- γ .

ІЛ-24 (гомолог ІЛ-10) – продукується активованими моноцитами і Т-лімфоцитами. Стимулює ріст Т-лімфоцитів та пригнічує ангіогенез.

ІЛ-25 – синтезують стромальні клітини кісткового мозку. Посилює продукцію цитокінів Т-хелперами-2-типу.

ІЛ-26 (гомолог ІЛ-10) – продукується активованими моноцитами, Т-лімфоцитами і НК.

ІЛ-27 – продукується активованими макрофагами, В-лімфоцитами, дендритними клітинами. Контролює продукцію цитокінів Т-хелперами-1. Діє синергічно з ІЛ-12 та ІЛ-18 стосовно стимуляції продукції ІФН- γ .

Ростові фактори – поліпептидні фактори, що регулюють мітогенну активність і диференціацію клітин. Серед них виділяють:

- інсуліноподібні фактори росту (IGF I, IGF-II);
- фактори росту фібробластів (FGF 1-9);
- тромбоцитарні фактори росту (PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB);
- епідермальні фактори росту (EGF);
- трансформуючий фактор росту (TGF- α , TGF- β 1-3);
- фактор росту гепатоцитів (HGF);
- колонієстимулюючі фактори росту (G-CSF, M-CSF, GM-CSF).

Колонієстимулюючі фактори – поліпептидні фактори росту, які регулюють ділення, диференціацію кістковомозкових стовбурових клітин та попередників клітин крові:

Гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор (Г-КСФ) – продукується моноцитами/макрофагами, фібробластами і ендотеліальними клітинами. Підсилює ріст, диференціацію і активацію гранулоцитів (нейтрофілів, еозинофілів, базофілів).

Моноцитарний колонієстимулюючий фактор (М-КСФ) – продукується моноцитами/макрофагами, Т-лімфоцитами, фібробластами, епітеліальними і ендотеліальними клітинами. Активує проліферацію попередників моноцитів/макрофагів в кістковому мозку.

Гранулоцитарно-моноцитарний колонієстимулюючий фактор (ГМ-КСФ) – продукується Т-лімфоцитами і моноцитами/макрофагами, а також фібробластами і ендотеліальними клітинами. Стимулює ділення і диференціацію попередників гранулоцитів та макрофагів і активує їх. Бере участь в стимуляції диференціації кровотворних попередників в

антигенпрезентуючі дендритні клітини. Підсилює секрецію ІЛ-1, ІЛ-6 і ФНП-α клітинами системи мононуклеарних фагоцитів.

Трансформуючий фактор росту-β (ТФР-β) – поліпептидний поліфункціональний фактор росту, до якого належать також фактори росту фібробластів, тромбоцитів, ендотелію, інсуліноподібний, епідермальний фактор росту та ін.

ТФР-β представлений білками ТФР-β 1, 2, 3, 4 і продукуються різними клітинами – макрофагами, Т-хелперами-3 типу, тромбоцитами, м'язовими і деякими пухлинними клітинами. Основна його функція полягає у пригніченні росту і активності Т-лімфоцитів. Деактивує функції макрофагів/моноцитів, В-лімфоцитів, нейтрофілів, НК. Знижує цитотоксичну та цитокінпродукуючу активність макрофагів, а також експресію на їх поверхні молекул МНС. Він діє синергічно з ІЛ-4, ІЛ-10, ІЛ-13 (деактиватори макрофагів).

ТФР-β – протизапальний цитокін, але у ряді випадків він може викликати і прозапальні ефекти. Регулює процеси запрограмованої клітинної загибелі нормальних і трансформованих клітин. ТФР-β пригнічує апоптоз Т-х1, а разом з ІЛ-2 інгібує апоптоз Тх-2.

Цей медіатор обумовлює імуносупресію при непластичних захворюваннях. Надлишкова активність його та інших ростових факторів може призвести до гіперпроліферативних процесів: гломерулонефриту, склерозування шкіри, цирозу печінки, а також до прогресуючого пухлинного росту.

Фактор некрозу пухлин (ФНП, TNF – tumor necrosis factor) – розрізняють власне ФНП-α та ФНП-β.

ФНП-α – прозапальний цитокін, продукується активованими макрофагами/моноцитами, дендритними клітинами, Т- і В-лімфоцитами, нейтрофілами, НК, кератиноцитами, астроцитами, ендотеліальними і гладком'язевими клітинами. Утворення ФНП-α індукується бактеріями та ІЛ-1, ІЛ-2, ІФН-γ, М-КСФ, а інгібується ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-10, ІФН-α, ІФН-β, Г-КСФ, ТФР-β та вірусом Епштейн-Барра.

В низьких концентраціях ФНП- α підвищує синтез адгезивних молекул на ендотеліальних клітинах, що дозволяє нейтрофілам прикріплюватись до стінки судин в місцях запалення. Підсилює синтез цитокінів хелперними Т-клітинами і стимулює проліферацію і ріст В-лімфоцитів та Т-клітин (індукує експресію рецепторів до ІЛ-2). Індукує секрецію IgG2. Відіграє роль медіатора цитотоксичності мононуклеарних клітин та НК. ФНП- α токсичний для пухлинних клітин за рахунок активації ендонуклеаз та пошкодження мітохондрій злоякісно трансформованих клітин.

У великих концентраціях, відомий як кахексин – має здатність пригнічувати ліпопротеїнову ліпазу жирової тканини (зменшення утилізації жирних кислот, що призводить до кахексії). Також приводить до розвитку ендотоксин-індукованого септичного шоку.

ФНП- α індукує синтез макрофагами ІЛ-1, ІЛ-6 і утворення печінкою білків гострої фази. Посилює експресію МНС на макрофагах. Стимулює ангіогенез. Здатний викликати геморагічний некроз деяких пухлин, обумовлений внутрішньосудинним тромбозом у межах малігнізованих тканин, що приводить до геморагічних "інфарктів" пухлинної тканини.

ФНП- β (лімфотоксин) – продукується активованими Т-і В-лімфоцитами. Головна його функція полягає в індукції апоптозу клітин –мішеней.

Виявлена роль ФНП у виникненні інсулітів і деструкції β -клітин острівками Лангенгарса, артриту, ішемії та запаленні міокарда. ФНП- α є маркером показника активності запального процесу.

Спостерігається підвищення рівня ФНП- α при серцевій недостатності та гострому інфаркті міокарда (його рівень корелює з розміром вогнища некрозу і ступеню важкості дисфункції лівого шлуночка). Гіперекспресія ФНП- α спостерігається не лише в плазмі крові, але і в міокарді при порушенні його функцій. Підвищена експресія ФНП- α та рецептора до нього на кардіоцитах спостерігається при дисфункції міокарда різної етіології. ФНП- α здатний індукувати ремоделювання серцевого м'яза, викликати гіпертрофію міокарда та зниження його скорочення. Зменшує артеріальний тиск і сприяє набряку

легень. Можливо ці ефекти пов'язані із здатністю ФНП- α активувати синтез NO-синтетази, підвищуючи тим самим склад в тканинах закису азоту.

Інтерферони (ІФН) – глікопротеїни, що виробляються клітинами у відповідь на вірусну інфекцію та ін. Блокують репродукцію вірусів в клітинах та беруть участь у взаємодії між клітинами імунної системи. Клітини людини виробляють 4 основних види інтерферонів: ІФН- α , ω , β , γ .

ІФН- α , ω , β обумовлюють протівірусну та протипухлинну дію. ІФН- α (лейкоцитарний) продукується лейкоцитами і макрофагами. ІФН- ω дуже схожий на ІФН- α . ІФН- β (фібробластний) – синтезується фібробластами, ендотеліальними клітинами, лімфоцитами, НК. ІФН- γ – продукується активованими Т-хелперами-1 та НК. Регулює специфічну імунну відповідь та неспецифічну резистентність.

Розрізняють наступні біологічні ефекти інтерферонів:

протівірусний ефект забезпечується 3-ома процесами, що відбуваються одночасно після зв'язування ІФН з рецептором. Ці механізми реалізують протівірусний ефект, що призводить до пригнічення реплікації віруса.

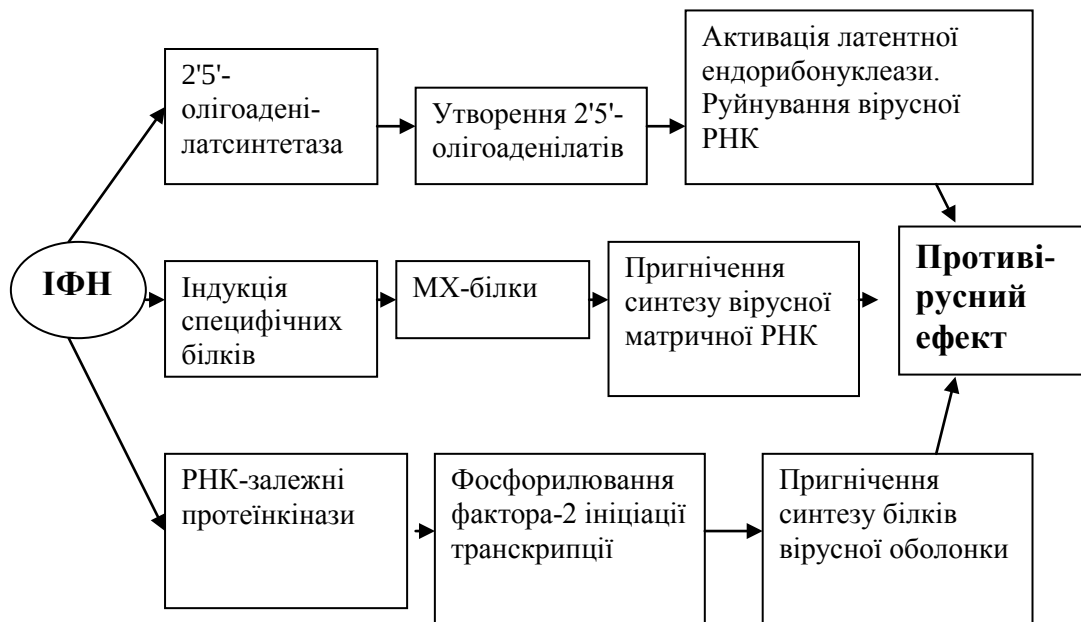


Рис. – Схема формування протівірусного ефекту інтерферонів.

✓ **Протипухлинний(антипроліферативний)ефект** забезпечується наступними механізмами:

1. Активація цитотоксичних клітин;

2. Підсилена експресія пухлиноасоційованих антигенів;
3. Модуляція продукції антитіл;
4. Пригнічення дії пухлинних ростових факторів;
5. Інгібування синтезу РНК і білків пухлинної клітини;
6. Уповільнення клітинного циклу і перехід у стан спокою;
7. Стимуляція злоякісно трансформованих клітин до дозрівання;
8. Відновлення стримуючого контролю за проліферацією;
9. Гальмування утворення нових судин у пухлині;
10. Пригнічення метастазування;
11. Біомодуляція активності цитостатиків (зміна метаболізму, зниження кліренса).

Сьогодні використовують рекомбінантні ІФН, отримані за допомогою генно-інженерних технологій для лікування вірусних інфекцій та численних ракових захворювань.

✓ **Імуномодулюючий ефект** забезпечується наступними механізмами:

1. Підвищення експресії антигенів МНС I та II класів;
2. Регуляція чутливості до цитокінів;
3. Активація цитотоксичних ефекторних клітин.

✓ **Антибактеріальний ефект**, в основі якого лежить здатність ІФН індукувати активність деяких ферментів в ураженій клітині:

1. Індукція індоламін-2,3-дезоксигенази приводить до зниження внутріклітинного складу L-триптофану, що є причиною смерті бактеріальної клітини у зв'язку з порушенням метаболізму;
2. Індукція NO-синтетази призводить до продукції NO – бактерицидний фактор, здатний руйнувати бактеріальні клітини.

Хемокіни – низькомолекулярні цитокіни (їх близько 50), які відповідають за хемотаксис лейкоцитарних клітин у вогнище запалення (направлений рух за градієнтом концентрації) та беруть участь у активації лейкоцитів. Вони регулюють рухливість лейкоцитів. Молекулярна маса складає від 8-12 кД. Рецептори для хемокінів структурно мають вид трансмембранної «гармошки» з

7 шарів G-зв'язуючих протеїнів. Хемокини розташовані у міжклітинному матриксі. Концентрація хемокинів підвищується з наближенням до клітини-продуцента. Хемокини можуть викликати дегрануляцію клітин і підвищувати експресію молекул адгезії. Хемокини експресуються лише активованими клітинами.

За **хімічною структурою** в порівнянні конфігурації залишків цистеїну (C) в амінокислотній послідовності хемокини поділяють на 4 групи: CX₃C – α -хемокини, CC – β -хемокини, C – γ -хемокини та CXXXC – δ -хемокини.

Характеристика деяких хемокинів

CX₃C – α -хемокини. NAP-1 (neutrofil activating protein-1, нейтрофіли, що активують білок-1), IL-8 – продукуються моноцитами, гранулоцитами, лімфоцитами. Основна функція – активація нейтрофілів: посилення хемотаксису, підвищення експресії адгезивних молекул, прилипання до ендотеліальних клітин. Крім того, підсилюють екзоцитоз лізосомальних ферментів ангіогенеза і підвищують експресію рецепторів до комплекменту.

NAP-2 (neutrofil activating protein-2, нейтрофіли, що активують білок-2) – продукуються тромбоцитами. Головна функція – підсилення хемотаксису і активація нейтрофілів.

PF-4 (platelet factor 4, тромбоцитарний фактор-4) – продукується тромбоцитами. Індукує вивільнення гістаміну з базофілів, підсилює експресію рецептора до IgE на еозинофілах, підвищує хемотаксис гранулоцитів і моноцитів.

GRO- α (growth regulated oncogene, онкоген регулюючий ріст) – продукується моноцитами, епітеліоцитами і ендотеліоцитами, а також злоякісно трансформованими клітинами (зокрема клітинами меланоми). Підсилює ангіогенез і ріст деяких типів пухлин.

IP-10 (inducible protein, індукцибельний протеїн) – продукується ендотеліоцитами, моноцитами і фібробластами, стромальними клітинами тимуса і селезінки. Підвищує хемотаксис активованих Т-лімфоцитів. Пригнічує проліферацію клітин ендотелія.

SDF-1 α , β (stromal cell-derived factor-1, фактор-1, що продукується стромальними клітинами) – продукується стромальними клітинами. Стимулює ріст пре-В-лімфоцитів. Підсилює хемотаксис моноцитів і Т-лімфоцитів.

MIG (monokine induced by IFN- γ , монокін, індукований γ -інтерфероном) – продукується моноцитами/макрофагами стимульованими γ -інтерфероном. Головна функція – посилення хемотаксису лімфоцитів інфільтруючих пухлину.

CC – β -хемокіни. MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1, моноцитарний хемоаттрактант білок-1) – продукується моноцитами/макрофагами, фібробластами, кератиноцитами. Підсилює хемотаксис Т-лімфоцитів, індукує хемотаксис і активацію моноцитів.

MIP-1 α , β (macrophage inflammatory protein-1 α , β , запальний макрофагальний білок-1 α , β) – продукується моноцитами, Т-лімфоцитами, тучними клітинами, фібробластами. Посилює хемотаксис моноцитів і Т-лімфоцитів. Пригнічує проліферацію гемопоетичних стовбурових клітин.

RANTES (regulated on activation normal T-cell expressed and secreted, регулятор активації, експресії і секреції нормальних Т-клітин) – продукується Т-лімфоцитами, моноцитами, тромбоцитами. Посилює хемотаксис Т-лімфоцитів, моноцитів, В-лімфоцитів, еозинофілів. Сприяє дегрануляції базофілів.

Eotaxin (еотаксин) – продукується ендотеліальними, епітеліальними клітинами, моноцитами, альвеолярними макрофагами, клітинами серця, тимусу, нирок, печінки. Приймає участь в алергії посилюючи хемотаксис еозинофілів.

C – γ -хемокіни. Lymphotactin (лімфотактин) – продукується тимоцитами і активованими Т-клітинами. Посилює хемотаксис Т-лімфоцитів.

CXXC – δ -хемокіни. Neurotactin (fractalkine, нейротактин) – єдиний хемокін, пов'язаний з мембраною клітин. Експресується на мембрані клітин мозку, легень і серця також на ендотеліальних клітинах, моноцитах. Забезпечує виражену адгезію моноцитів, Т-цитотоксичних клітин і НК. Високий рівень експресії нейротактина на ендотеліальних клітинах вказує на його важливу роль у приваблюванні лейкоцитів, Т-лімфоцитів і моноцитів з кров'яного русла.

В останні роки було отримано докази важливої ролі хемокінів в різноманітних патофізіологічних процесах – хронічному і гострому запаленні, інфекційних захворюваннях, проліферації гемопоетичних стовбурових клітин та ін. Цікавим є відкриття того, що деякі хемокінові рецептори функціонують у якості ко-рецепторів для ВІЛ. Відомо, що молекула CD4 є головним рецептором, з яким зв'язується ВІЛ-1 своїм білком gp 120. Але для інфікування клітини одного такого зв'язування не достатньо. Необхідне допоміжне зв'язування ВІЛ-1 з ко-рецептором – рецептором для хемокінів. Так, на макрофагах таким допоміжним ко-рецептором слугує рецептор для хемокінів MIP-1 α , β і RANTES. На Т-лімфоцитах – SDF-1. Виявилось, що у тих випадках, коли на поверхні макрофагів або Т-лімфоцитів у людини не експресувались дані ко-рецептори, то такі люди були резистентні до ВІЛ-інфекцій. Це відкриття робить можливою перспективу профілактики та лікування ВІЛ/СНІДу шляхом штучної блокади хемокінових рецепторів.

Таким чином цитокіни – це білкові продукти активованих клітин імунної системи, що забезпечують міжклітинні комунікації не лише при імунній відповіді, але і при кровотворенні, розвитку запалення та ін. До них відносяться інтерлейкіни, інтерферони, ростові фактори, хемокіни та ін. Система цитокінів характеризується тісним взаємозв'язком факторів, що виражаються у взаємних впливах та індукції, міцним перекриванням ефектів. Недивлячись на поліфункціональність та небезпеку розвитку токсичних ефектів, цитокіни в наш час все ширше використовуються у якості лікувальних засобів.

9.6. Макрофаги та фагоцити

Говорячи про фагоцити необхідно згадати, що перші класичні дослідження цих клітин провів видатний вчений І.І. Мечніков ще у кінці ІХХ і на початку ХХ століття. Він підійшов до фагоцитів та мікро- і макрофагів із порівняльно-еволюційних позицій, блискуче висвітлив їх роль в процесі запалення як універсальної захисно-пристосованої реакції багатоклітинних організмів. Мечніков та його послідовники вважали основною здатністю фагоцитуючих клітин поглинальну та бактерицидну функції, з якими вони пов'язували їх участь у антимікробному імунітеті.

У 20-х роках, вчення Мечнікова про фагоцитоз лягло в основу концепції про ретикулоендотеліальну систему, а у 30–40 рр. – вчення про систему сполучної тканини. В кінці 50–60 років уявлення про систему сполучної тканини почали змінювати імунологічні концепції. Замість системи сполучної тканини все частіше стали говорити про «систему імунологічного гомеостазу», і в решті решт – лімфоцити, які забезпечують специфічні імунні реакції, зайняли привілейоване положення, а усі інші фагоцитуючі клітини сполучної тканини та крові – допоміжне. В області вивчення лімфоцитів було досягнуто великих успіхів, впорядковано уявлення про структуру популяції лімфоцитів і про молекулярні механізми специфічних імунних реакцій. В той же час виявлено, що макрофаги є антигенпрезентуючими клітинами: макрофаги представляють антиген Т-лімфоцитам в зручній для них формі для того, щоб далі лімфоцитарному механізму легше було ним маніпулювати. Були відкриті фактори лімфоцитарного походження – лімфокіни, які, як вважали, робили макрофаги слухняними виконавцями волі лімфоцитів.

За останні 50 років позиції лімфоцитарного центрizmu стали поступово слабшати і фагоцити, які довгий час були низведені до «чистильників», почали відновлювати своє положення і входити в число «імунологічно респектабельних клітин». Накопились факти, що свідчать про те, що фагоцитуючі клітини не лише полегшують лімфоцитам

здійснювати специфічну імунну відповідь, але самі беруть участь в патогенезі алергічних реакцій негайного (нейтрофіли) або сповільненого типу (ГСТ) (макрофаги). Вперше уявлення про макрофаги як допоміжні клітини в імунитеті висловив Мекеніз (1971) в своїх роботах, в яких продемонстрована ефекторна роль макрофагів у розвитку ГСТ і у формуванні протиінфекційної перехресної резистентності. У ті ж роки у загальних рисах сформувалась концепція про систему мононуклеарних фагоцитів. З'ясувалось, що усі зрілі органо- і тканиноспецифічні макрофаги, а також фагоцитуючі мононуклеари з вогнищ запалення мають єдиного попередника – кровотворну стовбурову клітину кісткового мозку. Периферичний пул макрофагів представлений мігруючими клітинами та клітинами-резидентами з тривалим життєвим циклом. Він поповнюється за рахунок моноцитів циркулюючої крові. А.Н. Маянський у своїй монографії (1983) показав, яку важливу роль в патогенезі запалення, репаративної регенерації та фіброгенезу відіграє секреторна функція макрофагів. Розглядаючи макрофаг з позиції загальної патології, він хотів показати макрофаг, як клітину «на всі випадки життя», кінцева роль функціонування якої у масштабах організму – підтримання структурного гомеостазу. Інтерес до макрофагів різко зріс в період з кінця 60-х до початку 80-х рр. – почали регулярно виходити колективні праці, в яких проводились підсумки вивчення макрофагів з різних сторін, але головним чином в реакціях специфічного імунітету. Одночасно з цим «макрофагальні проблеми» досліджували і окремі автори, в тому числі І.Я. Учитель – «Макрофаги в імунитеті» (1978) та Я.Карр – «Макрофаги, огляд ультраструктури та функції».

Система мононуклеарних фагоцитів – велика популяція клітин імунної системи, яка включає кістковомозкові попередники, що походять з єдиної стовбурової клітини – монобласт та промоноцит, циркулюючий в крові, моноцит та зрілі тканинні макрофаги (рис.7.3.1).

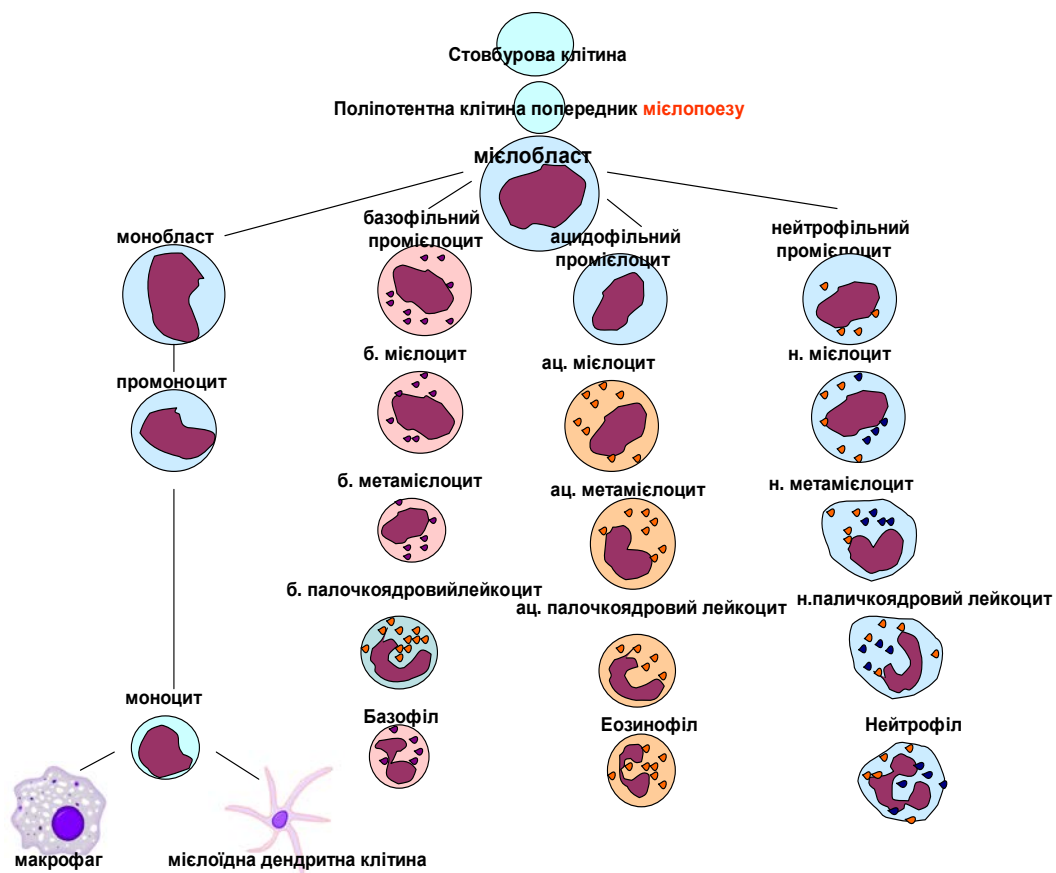


Рисунок 7.3.1. Схема мієлопоєзу

Фагоцити забезпечують в значній мірі неспецифічний захист організму за рахунок своєї фагоцитарної функції.

Фагоцитоз – поглинення моноцитами/макрофагами і гранулоцитами (нейтрофілами, еозинофілами, базофілами) часток діаметром більшим ніж 0,1 мкм, в т.ч. бактерій або крупних макромолекулярних комплексів. Фагоцитоз є різновидом ендоцитозу. Клітини організму поглинають ендоцитозом будь-які речовини з навколишнього середовища через спеціальні ділянки у своїй мембрані. Поглинання маленьких рідких частинок називається піноцитозом, або рідкофазним ендоцитозом. Рецептор-опосередкований ендоцитоз починається із взаємодії об'єкту ендоцитозу з рецепторами мембрани клітини і формування мембранних «обмежених ямок», вкритих всередині білковим комплексом, що називається клатрином. Везикули, вкриті клатрином, або «обмежені ямки», фагосоми, з'єднуються з лізосомами, в результаті чого антигени перетравлюються.

Фагоцитоз включає наступні етапи: 1) активація фагоцита; 2) хемотаксиси; 3) прикріплення (адгезія) до об'єкту фагоцитоза; 4) поглинення об'єкта; 5) кілінг та перетравлення, процесинг (перетравлення) об'єкта фагоцитозу.

Фагоцити направлено транспортуються до об'єкту фагоцитоза у сторону підвищення концентрації хемоаттрактантів – речовин мікроорганізмів, активованих компонентів комплементу (C5a) та цитокінів. Процес фагоцитозу підсилюють опсоніни, що оточують об'єкт фагоцитозу, який потім прилипає (адгезія) до рецепторів фагоцита. Псевдоподія – вип'ячування клітини, охоплює бактерію або іншу корпускулу, яка далі оточується плазмолемою за так званим «zipper»-механізмом (від англ. zipper – застібка «блискавка»); утворюється мембранна везикула (фагосома), яка занурюється в цитоплазму фагоцита (рання ендосома). Мембрана ранньої ендосоми (фагосоми) зливається з лізосомою, утворюючи фаголізосому (пізню ендосому). В пізніх ендосомах мікроорганізм руйнується: відбувається закислення (рН до 4,5) і активація ферментів лізосом (нуклеаз, протеаз глікозидаз, ліпаз, фосфатаз, сульфатаз, фосфоліпаз).

Макрофаги, моноцити

Макрофаги постійно дозрівають з циркулюючих в крові моноцитів, які мають кістковомозкове походження. Залишаючи кров'яне русло, дозрілі макрофаги мігрують в різні тканини організму. У легенях вони представлені альвеолярними макрофагами. Велика кількість макрофагів знаходиться в сполучній тканині, в лімфовузлах і лімфоїдній тканині, що асоціюється зі слизовими, зокрема – слизовими дихальних шляхів. Оновлення тканинних макрофагів відбувається, в основному, за рахунок рекрутування моноцитів з крові.

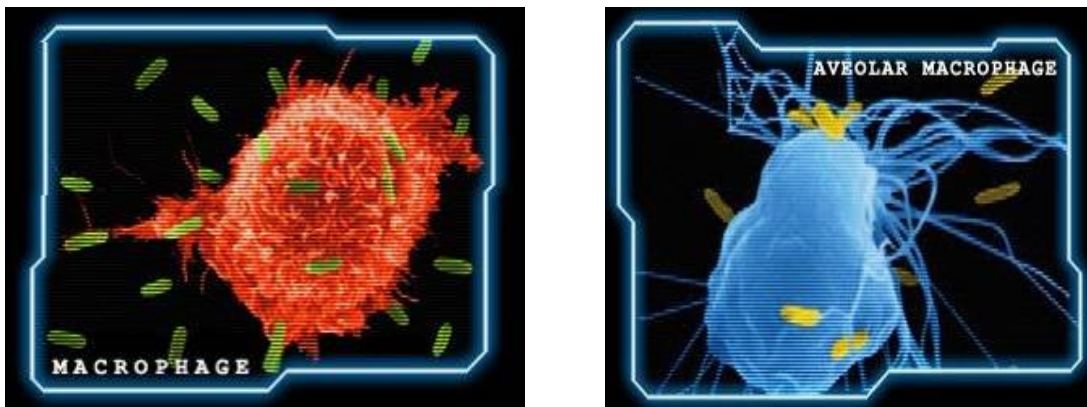


Рисунок 7.3.2. Різновиди макрофагів

Макрофаги беруть найактивнішу участь в неспецифічному захисті від патогенних мікроорганізмів, в ранній запальній відповіді на інфекцію, в «запуску» специфічної імунної відповіді та в клітинно-опосередкованій імунній відповіді. У вогнищі гострого запалення в перші години моноцити/макрофаги складають менше 5% інфільтруючих клітин, значно поступаючись за чисельністю гранулоцитам, проте через 24-48 годин від початку запалення макрофаги стають домінуючими клітинами інфільтрату, бо приходять на зміну швидко гинучим нейтрофілам.

Молекули, що секретуються макрофагами, виконують ефекторні і регуляторні функції. При формуванні специфічної імунної відповіді макрофаги виконують функцію представлення (презентації) антигену Т-лімфоцитам, тобто є антигенпрезентуючими клітинами. Для цього захоплений макрофагами антиген піддається переробці у фаголізосомах. Пептидні фрагменти антигену, утворені в результаті обмеженого протеолізу, комплексуються з молекулами антигенів головного комплексу гістосумісності II класу і експресуються на мембрані макрофага у формі, що доступна для розпізнавання Т-лімфоцитами. Крім того, цитокіни, які секретують макрофаги, зокрема інтерлейкін-1, сприяють активації Т-лімфоцитів при їх відповіді на антиген. **Участь макрофагів в ефекторній фазі специфічної імунної відповіді проявляється безпосередньо їх мобілізацією до вогнища імунного запалення під впливом лімфоцитарних продуктів.** Інші цитокіни лімфоцитарного походження,

зокрема ІФН- γ , здатні активувати макрофаги: підвищувати їх мікробіцидність і цитотоксичність. Такі активовані макрофаги виконують функції основних ефektorних клітин клітинно-опосередкованої імунної відповіді. **Макрофаги також беруть участь в ефektorній фазі гуморальної імунної відповіді, захоплюючи і знищуючи патогенні бактерії, опсонізовані специфічними антитілами і комплементом.** Для цього на мембрані макрофагів експресовані спеціальні рецептори: FcR – для імуноглобулінів, що з'єднані з відповідними антигенами мікроорганізму, і CR1, CR3 та CR4 – для фракцій активованого комплементу. Найбільш відомі рецептори для Fc-фрагментів IgG: Fc γ RI (CD64) – високоафінний рецептор; Fc γ RII (CD32) – рецептор з меншою афінністю; Fc γ RIII (CD14) – низькоафінний рецептор.

На мембрані макрофагів експресовані різні рецептори для захоплення мікроорганізмів: макрофагальний манозний рецептор (MMR), скевенджер-рецептор (від англ. «scavenger» – стерв'ятник) (MSR), рецептори для бактерійного ліпополісахариду (CD14). MMR опосередкує захоплення багатьох мікроорганізмів: *Mycobacteria*, *Leishmania*, *Legionella*, *Pseudomonas aeruginosa* та ін. Через MSR проходить ендоцитоз модифікованих ліпопротеїнів при перетворенні макрофага у пінисту клітину (активований макрофаг). Через ті ж MSR можуть фагоцитуватись більшість бактерій – як грам-позитивних, так і грам-негативних. Проте вплив бактерійного ліпополісахариду (ЛПС) на макрофаги опосередкований спеціальним рецептором CD14. Експресія цього рецептора підвищується на макрофагах при запаленні та імунній відповіді. Можлива участь CD14 в процесі адгезії моноцитів до ендотеліальних клітин, хоча оборотня адгезія моноцитів до ендотелію при трансендотеліальній міграції пов'язана з іншим компонентом мембрани – CD31. На моноцитах крові експресоровані два β_2 -інтегрини: LFA-1(CD11a) та Mac-1(CD11b), а також β_1 -інтегрин VLA-4(CD29). Їх лігандами на ендотеліальних клітинах є адгезійні молекули ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, фібриноген, фібронектин та ін. Експресія цих лігандів на

ендотеліальних клітинах зростає під впливом прозапальних цитокінів (TNF α , IL-1, IFN γ).

Таблиця 7.3.1 - Поверхневий фенотип моноцитів/макрофагів

Поверхневі молекули	Позначення маркерів	Функції
MHC I та II кл.	CD 74	Антигени гістосумісності
LFA-1	CD11a/CD18	Адгезійні молекули
LFA-3	CD58	
ICAM-1	CD54	
ICAM-2	CD102	
B7	CD80	
MMR, MFR		Манозний/манозо-фукозний рецептори або лектиноподібні поверхневі молекули для прикріплення мікроорганізмів
LLM		
CR1	CD35	Рецептор C3b, iC3b
CR3 CR4	CD11b/CD18 CD11c/CD18	Рецептори iC3b, адгезійні молекули
C5aR		Рецептор C5a - хемоатрактанту
Fc γ RI Fc γ RII Fc γ RIII	CD64 CD32 CD16	Рецептори IgG
Fc ϵ RII	CD23	Рецептор низькоафінних IgE
IL-1R	CDw121	Рецептор інтерлейкіна 1
TNFR	CDw120a,b	Рецептори туморнекротичного чинника
GM-CSFR	CDw116	Рецептор ростового чинника GM-CSF
IFN γ R	CDw119	Рецептор ІФН- γ
β 2інтегрин	CD18 CD14	Рецептор ліпополісахариду (ЛПС) Рецептор ЛПС-зв'язуючого білка сироватки крові

Альвеолярні макрофаги відповідальні за очищення від чужорідних частинок різної природи, які потрапили до організму через дихальні шляхи. Взаємодія альвеолярних макрофагів з частинками, які видаляються через певні рецептори, визначає вираженість запальної відповіді: від мінімальної до активного запалення з пошкодженням легеневої тканини. Відповідь альвеолярних макрофагів істотно відрізняється залежно від рецепторів, що залучені при фагоцитозі часток. Максимально виражена запальна відповідь

на захоплення опсонізованих частинок через Fc-рецептори, від яких відходить міцний сигнал активації респіраторного вибуху, секреції TNF α і хемокінів. Опсонін-незалежний фагоцитоз не супроводжується такою вираженою активацією метаболізму макрофагів. Захоплення неопсонізованих частинок альвеолярними макрофагами можливе через інтегровані рецептори або через рецептори для різних поверхневих компонентів часток: лектиноподібні (MMR) для вуглеводів, рецептори для залишків апоптотичних клітин, сквенджер-рецептори для модифікованих LDL та ін. Експресія всіх цих рецепторів регулюється прозапальними цитокінами. Їх експресією визначається роль альвеолярних макрофагів як бар'єра на шляху проникнення в організм різних компонентів забруднень повітря (air pollutions).

Таблиця 7.3.2. Антимікробні компоненти вмісту лізосом

Компоненти	Функції
Кислі гідролази (протеинази, нуклеази)	Гідролітичні ферменти з оптимумом при низьких значеннях рН, розщеплюють макромолекули бактерій
Нейтральні протеази	Розщеплюють білки бактерій
Лізоцим	Мурамідаза, руйнує клітинну стінку бактерій
Катіонні білки	Проявляють бактерицидність за рахунок підвищення проникності клітинної стінки бактерій
Дефензиви	Утворюють пори в мембранах, викликають одноланцюгові розриви в молекулі ДНК у бактерій
B12 - що зв'язує білок	Інгібує B12-залежні ферменти, що беруть участь в синтезі ДНК у бактерій
Лактоферин	Зв'язує залізо, інгібує залізо-залежні ферменти, що беруть участь в біологічному окисненні у бактерій

Коли патогенний мікроорганізм долає епітеліальний бар'єр, в субепітеліальній сполучній тканині він зустрічається з макрофагом. Взаємодія мікроорганізму з макрофагом викликає ряд наслідків. Перш за все, мікроорганізм захоплюється, вбивається і перетравлюється всередині макрофага. Цих подій може опинитися достатньо для запобігання подальшому розвитку інфекції. Проте, багато патогенних мікроорганізмів в

процесі еволюції паразитизму придбали чинники стратегії, що дозволяють їм уникнути захоплення, або внутрішньоклітинної загибелі та перетравлення в макрофагах. Так, наприклад, полісахаридна капсула захищає пневмококи та клебсієли від взаємодії з рецепторами макрофагів. Інфікуюча доза мікроорганізмів може бути така велика, що макрофаги не справляються з їх елімінацією. Однак, взаємодія мікроорганізмів з рецепторами макрофагів має ще один важливий наслідок – індукцію продукції і секреції прозапальних цитокінів, що забезпечують розвиток ранньої запальної відповіді на інфекцію. Крім того, захоплення і переробка макрофагами збудника є першою фазою індукції специфічної імунної відповіді на його антигени. **Макрофаги відносяться до професійних антигенпрезентуючих клітин, здатних взаємодіяти з Т-лімфоцитами.**

Таблиця 7.3.3 - Секреторні продукти макрофагів

Групи	Продукти
Лізосомні ферменти	Протеази, (дезоксир)ибонуклеаза, ліпази, лізоцим, мієлопероксидаза
Кисневі радикали	Перекис водню, супероксид, нітроксид і ін.
Цитокіни	IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, TNF α , IFN α/β , CSFs, TGF, FGF, PDGF
Інгібітори цитокінів	IL-1 inh
Гормони	Адренокортикотропний гормон, тимозин, β -ендорфін, вітамін Д3
Метаболіти арахідонової кислоти	Простагландини, лейкотрієни, тромбосани
Інгібітори протеаз	α 2-макроглобулін і ін.
Компоненти комплементу	C1 - C9
Компоненти позаклітинного матриксу	Фібронектин, тромбоспондин, хондроїтин сульфат
Зв'язують білки	Трансферин, авідин, аполіпопротеїн E

На мембрані макрофагів експресовані рецептори для багатьох регулюючих цитокінів, головним активуючим серед яких є IFN γ . Дозрівання, диференціація і активація макрофагів залежать від ростових чинників: GM-

CSF і M-CSF. Альтернативним регулюючим цитокином для макрофагів є IL-10, що інгібує всі властивості і функції макрофагів, які стимулює IFN γ . Проміжний вплив на функції макрофагів чинять IL-4, IL-13, M-CSF і TGF β .

Серед продуктів секреції макрофагів головне місце займають прозапальні (IL-1, IL-6, TNF α IL-8, IL-12) і протизапальні (IL10, TGF β) цитокини. Макрофаги продукують і секретують чинники зростання для аутокринної регуляції і для регуляції інших клітин (фактор росту фібробластів). Серед монокінів виявляються хемокіни для різних клітин. Продукти макрофагів забезпечують адгезію лейкоцитів до ендотелію судин і подальшу трансендотеліальну міграцію (TNF α , IL-8 та ін. хемокіни).

Макрофаги є джерелом цитокінів та костимулюючих молекул, необхідних для активації Т- і В-лімфоцитів. При цьому експресія костимулюючих молекул на мембранах макрофагів модулюється цитокинами і вони можуть діяти в синергізмі з костимулюючими молекулами. З іншого боку, продуковані Т-лімфоцитами цитокини впливають на макрофаги, викликаючи їх активацію. Основний стимулятор макрофагів – IFN γ – стимулює продукцію макрофагами IL-12 і костимулюючих молекул B7.1 (CD80), B7.2 (CD86). Цитокини IL-6 та IL-12 у синергізмі з молекулами B7 підсилюють проліферацію Т-лімфоцитів і їх диференціацію. На Т-лімфоцитах лігандами для костимулюючих молекул B7 служать молекули CD28 і CTLA-4.

IFN γ , крім того, індукує продукцію макрофагами додаткового ростового фактора Т-лімфоцитів – IL-15, що має багато спільних властивостей з IL-2. Активовані Т-лімфоцити разом з IFN γ продукують фактор інгібуючий міграцію (MIF), який в синергізмі з TNF α індукує продукцію макрофагами нітроксидних радикалів.

Разом з прозапальними цитокинами, що активують макрофаги, існують протизапальні цитокини, що інгібують окремі функції макрофагів: IL-4, IL-10, IL-13, TGF β . IL-10, який продукують і макрофаги, і Т-лімфоцити, пригнічує багато функцій макрофагів: знижує експресію B7, інгібує

продукцію і активність MIF, TNF α , IL-12. На відміну від цього IL-4 і TGF β інгібують секрецію монокінів, але не знижують експресії костимулюючих молекул B7. Всі протизапальні цитокіни пригнічують продукцію макрофагами нітроксидних радикалів. В ролі інгібіторів можуть виступати і інші цитокіни, наприклад IL-2, який може індукувати продукцію макрофагами TGF β . Останній знижує мікробіцидність макрофагів, інгібуючи продукцію нітроксидних радикалів, інгібує продукцію простагландину E2, а на Т-лімфоцитах знижує експресію рецепторів для IL-2. Інгібіторним ефектам TGF β , можуть протистояти стимулюючі ефекти IFN γ та TNF α , які продукуються паралельно з IL-2. Кінцевий результат активації або деактивації макрофагів багато в чому залежить від особливостей мікрооточення. На відміну від певного напрямку диференціювання Т-лімфоцитів (в Th1 або Th2), активація макрофагів, як правило, не приводить до такого цілеспрямованого диференціювання, а може проявитися виборчою активацією окремих функцій макрофагів.

Дисфункції макрофагів можуть бути проявами дефектів їх метаболічних шляхів, а також – наслідком дефектів гуморальних чинників: антитіл, системи комплемента, цитокінів, які необхідні для їх активації. Найбільш істотними для підтримки захисних функцій фагоцитів є метаболічні шляхи, що забезпечують мікробіцидність фагоцитів. Тому найбільш істотними можуть виявитися дефекти таких ферментів, як мієлопероксидаза, глюкозо-6-фосфат-дегідрогеназа, кисла і лужна фосфатази, лізосомні гідролази, нейтральні протеази.

Генетичні дефекти моноцитів/макрофагів можуть торкатися окремих їх функцій: рухливості, хемотаксису, адгезії (при порушенні синтезу і експресії адгезійних молекул або їх компонентів), бактерицидності (при порушенні киснево-залежних або киснево-незалежних механізмів). Набуті імунодефіцити з дефектами функцій макрофагів найчастіше розвиваються в результаті перенесених інфекцій. Деякі віруси та найпростіші здатні синтезувати копії FcR, які зв'язують антитіла, що утворилися, через Fc-фрагменти і перешкоджають активації

захисних функцій макрофагів (фагоцитозу). Патогенні мікобактерії містять сульфатиди та гліколіпіди, які інгібують злиття лізосом з фагосомами, та продукують ряд ферментів, що нейтралізують реактивні кисневі радикали фагоцитів. Лейшманії секретують протеази, що інактивують лізосомні ферменти, або інгібують респіраторний вибух. Деякі бактерії продукують екзотоксини, що одержали назву лейкоцидини, які викликають дезінтеграцію лізосом всередині макрофагів, що приводить до руйнування клітинної органели і до загибелі клітин. Багато з внутрішньоклітинних паразитуючих бактерій, найпростіших і вірусів всередині макрофагів по-різному інтерферують із складною системою внутрішньоклітинної трансдукції сигналів. Викликане ними порушення взаємозв'язків між протеїнкіназами, фосфоліпазами та іншими молекулами внутрішньоклітинних вторинних месенджерів призводить до деактивації макрофагів. При цьому знижується переробка захоплених антигенів, експресія антигенів гістосумісності МНС II класу, презентація антигенів, продукція цитокінів, страждають і захисні функції макрофагів. У людей, інфікованих плазмодіями або трипаносомами, була описана поява «супресивних макрофагів», секретуючих цитокін, який інгібував і секрецію IL-2, і експресію IL-2R на Т-лімфоцитах. Такі дефектні макрофаги можуть пригнічувати Т-лімфоцити через клітинні контакти, що залучають поверхневі регуляторні молекули.

Описаний рідкісний набутий дефект макрофагів під назвою «малакоплакія», при якій запальні гранулеми утворюються в різних тканинах, частіше – в епітелії сечостатевого тракту. У складі таких гранул виявляються крупні мононуклеари з мінералізованими агрегатами бактерій у фагосомах (тільця Michaelis-Gutman'a). Передбачається дефект деградації захоплених бактерій.

Дендритні клітини та клітини Лангерганса

За останні 10 років уявлення про дендритні клітини, їх походження і функції були значно уточнені. Доведено кістково-мозкове походження

дендритних клітин. Можливі два шляхи диференціювання: з окремої клітини-попередника дендритної клітини або із загального попередника мієломонітоцитарної серії, який диференціюється до стадії моноцита, а моноцит може диференціюватися або в тканинний макрофаг, або в дендритну клітину (рис.7.3.2). Попередники дендритних клітин з кісткового мозку через кров'яне русло заселяють різні нелімфоїдні тканини: епідерміс шкіри, слизові оболонки повітроносних шляхів, шлунково-кишкового і уrogenітального трактів, інтерстиціальні тканини серця, нирок і інших органів. У епідермісі шкіри і слизових повітроносних шляхів ці клітини носять назву «клітини Лангерганса». Міграція дендритних клітин-попередників з периферичної крові в шкіру може бути пов'язана з тим, що на них посилюється експресія лігандів для селектинів ендотелію. Одночасно на ендотеліальних клітинах дермальних капілярів посилюється експресія Е-селектинів. Заселення нелімфоїдних тканин дендритними клітинами стимулює ростовий чинник GM-CSF .



Рисунок 7.3.3. Походження дендритних клітин

Посилена продукція GM-CSF в легеневій тканині при запаленні приводить до рекрутування в легеневу тканину клітин типу Лангерганса. Найперші клітини, що мігрують у вогнище бактерійного запалення в легенях – дендритні клітини-попередники, які експресують

антигени МНС II класу. Транспортовані клітини залишаються у зв'язку з епітеліальними і диференціюються в типові дендритні клітини. Дендритні клітини рекрутують в епітелій дихальних шляхів у відповідь на аерозольне введення ліпополісахариду бактерій (ЛПС). Той же ЛПС, очевидно, через індукцію синтезу TNF може послужити сигналом переходу дендритних клітин з периферійної тканини в дренуючий лімфовузол. У нелімфоїдних тканинах відбувається початкове диференціювання дендритних клітин, де вони набувають максимальної активності.

Прозапальні цитокіни (IL-1, TNF α) викликають прискорене дозрівання дендритних клітин та їх міграцію з нелімфоїдних органів у кров або в аферентну лімфу. Таким чином, дендритні клітини мігрують в лімфовузли, де їх фенотип різко змінюється і вони перетворюються на зрілі «презентуючі» клітини, що експресують на мембранах коstimулюючі молекули та здатні ініціювати специфічну відповідь Т-лімфоцитів. До цитокінів, що підсилюють диференціювання дендритних клітин, відносяться: TNF α , GM-CSF, IL-4, IFN γ . На відміну від цього продукований кератиноцитами IL-10 пригнічує антигенпрезентуючі функції дендритних клітин. Дендритні клітини разом з макрофагами і В-лімфоцитами є професійними антиген-презентуючими клітинами. Дендритні клітини найбільш активні в ініціації первинної імунної відповіді.

Дендритні клітини мають багато подібностей з макрофагами, але мають і істотні відмінності. Фагоцитарною активністю володіють лише незрілі дендритні клітини на ранніх стадіях диференціювання в нелімфоїдних тканинах, наприклад клітини Лангерганса. Основний шлях захоплення антигену, властивий дендритним клітинам, – макропіноцитоз, в результаті якого антиген транспортується у вакуоль, де переробляється, а пептиди, що утворилися, з'єднуються з молекулами МНС. Як правило, дендритні клітини захоплюють антиген на периферії (у нелімфоїдних тканинах), після чого вони мігрують в лімфовузли, де презентують цей антиген для розпізнавання ТКР і активації Т-клітин.

Таблиця 7.3.4 - Характеристики професійних антигенпрезентуючих клітин

Типи клітин		Макрофаги	Дендритні клітини	В-лімфоцити
Експресія	Конститутивна	++	+++	++
МНС II кл.	Індукується	IFN γ , TNF α	IFN γ , TNF α	IL-4 але не IFN γ
Рецептори		FcR CR1	FcR	SIg, FcR CR1
Адгезійні молекули		B7, LFA-1, ICAM-1,	LFA-2, LFA-3, ICAM-2	B7, LFA-1, LFA-3, CD72, CD22, CD54
Продукція і секреція IL-1		+++	+	+
Здатність до: Фагоцитозу		+++	—	—
Піноцитозу		+++	+++	+
Переробка антигену		+++	+	+
Презентація антигену		+	+++	+++

При цьому відбувається переключення функцій дендритних клітин із захоплення антигену на стимуляцію Т-лімфоцитів, тому на мембрані дендритних клітин починають експресуватися відповідні адгезійні (ICAM-1, LFA-3) і ко-стимулюючі (B7-1, B7-2, CD40) молекули, а також молекули CD44, що контролюють міграцію дендритних клітин в лімфоїдні органи. Дендритні клітини можуть презентувати перероблений у фаголізосомах антиген в комплексі з молекулами МНС II класу, а розчинні екзогенні антигени - в комплексі з молекулами МНС I класу. При цьому захоплення антигену і його презентація роз'єднані в часі та просторі. На відміну від макрофагів дендритні клітини не здатні виконувати функції «двірника» з перетравленням захоплених білків до окремих амінокислот. У дендритних клітин ендоцитоз служить лише першим етапом презентації антигену. Вони вважаються найбільш активними з професійних антигенпрезентуючих клітин, здатних презентувати і власні аутоантигенні епітопи, та туморасоційовані антигенні епітопи.

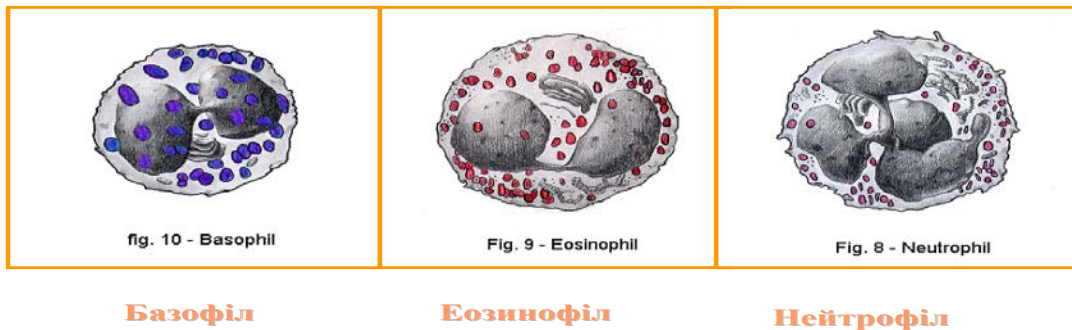
Крім того, дендритні клітини здібні до конститутивного синтезу фізіологічно значущих кількостей біологічно активного MIP-1, γ який опосередковує хемотаксис і міграцію Т-лімфоцитів. Тобто дендритні клітини

можуть брати участь в рекрутуванні Т-лімфоцитів (як CD4+ , так і CD8+) перед їх активацією.

Гранулоцити

У ефекторній фазі специфічної імунної відповіді можуть брати участь і інші лейкоцити крові: гранулоцити або поліморфноядерні лейкоцити (нейтрофіли) (рис.7.3.4).

Ці клітини складають першу лінію неспецифічного протимікробного захисту. Вони першими мобілізуються у вогнище запалення або інфекції і від їх фагоцитарної активності залежить елімінація збудників. Їх мобілізація з кров'яного русла різко підвищується під впливом цитокінів макрофагального походження (IL-8) або C5a-фракції активованої системи комплементу. Інші продукти макрофагів активують функції гранулоцитів (TNF- α).



?

Рисунок 7.3.4. Гранулоцити або поліморфноядерні лейкоцити

Гранулоцити продукуються в кістковому мозку під впливом IL-1, IL-3, IL-5, GM-CSF і G-CSF. У кістковому мозку у дорослих міститься 2×10^{11} мієлоїдних попередників, а резерв гранулоцитів складає 6×10^{11} . Попередники активно проліферують, а до резерву входять дозріваючі гранулоцити, що не діляться. Через стадію попередника вони проходять за 4 дні (3-5 ділень), а морфологічне і функціональне дозрівання в резерві займає ще 5 днів.

Щоденний вихід з кісткового мозку в нормі складає 10^{11} гранулоцитів, але він може підвищуватися у декілька разів під впливом запальних стимулів, які змушують виходити з резерву менш зрілі клітини, що проявляється «зрушенням вліво», яке розцінюється як ознака гострої інфекції. Такий посилений вихід гранулоцитів з резерву можуть індукувати бактерійні ліпополісахариди, або прозапальні цитокіни (IL-1, TNF α), або C3-фракція активованого комплементу, або кортикостероїди.

У судинному руслі 5×10^{11} гранулоцитів (середня норма у дорослих – 2000 – 9000 в мм³) діляться на два майже рівні пули: циркулюючий і пристінковий (тимчасово секвеструють в стані прилипання до поверхні ендотелію венул). При заборі венозної крові враховується лише циркулюючий пул. Динамічна рівновага двох пулів регулюється агентами, що підсилюють пристінкове стояння шляхом посилення експресії адгезійних молекул (ICAMs), до яких відносяться хемокіни IL-1, TNF α , IFN γ , а також агентами, що інгібують пристінкове стояння, до яких відносяться кортикостероїди. Пристінкове стояння – перший крок до виходу з судин в тканини, в осередок інфекції або запалення.

Нейтрофіли

Нейтрофільні гранулоцити – найбагаточисельніша група лейкоцитів, що складає (48–78% із загальної кількості лейкоцитів). У зрілому сегментоядерному нейтрофілі ядро складає 3–5 сегментів, сполучених тонкими перемичками. В популяції нейтрофілів крові можуть знаходитись клітини різної ступені зрілості – юні, паличкоядерні і сегментоядерні.

Нейтрофіл займає одну з найбільш активних позицій в системі гуморально-клітинної кооперації крові та сполучної тканини. Це робить його універсальною мішенню та індикатором різних порушень гомеостазу та гоміокінезу. У свою чергу, стимульований нейтрофіл сам стає міцним

ефектором та одним із пускових механізмів каскадних реакцій, які забезпечують розвиток запалення.

У 1978 р. Пісаревський В.Е. у своїй монографії висвітлив важливе питання – антимікробні властивості нейтрофілів, проте вони не розглядаються з позицій фізіології та загальної патології. В книзі В.А. Фрадкіна «Аллергодиагностика *in vitro*» (1975) проаналізований ще один приклад – хемокінез нейтрофілів як відображення реакції крові на специфічні алергени, окремі сторінки відведені нейтрофілу. У працях О.М. Маянського (1983, 1985 рр.) головна увага приділяється змінам нейтрофілів у відповідь на стимуляцію: метаболічній перебудові, випадковій та направленій міграції, процесам поглинання, секреторній дегрануляції, бактерицидним ефектам. Спеціально розбираються молекулярні основи рецепції та ультраструктурні перетворення фагоцитів в процесі ендоцитозу.

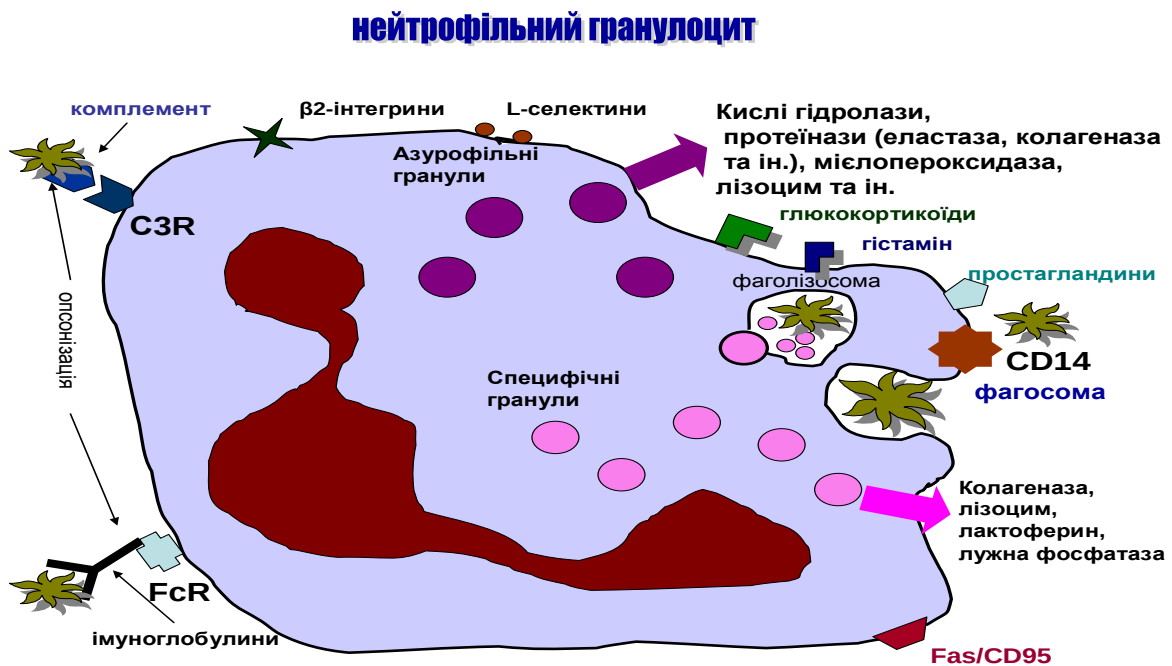


Рисунок 7.3.5. Нейтрофільний гранулоцит

Нейтрофіли володіють всіма функціями фагоцитарних клітин: адгезивністю, рухливістю, здатністю до хемотаксису, здатністю захоплювати бактерії та інші частки без участі специфічних рецепторів або за участю FcR, або – CR1, здатністю вбивати захоплені мікроорганізми за допомогою кисень-залежних та кисень-незалежних механізмів і

переварювати захоплені об'єкти фагоцитозу. Нейтрофіли містять 2 основних типи гранул (первинні і вторинні). В первинних гранулах містяться кислі гідролази (фукозидаза, нуклеотидаза, галактозидаза, манозидаза та ін.), нейтральні протеїнази (катепсин G, еластаза, колагеназа), а також катіонні білки, мієлопероксидаза, лізоцим і мукополісахариди. У вторинних гранулах немає кислих гідролаз, тут містяться лише активні за нейтральних і лужних значень рН агенти (лужна фосфатаза, лактоферин, лізоцим та білок, що зв'язує вітамін В₁₂. Крім того, нейтрофіли є активними продуцентами вільних радикалів, які забезпечують максимальний пошкоджуючий вплив. Тактика нейтрофілу полягає у першочерговому вивільненні у навколишню рідину вільних радикалів та вмісту вторинних гранул, ферменти яких активні саме на початкових етапах запалення, доки в осередку не розвинувся виражений ацидоз. Пізніше нейтрофіл вивільняє первинні гранули, кислі гідролази яких активно функціонують при низьких значеннях рН.

Ферменти і чинники бактерицидності, що містяться в специфічних гранулах і лізосомах нейтрофіла окрім знищення патогенів можуть викликати пошкодження власних клітин і тканин організму. З цим пов'язана патогенетична роль нейтрофілів у імунокомплексній патології, при якій імунні комплекси активують систему комплементу з утворенням біологічно активних пептидів, зокрема С5а-хемоатрактанту для нейтрофілів. Інфільтрація вогнища імунного запалення нейтрофілами веде до пошкодження тканин їх ферментами.

У зрілому стимульованому нейтрофілі спостерігається перебудова метаболізму, його міграція до антигену, адгезії, поглинання, утворення травних вакуолей, секреторна дегрануляція. Один і той самий антиген здатний індукувати усі чи більшість реакцій нейтрофіла. Різні форми реактивності його забезпечуються різними механізмами дії, та можуть проявлятися незалежно одна від одної.

На поверхневій мембрані нейтрофілів експресуються різні антигени і рецепторні структури. Дані клітини експресують антигени I та II класів ГКГ, більшість поверхневих рецепторів: FcγRI, FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) –

низькоафінний рецептор для IgG, та FcγRIII (CD64) – ліганд для різних підкласів IgG. FcαR (CD89) – ліганд для IgA; IgE-зв'язуючий білок Mac-2/BP; рецептори для компонента комплементу – CD88 (ліганд C5a), CD35 (ліганди C3b та C4b). На поверхні нейтрофілів експресуються і багато адгезивних молекул, серед яких в першу чергу слід відзначити CD11 та CD11b – ліганди для ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102) та ін. В реалізації багатьох функцій нейтрофілів, зокрема фагоцитозу та адгезії до ендотеліальних клітин, активну участь приймає і комплекс CD11b/CD18, який має здатність зв'язуватись з багатьма лігандами. Нейтрофіли також експресують CD49f (ліганди – ламініни, інвазіни та ін.), CD147 та ін.

Крім перерахованих речовин нейтрофіли експресують: рецептори для гістаміну (H1, H2, H3, H4), р-адренергічні, до глюкокортикоїдів GRα та GRβ, різних хемотоксичних факторів, простагландинів, цитохрому В, лейкотрієну LTB-4 та ін. Значний інтерес представляє експресія CD69, який експресується нейтрофілами після їх стимуляції різними молекулами, включаючи цитокіни.

Нейтрофільні гранулоцити є джерелом різних біологічно активних речовин, т. я. поряд з різноманітним складом гранул вони продукують різні цитокіни. Комплекс біологічно активних сполучень нейтрофілів забезпечує їм і багато регуляторних впливів. До таких цитокінів відносять: ІЛ-1α, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-9, ІЛ-10, ІЛ-12, G-CSF, GM-CSF, TNF-α, фактор росту гепатоцитів (HGF), фактор активації тромбоцитів (PAF), фактор росту ендотелію судин (VEGF), MIP-1 α MIP-1 α та гістамін.

Регуляторний вплив, пов'язаний з дією різних цитокінів, здійснюється локально, оскільки загальний рівень цитокінів, що продукуються нейтрофілами, в периферичній крові невеликий. Біологічні властивості цитокінів, що виділяються нейтрофілами, дозволяють їм регулярно впливати на різні типи клітин, включаючи Т- і В-лімфоцити, моноцити, макрофаги та ін.

Одне з центральних місць в регуляторних ефектах нейтрофілів належить GM-CSF і G-CSF, адже вони впливають на продукцію цитокінів

іншими клітинами: G-CSF індукує синтез IL-10 в нейтрофілах. Не менш суттєва і регуляція з участю TNF α .

Отримані докази впливу нейтрофілів і на функції В-лімфоцитів. Після стимуляції TNF- α вони починають експресувати новий білок BlyS, який відноситься до суперродини TNF α ; його розчинна форма виявляється в сироватці крові хворих після введення G-CSF, що свідчить про важливу роль цього білку в підтриманні гомеостазу В-лімфоцитів.

Регуляторний вплив нейтрофілів проявляється і у відношенні опасистих клітин. Існують дані, згідно яких лактоферин інгібує IgE-залежну активацію опасистих клітин людини та модулює активність протеаз. Більш детальне вивчення цього факту з використанням опасистих клітин шкіри, легень та мигдаликів дозволило встановити, що лактоферин опосередковано інгібує активність триптази; його дія на гепарин лишає останньої здатності стабілізувати триптазу.

Таким чином біологічні властивості нейтрофілів дають їм можливість активно впливати на різні клітинні популяції.

Еозинофіли

На еозинофільні лейкоцити крові здорової людини припадає 2-5 %. Вони здатні фагоцитувати та знищувати поглинені мікробні клітини.

Еозинофіли крові людини зазвичай мають дводольчате ядро і багато цитоплазматичних гранул, які фарбуються кислими барвниками (еозином) (рис.7.3.5).

Еозинофільні гранулоцити містять гранули, де перебуває низка біологічно активних речовин, здатних до фагоцитозу і хемотаксису. Агенти, що містяться в еозинофілах, виконують різні функції, в тому числі – протиалергійну, сприяючи розщепленню біологічно активних речовин, які виділяються у ранній фазі atopічних реакцій. Так, гістаміназа здійснює інактивацію гістаміну, арилсульфатаза В розщеплює лейкотрієни, а фосфоліпаза D – тромбоцит- активуючий фактор.

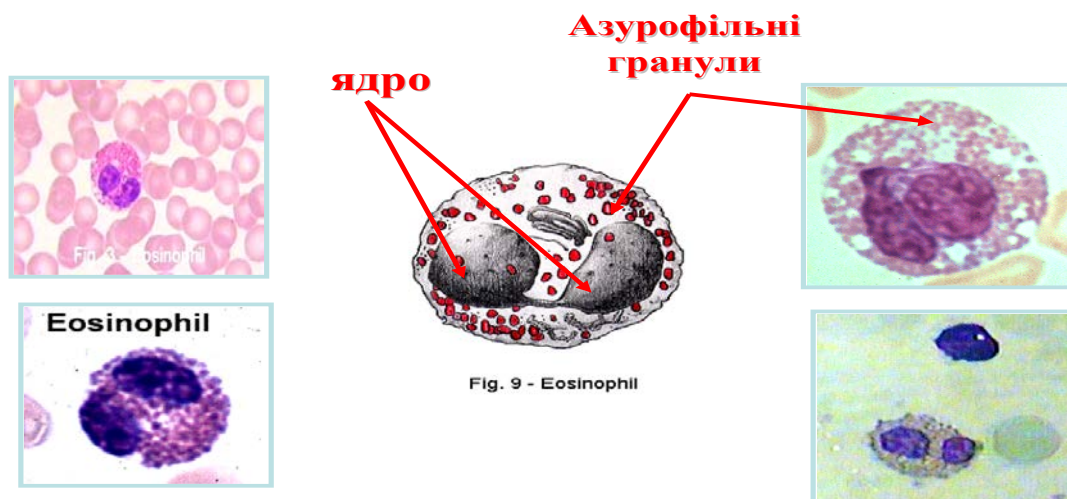


Рисунок 7.3.6. Еозинофіли

Особливістю еозинофілів є експресія на їх мембранах Fcε-рецепторів, специфічних для імуноглобулінів E. У зв'язку з цим їх ефекторна функція виявляється в основному в протипаразитарній імунній відповіді, при якій утворюються специфічні антитіла, що відносяться до класу імуноглобулінів E. Оскільки продукція останніх характерна також для алергічних реакцій негайного (анафілактичного) типу, в місцях прояву таких реакцій відбувається скупчення еозинофілів.

Певні стимули викликають дегрануляцію еозинофілів, тобто – зливання гранул з цитоплазматичною мембраною і вивільнення їх внутрішнього вмісту в позаклітинне середовище. Реакція дегрануляції – це один з механізмів використання еозинофілами токсичного вмісту своїх гранул для знищення крупних мішеней, що не піддаються фагоцитозу. Інший механізм складається з утворення токсичних реакційноздатних метаболітів кисню. Ці механізми складають основу протигельмінтного імунітету, в якому еозинофілам належить особлива роль. Приваблення еозинофілів до місця інвазії паразитів відбувається за рахунок вивільнення Т-лімфоцитами, опасистими клітинами і базофілами особливих продуктів, таких як анафілактичний фактор хемотаксиса еозинофілів. Вони зв'язуються з поверхнею мішеней, опсонізованою специфічними антитілами ізоотопу IgG

або IgE, і в процесі дегрануляції виділяють токсин – головний основний білок. Цей токсин знаходиться у серцевині еозинофільної гранули; матрикс гранули вміщує іншу токсичну речовину – катіонний білок еозинофілів. Еозинофіли виділяють також гістаміназу та арилсульфатазу, які інактивують продукти виділення опасистих клітин – гістамін та фактор анафілаксії, що викликає алергічну реакцію сповільненого типу. Таким чином, речовини, що виділяються еозинофілами пригнічують запальну реакцію і міграцію гранулоцитів у вогнище запалення.

Базофіли

Базофіли присутні у крові у невеликій кількості, менш 0,2 % загальної кількості лейкоцитів. Аналогами базофілів є опасисті (тучні) клітини, але вони не зустрічаються в циркуляції і мають ряд відмінностей. Відомо два види опасистих клітин – опасисті клітини слизових оболонок та опасисті клітини сполучної тканини (рис.7.3.7).

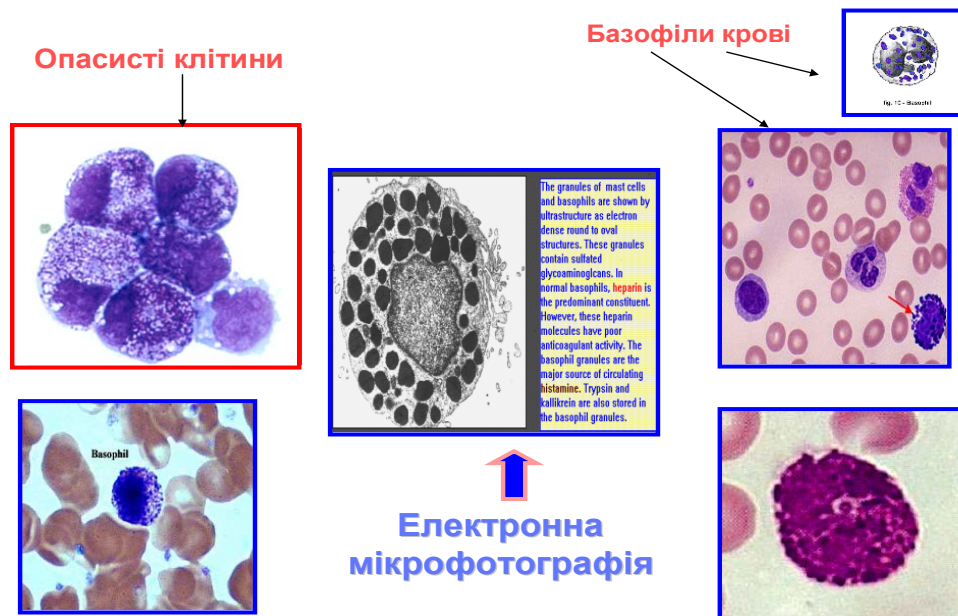


Рисунок 7.3.7. Базофіли

На мембранах базофілів експресовані високоафінні FcR рецептори для імуноглобуліну E, на яких зв'язуються циркулюючі антитіла, що відносяться до класу імуноглобуліну E.

Подальша взаємодія специфічного антигену з такими фіксованими на базофілах антитілами викликає дегрануляцію клітин. Гранули базофілів, як і опасистих клітин, містять біогенні аміни (гістамін), гепарин, деякі ферменти (трипази, хімази, карбоксипептидаза A) та хемотаксичні фактори, які викликають реакції гіперчутливості негайного (анафілактичного) типу. Таким чином, базофіли та еозинофіли крові належать до клітин-ефекторів імуноглобулін E-опосередкованих алергічних реакцій. На відміну від інших Fc-рецепторів FcRI з високою афінністю зв'язують вільні IgE на опасистих клітинах і базофілах. Але активує клітини не мономірна форма IgE-антитіл, а тільки їх агрегати, що утворилися в результаті «зшивання» при взаємодії з полівалентним антигеном. Сигнал активації від цих рецепторів примушує опасисті клітини і базофіли секретувати вміст гранул і запускати місцеву запальну відповідь. Миттєво відбувається дегрануляція цих клітин з викидом гістаміну і серотоніну, які викликають місцеве посилення кровотоку і підвищення проникності судин з швидким накопиченням рідини в навколишніх тканинах і притокою гранулоцитів з кров'яного русла. Така швидка запальна відповідь може бути захисною, оскільки сприяє швидкій мобілізації фагоцитів і антитіл в осередок інфекції. Проте відомо, що аналогічні реакції лежать в основі патогенезу алергії анафілактичного типу. Гістамін і серотонін – короткоживучі молекули, їх дія короточасна. Але місцеве запалення далі підтримується подальшою продукцією тими ж клітинами інших молекул, зокрема лейкотрієнів – вазоактивних метаболітів арахідонової кислоти. На сигнал активації базофіли відповідають синтезом і секрецією SRS-A (LTC_4 , LTD_4 , LTE_4) PGD_2 , а також $TNF\alpha$, які вносять істотний внесок в підтримку місцевої запальної реакції.

Гранулоцитопенія може служити проявом різних генетичних дефектів. Назва «Генетична хронічна нейтропенія» об'єднує групу

генетично детермінованих станів зрілих нейтрофілів, що характеризуються низьким рівнем продукції. У таких пацієнтів частіше виникають інфекції шкірних покривів або респіраторного тракту, викликані *Staph. aureus*, або надмірне розмноження і дисемінація представників нормальної мікрофлори кишечника. Частота і тяжкість таких інфекцій корелює з рівнем нейтропенії. Саме під час епізодів нейтропенії виявляються інфекції шкіри і слизової порожнини рота. При більш рідких генетичних порушеннях нейтрофіли можуть повністю бути відсутніми: інфантильний генетичний агранулоцитоз (синдром Kostmann'a) і синдром Scywachman'a, при якому нейтропенія асоційована з недостатністю підшлункової залози.

Гранулоцити перебувають в крові не довгий час: середній напівперіод життя 6-7 днів, а після виходу в тканини – не більше двох днів. У зв'язку з цим будь-яке порушення продукції гранулоцитів в кістковому мозку веде до зниження їх рівня в крові. Надбана нейтропенія може мати різні причини. Лікарську нейтропенію можуть індукувати багато фармакологічних агентів. Важку нейтропенію аж до агранулоцитозу може викликати застосування таких поширених лікувальних препаратів, як сульфаніламід, пеніцилін, цефалоспорини, фенотіазини, антитиреоїдні препарати, хлорамфенікол. Препарати, вживані для протипухлинної хіміотерапії, володіють антимітотичною дією, антибіотик хлорамфенікол викликає мієлосупресію. Інші лікарські препарати (наприклад, сульфаніламід) комплексуються з глікопротеїнами мембрани гранулоцитів і індукують синтез аутоантитіл, які активують систему комплементу на мембранах гранулоцитів, що веде до їх лізису.

Іноді у вагітних жінок виробляються антитіла проти ізоантигенів гранулоцитів плоду, які можуть викликати зниження тривалості життя нейтрофілів новонародженого – ізоімунна неонатальна нейтропенія.

З іншого боку, посилене споживання препаратів при важких і тривалих бактерійних або грибкових інфекціях може призвести до гранулоцитопенії, якщо продукція гранулоцитів в кістковому мозку з якихось причин пригнічена. Таке явище спостерігається, наприклад, при крупозній пневмонії

у алкоголіків або осіб з дефіцитом живлення. Нижнім лімітом вважається зміст 1800–2000 гранулоцитів в мкл крові. При зниженні кількості циркулюючих гранулоцитів до 1500 кл/мкл виявляється порушення перебігу місцевої гострої запальної відповіді. При падінні рівня гранулоцитів в крові нижче 500 клітин/мкл прогресивно наростає частота інфекцій. При рівні 100 гранулоцитів/мкл всі хворі мають інфекційні ускладнення.

Причинами розвитку нейтропенії можуть служити самі інфекції, в першу чергу вірусні (HIV, HBV, EBV), а також викликані мікобактеріями, грибами. Транзиторна нейтропенія розвивається за ендотоксемією. На фоні нейтропенії частіше за інших розвиваються інфекції, викликані бактеріями, що колонізують шкіру, слизисті, носоглотку, шлунково-кишковий тракт: *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* та іншими гнійними бактеріями.

Описані численні генетичні дефекти окремих функцій гранулоцитів. Дефект актинових ниток в цитоплазмі нейтрофілів призводить до зниження їх рухливості і порушення хемотаксису – синдром ледачих лейкоцитів. Нездатність синтезувати і експресувати адгезійні молекули (CD18) слугує причиною порушення мобілізації клітин з кров'яного русла в осередок інфекції. Хронічна гранулематозна хвороба є наслідком дефектів продукції різних компонентів NADPH-оксидази. У більшості хворих виявлена дефектна субодиниця цитохрому b₅₅₈. При цьому порушена продукція антимікробних окислюючих кисневих радикалів при фагоцитозі. Важкий імунодефіцит у таких хворих пов'язаний з нездатністю їх гранулоцитів вбивати захоплені бактерії у фаголізосомах через дефектність їх окислювального вибуху. Тому найбільшу небезпеку для таких хворих представляють інфекції, викликані мікроорганізмами, що продукують каталазу: *S.aureus*, *E.coli*, *S.marcescens*, *Aspergillus*, *Candida*. Дефект бактерицидності гранулоцитів може бути пов'язаний з недостатнім синтезом таких ферментів, як глюкозо-6-фосфат дегідрогеназа, мієлопероксидаза. Успадкований синдром Chediak-Higashi включає серед безлічі різних генетичних дефектів недостатність лізосомного апарату нейтрофілів.

Нейтрофіли містять гігантські лізосоми і відрізняються ослабленою здібністю до фагоцитозу та мікробіцидності, дегрануляції і хемотаксису. Захворювання виявляється різко підвищеною чутливістю до інфекцій, викликаних гнійними бактеріями. Порушення мікробіцидності нейтрофілів може бути також наслідком дефекту специфічних гранул. У дітей з таким генетичним дефектом часто виявляється місцевий ювенільний періодонтит. Рецидивуючі важкі інфекції порожнини рота ведуть до втрати зубів і альвеолярних відростків.

Таким чином, мононуклеарні фагоцити та гранулоцити – надзвичайно різноманітні за структурою, місцем синтезу та функціональною активністю, мають одну спільну рису – участь у боротьбі з антигенами різного походження на підставі розпізнавання, поглинання та перетравлення чужорідних агентів, а також регуляції та ініціації імунної відповіді, яка не може здійснитися без тісної взаємодії та взаємозв'язку цих клітин з лімфоцитами.

обмеженням (рестрикцією) по HLA. Також в МНС локалізовані гени, які контролюють синтез імунорегуляторних і ефektorних молекул - цитокінов ФНО- α , ФНО- β і деяких компонентів комплементу. Деяка невідповідність до основної функції самої назви даної генетичної системи пов'язана з відкриттям перших продуктів генів головного комплексу гістосумісності HLA (от Human leucocyte antigens), оскільки вперше молекули МНС ідентифікували по їх здатності викликати відторгнення трансплантанта, але на сьогодні ця здатність є лише однією із фізіологічних функцій МНС.

Високий поліморфізм молекул МНС, а також здатність кожної антигенпрезентуючої клітини (АПК) експресувати декілька різних молекул МНС забезпечують можливість презентації Т-клітинами множинності різноманітних антигенних пептидів. Слід зауважити, що, як правило, молекули МНС називають антигенами, але вони проявляють антигенність виключно у випадках, коли розпізнаються імунною системою індивіду не особистого, а генетично іншого організму, наприклад, при органній або тканинній алотрансплантаціях. Наявність в МНС генів, більшість з яких кодує імунологічно значимі поліпептиди, дає підставу для припущення, що даний комплекс еволюційно сформований саме для здійснення імунних форм захисту індивіду.

Тобто, згідно сучасному уявленню, система HLA забезпечує регуляцію імунної відповіді організму на рівні взаємодії всіх імунокомпетентних клітин шляхом розпізнавання своїх і чужорідних (в тому числі змінених своїх клітин), запуск і реалізацію імунної відповіді, що забезпечує виживання людини на рівні індивіду, і популяції в цілому в умовах дії негативних екзогенних і ендогенних чинників. Така чисельність наведених функцій безумовно пов'язана зі складною структурою головного комплексу гістосумісності. Фізіологічна функція алелей і

антигенів HLA, які вони кодують, визначається належністю до певного класу і, в значній мірі розрізняється.

Так, антигени класу I присутні на поверхні всіх ядровмісних клітин і тромбоцитів і необхідні для розпізнавання трансформованих клітин цитотоксичними Т-лімфоцитами. Але вони мають і іншу функцію, а саме забезпечення взаємодії між всіма іншими ядровмісними клітинами (навіть на рівні взаємодії нейрон–синапс), що, зокрема, забезпечує цілісне функціонування імунного гомеостазу і організму як біологічної системи в цілому. Встановлено, що за структурою β 2-мікроглобулін і домен альфа3 молекул МНС класу I є гомологічними окремим доменам імуноглобулінів. Враховуючи той факт, що обидва типи молекул приймають участь в імунних функціях, деякі дослідники висловлюють думку про загальне еволюційне походження цих молекул.

Основними локусами II класу HLA є DR, DQ, DP, а також DM, LMP і TAP, які були відкриті порівняно нещодавно. Антигени класу II присутні на поверхні B-лімфоцитів, активованих T-лімфоцитів, моноцитів, макрофагів і дендритних клітин. Важливішою імунологічною функцією антигенів МНС (HLA) класу II є забезпечення взаємодії між T-лімфоцитами і макрофагами в процесі імунної відповіді. T-хелпери розпізнають чужорідний антиген лише після його переробки макрофагами, поєднання з антигенами HLA другого класу і презентації цього комплексу на поверхні макрофага. Три останніх локуси забезпечують такі важливі функції, як процесінг і експресія антигенів HLA на поверхні клітин. Низькомолекулярні білки, які контролюються цими генами, приймають участь в підготовці чужорідного антигена до презентації T-клітинами. Велике значення для формування сучасного уявлення відносно фізіологічної ролі і реалізації імунологічної функції антигенів HLA мало відкриття "нових" генів HLA DM, LMP (large multifunctional protease) і TAP. Імунологічна функція цих генетичних структур представлена на рис. 1.

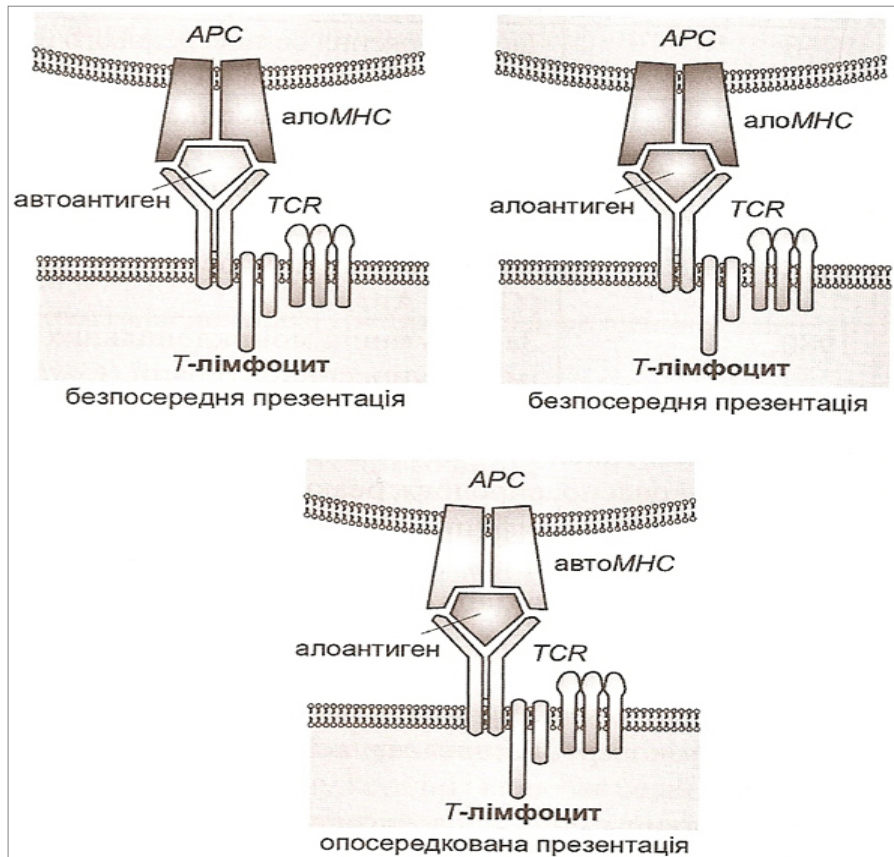


Рис. 1. - Розпізнавання комплексу антигенного пептиду з молекулами MHC I і II класів рецептором і корецептором Т-лімфоцита.

Тобто, першими в систему процесингу антигенів системи HLA підключаються продукти локуса LMP (гени LMP, LMP7), що активовані γ -інтерфероном і інкорпоровані в протеосоми. Ген LMP, також відомий як RING (really interesting new genes) 12, а LMP₇ — як RING 10. Ген LMP₂; знаходиться в нерівноважному зчепленні з геном TAP1. Вперше дані гени були описані Glynn, і Kelly і картовані в регіоні хромосоми 6, який знаходиться між TAP-генами. Чотири HLA гени (LMP₂, LMP₇ і RING4, RING11) складають кластер генів, який відповідає за індукцію інтерферонів. Саме з цим і пов'язаний механізм дії генів LMP₂ і LMP₇ в аспекті активації протеосом. Можливим механізмом дії продуктів генів LMP₂ і LMP₇ також може бути заміна ними двох протеосомних субодиниць Y і X під впливом індукції γ -інтерферона.

Молекули MHC класу I синтезуються в цитозолі клітини, де в період до появи відповідного пептиду знаходяться в зв'язку з тирозин-

калретикуліновим комплексом. Після зв'язування з пептидом відбувається вивільнення і транспорт молекул HLA на поверхню клітин за участю "пептидних насосів" TAP, що кодуються MHC (від транспортерів, асоційованих з антигенним процесингом). Ці гени відомі також під назвою RING4 і PSF (peptide supply factor). Саме ця назва відображає їх функцію - регуляцію розміру і специфічності пептидів шляхом приведення їх до "відповідності" зі зв'язуючими сайтами молекул MHC класу I. Зазначені гени аналогічні Nam1 і Nam2, які були раніше відкриті у мишей.

У 1993 р. дослідниками було показано, що гетеродимери TAP1 і TAP2 приймають участь в кінцевій сборці молекул антигенів класу I і презентації ними ендогенних пептидів. Молекули, які кодовані геном TAP2, знаходяться в нерівноважному зчепленні з антигенами HLA-DR і поміж генами TAP1 і TAP2 існує висока частота рекомбінацій. Встановлено, що деякі мутації в районі генів HLA-TAP призводять до втрати презентуючої функції антигенів гістосумісності класу I. Можливо, що з порушенням антигенпрезентуючої функції TAP може бути пов'язано з високим рівнем асоціації між алелями гену TAP1 і генетичною схильністю до розвитку такого аутоімунного захворювання, як інсулінзалежний цукровий діабет. Відомі також дані відносно одного з алелей TAP1-локуса, а саме R659Q, для якого є характерним дефект транскрипції РНК, який виявляється на клітинах дрібноклітинного раку легенів. Було також встановлено, що при синдромі Луї-Бара, (наявність "оголених Т-лімфоцитів"), порушення експресії антигенів HLA класу I пов'язане саме з гомозиготністю алелей гена TAP2.

На відміну від молекули класу I обидва ланцюги молекули MHC класу II синтезуються в ендоплазматичному ретикулумі, звідки після їх тимчасового з'єднання з третім інваріантним ланцюгом вони транспортуються до ендочитарного компартменту, де або зустрічаються і потім зв'язуються з пептидом, або ж деградують в лізосомах. Після зв'язування з пептидом, який заміняє інваріантний ланцюг, молекули MHC класу II переміщуються на клітинну мембрану. Витискання пептидом інваріантного ланцюга молекул HLA класу II забезпечують білки, які також

кодуються системою HLA і мають назву HLA-DM. Ці білки каталізують заміну "тимчасового" пептиду інваріантного ланцюга на специфічний пептид.

В систему DM входять 2 гени — DMA і DMB. Аналіз сиквенсу алельних варіантів генів DMA і DMB дозволив зробити висновки, що еволюційно вони є більш давніми, ніж класичні молекули генів HLA класу II. На основі мутаційного аналізу Р. Morris зі співавторами картували гени DMA і DMB між локусами DP і DQ.

Отже, роль антигенів HLA-DM є вирішальною в презентації екзогенних пептидів молекулами класу II. Механізм їх дії - видалення тимчасово зв'язуючої пептид молекули CLIP і вивільнення зв'язуючого сайту молекули HLA класу II для його заміщення пептидом, який походить з екзогенного білка. Дефект функції HLA-DM призводить до порушення заміни молекули CLIP на пептид, і відміні антигенпрезентуючої функції молекул класу II. Враховуючи цей факт, можна припустити, що саме з порушенням функцій цих молекул пов'язані окремі форми імунодефіцитних станів людини, в основі яких лежить неможливість експресії HLA на імунокомпетентних клітинах.

Незважаючи на те, що дані відносно "нових" систем HLA LMP, TAP і DM знаходяться в перспективному розвитку, вже зараз зрозуміло, що вони виконують важливу роль для імунної відповіді, що полягає в забезпеченні фізіологічної презентації процесованих пептидів для подальшого розвитку імунної відповіді.

Таким чином, на сьогодні описані основні імунологічні властивості алелей і антигенів I і II класів системи HLA, що кодуються ними.

Імунологічні властивості MHC пов'язані зі:

- ❖ стимуляцією утворення антитіл,
- ❖ стимуляцією реакції у змішаній культурі лімфоцитів,
- ❖ реакцією «трансплантат проти господаря»,
- ❖ клітинною реакцією лімфолізу,

- ❖ генами імунної відповіді,
- ❖ рестрикцією імунної відповіді.

HLA клас III вміщує в себе гени, які кодують фактори комплементу, фактор некрозу пухлин і деякі інші. Гени MHC класу III, розміщені в межах групи генів MHC, або тісно зчеплені з нею, контролюють деякі компоненти комплементу: C4 і C2, а також, фактор В, який знаходиться скоріш у плазмі крові ніж на поверхні клітин. На відміну від молекул MHC класу I і класу II приймають лише опосередковану участь в імунній відповіді. За механізмом забезпечення розвитку імунного реагування на будь-який агент, роль антигенів системи HLA є найважливішою, тому що саме молекули антигенів HLA забезпечують презентацію імунодомінантних пептидів, які є продуктом внутрішньоклітинного протеолізу чужерідних антигенів, саме проти яких і буде індукована, а потім і розвинута імунна відповідь. Ця функція антигенів системи HLA обумовлена структурою молекул, яка, незважаючи на певні поміжкласові відмінності в структурі, дозволяє створювати на зовнішньому кінці, так звану, пептидзв'язуючу боріздку, яка і утримує презентований для розпізнавання пептид.

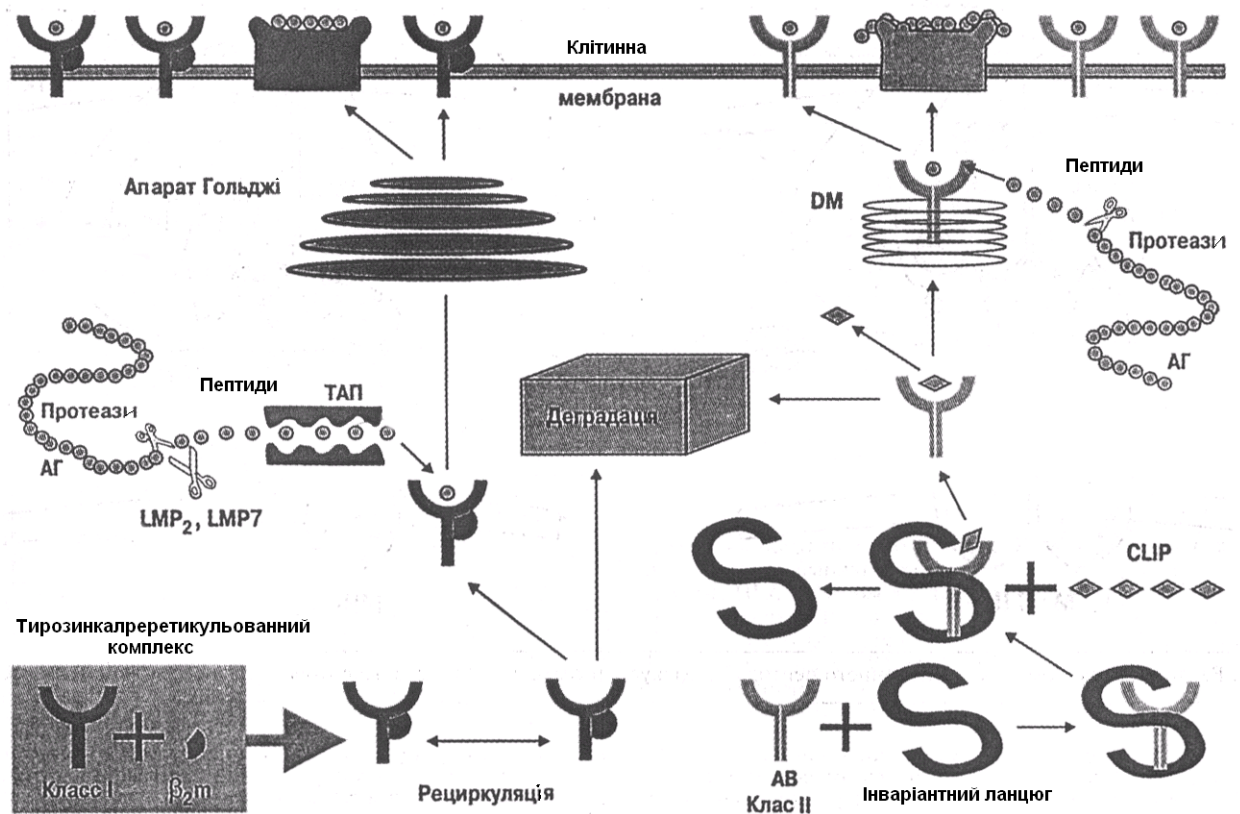


Рис. 2. - Схема пептидів антигенів HLA класу I (праворуч) і класу II (ліворуч).

Загальним принципом для антигенів класів I і II є: антигенпрезентуюча клітина здійснює специфічну взаємодію, представляючи пептид в контексті особистої HLA-молекули, ідентичної молекулі на клітині, яка приймає інформацію. Цей феномен названо феноменом подвійного розпізнавання і саме за це відкриття Цинкернагель і Догерті отримали Нобелівську премію. Дійсно, описаний феномен є ключовим в розумінні підґрунтя фізіологічної регуляції імунного гомеостазу. В той же час на рис. 2 представлені і суттєві розбіжності між взаємодією, яка забезпечується в процесі імунної відповіді антигенами HLA класів I і II. Антигени HLA класу II, як було наголошено вище, забезпечують взаємодію антигенпрезентуючої клітини з Т-хелпером, а антигени HLA класу I — з Т-ефектором/кілером. Допомагають їм у цьому різноманітні молекули корецептори — CD4 для Т-хелперів і CD8 для

Т-кіллерів. Ефект такої взаємодії є різним: розпізнавання пептидів на рівні молекули HLA класу II призводить до формування популяції Th1 і Th2-клітин. Одні з них є індукторами розвитку гуморальної імунної відповіді, а інші – виконують функцію необхідного для індукції Т-кіллерів компоненту.

Відносно антигенів гістосумісності першого класу, Т-кіллер, індукований проти імунодомінантного пептиду, експресованого на поверхні клітин-мішеней, які є ідентичними такому ж пептиду на Т-кілері, знищить ці клітини. Важливо підкреслити, що обидва ланцюга фізіологічної, "нормальної", імунної відповіді рестриктовані HLA-фенотипом кожного індивіду. Якщо пептид був би презентований для розпізнавання клітиною, яка відрізняється за антигенами HLA від розпізнаючих клітин, то імунна відповідь була б направлена проти саме цих клітин. В таких випадках ми торкаємось питань трансплантаційного імунітету.

Система HLA здійснює регулювання на всіх основних етапах імунної відповіді: початковому; продуктивному; а також забезпечує, так званий, "термінальний" етап регуляції - апоптоз різних типів антигенпрезентуючих клітин. Доцільно відмітити, що даний ефект притаманний як антигенпрезентуючим клітинам, тобто макрофагам, CD34⁺-клітинам, які диференційовані з моноцитів в культурі клітин, дендритним клітинам, так і В-лімфоцитам. Так, в останні роки було визначено, що блокуючий вплив моноклонального антитіла L243 на молекули HLA-DR, експресовані на різних типах антигенпрезентуючих клітин, блокує їх апоптоз, який визначають за допомогою FITC-міченого анексину V. У всіх випадках після блокування молекул DR відмічено значне зниження апоптозу. Сам ефект HLA-DR-опосередкованого апоптозу дендритних клітин не змінювався навіть при використанні високої концентрації таких інгібіторів, як z-VAD-fmk і z-DEVD-fmk. Вважається, що регуляція апоптозу антигенпрезентуючих клітин, які є на стадії диференціювання, здійснюється крізь молекули HLA-DR і саме це може бути вирішальним механізмом для обмеження їх HLA-DR життя. Важливо відмітити, що роль антигенів не обмежується регуляцією

апоптозу „професійних” антигенпрезентуючих клітин, вони також приймають безпосередню участь в апоптозі В-лімфоцитів.

Світові набутки в галузі імуногенетичних досліджень показали, що гени HLA-DR і молекули, що ними кодуються відповідальні за "сигнал трансдукції", а саме, за генерацію вторинних сигналів. Дослідниками було показано, що виявлені ними HLA-DR-опосередковані сигнали призводять до активації тирозинкінази і внутрішньоклітинному вивільненню кальцію, а також до продукції діацилгліцеролу і активації сімейства серин/треонінкінази і протеїнкінази С (ПКС). Взаємозв'язок між ПКС- і HLA-DR-залежними сигналами є комплексними, оскільки HLA-DR-сигнали призводять до активації ензимів. В наслідок цієї активації зростає експресія HLA-DR на клітинних мембранах, що вважається одним з механізмів апоптозу. Тобто, для В-лімфоцитів, мабуть, окрім непрямого механізму взаємодії Fas/Fas-лигандів, може існувати і прямий механізм HLA-DR-опосередкованого апоптозу, коли не включені ці рецептори. Така пряма взаємодія може мати значення для злоякісних перетворень перероджених В-лімфоцитів, які втратили здатність до експресії Fas.

Всі ці дані, в цілому, свідчать на користь ключової фізіологічної ролі молекул HLA-DR в регуляції апоптозу всіх типів антигенпрезентуючих клітин, що по суті є регуляцією одного з найважливіших етапів імунної відповіді. Ці дані також свідчать на користь того, що сучасний рівень знань про імуно-фізіологічну роль генів HLA-DR дає підставу вважати їх генами імунної відповіді у людини.

Генам головного комплексу гістосумісності належить також цілий ряд інших фізіологічних функцій, зокрема - функції генетичного контролю якості імунної відповіді на рівні специфічності імунокомпетентних клітин – мова йде про асоційовані з системою HLA контролю активності різних субпопуляцій імунокомпетентних клітин, що в свою чергу, суттєвим чином пов'язано з кінцевим рівнем імунної відповіді. Слід пам'ятати, що дана функція є вторинною і залежить від здатності людини генетично відповідати на даний антигенний агент.

Передумовою розвитку даного напрямку було припущення W. Bodmer і J. Boomer ще в 1978 р про те, що на формування HLA-профілю європеїдної популяції в певній мірі вплинули епідемії, що мали місце в середині сторіччя, таких захворювань як чума, віспа, холера та інші. В результаті цього, серед осіб, які вижили, опинились особини з певними HLA-генотипами, в першу чергу з генотипом HLA-A1, -B8, -DR3. Даний генотип, як припускав W. Bodmer, забезпечує більш високу резистентність до інфекційних захворювань і на сьогодні є генетичним маркером європеїдної популяції. Надалі це припущення було підтверджене на прикладі недавніх епідемій черевного тифу в Сурінамі, коли серед осіб європеїдної раси, які вижили, значний відсоток склали особи саме з таким генотипом. Разом з тим W. Bodmer припустив, що реалізація такого ефекту може бути пов'язана тільки в умовах асоціації між конкретними HLA-специфічностями і HLA-гаплотипами в реалізації імунної відповіді. Враховуючи той факт, що з одними і тими ж гаплотипами HLA асоційована толерантність до різних інфекційних агентів, логічно було б припустити, що подібного роду асоціації з HLA можуть бути пов'язані не тільки з самою генетично обумовленою відповідністю до конкретного інфекційного агента, але і з тими ланцюгами імунної відповіді, які приймають участь в її реалізації, тобто в кінцевому результаті. Саме це і мається на увазі сьогодні імуногенетиками під терміном - якість імунної відповіді, і саме цей аспект склав основу нового напрямку фізіологічної функції HLA. В даному напрямку вітчизняні дослідники мають певний пріоритет.

В наш час достатньо добре вивчені позитивні і негативні асоціативні зв'язки між ізольованими HLA-специфічностями і HLA-гаплотипами з певними показниками імунного гомеостазу, наприклад, з кількістю і функціональною активністю клітин CD4⁺, CD8⁺, ЕКК, фагоцитуючою функцією нейтрофілів і інше. В останні роки у працях Хаїтова показники імунного статусу асоційовані з HLA можуть розрізнятись в залежності від приналежності до певної етнічної групи.

Доцільно відмітити роль HLA молекул в якості поверхневих клітинних маркерів, які розпізнаються цитотоксичними Т-лімфоцитами і Т-хелперами в комплексі з антигеном. Молекули, кодовані комплексом Tla, залучені в процеси диференціювання}, особливо у ембріона, а, можливо, і в плаценті. МНС приймає участь в найрізноманітніших неімунних процесах, в тому числі і в тих, які опосередковані гормонами (наприклад, регуляція маси тіла у мишей або яйцenessкості кур). Молекули МНС класу I можуть входити до складу гормональних рецепторів. Так, зв'язування інсуліну знижується, якщо з поверхні клітин видалити антигени МНС класу I, але не класу II. Крім того, описані випадки асоціації продуктів МНС з рецепторами глюкагону, епідермального фактору росту, гама-ендорфіну.

Сучасний молекулярно-генетичний рівень досліджень HLA дозволив по-новому подивитись на фізіологічну функцію системи HLA. Можливість аналізувати амінокислотні послідовності всіх алельних варіантів антигенів HLA, навіть фрагменти, які визначають їх специфічність, а також структуру пептидів, які визначають специфічність різних чужерідних агентів, в тому числі і хвороботворні, дозволяє передбачити відповідність тих чи інших імунодомінантних пептидів відповідним ділянкам молекули МНС. Таким чином, можливо передбачити генетичну відповідь або її відсутність на конкретний агент. В свою чергу, це дає можливість не тільки передбачити, чи відповідь даний індивид на вакцинацію проти певного хвороботворного агенту, але і передбачити, наскільки ця відповідь буде фізіологічною. Тобто, даний підхід дозволить прогнозувати можливість розвитку цілого ряду захворювань аутоімунного генезу, наприклад, ревматоїдного артрити, або інсулінзалежного цукрового діабету, в генезі яких, можливо, також лежить комплементарність імунодомінантних пептидів інфекційних агентів конкретним епітопам алелей HLA.

Таким чином, завдяки високому поліморфізму системи HLA, стала можливою взаємна комплементарність імунодомінантних сайтів молекул багаточисельних інфекційних збудників і конкретних антигенів

гістосумісності. Саме це стало ефективним засобом захисту і збереження людини як виду в умовах мінливого мікробного оточуючого середовища.

Питання для самоконтролю

1. Охарактеризуйте основну фізіологічну функцію ГКГС.
2. На яких етапах система HLA здійснює регулювання імунної відповіді?
3. Чи можливо передбачити генетичну відповідь або її відсутність на конкретний агент на основі HLA генотипування індивіду?
4. Гени якого класу і молекули, що ними кодуються HLA відповідальні за "сигнал трансдукції"?
5. Охарактеризуйте основні імунологічні властивості алелей і антигенів I і II класів системи HLA, що ними кодуються.
6. Що таке феномен подвійного розпізнавання?
7. Назвіть основні локуси II класу HLA.
8. Назвіть основні локуси I класу HLA

ЛІТЕРАТУРА

13. М. Якобисяк. Імунологія/Переклад з польської за ред. проф. В.В. Чоп'як. – Вінниця: НОВА КНИГА, 2004. – 672 с.
14. А.А. Воробьева, А.С. Быкова, А.В. Караулова. Иммунология и аллергология – Москва: Практическая медицина, 2006. – 288с.: ил.
15. Г.Н. Дранник. Клиническая иммунология и аллергология. – М.: ООО «Полиграф плюс», 2006. – 482 с.: ил.
16. Garrido F. HLA and cancer// Tissue Antigens. - 1996. - Vol. 47. - P. 361-363.
17. Garrido F, Cabrera T, Concha A, Glew S, Ruiz - Cabello F, Stern P. Natural history of HLA expression during tumour development// Immunol. Today.- 1993.- Vol № 14 -10.-P. 491-499.
18. Хаитов Р.М., Алексеев Л.П. Физиологическая роль главного комплекса гистосовместимости человека // Иммунология. – 2001, №3. – с. 4-12.

19.Зарецкая Ю.М., Хамагонова Е.Г., Губарев М.И. Иммунология и *иммуногенетика* человека, Триада, Москва, 2002. 128 с.

9.8 Імунодефіцити

Зазвичай прийнято поділяти імунодефіцити на дві групи:

- первинні імунодефіцити, причиною яких є генетично зумовлені дефекти імунних механізмів;
- вторинні імунодефіцити, коли порушення опірності з'являються процесі під час перебігу існуючого патологічного процесу.

Домінуючим проявом імунодефіцитів є рецидивуючі інфекції, лікуванню досить стійкі до лікування. Якщо дефект охоплює продукцію антитіл, мають місце хронічні бактеріальні інфекції. Дефіцити клітинного імунітету часто призводять до заражень опортуністичними мікроорганізмами, до яких відносять деякі віруси (цитомегаловірус), найпростіші (*Pneumocystis carinii*) та гриби (*Candida*, *Cryptococcus*). Ці мікроорганізми знаходяться в наших клітинах або на слизових оболонках організму і в нормальному його стані, але здорова імунна система контролює їх проліферацію і не допускає проникнення в тканини та органи. Для хворих з глибоким клітинним імунодефіцитом загрозою для життя є також вакцини, які містять живі мікроорганізми, котрі, як правило, зберігають залишкову агресивність.

У людини відомі багаточисленні імунодефіцитні стани, які не обумовлені впливом факторів зовнішнього середовища, тобто належать до первинних імунодефіцитних станів. Дефіцит навіть одного з трьох факторів – системи комплементу антитіл або фагоцитарних клітин, на взаємодії яких базується захист проти інфекцій спричинених піогенними (гноєрідні) бактеріями, може викликати у людини схильність до інфекцій зазначеного типу. У випадку Т-клітинної недостатності спостерігається підвищена чутливість до зараження вірусами, грибами, паразитами та внутрішньоклітинними бактеріями, опірність до яких забезпечує клітинний імунітет. Нижче наведено різні форми таких первинних імунодефіцитних станів.

ПЕРВИННІ ІМУНОДЕФІЦИТИ

1. Імунодефіцити з переважанням порушень функції Т-лімфоцитів

1.1. *Синдром Ді Джорджі*

Хвороба виникає внаслідок неправильного розвитку структур, що походять з третьої та четвертої горлової кишеньки в процесі органогенезу. Ця вада є наслідком делеції фрагмента хромосоми 22. В літературі є дані щодо значення певних зовнішніх факторів, наприклад, вживання алкоголю матір'ю, внутрішньоутробних інфекцій. Діти народжуються з відсутністю тимуса, навколощитоподібних залоз, дефектами великих судин і серця та деформаціями лицевої частини черепа.

Імунодефіцит характеризується збільшеною схильністю до вірусних, грибкових інфекцій та заражень внутрішньоклітинними бактеріями. У кровотоці знаходять нечисленні Т-лімфоцити. Здатність синтезувати антитіла деколи зберігається, у тяжких випадках спостерігається картина гіпогаммаглобулінемії із пригніченням продукції специфічних антитіл. Функція натуральних цитотоксичних клітин (NK) залишається непорушеною. У більшості хворих розвиваються ектопічно розташовані фрагменти тканини тимуса і навколощитоподібних залоз. Внаслідок їх розростання в пізнішому віці спостерігається самовільна ремісія проявів дефіциту.

1.2. *Вибірковий дефіцит Т-лімфоцитів із зниженою активністю фосфорилази пуринових нуклеозидів*

Хвороба є наслідком дефіциту рецесивного гена для фосфорилази пуринових нуклеозидів (purine nucleoside phosphorylase - PNP), який знаходиться на 14 хромосомі. Цей фермент бере участь у шляху деградації пуринів, каталізуючи перетворення гуанозину в гуанін та інозину в гіпоксантин. Відсутність активності PNP викликає накопичення в лімфоцитах дезоксигуанозину, котрий підлягає фосфорилюванню до дезокси-GTP. Обидві сполуки безпосередньо токсичні для клітин і, блокуючи редуктазу рибонуклеотидів, гальмують синтез ДНК. Фізіологічно найбільша активність властива PNP в тимусі та селезінці, саме тому метаболічні наслідки відсутності ферменту переважно стосуються Т-лімфоцитів.

У крові знаходиться значно знижене число Т-лімфоцитів; за умов *in vitro* Т-лімфоцити не проліферують після стимуляції мітогенами і антигенами. На відміну від імунodefіциту, викликаного відсутністю аденозинової дезамінази, не спостерігається проявів значного погіршення гуморальної відповіді. Кількість В-лімфоцитів у крові найчастіше буває нормальною, як і концентрація імуноглобулінів усіх класів. Хворі мають в сироватці природні гемаглютиніни проти групових антигенів еритроцитів і можуть виробляти специфічні антитіла внаслідок щеплень і заражень. Клінічна картина дефіциту може бути різною, серед симптомів переважають рецидивуючі вірусні інфекції дихальної системи.

1.3. Інші імунodefіцити з переважанням дефекту відповіді клітинного типу

Синдром Незелофа – захворювання, якому відповідає вибіркова гіпоплазія тимуса. Даний імунodefіцит має симптоми, ідентичні з вищеописаним синдромом Ді Джорджі. Хворих характеризує відсутність ендокринних порушень і вроджених дефектів. Може бути порушена здатність до вироблення антитіл.

Транскобаламін II – це білок, який зв'язує і транспортує вітамін В12, що призводить до загальмування синтезу ДНК. У хворих без транскобаламіну II виявляють мегалобластичну анемію, гранулоцитопенію і лімфопенію, зниження рівня імуноглобулінів у крові. Домінуючим клінічним проявом є порушення всмоктування в травному тракті. У культурі Т-лімфоцити виявляють нормальну відповідь на мітогени.

Тяжкі імунodefіцити клітинного типу є показанням для пересадки кісткового мозку. Робляться спроби корекції дефіциту шляхом пересадки культивованого епітелію тимуса, введення гормонів тимуса або цитокінів. Ідентифікація генетичної основи дефіциту створює надію на ефективне лікування шляхом генної терапії.

2. Імунodefіцити з переважанням порушень продукування антитіл

2.1. Агаммаглобулінемія, щеплена з Х-хромосомою (агаммаглобулінемія Брутона).

Цей тип агаммаглобулінемії, описаний Брутоном у 1952 році, є першим вивченим первинним імунодефіцитом. Клінічні прояви хвороби проявляються після 6 місяця життя, коли з циркуляції зникають імуноглобуліни, передані дитині матір'ю. У клінічному стані домінують прояви тяжких рецидивуючих бактеріальних інфекцій дихальної системи. Хоча хворі виявляють стійкість до багатьох вірусних інфекцій, часто спостерігаються хвороби, викликані еховірусами і ентеровірусами, а також персистуючими в травному тракті найпростішими *Giardia lamblia*. Зараження мікоплазмою можуть призводити до тяжких артритів. У крові хворих часто знаходять зменшене число нейтрофілів, яке нормалізації приходить до норми після вилікування інфекцій. При агаммаглобулінемії, пов'язаній з Х-хромосомою, не спостерігається аномалій фенотипу та порушень функції Т-лімфоцитів. Тимус і тимусзалежні зони лімфовузлів мають нормальну будову. У периферичній крові, лімфовузлах та кістковому мозку не знаходять В-лімфоцити, що мають імуноглобулінові рецептори, і плазматичні клітини. Також у лімфовузлах не виникають центри розмноження. У кістковому мозку хворих виявляють нормальну або дещо знижену кількість незрілих пре-В-лімфоцитів. Ці клітини не мають поверхневих рецепторів, а їх цитоплазма містить неповні тяжкі ланцюги μ , позбавлені варіабельної частини. У периферичній крові хворих Т-лімфоцити становлять менш ніж 1 % циркулюючих клітин (у здорових осіб відповідно 11-16 %) і мають ознаки незрілих клітин: збільшену експресію поверхневого IgM при зменшеній кількості молекул МНС II класу і CD21. За допомогою рутинних методів (нефелометрія, радіальна імунодифузія) в крові не знаходять IgG, IgA і IgM. Використовуючи більш чутливі радіоімунологічні чи імуноферментні методики, вдається виявити присутність залишкової кількості цих імуноглобулінів. Однак навіть після введення сильних імуногенів у сироватці не знаходять специфічних антитіл.

Причиною хвороби є відсутність тирозинкінази *Btk* (Bruton's tyrosine kinase), необхідної для виникнення зрілих В-лімфоцитів. Цей фермент належить до родини цитоплазматичних кіназ, котрі присутні в усіх клітинах,

які походять з кісткового мозку, за винятком Т-лімфоцитів і плазматичних клітин. У лімфоцитах *Btk* є, зокрема, посередником проведення сигналу, який викликає експансію клонів пре-В-лімфоцитів. Вірогідно, існує багато рецепторів, активація котрих вимагає участі кінази *Btk*. До них зараховують поверхневі *IgM* В-лімфоциту, рецептор для *IL-7*, *-5*, *-10*, *FcεRI*, молекул *CD19*. Агаммаглобулінемія виникає найчастіше в результаті точкової мутації гена *Btk*: на сьогодні ідентифіковано понад 100 різних мутацій в межах гена *Btk*. Існують форми первинного імунодефіциту з клінічними і лабораторними проявами, ідентичними із агаммаглобулінемією, пов'язаної з Х-хромосомою, при яких виявляють аутосомний шлях успадкування і нормальну активність кінази *Btk*.

2.2. Звичайний варіабельний імунодефіцит.

Звичайний варіабельний імунодефіцит (common variable immunodeficiency - *CVID*) – це група вроджених порушень дозрівання В-лімфоцитів, що характеризуються відсутністю плазматичних клітин в лімфоїдних органах, гіпо- або агаммаглобулінемією і рецидивами інфекцій дихальної системи. Від агаммаглобулінемії, спряженої зі статтю *CVID* відрізняється аутосомним способом успадкування та появою перших симптомів хвороби в більш пізні роки життя. Неодноразово, попри вроджений характер хвороби, прояви дефіциту знаходять тільки в зрілому віці, звідси інша назва вживана в літературі: пізно виявлена гіпогаммаглобулінемія (late, adult onset hypogammaglobulinemia). У крові, як правило, спостерігається значне зниження рівня імуноглобулінів усіх класів, хоча продукція *IgM* буває зниженою найменше. У деяких хворих, незважаючи на відсутність в циркуляції *IgM*, вдається "розблокувати" синтез антитіл цього класу шляхом збудження лімфоцитів у культурі деякими антигенами, антитілами анти-*IgM* або вірусом *Epstein - Barr*. Результати описаних досліджень доводять, що клітини хворих мають здатність виробляти імуноглобуліни, які можуть з'явитись у відповідь на присутність відповідних стимуляторів. Як виняток, спостерігається незначне зменшення концентрації імуноглобулінів у крові і присутність секреторних *IgA* в слині.

Однак у цих хворих не виробляються специфічні антитіла після стимуляції антигеном.

Більшість хворих з CVID мають нормальне число Т- і В-лімфоцитів у крові. Часто в культурі Т-лімфоцити CD4+, які походять від хворих, виконують хелперну функцію щодо В-лімфоцитів здорових осіб. Оцінюють, що у приблизно 20% хворих причиною дефіциту є порушення функції Т-лімфоцитів (погіршення функції лімфоцитів-хелперів, зменшення продукції IL-2, IL-4 або надмірна активність супресорних лімфоцитів). У решті випадків гіпогаммаглобулінемія є наслідком внутрішнього дефекту лімфоцитів. Поодинокі повідомлення в літературі вказують на існування опірності лімфоцитів хворих до екзогенних цитокінів (IL-4, IL-6). В-лімфоцити хворих поведуть себе в культурі подібно до незрілих лімфоцитів новонароджених: після стимуляції Т-незалежними мітогенами відповідають лише синтезом *IgM*, після збудження мітогенами, які діють за посередництва Т-лімфоцитів (мітоген краснухи), виділяють лише невеликі кількості антитіл, переважно класу *IgM*.

Виявляється, що в організмі частини хворих В-лімфоцити відповідають проліферацією на стимуляцію антигеном, після чого процес диференціації затримується на етапі незрілого В-лімфоцита. У слизовій оболонці травного тракту відбувається зростання центрів розмноження лімфатичних фолікулів та інфільтратів лімфоцитів у *lamblia propria*. Хворі страждають погіршення кишкового всмоктування, з часом у третини з них виникають залозисті раки або лімфоми.

Молекулярні підстави порушень диференціації В-лімфоцитів, як і локалізація відповідального за це гена (генів) не досліджені. На підставі аналізу фенотипу припускають існування чотирьох вивдів CVID (A, B, C, D). Останнім часом стосовно CVID і дефіцитів ізольованих класів чи підкласів імуноглобулінів вважається, що дефект стосується генів, розташованих у межах групи генів, які кодують молекули МНС III класу (компоненти комплементу, TNF та інші). Черговою передумовою на користь гіпотези про близький патогенез вищезгаданих дефіцитів, є прогресія первинного

ізолюваного дефіциту класів чи підкласів Ig до повного CVID, що часом спостерігається. У 15% хворих з CVID виявляють ізолюваний дефіцит IgA серед членів найближчих родичів. Можливо, деякі форми CVID є полегшеними варіантами агаммаглобулінемії, пов'язаної з X-хромосою (підтип A) або агаммаглобулінемії з надлишком IgM (підтип C).

Звичайний варіабельний імунодефіцит у 20% випадків співіснує з хворобами аутоагресії (гемолітична анемія, тромбоцитопенія або нейтропенія, тироїдит, артрит, міозит).

2.3. Ізолюваний дефіцит IgA.

Ізолюваний дефіцит IgA проявляється у пониженому рівні цього імуноглобуліну (менше 5 мг/дл) при нормальному рівні IgG і IgM. Дефіцит стосується обох підкласів імуноглобуліну (IgA1 і IgA2), як в сироватці, так і в слизово-серозних виділеннях. Цей первинний імунодефіцит зустрічається найчастіше, в різних частинах світу з різною частотою. Наприклад, у Європі він діагностується у 1 на 500 осіб, а в Японії – в 20 разів рідше. Спосіб успадкування - як домінантний, так і аутосомно-рецесивний.

Клінічні прояви полягають у рецидивах бактеріальних інфекцій дихальної системи, які з'являються, як правило, у ранньому віці. У осіб з проявами дефіциту IgA часто зустрічаються алергії, особливо у вигляді гіперчутливості на харчові антигени, та аутоімунні захворювання (в основному ревматоїдний артрит і системний червоний вовчак). Частіше діагностують хвороби травного тракту, серед іншого пухлини. Однак понад 50 % осіб з дефіцитом IgA не виявляє підвищеної схильності до зараження. Здається, що у цих осіб роль імуноглобулінів слизово-серозних виділень переймають антитіла класу IgM. Вказують також на факт, що особи, схильні до інфікування, як правило не мають одного з підкласів IgG (IgG2 і IgG4 або IgG3) і слабше виробляють специфічні IgG після стимуляції антигенами мікроорганізмів.

Механізм, який призводить до вибіркового гальмування продукції імуноглобулінів класу IgA, невідомий. Хворі мають нормальний ген для стабільної частини важкого ланцюга $\alpha 1$ і $\alpha 2$.

Попри відсутність плазматичних клітин, що містять *IgA*, спостерігається нормальне число В-лімфоцитів з поверхневими рецепторами *IgA*. У культурі лімфоцити хворих не відповідають виробництвом *IgA* на стимуляцію мітогенами (наприклад, мітогеном краснухи чи вірусом Epstein - Barr).

У В-лімфоцитах хворих порушується процес зміни класів синтезованих антитіл. Виявлено, що в них не відбувається тимчасова експресія стабільної частини важкого ланцюга α , що є необхідним етапом на шляху до зміни класу імуноглобуліну. Цікаво, що дане явище можна викликати у клітинах хворих, інкубуючи їх з TGF- β .

Рідко пригнічення диференціації В-лімфоцитами до *IgA*-продукуючих плазматичних клітин можна приписати погіршенню функції Т-лімфоцитів-хелперів. Сумнівним видається твердження деяких дослідників про існування у хворих специфічних щодо ізо типу *IgA* Т-лімфоцитів-супресорів.

Дефіцит *IgA* може стосуватись виключно слизово-серозних виділень внаслідок дефекту синтезу секреторного фрагмента, котрий оберігає молекулу антитіла від протеолізу.

Вважається, що причиною ізольованого дефіциту *IgA* і звичайного варіабельного імунодефіциту (*CVID*) є ідентична генетична вада з різним ступенем експресії. Максимальна експресія дефектного гена призводить до повної агаммаглобулінемії (*CVID*), натомість ізольований дефіцит *IgA* є найбільш легкою формою з найменшою експресією гена. Між цими двома фенотипами знаходяться особи із середнім ступенем експресії гена, наприклад: хворі з *CVID* і нормальним рівнем *IgM*, дефіцитом *IgA* і підкласів *IgG*.

Вищенаведена гіпотеза підтверджується існуванням спільних для обох дефіцитів ознак. В обох випадках спостерігається подібний механізм порушення синтезу антитіл - гальмування диференціації і дозрівання В-лімфоцитів у результаті їх внутрішнього дефекту. Ген, котрий викликає порушення синтезу *IgA*, мав би знаходитись на відрізку хромосоми 6 між локусами для компонентів C4a і C4b комплементу (гена МНС III класу).

Вказують теж на зв'язок між відсутністю аспарагінової кислоти у 57-й позиції β -ланцюга молекули DQ та збільшеною частотою наявності дефіциту IgA і CVID. Генетичний маркер вибіркового дефіциту IgA локалізовано також в хромосомі 14 (в якій, серед іншого, кодовано структурні гени антитіл). Вищенаведені дані показують, що вибіркового дефіциту IgA (та CVID) може бути наслідком мутації кількох генів. Ще не вивчено механізм, за допомогою якого названі гени впливають на синтез *IgA*.

Дефіцит *IgA* може проявитись під впливом факторів зовнішнього середовища. Докладно описано явище пригнічення синтезу IgA в немовлят, заражених вірусом краснухи під час вагітності. Припускають, що подібні прояви може викликати внутрішньо-маткове інфікування цитомегаловірусом та найпростішою *Toxoplasma gondii*. Як правило, дефіцит IgA зникає після виведення мікроорганізму.

Лікування епілепсії фентойном часто призводить до зменшення концентрації IgA в сироватці хворих. Рідше бачимо вияв дефіциту внаслідок застосування солі золота, сульфасалазину, протималярійних середників, каптоприлу. Рівень *IgA* в сироватці зростає після закінчення лікування.

2.4. Дефіцити підкласів IgG

Значно знижений рівень одного або двох підкласів імуноглобулінів класу G часто спостерігається в осіб з рецидивуючими хронічними інфекціями дихальної системи. Наприклад, дефіцит підкласів IgG виявляють у 25 % дітей, які мають мінімум 7 епізодів інфекцій протягом року. Загальний рівень IgG, як правило, нормальний або незначно знижений, а дефект найчастіше стосується IgG2 або IgG2 і IgG4. Дефіцит підкласів IgG часто нагадує дефіцит IgA. Окремі підкласи IgG відрізняються послідовністю амінокислот в межах деяких фрагментів важкого ланцюга, переважно в зоні «регіону завіс». Попри невеликі відмінності в будові, підкласи IgG мають різні біологічні властивості, які визначають клінічні прояви дефіциту.

Ізольований дефіцит IgG1 зустрічається найбільш рідко. Оскільки IgG1 становить 60-70 % всіх імуноглобулінів класу IgG в циркулюючій крові, його

відсутність може спричиняти прояви звичайного варіабельного імунodefіциту.

Найчастіше зустрічається дефіцит IgG2, котрий часто має місце при інших вроджених станах зниженої опірності (дефіцит IgA, синдром Віскотта Олдрича). Антитіла класу IgG2 переважно виробляються після стимуляції антигенами з полісахаридною будовою. Тому у хворих з дефіцитом підкласу IgG2 часто зустрічається зараження бактеріями з полісахаридною оболонкою (наприклад, *Haemophilus influenzae*). Часом прояви дефіциту обмежуються погіршеною продукцією IgG2 у відповідь на деякі полісахариди бактерій. Цікаво, що знижена концентрація IgG2 в крові часто буває у здорових людей, без посиленої схильності до інфекцій. Встановлено, що замість IgG2 ці особи здатні виробляти антитіла класу IgG1, специфічні стосовно полісахаридів бактерій. Є спроби індукувати захисні антитіла класу IgG1 у хворих з дефіцитом IgG2 шляхом щеплення ізольованими полісахаридами оболонки, з'єднаними з анатоксином мембрани як білкового носія.

Ізольований дефіцит IgG3 часто виявляють у дорослих людей. Антитіла цього підкласу виникають у відповідь на стимуляцію вірусними білками та бактеріями *Branharvella catarrhilis* і *Streptococcus pijogenes*. Механізм продукції IgG інших підкласів не порушений, хворі мають нормальну концентрацію антитіл IgG1 в сироватці після імунізації бактеріальними білками (анатоксини), а також нормальний синтез IgG2 проти полісахаридів бактерій.

Значення вибіркового дефіциту IgG4 залишається предметом суперечок. У 15 % осіб популяції, котрі переважно не мають симптомів погіршеної опірності, не вдається знайти імуноглобуліни цього підкласу за допомогою стандартних методів. З іншого боку, підкреслюється, що у невеликої групи осіб без IgG4 можна запобігти рецидивуючим інфекціям верхніх дихальних шляхів, вводячи препарати імуноглобулінів.

Причина вибірових дефіцитів класу IgG не вивчена. У деяких осіб спостерігається делеція генів для тяжкого ланцюга певного підкласу, часто без проявів посиленої схильності до зараження. Описували також порушення

числа і функцій В- і Т-лімфоцитів. Привертає увагу зменшена частота присутності деяких алотипів на тяжких ланцюгах імуноглобулінів у хворих з дефіцитом підкласів.

2.5. *Імунодефіцит із підвищенням концентрації IgM*

Дефіцит викликає мутація розташованого в Х-хромосомі гена для ліганда молекули CD40 на Т-лімфоциті, присутнього в В-лімфоциті. У сироватці хворих спостерігаються нормальні або підвищені рівні IgM при дуже малій концентрації IgA і IgG. Після контакту з антигеном хворі виробляють лише специфічні антитіла класу IgM, виявляючи порушення переключення ізотипу вироблених антитіл. Відсутність специфічних антитіл класу IgA і IgG викликає клінічні прояви, сильно наближені до CVID, із виключно типовим для цього синдрому збільшенням лімфовузлів і аутоіmunізацією. Стимуляція активованими Т-лімфоцитами присутньої на макрофагах та дендритних клітинах молекули CD40 стимулює продукування ІЛ-12-цитокіну, який підтримує механізми знищення внутрішньоклітинних мікроорганізмів. Відсутність цього механізму може пояснити підвищену частоту заражень внутрішньоклітинними паразитами у хворих із цим синдромом. Ізольований дефіцит IgM зустрічається надзвичайно рідко.

2.6. *Імунні синдроми дефіцитів антитіл*

Перехідна гіпогаммаглобулінемія немовлят є наслідком запізнілого дозрівання імунної системи. Більшість антитіл класу IgG, що циркулюють у крові немовлят, походять від матері. Прогресуючий катаболізм материнських імуноглобулінів при гальмуванні продукції власних антитіл обумовлює те, що на 2-6 місяці концентрація IgG становить найнижчий рівень їх за все їх життя. Надалі спостерігається поступове зростання рівня IgG та його стабілізація близько шостого року життя. Повна здатність до синтезу IgA з'являється дещо пізніше, близько дванадцятого року життя, натомість продукція IgM повністю достатня після закінчення першого року життя. Про перехідну гіпогаммаглобулінемію говорять тоді, коли виражено знижений рівень IgG утримується після 12 місяців життя. Кількість циркулюючих В-лімфоцитів і здатність виробляти специфічні антитіла класу IgM

зберігаються. Часом виявляють порушення функції Т-лімфоцитів. Погіршення продукції IgG і IgA, як правило, зникає після другого року життя.

Точкова мутація в межах гена для κ-ланцюга призводить до того, що утворений легкий ланцюг не утворює стабільних дисульфідних зв'язків з таким ланцюгом. Хворі з цим дефектом страждають рецидивуючими інфекціями.

Агаммаглобулінемія часом спостерігається у хворих з пухлинами, що походять з епітеліальної тканини тимуса (thymoma). Як правило, пухлини виникають у дорослих осіб, а злоякісний процес супроводжується вибірковою аплазією системи еритроцитів та пригніченням продукції еозинофілів. У кістковому мозку не знаходять попередників В-лімфоцитів. Здається, що причиною дефіциту є порушення дозрівання стовбурових клітин. Зв'язок між пухлиною тимуса і порушеннями гемопоезу не вивчено, гіпогаммаглобулінемія зберігається і після оперативного видалення пухлини.

Дефіцити антитіл, що проявляються тяжкими інфекціями, лікують введенням людських імуноглобулінів. Сучасні препарати містять великі кількості IgG, отриманих від багатьох (від кількох сот до навіть кільканадцяти тисяч) здорових донорів. Таке лікування, як правило, зменшує число епізодів інфекції і робить можливим нормальний розвиток дитини. У випадках ізольованого дефіциту IgA субституція даними препаратами імуноглобулінів не може бути ефективною з огляду на короткий час перебування IgA в циркуляції (3-5 дні). До того ж, хворі можуть виробляти антитіла анти-IgA, які загрожують анафілактичними реакціями після контакту з кров'ю або похідними з крові препаратами.

Незважаючи на можливість раннього розпізнавання дефіциту, інтенсивного лікування антибіотиками і даними препаратами імуноглобулінів, 1/3 дітей з агаммаглобулінемією все ж вмирають до 10 року життя. З огляду на досягнення генної інженерії можна сподіватися, що більшість з наведених імунодефіцитів будуть скореговані шляхом генної терапії.

3. Дефіцити компонентів комплементу

Вроджені порушення синтезу компонентів системи комплементу рідко є причиною первинних імунodefіцитів.

Описано генетично обумовлені дефекти синтезу всіх (крім фактора В) компонентів класичного і альтернативного шляху комплементу та їх регуляторних білків. За винятком дефіциту пропердину, спряженого з Х-хромосомою, інші дефекти компонентів комплементу успадковуються як аутосомно-рецесивна ознака. Клінічні прояви відсутності окремого компонента залежать від місця, в якому перервався процес активації комплементу.

3.1. Дефіцити компонентів ранніх етапів класичного шляху активації комплементу

Відсутність компонентів С1, С2 або С4 робить неможливим запуск класичного шляху, натомість зберігається активація комплементу альтернативним шляхом, хоча сам процес уповільнюється. Сильно порушується механізм нейтралізації і ліквідації шкідливих комплексів антиген-антитіло.

Відсутність названих механізмів виведення комплексів сприяє розвитку аутоімунних захворювань, таких як гломерулонефрит, системний червоний вовчак, дерматоміозит та ін.

Крім того, хворі мають прояви імунodefіциту у вигляді збільшення частоти інфекцій, переважно викликаних бактеріями з оболонкою (*Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*).

Інгібітор фактора С1, крім впливу на активний С1-компонент комплементу, пригнічує також плазмін, калікреїн і активний XII-й фактор зсідання крові (Хагемана). Ці фактори беруть участь у виникненні похідної С2-компонента комплементу, яка має сильну кініноподібну дію на дрібні судини. Відсутність інгібітора С1 пов'язана з раптовим розвитком ангіоедеми (ангіоневротичного набряку Квінке), що може бути загрозливим для життя у випадку розвитку в гортані. Продукцію інгібітора посилюють тестостерон та

його похідні (даназол). Гострі прояви вдасться ліквідувати шляхом введення ϵ -амінокапронової кислоти, котра пригнічує активність плазміну.

3.2. Дефіцити компонентів альтернативного шляху активації комплементу

Їх знаходять рідше, ніж дефекти продукції компонентів класичного шляху. Відсутність факторів H і I ліквідує природний механізм запобігання спонтанній активації альтернативного шляху. Після цього збільшується метаболізм C3-компонента, знижується його концентрація в плазмі і погіршується активація альтернативного шляху. Дефіцит пропердину або фактора D робить неможливим запуск альтернативного шляху комплементу.

Порівняно з випадками дефіцитів компонентів класичного шляху активації комплементу у хворих не спостерігається збільшення частоти аутоімунних захворювань. Понад половина з них мають системне зараження *Neisseria meningitidis*.

3.3. Дефіцит C3

Компонент C3 має стратегічну позицію на шляху класичної та альтернативної активації системи компонента. Його дефіцит викликає пригнічення механізмів специфічної та неспецифічної відповіді.

Ускладнення елімінації імунних комплексів сприяє виникненню аутоімунних захворювань. Вже під час двох перших років життя виявляється збільшена схильність до інфікування. Найчастіше спостерігаються тяжкі рецидиви зараження бактеріями.

3.4. Дефіцит компонентів кінцевого шляху активації комплементу

Дефекти одного із компонентів кінцевого шляху активації комплементу роблять неможливим утворення комплексу, що атакує мембрану. Тому не відбувається літичної дії системи комплементу на клітини. Типовим клінічним проявом у хворих з цієї групи є рецидивуючі менінгеальні інфекції (*Neisseria meningitidis*), котрі з'являються у віці кільканадцяти років. Хворі з дефіцитом C5 на додаток мають порушення хемотаксису гранулоцитів, що, однак, не впливає на клінічну картину синдрому. Оскільки комплекс C5-C8 має певну літичну активність стосовно бактерій, хворі без C9-компонента

виявляють десятикратно більшу схильність до зараження *N. meningitidis*, ніж інші особи з цієї групи.

4. порушення функції фагоцитів

Імунодефіцит може виникати через зменшення числа фагоцитів (наприклад, нейтропенії) або погіршення функції: хемотаксису, рухливості, захоплення і знищення мікроорганізмів. Слід пам'ятати, що функція фагоцитів залежить від інших факторів або перебуває під контролем: продуктів активації комплементу (хемотаксис, фагоцитоз), антитіл (фагоцитоз), цитокінів (хемотаксис, цитотоксичність). Дефект однієї з названих систем викликає вторинні порушення функцій фагоцитів і прояви імунодефіциту. Характерним симптомом первинних і вторинних порушень функцій фагоцитів є підвищена вразливість до бактеріальних і грибкових інфекцій.

4.1. Хронічна гранульоматозна хвороба

Хворобу викликає дефект продукування фагоцитами реактивних окислювачів з токсичними властивостями.

Продукція вільних кисневих радикалів відбувається за участю NADPH-оксидази. Активація фагоцитів включає пентозний шлях, під час якого синтезується NADPH, що є субстратом для оксидази. Цей фермент знаходиться в клітинній мембрані і складається з комплексу флавопротеїну і цитохрому b_{558} , котрий переносить електрони на атом кисню. Утворений аніон здатний до продукції наступних реактивних окислювачів. Активація NADPH-оксидази вимагає фосфорилування: приєднання двох білків з молекулярною масою 67 кДа і 47 кДа, котрі знаходяться в цитоплазмі (їх називають p67-phox і p47-phox), та низькомолекулярного білка, який зв'язує GTP (gac-1 і gac-2). Близько 60% хворих не мають субодиниці 91 кДа в цитохромі- b_{558} , який внаслідок мутації гена знаходиться в X-хромосомі. У решти хворих спостерігається аутосомно-рецесивний шлях успадкування. Другу за частотою (30%) форму хвороби характеризує відсутність цитоплазматичного білка 47 кДа. Рідше (<10%) у фагоцитах не інаходять p67-phox або мембранної субодиниці 22 кДа цитохрому. Надзвичайно рідко

хронічну гранульоматозну хворобу викликає дефіцит білка 47 кDa, який успадковується як аутосомно-домінантна ознака.

Погіршення продукції токсичних кисневих сполук має місце і у хворих з дефіцитом глюкозо-6-фосфат-дегідрогенази, яка бере участь у пентозному циклі. Зменшена активність дегідрогенази викликає дефіцит NADPH, субстрату для оксидази.

Хворі мають підвищену схильність до зараження мікроорганізмами, котрі виробляють каталазу (*Staphylococcus aureus*, деякі грамнегативні бактерії, гриби родини *Aspergillus*). Фагоцити господаря, позбавлені нормальної системи NADPH-оксидази, не здатні виробляти відповідної кількості окислювачів, щоб знейтралізувати ефект дії бактеріальної каталази, що розкладає бактерицидний H_2O_2 .

Недостатня деградація та елімінація бактеріальних компонентів зумовлює те, що довго підтримується їх хемотаксична дія на фагоцити. Мігруючи в місце реакції макрофаги утворюють гранульоми (granuloma). Існують певні дані, що порушення функції макрофагів охоплює також деградацію і презентацію антигенів бактерій.

Активність NADPH-оксидази фагоцитів, отриманих від хворих, зростає під впливом $INF-\gamma$, хоча позитивний ефект лікування цим цитокіном не пов'язаний з впливом на кисневі механізми знищення мікроорганізмів. За умов *in vitro* вдалося скорегувати активність NADPH-оксидази шляхом трансфекції клітин кісткового мозку хворих ретровірусним вектором, який містить ген для p47-phox.

4.2. Синдром Чедіака - Хігаші

Синдром викликаний дефектом, який успадковується як аутосомно-рецесивна ознака. Хворі мають порушення пігментації, схильність до рецидивуючих інфекцій та лімфоцитарних інфільтратів в органах. Нейтрофіли мають характерні велетенські лізосоми, натомість не містять азурофільних гранул. Нейтрофіли хворих мають численні дефекти: погіршення хемотаксису, порушення утворень фаголізосом і зменшену

цитотоксичність. У зернах гранулоцитів виявлено зменшення активності протеазеластази і катепсину G.

Велетенські лізосоми спостерігаються також в НК-клітинах хворих із синдромом Чедіака - Хігаші. Цитотоксична активність цих клітин зменшена і не підлягає збільшенню під впливом IL-2 і INF- γ . Молекулярні основи хвороби ще не вивчено.

4.3. Дефіцити адгезивних молекул

Спочатку синдроми дефіциту адгезивних молекул описували як порушення фагоцитозу, викликані зменшеною рухливістю фагоцитів. У переважній більшості випадків причиною є мутація Д-ланцюга, спільного для всіх інтегринів $\beta 2$. Дефект успадковується як аутосомно-рецесивна ознака. Дотепер описано кілька десятків хворих із зменшеною експресією деяких молекул, що знаходяться на гранулоцитах і макрофагах: LFA-1 (CD11a/CD18), CR3 (CD11b/CD18) і CR4 (CD11c/CD18). Лігандом для інтегрину LFA-1 є молекули, які знаходяться на ендотеліоцитах. Відсутність експресії адгезивних молекул на мембрані фагоцитів ускладнює прилягання до ендотеліоцитів. Гранулоцити не здатні проникати у вогнище запалення, де знаходяться мікроорганізми. Тому для цього дефіциту характерна відсутність гнійного ексудату, який утворюється в місці інфікування в результаті дії ферментів гранулоцитів на бактерії та тканини господаря. Знижена експресія рецепторів CR3 і CR4 для iC3b компонента комплексу значно зменшує здатність фагоцитувати мікроорганізми, піддані опсонізації.

Хворі страждають рецидивуючими бактеріальними і грибовими інфекціями при стабільно підвищеній кількості гранулоцитів у крові. Клінічні прояви залежать від ступеня дефекту. Наприклад, при повній відсутності LFA-1 хворі гинуть внаслідок бактеріальних інфекцій на першому році життя. При збереженні часткової (2-10 % від вираженості у здорових людей) експресії LFA-1 хворі, як правило, доживають до дорослого віку.

Пригнічення синтезу інтегрину LFA-1, присутнього і на лімфоцитах, і НК-клітинах, може впливати на специфічну імунну відповідь. У

периферичній крові знаходять нормальні кількості Т- і В-лімфоцитів, але в частини хворих спостерігається погіршення синтезу специфічних антитіл і гальмування утворення цитотоксичних Т-лімфоцитів після стимуляції антигеном. Цікаво, що в більшості осіб з дефіцитом LFA-1 немає посиленої схильності до зараження вірусами. У культурі вдається активувати лімфоцити лектинами або алоантигенами, натомість антитіла анти-CD3 неефективні.

5. Тяжкі комбіновані імунodefіцити

Тяжкий комбінований імунodefіцит (severe combined immunodeficiency - SCID) є групою генетично зумовлених захворювань з різним патогенезом, але з подібною клінічною картиною, котра виникає внаслідок нефункціонування як Т-, так і В-лімфо-цитів. У хворих спостерігається зникнення центральних (тимус) та периферичних (лімфовузли, лімфатичні фолікули, мигдалики, селезінка) лімфоїдних органів, а в крові Т- і В-лімфопенія і агаммаглобулінемія. Як правило, має місце нормальна активність НК-клітин. Тимус переважно містить лише епітеліальні клітини, просякнуті пасмами сполучної тканини і жирової тканини безтимоцитів і вилочкових тілець (Hassala).

Як правило, до 3 місяців життя діти розвиваються нормально. Хоча в цей час вони можуть мати прояви хвороби "трансплантат проти господаря" (graft versus host disease - GVHD), викликані лімфоцитами матері, що пройшли крізь плаценту. Як правило, вже тоді з'являються хронічні зараження дріжджовими грибками (Candida). Потім дитина перестає рости, спостерігаються інфекції з надзвичайно бурхливим перебігом. Якщо не спробувати скорегувати дефіцит, діти вмирають переважно на першому році життя.

Від часу відкриття першого "класичного" SCID описано декілька наступних різновидів цього синдрому і вивчено їх патогенез.

5.1. Тяжкий комбінований імунодефіцит з аутосомно-рецесивним успадкуванням.

Цей перший описаний випадок SCID має також іншу назву – агаммаглобулінемія швейцарського типу. В основі цього рідкісного імунодефіциту лежить порушення дозрівання і диференціації материнських клітин лімфопоезу.

Генетичний дефект, що викликає цей тип імунодефіциту людини, не ідентифіковано. Натомість існує тваринна модель хвороби - лінія мишей *scid*. У клітинах *scid* не виявляють активності DNA-залежної протеїнкінази (DNA-PK_{sc}). Цей фермент бере участь у з'єднанні кінців нитки DNA у процесі рекомбінації генів для рецептора T-лімфоцита (TCR) та імуноглобулінових генів. Його відсутність робить неможливою реаранжацію генів для рецептора T-лімфоцитата імуноглобулінів, тобто гальмує розвиток обох ліній лімфоцитів, призводячи до тяжкого імунодефіциту.

У людини ген для DNA-PK_{sc} знаходиться у 8-й хромосомі. Певні спостереження за реаранжацією імуноглобулінових генів у лініях пре-B-клітин, отриманих від хворого, змушують думати, що і в людини дефект кінази DNA-PK_{sc} може бути підґрунтям для цього типу SCID.

5.2. Тяжкий комбінований імунодефіцит внаслідок дефіциту аденозинової дезамінази.

Тяжкий комбінований імунодефіцит внаслідок дефіциту аденозинової дезамінази (ADA) є частою формою SCID. Припускають, що дефіцит ADA є причиною 40-50 % випадків SCID що успадковуються як аутосомно-рецесивна ознака. Його викликає мутація або делеція в межах гена для аденозинової дезамінази, що знаходиться на 20-й хромосомі людини.

У хворих і носіїв виникає білок із значно ослабленою активністю дезамінази або синтезується ненормальна молекула фермента, що швидко підлягає розпаду. У частини хворих взагалі не спостерігається активності ADA в клітині.

Аденозинова дезаміназа відіграє важливу роль у процесі деградації пуринів, каталізуючи перетворення аденозину в інозин. Цей фермент знаходиться в більшості клітин організму, однак найбільшу активність виявляє в лімфоцитах, особливо незрілих Т-лімфоцитах. У носіїв хвороби знаходять знижену активність ADA без ознак імунодефіциту. Нормальну функцію лімфоцитів забезпечує збереження 5-10 % активності ферменту порівняно із здоровими людьми. До кінця не зрозуміло, чому дефіцит ADA викликає пошкодження лише Т-лімфоцитів. Говорять про роль токсичних метаболітів, які накопичуються в клітинах; пригнічують ферменти, котрі беруть участь у синтезі DNA. Згідно з іншою гіпотезою, надмір аденозину призводить до зростання концентрації cAMP у тимоцитах, що викликає порушення реаранжації гена для α-ланцюга TCR-рецептора і може запускати в клітині процес апоптозу.

Клінічна картина SCID на тлі дефіциту ADA буває різна, що впливає зі ступеня збереженої активності фермента. У частини хворих спостерігаються прояви класичного синдрому, в інших має місце незначна лімфопенія і збережені деякі функції лімфоцитів (наприклад, продукція антитіл).

5.3. Тяжкий комбінований імунодефіцит, пов'язаний з X-хромосомою.

Клінічна картина цієї форми не відрізняється від класичного синдрому SCID. Рецесивний ген, що обумовлює виникнення проявів дефіциту, локалізується в проксимальній частині довгого плеча X-хромосоми (Xq13). У половині випадків синдром є результатом спонтанної мутації. Видається, що в небагатьох хворих зустрічається аутосомно-рецесивний спосіб успадкування. Хвороба викликає мутацію в межах гена для γ-ланцюга рецептора для IL-2 (IL-2Rγ). Ланцюг уходить до складу рецептора для IL-2 із середньою та сильною спорідненістю до цього інтерлейкіну, а також знаходиться в рецепторах для інших цитокінів (IL-4, -7, -11, -15). Наявність γ-ланцюга в інших рецепторах могло б пояснити більш значне порівняно з ізольованим дефіцитом IL-2 погіршення імунітету.

Відсутність γ -ланцюга викликає елімінацію тимоцитів у тимусі, а механізм цього явища ще невідомо. Відсутність Т-лімфоцитів-хелперів та (як припускається) порушення активації В-лімфоцитів є причиною дефектного виробництва антитіл. У периферичній крові переважають В-лімфоцити (часом вони становлять 90% всіх циркулюючих лімфоцитів), але виявляють лише невеликі кількості IgA і IgG. Цікаво, що в частини хворих спостерігається нормальний рівень IgM. Можливо це результат безпосередньої стимуляції В-лімфоцитів тимуснезалежними антигенами *In vivo*. Однак не спостерігається появи специфічних антитіл після стимуляції тимусзалежними антигенами.

5.4. Тяжкий комбінований імунodefіцит, пов'язаний з відсутністю МНС-молекул II класу (синдром "оголених" лімфоцитів).

При цій рідкісній, успадкованій аутосомно-рецесивній формі синдрому SCID взагалі не знаходять або знаходять дуже мало молекул МНС II класу на поверхні макрофагів, В-лімфоцитів, дендритних клітин (звідси походить раніше вживана назва - синдром "оголених" лімфоцитів). Дефект синтезу охоплює поліпептиди, кодовані у всіх локусах цієї системи: HLA-DR, -DQ, -DP. Продукція молекул МНС I класу проходить нормально або спостерігається їх зменшена експресія. Стимуляція γ -інтерфероном не впливає на експресію МНС-молекул.

Причиною хвороби є набутий дефект структурних генів системи МНС, а порушення регуляції транскрипції генів МНС II класу (Регуляцію синтезу молекул МНС обговорено в підрозділі 9.3).

У частини хворих не знаходять білок, названий *CIITA* (МНС class II transactivator), необхідний для експресії генів МНС II класу. У решти осіб з цим синдромом немає транскрипційних факторів RFX 5 або RFXAP, поєднання яких з промоторним регіоном розпочинає транскрипцію генів для молекул МНС II класу.

У хворих, як правило, не спостерігається лімфопенія, часом має місце нормальний рівень імуноглобулінів. У частини хворих знаходять виражений дефіцит Т-лімфоцитів CD4⁺. Можна припустити, що це є наслідком

зменшеної експресії молекул МНС II класу в тимусі. Контакт з ним є необхідною передумовою диференціації Т-лімфоцитів CD4+.

Наявні у хворих симптоми підкреслюють значення молекул МНС для презентації антигену і виникнення специфічної імунної відповіді. Клінічно у хворих спостерігаються прояви погіршення відповіді клітинного та гуморального типу, і більшість пацієнтів вмирають між 6 місяцем і 5 роком життя внаслідок тяжких і рецидивуючих заражень. *in vitro* їх лімфоцити відповідають на стимуляцію мітогенами і алоантигенами, вдається також викликати утворення специфічних цитотоксичних Т-лімфоцитів.

Натомість за умов культивування не доходить до відповіді на розчинні білки, оскільки вони не підлягають перетворенню і презентації Т-лімфоцитам CD4+ антигенпрезентуючими клітинами.

У значної групи хворих виявляють панцитопенію (еритропенію, нейтропенію, тромбоцитопенію) аутоімунного походження.

Нещодавно описали родинний ізольований дефіцит молекул МНС I класу. Дефект виник внаслідок мутації гена, який кодує білок ТАР, що з'єднує пептиди з молекулами МНС I класу в цитоплазматичній сітці. Порушення його функції зумовлює те, що замість подальшого транспортування комплексу МНС-пептид на поверхню клітинної мембрани він підлягає знищенню в цитоплазмі. Легко дійти висновку, що в осіб із цією вадою немає Т-лімфоцитів CD8+.

5.5. Інші форми тяжкого комбінованого імунodefіциту.

Можливість дослідження порушень імунної відповіді на молекулярному рівні дозволила встановити причину багатьох станів, які відносять до групи тяжких комбінованих імунodefіцитів. Описання в літературі стосуються невеликих груп хворих або часом поодиноких родин чи осіб.

Синдром SCID зустрічається в осіб, які не мають одного з білків комплексу рецептора Т-лімфоцита (TCR/CD3) або цілої молекули CD3, CD4, CD7, CD8. У іншій групі хворих, крім нормальної експресії TCR і CD3 в клітинній мембрані, збудження рецептора не активує систему вторинних

медіаторів збудження (іони кальцію, білкова кіназа C). При одній з таких форм синдрому SCID спостерігається відсутність Т-лімфоцитів CD8+. У клітинах хворих знайшли мутацію в межах тирозинкінази ZAP-70, яка бере участь в передачі сигналу з рецептора Т-лімфоцита. Мутація в межах гена для кінази JAK3 також викликає дефіцит Т-лімфоцитів і NK-клітин з проявами SCID.

Причиною дефіциту може бути і дефект транскрипції генів для інтерлейкінів у Т-лімфоцитах, відсутність рецептора для IL-2 і IL-1. У одному з виявлених випадків дефект продукування IL-2 виникав з мутації в межах транскрипційного фактора NF-AT, який ініціює транскрипцію гена для цього інтерлейкіну. Описано невелику групу хворих з проявами SCID, моноцити котрих не вивільняли інтерлейкін-1. У згаданих прикладах клінічні симптоми є наслідком відсутності хелперної функції Т-лімфоцитів.

До інших, рідкісніших форм комбінованих імунодефіцитів належить дизгенезія сітки. При цій формі порушення диференціації стосуються не лише материнської клітини Т- і В-лімфоцитів, але й охоплюють кістково-мозкову материнську клітину лейкоцитарного ряду. Розвиток еритроцитарної і тромбоцитарної систем відбувається правильно. Причину хвороби і спосіб її успадкування ще не вивчено - припускають загальмування синтезу відповідних факторів росту або дефект експресії рецептора для цих факторів.

При синдромі Омена (тяжкий комбінований імунодефіцит з еозинофілією) прояви SCID супроводжуються інфільтратами Т-лімфоцитів у шкірі та слизово-серозних оболонках, нагадуючи зміни під час хвороби "трансплантат проти господаря" (GVHD). Висунуто гіпотезу, що цей синдром є випадком хвороби GVHD, яка виникла у хворого із синдромом SCID внаслідок проникнення крізь плаценту лімфоцитів матері, які розпізнають антигени дитини. Однак аналіз Т-лімфоцитів у інфільтратах та крові вказує на їх походження від господаря. Припускають, що в імунній системі хворих із синдромом Омена зберігається обмежена кількість клонів Т-лімфоцитів, які розвивають відповідь на власні антигени організму.

Лікування синдрому тяжкого комбінованого імунодефіциту полягає в реконструкції імунної системи шляхом пересадки кісткового мозку, взятого від родичів з ідентичними антигенами HLA.

Мають місце спроби пересадки кісткового мозку від донорів-родичів з одним сумісним гаплотипом або донорів-неродичів з ідентичною системою HLA. З цією метою виникли міжнародні бази даних, які централізовано накопичують результати тканинного типування потенційних донорів кісткового мозку.

У випадку дефіциту аденозинової дезамінази робляться спроби подати відсутній фермент шляхом переливання еритроцитів від здорових донорів або введення препарату чистого ферменту, відповідно стабілізованого для збереження активності.

6. Діагностика імунодефіцитних станів

Дефекти гуморального імунітету можуть бути виявлені шляхом кількісного визначення імуноглобулінів, а також дослідження продукції антитіл після активної імунізації проти дифтерії, правця, коклюшу та поліомієліту (вбитою вакциною). Крім того, застосовують підрахунок В-клітин за допомогою метода проточної цитометрії із використанням антитіл до маркерів В-клітин – CD19, CD20 та CD22.

Для визначення числа Т-клітин найбільш придатним є метод проточної цитометрії із застосуванням моноклональних антитіл до CD3 або інших поверхневих молекул Т-клітин – CD2, CD5, CD7 або CD4 та CD8. У хворих з Т-клітинним дефіцитом спостерігається знижена реактивність або її відсутність під час проведення шкірних тестів з туберкуліном, антигенами *Candida*, трихофітином, стрептокіназою та вірусом паротиту; лімфоцити таких хворих виробляють знижену кількість цитокінів після стимуляції фітогемаглютиніном (ФГА) чи іншими неспецифічними мітогенами.

Існують тести *in vitro* для визначення комплемента, бактерицидних та інших функцій поліморфноядерних лейкоцитів; тест з барвником тетразолієвим нітросинім або тест стимуляції продукції супероксидного

аніон-радикала дозволяє визначити окислювальні ферменти, пов'язані з фагоцитозом та бактерицидною активністю.

7. Генна терапія імунodefіцитів

Первинні імунodefіцити – перша група захворювань, котрі привернули увагу дослідників як потенційний "дослідницький полігон" генної терапії. У багатьох випадках відомий тип пошкодження гена, який відповідає за прояви хвороби. Оскільки мутація стосується клітин імунної чи кровотворної системи, можна спробувати "замінити" DNA поза організмом хворого, а потім повернути йому "відремонтовані" клітини, що містять дефіцитний ген. Стабільне введення гена в стовбурові клітини, які мають здатність до самовідновлення, може призвести до виліковування. Хоча з 1968 року пересадка кісткового мозку є методом, який переважно обирають при всіх типах вроджених форм імунodefіцитів, проте з огляду на труднощі із знаходженням гаплоідентичного за HLA донора (наприклад, близнюка) та велику частину GVHD (25-35% випадків) цей метод все ще вважається незадовільним.

Найчастіше зараз використовують модифіковані ретровіруси як вектори "впровадження" гена в клітину. На жаль, вони роблять можливим введення та інтеграцію чужої DNA лише до клітин у фазі поділу, тобто є неефективними щодо клітин у фазі G0 циклу (наприклад більшість стовбурових клітин гемопоезу).

Альтернативними векторами могли б стати аденовіруси або аденоасоційовані віруси (adeno-associated virus). На даний час у дослідженнях всюди застосовують модифіковані аденовіруси, позбавлені здатності до реплікації в клітинах людини. У пошуках ефективних векторів не виключають можливість використати віруси підродини *Lentiviridae* (наприклад, HIV-1) за умови кращого вивчення біології цих вірусів та гарантії абсолютної безпеки для пацієнта.

SCID на фоні дефіциту ADA є модельною хворобою для застосування генної терапії. Першу спробу провели 14 вересня 1990 року і за допомогою

ретровірусного вектора ген для ADA ввели для аутологічних Т-лімфоцитів. На користь цієї стратегії може свідчити існуюча дотепер в одного з хворих інтеграція "векторного" гена ADA і значне покращення клінічних проявів. Однак слід зазначити, що хворі надалі отримують препарати ферменту ADA (PEG-ADA), що повинно захистити їх від рецидиву хвороби у випадку, якщо експресія ADA виявилась тимчасовою.

Подібну стратегію застосували із використанням стовбурових клітин плоду, отриманих з пуповинної крові дитини після встановлення у неї дефіциту ADA в пренатальному періоді. Ген введено в ізольовані клітини CD34 серед яких міститься значний відсоток кровотворних стовбурових клітин (у кістковому мозку вони становлять 0,001%). На 4 добу життя було повернуто власні трансформовані клітини CD34+ трьом дітям з дефіцитом ADA. Півторарічне спостереження підтвердило експресію гена ADA в клітинах лімфоїдного і міелоїдного ростків, але пройшло ще замало часу, аби оцінити клінічний ефект лікування.

В найближчому майбутньому варто сподіватися подібних спроб генної терапії вже у плодів. Трансфузія *in vitro* має ще одну перевагу: з огляду на ранній етап розвитку імунної системи в цей спосіб уникають сенсibilізації до білків вектора, який є носієм гена.

Значення цих перших спроб підкреслює той факт, що до цього часу пренатальне розпізнавання важкого комбінованого імунодефіциту в багатьох країнах вважалось відносним показом до переривання вагітності. Крім дефіциту ADA, вже розпочали терапію вродженого дефіциту фосфорилази пуринових нуклеотидів та хронічної гранульоматозної хвороби. На даний час приготування відповідного протоколу генної терапії вимагає встановлення генетичного дефекту в пацієнта та місце дефекту в клініці (фермент, поверхнева молекула, фактор транскрипції). Подальшим етапом є спроби знайти "ген-кандидат". Підтвердження точності молекулярного діагнозу проводиться порівнянням клінічних проявів у пацієнта і мишей "knock-out" (тобто таких, у яких штучним способом виключили нормальну функцію даного гена). Якщо генна терапія на тваринній моделі буде функціонувати

так, як очікувалось, тобто ми отримаємо повну корекцію дефекту, тоді можна думати про початок розробки генної терапії в клініці.

Слід пам'ятати, що генна терапія має і небезпеку, пов'язану з як правило багато-векторним впливом досліджуваного гена. Наприклад дефект гена АТМ при синдромі атаксія-телеангіектазія викликає прояви з боку кількох систем. Постійна експресія введеного гена може призводити до небажаних наслідків. У мишей з генетичним дефектом, котрий відповідає людській гіпогаммаглобулінемії з надміром IgM, введення бракуючого гена для молекули CD40L (gp39) викликало появу тяжких лімфопроліферативних синдромів. Причиною є постійна "ектопічна" експресія CD40L. Щоб запобігти цим ускладненням, слід було б наділити cDNA оригінальним промотором, котрий регулював би роботу гена залежно від потреб даної клітини.

9.9 Трансплантаційний імунітет

Історично перші згадки про органну трансплантацію відносяться до IV, III сторіч до нашої ери, коли в Індії було розроблено хірургічну техніку відтятих носів (кари за крадіжку), що і було описано в Shishruta Samhuta. Приблизно в той же час у Китаї лікар Tsin Yue-Jen зробив першу трансплантацію серця двом солдатам на тлі тогочасної анестезії – знеболення під впливом великої кількості вина. У Європі першими органними трансплантологами вважаються святі близнюки Kosma і Damian, які ще в IV столітті н.е. пересадили в Римі набожному церковнику ногу, але пізніше вони загинули за це мученицькою смертю і саме поняття пересадки органів на кількасот років було заборонено. Впровадження трансплантації органів до сучасної медицини стало можливим завдяки, з одного боку, відкриттю законів тканинної сумісності, з іншого боку – удосконаленням хірургічної техніки. Тепер трансплантація стала необхідним ланцюгом при лікуванні недостатності нирок, печінки і серця. В світовій практиці впроваджується трансплантація сегментів підшлункової залози хворим на цукровий діабет.

Залежно від генетичної відмінності між донором і реципієнтом, розрізняють види трансплантації:

- Аутологічний (аутогенний) – донор і реципієнт є однією і тою ж особою;
- ізогенний (сингенний) між ідентичними особами одного виду (монозиготні близнюки);
- аллогенний – між генетично різними особами одного виду;
- ксеногенний – між особами різних видів;

Серед ксеногенних трансплантатів розрізняють трансплантати „сумісні” (конкордатні) – між спорідненими видами, наприклад, серед приматів і „несумісні” (дискордатні), коли донор і реципієнт походять з генетично віддалених видів (наприклад, свиня і макака).

Поширене застосування трансплантації кісткового мозку (ТКМ) та стовбурових клітин периферичної крові (ТСКПК) при лікуванні життєзагрозливих гематологічних, онкологічних, спадкових та імунологічних

захворювань є кульмінацією більш ніж чотирьох декад випробувань великої кількості дослідників різних країн світу.

Велика кількість трансплантацій виконуються щорічно у всьому світі. Достатньо сказати, що Європейська асоціація по трансплантації крові та кісткового мозку (ЄВМТ) повідомила про здійснення на протязі 2007 року 19341 трансплантацій, з яких було 6456 алогенних і 12885 аутологічних процедур. Значно поширилась кількість країн, де застосовують трансплантацію кісткового мозку в терапії хворих. Під час організації спільноти „Євротрансплант” ЄВМТ 1973 році, налічувалось лише вісім центрів, які запроваджували цей метод лікування у п’яти країнах. Зараз членами ЄВМТ є 500 трансплантаційних центрів з більш ніж 30 країн, в тому числі і дві українських установи - ТКМ та ТСКПК.

Перші спроби трансплантувати живі гемопоетичні клітини від одного індивідуума іншому виконувалися на початку 1950 року, незважаючи на значний скептицизм тогочасної наукової громади. І тільки після демонстрації факту, що кістковий мозок може бути трансплантований і що рівень одуження хворих може бути значним, наступним логічним кроком було призначення трансплантації як терапії вибору. Загальні результати трансплантації кісткового мозку продовжували поліпшуватись із покращанням відбору пацієнтів, розвитком удосконалених методів типування тканин, можливістю застосовувати потужні антимікробні препарати, прогресом методів інтенсивної терапії та профілактики реакції „трансплантат проти хазяїна”. Насьогодні вже окреслені і затверджені основні правила трансплантації, дотримування яких сприяє клінічній ефективності методу, яка в великій мірі залежить від клініко-діагностичного моніторингу в перед- і післятрансплантаційному періоді, від опцій лікування та прогнозу можливих післятрансплантаційних ускладнень. У цьому аспекті важливим є рівень диференційної діагностики, зокрема визначення цитогенетичних та молекулярно-генетичних маркерів пухлинних клонів, серологічних та молекулярних маркерів вірусної інфекції, яка є великою загрозою для імунокомпроментованих осіб – реципієнтів. У світовій асоціації

трансплантологів використання сучасних молекулярних біотехнологій є необхідною умовою, яка сприяє підвищенню ефективності даного виду терапії.

ТКМ та ТСКПК сьогодні використовується при цілому переліку захворювань з широкими коливаннями у результатах, відповідно до типу хвороби, її стадії та виду трансплантації. При деяких захворюваннях трансплантація є найбільш ефективним доказаним методом лікування (наприклад, деякі лейкемії та важка апластична анемія), в той час як для інших хвороб (наприклад, таласемія) трансплантаційний метод є тільки певним можливим засобом лікування.

Тільки шляхом ретельного вивчення і довгострокового нагляду за пацієнтами може бути підтверджена ефективність (або неефективність) новітніх підходів до терапії.

Яка ж суть стоїть за визначеннями ТКМ та ТСКПК ? Під здійсненою трансплантацією мають на увазі приживлення у певному індивідумі гемопоетичних стовбурових клітин після внутрішньовенної інфузії клітин кісткового мозку, або клітин периферичної крові, які вилучені із організму самого індивідуума (аутологічна трансплантація), або із організму іншого індивідуума (алогенна трансплантація).

Головною метою трансплантації стовбурових кровотворних клітин (СКК) є відновлення гемопоетичної системи. Трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин призводить до довгострокового приживлення клітин, що імплантуються, на відміну від гемотрансфузій, позитивні результати якої мають певний час. Сьогодні гемопоетичні стовбурові клітини для клінічного застосування отримують з кісткового мозку, периферичної крові або пуповинної крові (кордової). Вони можуть бути отримані від придатного спорідненого або неспорідненого донора для алогенної трансплантації, чи від самого пацієнта для аутоотрансплантації. При лікуванні онкологічних захворювань ці клітини застосовуються після мієлоаблативної хіміотерапії для досягнення конкретних цілей: подолання обмежуючої гематологічної токсичності курсу протипухлинної

хіміотерапії; елімінації пухлинних клітин, що не піддаються впливу звичайних доз цитостатиків при аутотрансплантації; додаткового забезпечення протипухлинної імунної реакції при алогенній трансплантації.

Стовбурові клітини з кісткового мозку, насамперед для алогенних трансплантацій, одержують під загальним наркозом шляхом багаторазових пункцій. Достатня для трансплантації кількість стовбурових клітин периферичної крові може бути зібрана тільки за допомогою відповідних мобілізаційних заходів із застосуванням хіміотерапії та/або ростових факторів. **Виділяють СКПК з організму донора за допомогою спеціального програмованого лейкоцитозфери.** Клітини, отримані з периферичної крові в порівнянні з клітинами кісткового мозку мають певну перевагу - видалення цих клітин у донора- реципієнта не є травматичним, вони сприяють більш швидкому відновленню гемопоєзу реципієнта після мієлоаблативної терапії, зменшується ризик повторної контамінації хворого пухлинними клітинами з трансплантату та економічно сама маніпуляція є більш вигідною.

Залежно від генетичної відмінності між донором і реципієнтом розрізняють два види трансплантації стовбурових гемопоетичних клітин:

Аутологічна – донор і реципієнт є однією особою;

Алогенна – донор і реципієнт є різними особами (спорідненими або неспорідненими).

Оскільки кожна людина за генетичним набором антигенних детермінант визначені ступені генетичної сумісності донора і реципієнта за антигенами головного комплексу гістосумісності:

- Ідентичний близнюк – донор і реципієнт ідентичні не тільки за локусами HLA, але і за усіма іншими генетичними системами крові;

- HLA- сумісний сиблінг – донор і реципієнт сумісні за системою HLA, але є імовірність несумісності за локусами інших генетичних систем крові;

- Донор і реципієнт -частково несумісні, є спорідненими особами або не мають споріднених зв'язків.

Оскільки молекули МНС є головним антигеном, який ініціює імунологічну відповідь на трансплантат, вважається, що максимальна сумісність за системою HLA є запорукою найкращих результатів лікування.

Дійсно, це положення підтверджується фактами ефективності трансплантаційної терапії як при органній трансплантації, так і при трансплантації СККК. Оскільки при органній трансплантації більшість пересадок проводиться від кадаверних донорів (трупні органи), то шанс на підбір донора ідентичного за антигенами HLA дуже малий. Тому застосовується стратегія підбору пари з найменшою кількістю несумісних антигенів (*mismatch*), а не підбору донора і реципієнта із найбільшою кількістю сумісних антигенів. При трансплантації стовбурових гемопоетичних клітин, в тому числі і кордової крові, застосовується принцип максимальної сумісності за системою HLA, з урахуванням предсенсibilізації організму реципієнта до антигенів еритроцитарних систем і до антигенів гістосумісності.

Наводимо стандартний протокол імуногенетичного обстеження донора (реципієнта) для трансплантації СКПК і ТКМ (табл.9).

Таблиця 9.

**Імуногенетичне лабораторно-діагностичне обстеження пацієнта
для трансплантації СКПК**

№	Назва обстеження	Строки проведення обстеження у передтрансплантаційний період
1.	Серологічне типування HLA-антигенів I класу (локуси A, B, C)	Під час первинного обстеження та період стійкої ремісії
2.	Серологічне типування HLA-антигенів II класу (локуси DR, DQ)	Під час первинного обстеження та період стійкої ремісії

3.	ДНК-типуювання HLA-антигенів I класу (локуси A, B, C)	Під час первинного обстеження та період стійкої ремісії
4.	ДНК-типуювання HLA-антигенів II класу (локуси DRB1, DQB1, DQA1)	Під час первинного обстеження та період стійкої ремісії
5.	Визначення фенотипу за еритроцитарними системами AB0, Rh-Hr, MN, Ss, Kell, Duffy, Kidd	Під час первинного обстеження та період стійкої ремісії
6.	Визначення перед сенсibiliзації до антигенів еритроцитів і тромбоцитів	Під час первинного обстеження та в період проведення гемотрансфузій

Як видно з наведеного протоколу обстеження, необхідним є визначення передчасної сенсибілізації до антигенів різних генетичних систем крові. Виникає питання, навіщо так ускладнювати підготовку реципієнта до процедури?

Ще у 1973 р. роботами Terasaki було проілюстровано, що попередні гемотрансфузії під час органної трансплантації парадоксальним чином виправляли результати трансплантаційного лікування. Навіть проводилась підготовка реципієнта до трансплантації шляхом переливання хворому крові від донора органу. Але на сьогодні, коли є великий вибір імуносупресивних посередників і є небезпека інфікування інфекційними збудниками цей шлях стає все менш популярним. При пересадці гемопоетичних стовбурових клітин крові, навпаки, передсенсибілізація до еритроцитарних і лейкоцитарних антигенів є провокатором розвитку імунологічних реакцій при після трансплантаційної гемотерапії, що впливає на приживлення трансплантата. Цей факт добре проілюстрований на прикладі повторної трансплантації шкіри від одного і того ж донора, коли після другої пересадки трансплантат відторгається швидше. Це призвело до появи у

трансплантаційній медицині нового підходу, коли проводять „відсівання” потенційних реципієнтів, які вже були сенсibilізовані антигенами даного донора. Сама сенсibilізація може відбуватись за рахунок попередніх трансплантацій, гемотрансфузій, вагітностей і в результаті лікування гемопрепаратами.

З метою виключення наявності специфічних анти- HLA антитіл, безпосередньо перед пересадкою з сироваткою кожного реципієнта проводиться лімфоцитотоксичний тест з лімфоцитами донора і з панеллю лімфоцитів, що містить не менше 20 образців лімфоцитів. Відсоток реактивності сироватки реципієнта з панеллю (panel reactive antibody PRA) є мірою його сенсibilізації антигенами HLA. Реципієнти з PRA вище 50% - в 5 разів довше чекають на відповідного донора ніж десенсibilізовані хворі.

Постає запитання, сумісність за якими локусами MHC людини має найбільше значення для приживлення трансплантата? Дві найбільш потужні бази даних гістотипованих осіб – американська (United Network For Organ Sharing) і європейська (Collaborative Transplant Study), які містять інформацію про 150000 реципієнтів, надали переконливі докази про найкращі результати сумісності за локусами HLA-DR і HLA B. Сумісність за локусом A має менший вплив на відторгнення трансплантата, а сумісність за локусом C значення не має.

За матеріалами світової спільноти трансплантологів по пересадці трупних нирок встановлено, що сумісність за системою HLA-DR і –B локусів дає 65 -70% шансів на щонайменше десятирічне функціонування трансплантата, період півжиття трансплантата становить приблизно 20 років, в порівнянні для живих HLA –ідентичних донорів трансплантата цей термін складає до 24 років. Присутність одного несумісного антигену у локусі HLA-A; B; -DR зменшує ймовірність десятирічного функціонування трансплантата приблизно до 40 – 50%, а тривалість його життя до 10 -12 років. Якщо існує більша кількість несумісних антигенів, то шанси десятирічного виживання зменшуються до 30 -35%, а тривалість півжиття до 7 -9 років. Аналіз віддалених результатів пересадки нирки свідчить, що

несумісність навіть за одним антигеном має відчутний вплив на успіх трансплантації.

Ретельний підбір пар донор-реципієнт за системою HLA зменшує частоту гострих відторгнень впродовж першого року після трансплантації, а також зменшує ризик виникнення хронічних ускладнень.

Вважається, що несумісність за певними антигенами особливо негативно впливає на долю трансплантата. Визначено декілька таких (табу) „заборонених” комбінацій антигенних специфічностей. Відомі також комбінації з несумісними антигенами, які практично не впливають на подальшу долю трансплантата, і які називають „допустимими” (permissible mismatch). Пояснення цього явища може бути наступним: молекула МНС людини на своїй поверхні має 4 -5 регіонів, які містять певні епітопи, що саме розпізнаються як антигени. Реципієнт з певним **HLA** генотипом може розпізнавати деякі з них як сильні імуногени (ефект табу), інші – як слабкі імуногени (допустима несумісність).

Пресадка інших органів: серця, печінки, підшлункової залози виконується без підбору реципієнтів за системою **HLA**, дотримуюсь тільки підбору за системою АВО. Але ретроспективний аналіз ефективності органної трансплантації свідчить що ретельний підбор з урахуванням системи гістосумісності збільшує шанси на довго тривалість життя трансплантата.

При органній трансплантації, як правило, застосовуються серологічні методи гістотипування, які на сьогодні не мають високої *точності*. Так, було відмічено, що навіть при ідеальній сумісності за антигенною специфічністю певний відсоток гістосумісних нирок на приживлюється з імунологічних причин за рахунок, так званих, мінорних (слабких) антигенів, які визначаються при аналізі DNA методами.

В той же час при трансплантації кісткового мозку селекція за повним набором алелей HLA-C є абсолютно необхідною і, більш того, має велике значення. Практично така ж сама ситуація має місце і для антигенів класу II.

Вище вже було наведено, що для ефективної трансплантації органних трансплантатів абсолютно достатня селекція на рівні визначення антигенів HLA класа II або DRB1-специфічностей, які визначаються при генотипуванні методом низької здатності (загальна кількість таких специфічностей не більше 18). Навпаки, під час відбору донорів кісткового мозку неспорідненого походження абсолютно необхідний підбір донора на рівні окремих алельних варіантів генів HLA, загальна кількість яких на сьогодні перевищує 2000.

Є достатньо підстав для припущення, що при первинній пересадці органних трансплантатів має місце пряме розпізнавання чужерідних HLA-антигенів класа II, на відміну від трансплантації кісткового мозку, коли має місце розпізнавання пептидних мотивів алельних варіантів, які, як правило, відбуваються при непрямому варіанті розпізнавання. Дана різниця має принципове значення для прикладної трансплантології. І якщо для ефективного підбора трансплантата кісткового мозку, або ГСКПК необхідно мати базу даних на мільйони HLA-генотипованих донорів, то при органної трансплантації для підбора HLA-гістосумісного донора кількість реципієнтів в листку очікування (в даному випадку один донор скринуються на листку очікування реципієнтів, а не навпаки, як при трансплантації кісткового мозку) може не перевищувати 1000 осіб.

Вище ми вже розглядали, яка ж суть стоїть за визначеннями ТКМ та ТСКПК. Зупинимось більш ретельно на імунологічних принципах алогенної трансплантації ТСКПК оскільки трансплантація КМ виконується все рідше.

Пересадка алогенною трансплантацією стовбурових гемопоетичних клітин проводиться з метою реконструкції імунної і кровотворної систем при наступних захворюваннях:

- гострі і хронічні лейкемії
- важкий комбінований імунодефіцит
- апластична анемія
- вроджені хвороби кісткового мозку

- незворотнє ураження кісткового мозку внаслідок застосування полі хіміотерапії як лікувального засобу.

За винятком дітей, з вродженими імунодефіцитами, реципієнт кісткового мозку вимагає інтенсивної підготовки для трансплантації з метою знищення його власної кровотворної системи і імунореактивності для створення мікросередовища в яке будуть засілятися донорські частково комітовані і імунокомпетентні клітини, а також для запобігання відторгнення трансплантата.

Підготовка реципієнта полягає у введенні асоціації мієлотоксичних алкілюючих препаратів (циклофосфамід), одночасно з імуносупресивними середниками або опроміненням всього тіла. У випадку пухлинних захворювань такий підхід проводиться з метою знищення пухлинних клонів, розсіяних в різних тканинах організму.

Кістковий мозок дорослої людини містить материнські клітини гемопоєзу, лімфопоєзу, а також дозрілі Т-лімфоцити. Після відповідного приготування реципієна і саме трансплантації донорських клітин всі елементи імунної системи (реципієнт-донор) повинні знаходитися в рівновазі. Перевага відповіді реципієнта може призвести до відторгнення кісткового мозку, домінування елементів донора – до розвитку хвороби „трансплантат проти господаря” (graft versus host disease – GVHD).

Ймовірність ризику відторгнення трансплантату зростає паралельно згенетичними відмінностями між донором і реципієнтом за HLA системою головного комплексу гістосумісності, оскільки молекули комплексу приймають активну участь в імунологічних реакціях (табл.9).

Таблиця 9.

Участь молекул I и II класів МНС в деяких імунних реакціях

Функциональна активність	Клас I	Клас II
Інтенсивність відторгнення алотрансплантата	++++	++
Індукція утворення антитіл	++++	++++
Стимуляція СКЛ	+	++++
Ініціація РТПГ	++	++++

Презентація антигена для цитотоксичних Т- клітин	++++	-
Презентація антигена для хелперних Т- клітин	-	++++

Процес відторгнення залежить від активності Т-лімфоцитів, а також НК-клітин.

Розрізняють гостру і хронічну хвороби GVHD. Гостра виникає впродовж 100 днів після пересадки трансплантата і з'являється у половини пацієнтів. Фактори ризику виникнення захворювання представлені у таблиці 9.

Таблиця 9.

Чинники ризику виникнення хвороби „Трансплантат проти господаря”

Гостра хвороба GVH	Хронічна хвороба GVH
Велика кількість Т-лімфоцитів кісткового мозку	
Несумісність HLA	Несумісність HLA
Трансплантація від жінки чоловікові	Трансплантація від жінки чоловікові
Похилий вік донора і реципієнта	Похилий вік донора і реципієнта
Попередні вагітності у донора	
Трансплантація без застосування імуносупресії	Перенесена після пересадки гостра хвороба GVH (більше двох разів)
Інфікуванням вірусом герпесу в анамнезі	Переливання лейкоцитів донора.
Застосування високих доз опромінення	

Основу хвороб складають імунологічні механізми: алореактивні Т-лімфоцити, що походять з пересадженого КМ, або СГКПК, інфільтрують в тканини господаря, проявляючи безпосередньо цитотоксичний ефект.

На ендотеліальних клітинах у задіяних органах з'являються молекули HLAII та адгезивні молекули. У ендотелії ідентифікуються головні лімфоцити з рецептором $TCR\alpha\beta$ і фенотипом $CD3^+CD45RO^+$, але в патогенезі також відіграють роль $CD4^+$ $CD8^+$. Ймовірно важливим для

виникнення хвороби є посилене виділення цитокінів у тканинах активованими лімфоцитами. Визначається значний ріст концентрації в плазмі $\text{INF-}\gamma$, GM-CSF, TNF, IL-1, -4, -6 (так звана цитокінова буря), причому частина з продукованих цитокінів виділяється активованими лімфоцитами донора (клітини NK). Подразником, що стимулює продукцію цитокінів є також ураження тканин в процесі підготовки до трансплантації, а також можливе після трансплантації інфікування. Про безпосередню роль цитокінів у патогенезі GVHD свідчать результати їх лікування специфічними антагоністами, оскільки ефективною профілактикою GVHD є застосування антитіл, що блокують TNF- α .

Віддалені симптоми пересадки стовбурових гемопоетичних клітин

Не дивлячись на відновлення роботи кровотворної системи у після трансплантаційному періоді певний час спостерігаються розлади в імунотворенні. Часто розвивається стан набутого імунodefіциту, що проявляється у недостатньому імунному реагуванні на неоантигени і в інфекційних ускладненнях. Механізми цих розладів остаточно не в'яснені, але те, що виникають певні труднощі в „навчанні” підсажених імунотворних клітин (Т-лімфоцитів) в новому середовищі є безперечним. Відома також явище активації специфічних і неспецифічних супресорних лімфоцитів. Хронічна хвороба „Трансплантат проти господаря” виникає у 20 – 30% хворих, після трансплантації стовбурових гемопоетичних клітин, головним чинником у виникненні якої є перенесена GVH. Хронічна хвороба спричиняє гематологічні розлади і рецидивуючий імунodefіцит.

Реакція „трансплантат проти лейкої” – означає реакцію клітин донора на антигени, що знаходяться на клітинах новоутвору. Важають, що існує незалежно від GVH складова реакції GV L, за яку можуть відповідати NK-клітини.

Індукція трансплантаційної толерантності.

В експерименті можна достатньо легко викликати стан толерантності до алоантигенів. У клінічній практиці це явище, коли у реципієнтів після

трансплантації, на тлі припинення застосування імунодепресанів, не відбувається відторгнення трансплантата спостерігається нечасто.

Визначені наступні механізми можливої толерантності на алоантиген:

1. Клональна анергія – контакт T -лімфоциту з клітиною, що має антиген, котрий розпізнається його рецептором, але позбавленою молекул, які дають другий сигнал активації, що спричиняє стан, названий анергією. Клональна анергія може бути основою толерантності трансплантату, пов'язаної з поняттям **мікрохімеризм, коли спостерігаються у реципієнта імунокомпетентні клітини особистої специфічності і специфічності донора.**
2. Клональна делеція – у ході розвитку імунної системи аутореактивні T -лімфоцити елімінують з тимусу. Існують передумови стверджувати, що клональна делеція відбувається в інших тканинах поза тимусом і може спричинити толерантність на антигени донора.
3. Перевага активації T -лімфоцитів хелперів 2 – це явище було виявлено в експериментальних дослідженнях. Цитокіни, які виділяються лімфоцитами $Th2$, гальмують проліферацію і активацію цитотоксичних лімфоцитів шляхом безпосередньої дії на клітини.
4. Супресія. У носіїв трансплантованих органів описано виникнення специфічних в неспецифічних супресорних лімфоцитів. Гальмуючий вплив на галогенний трансплантат можуть викликати антитіла, які зв'язують алоантигени на поверхні клітини, не активуючи комплементу.
5. „Імунне привілеювання. Єдиними місцями в нашому організмі, де галогенні і ксеногенні трансплантати не піддаються відторгненню, або, принаймі час їх життя є подовженим, називають привілейовані імунні місця. До них відносяться: передня камера ока, печінка, яєчко, мозок, хрящ, щитовидна залоза, наднирники і плацента.

На сьогодні імунні механізми, що зумовлюють дефіцит імунних реакцій на трансплантат детально не вивчені. Як клінічний протокол трансплантації, що індукує толерантність пропонується пересадка органа з

одночасним введенням до стовбурових клітин кісткового мозку реципієна генів, що кодують алоантигени донора.

Таким чином, подальший розвиток вивчення імуногенетичних механізмів трансплантаційної індукції і толерантності, можливість модифікації клітин донора методами генної інженерії будуть сприяти перспективі даного наукового і практичного напрямку, оскільки саме трансплантаційна терапія часто є єдиним шансом для продовження життя людини.

РОЗДІЛ 10

Стовбурові клітини

Загальна характеристика

Бурхливий розвиток новітніх біотехнологій в останні роки ХХ сторіччя не тільки призвели до формування нових напрямків фундаментальних досліджень, але і дозволили швидко реалізувати їх набутки в різних галузях біології і медицини. Це у значній мірі торкається і біології стовбурових клітин, для яких факт реального існування підтвердився на рівні генетичного маркування і визначення функціональних властивостей ще у 1961 році.

Можна говорити про сенсаційний ефект даного наукового відкриття. Дійсно, що приголомшуючими були дані відносно можливості до **диференціації** дорослих диференційованих клітин, яка була продемонстрована при клонуванні вівці (Доллі), виявлення дорослих стовбурових клітин в усіх органах і тканинах людини.

Не менш сенсаційним був доказ можливості відновлення ушкодженого головного мозку за рахунок особистих стовбурових клітин (СК). Були доказані неймовірні потенціали ембріональних стовбурових клітин, отримання з них гамет, які здібні утворювати зиготи. Почався науковий бум по вивченню усіх можливих властивостей стовбурових клітин: диференціювання, метаболізму, фенотипу, морфо-функціональних,

імунологічних, регенеративних властивостей. Наукові факти, які отримали дослідники були незвичайними в розумінні жорстких біологічних законів, **зокрема властивості стовбурових клітин дозволили розглядати їх як джерело самовідновлення всіх тканин і органів людини (рис.1)**, що, в свою чергу, відкривало непередбачені можливості в регенеративній медицині.

Отримані результати вже сьогодні дозволили переглянути цілий ряд біологічних догматів ембріогенезу і онтогенезу і, зокрема, регенерації клітинних і тканинних структур а також трансплантації ембріональних, мезенхімальних і гемопоетичних стовбурових клітин.



Вже досить повно вивчені молекулярно-генетичні механізми підтримки плюро-потентності ембріон-нальних стовбурових клітин і включення їх до процесу диферен-ціювання. Велика увага приділена питанням внеску мікрооточення в ці процеси.

Рис.1 – Диференціювання стовбурових клітин.

Характерним для даного напрямку біології є виключне практичне значення в контексті використання наукових набутків для відновлення і підтримки нормального гемопоезу та імунного гомеостазу людини (рис. 2).

Стовбурові клітини вважаються недиференційованими клітинами, які мають властивості самооновлення (self-renewal), є

джерелом таких ж недиференційованих клітин, а можуть продукувати т одного і більше типів високодиференційованих нащадків.

Структура генеалогічного древа нащадків стовбурової клітини може бути представлена у вигляді без кінцевого фрактала. Поняття потентності розглядається з точки зору повноти реалізації морфогенетичної інформації нащадками стовбурової клітини. Якісно потентність має чотири рівня:

тотипотентність – здібність давати початок росту всього організму;

плюрипотентність – здібність відтворювати будь - яку тканину зрілого організму; **мульти(полі)потентність** – здібність започатковувати більш ніж один тип диференційованих клітин; **моно(уні)потентність** – спроможність

продукувати однорідний, однотипний пул диференційованих клітин, що може бути використано для визначення рівня потентності клітин-

прогеніторів – безпосередніх нащадків мультипотентних стовбурових клітин (МСК) з певним і обмеженим сектором диференціації.

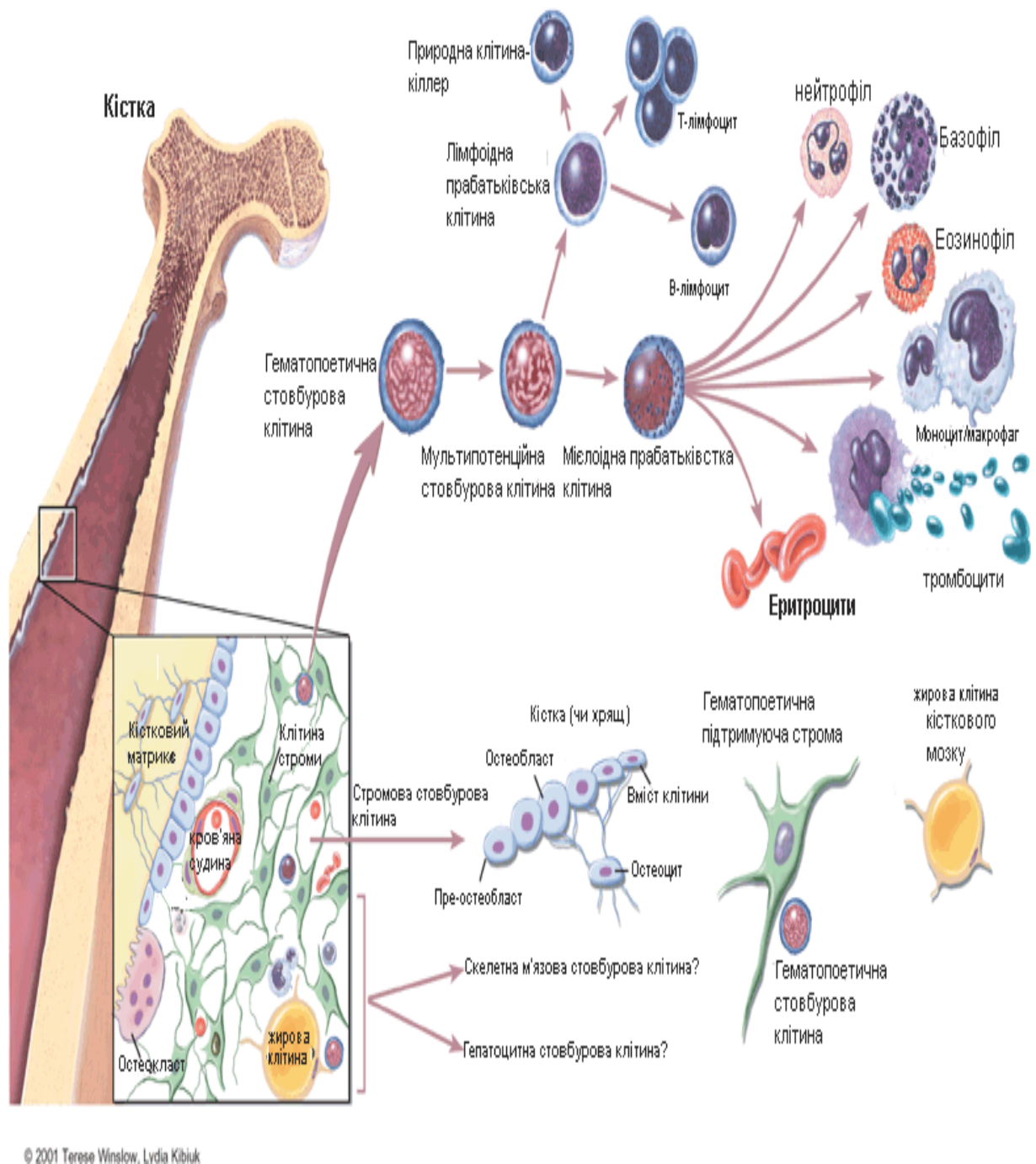


Рис.2 – Роль стовбурової клітини у гемопоезу та імунному гомеостазі.

До мультипотентних стовбурових клітин відносять НСК, стовбурові клітини, які приймають участь у гемопоезі (ГСК), загальні попередники лімфо- і мієлопоеза, а також епідермальні і ентодермальні (інтестинальні) стовбурові клітини. Важливою ознакою як плюрипотентних стовбурових клітин так і МСК є відносно низька частота їх мітотичного поділення. На сьогодні, відносно загальних аспектів комікування генетичної експресії в процесі

диференціації плюрипотентних стовбурових клітин, вважається, що рестрикція напрямку диференціації ЕСК приймають участь наступні фактори: GATA-2, Tef-4, Okt4, Mash1, LH2, SCL/tal-1.

Клітини нормальної тканини мають високу мітотичну активність. Їх можна розділити на **прогенітори** (progenitor sell) і **прекурсори** (precursor sell). Найбільш часто у сучасних наукових розробках використовують наступний варіант термінів прогенітори і прекурсори:

- **прогенітори** це клітини, які втратили здібність до само відтворення. *Широта реалізації фенотипового потенціалу першої в генеалогічному дереві тканинного діфферона прогеніторної клітини не повинна кардинально відрізнятися від широти морфогенетичного потенціалу стовбурової клітини тканини.*
- **прекурсори** це комітовані клітини – попередники певного виду, які мають мітотичну активність. *Широта реалізації фенотипового потенціалу на рівні прекурсорної клітини звужується до утворення певного виду диференційованих клітин тканини, наприклад, нейронів.*

Перші відповіді на питання дослідників відносно специфічності диференцировки даних клітин виявились непередбаченими. Дійсно, згідно класичним законам біології кровотворна стовбурова клітини повинна продукувати клітини гемопоезу а не клітини інших тканин. Якщо це стовбурова клітина шкіри, то вона повинна диференціюватись в кератиноцити, або у фібробласти, які у великій кількості присутні в шкірі. Але експериментальні дані свідчили зовсім про зворотне. Виявилось, що майже „регіональна” клітина за місцем локалізації може давати клітину будь-якої диференціації. Наприклад, з мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку можуть утворюватись клітини навіть усіх зав’язкових листків.

Особливо багато уваги дослідники приділяли гемопоетичним клітинам. Це не дивно, враховуючи факт важливості гемопоетичних структур

для підтримання гомеостазу людини, а також доступності в отриманні стовбурових клітин з периферичної і кордової крові. В наш час з клітин кровотворного ряду відтворюють практично всі клітини людини: М'язові, нейрони, остеобласти, гепатоцити, епітеліальні та інші (рис. 3).



Рис.3- Можливі джерела дорослих стовбурових клітин [4].

Такі властивості притаманні не тільки популяції стовбурових клітин які несуть функції гемопоєзу. Ні, навіть жирова тканина має свої популяції стовбурових клітин, з яких не тільки утворюються адипоцити, але і йде їх диференціація в різні тканини людини. Всі наведені вище здобутки наукових розробок отримані експериментально. А як же всі ці процеси відбуваються в цілісній біологічній системі – організмі людини?

В самому організмі всі процеси диференціації стовбурових клітин відбуваються за загальними біологічними законами, тобто так, як повинно бути – у кістковій тканині не продукуються нейрони і клітини головного мозку гепатоцити не продукують. Проте в експерименті відносно спектрів диференціювання стовбурових клітин знайдені технології, які можуть змінювати програми стовбурових клітин. Ми вже згадували про клонування вівці Доллі (рис. 4) – коли соматична клітина дорослого організму була

переведена до нульового програмного стану і фактично була переведена в зиготу, але не за *походженням*, а за *станом*.



Рис.4 - Фотографія першої клонованої тварини – вівці Доллі.

Важалось, що Доллі мала сумарний біологічний вік, який складався з віку донора від якого була отримана соматична клітина і особистого віку після народження. Саме тому у Доллі ще в період формальної молодості почали проявлятися патології похилого віку і вже через місяць після народження вона була омертвлена.

Під час клонування Доллі до енукейованої яйцеклітки було введено не ядро соматичної клітини, а соматична клітина повністю. Тобто енукейована яйцеклітина в даному випадку виконувала роль специфічного субстрату для повної дедиференціації, а потім, при ембріогенезі – для повної диференціації в усі клітини ягня ядра дорослої соматичної клітини. Завдяки цьому експерименту стало ясно, що технологічно в Ноосфері з біологічним об'єктом, зокрема на рівні людського організму, принципово можна робити все що забажається, що склало підґрунтя ідеї відносно можливості відновлення ушкоджених органів і тканин, а також клонування людини.

На сьогодні в регенеративній медицині чітко окреслились два основних напрямки розвитку, які є взаємопов'язаними:

1. **Відтворення тканин, фрагментів органів і самих органів поза організмом.** В таких випадках стовбурові клітини беруть саме з даного організму з наступним введенням отриманого аутотрансплантата реципієнту. Так, наприклад, вирощують шкіру для трансплантації, яку завдяки сучасним біотехнологіям вирощують одразу багатошарною, з зовнішнім роговим шаром, утвореним з кератиноцитів і термальних фібробластів, об'єднаних єдиним екстраклітинним матриксом. Цей матрикс вже через місяць після трансплантації проростає новоутвореними кровоносними судинами.
2. Другий напрямок – **відновлення ушкоджених фрагментів тканин безпосередньо в організмі людини.** В цьому напрямку найбільш інтенсивно вивчається і досліджується вже в клінічній практиці кардіоміопластика – відновлення внаслідок інфаркту ушкоджених ділянок серця. Проводяться також інтенсивні дослідження по відновленню ураженого мозку при інсультах і хворобі Паркінсона, відновленню ушкоджених кісток, м'язів судин, елементів ока, які вже виконуються і поза організму.

Щоб продемонструвати силу і можливості будь-якої, навіть фантастичної регенерації, на спині імунодефіцитної (для запобігання відторгнення) миші виростили вуха людини (рис.5).



Незважаючи на великі здобутки в галузі відтворення цільних функціонально повноцінних органів людини ще передчасно виносити в окрему галузь медицини.

Рис.5 - Вухо людини, яке вирощене на спині безтимусної миші.(1)

Тобто, на основі використання безмежних регенеративних властивостей стовбурових клітин (рис. 6) різного походження сформувався новий напрямок в лікуванні хвороб людини – **регенеративно-пластична медицина**. При цьому **пластичність розуміють як здібність екзо- і ендогенних стовбурових клітин імплантуватися і давати початок новим спеціалізованим клітинним паросткам в ушкоджених тканинних зонах організму.**

Але цей напрямок є вельми перспективним для терапії невиліковних на наш час захворювань, зокрема спадкової патології, для якої методи традиційної медицини передбачають тільки симптоматичний ефект. Одночасно застосування стовбурових клітин для генотерапії хвороб людини відкрило нові перспективи в розширенні спектру високоефективних терапевтичних заходів, але поставила цілу низку нових завдань перед клініцистами і експериментаторами.

По-перше, проблеми генотерапії пов'язані з розробкою безпечної і ефективної системи транспорту гена в клітину-мішень. На даний момент ефективність переносу генів в клітини людини є замалою – (0,1 -1%). Перенос гену *in vitro* відбувається за рахунок трансфекції генетичного матеріалу в клітини пацієнта, які знаходяться в культурі, з наступним поверненням їх до організму хворого. Даний підхід визнано оптимальним при використанні генів, які введені в стовбурові клітини кісткового мозку, оскільки саме ці методи опрацьовані краще за інші.

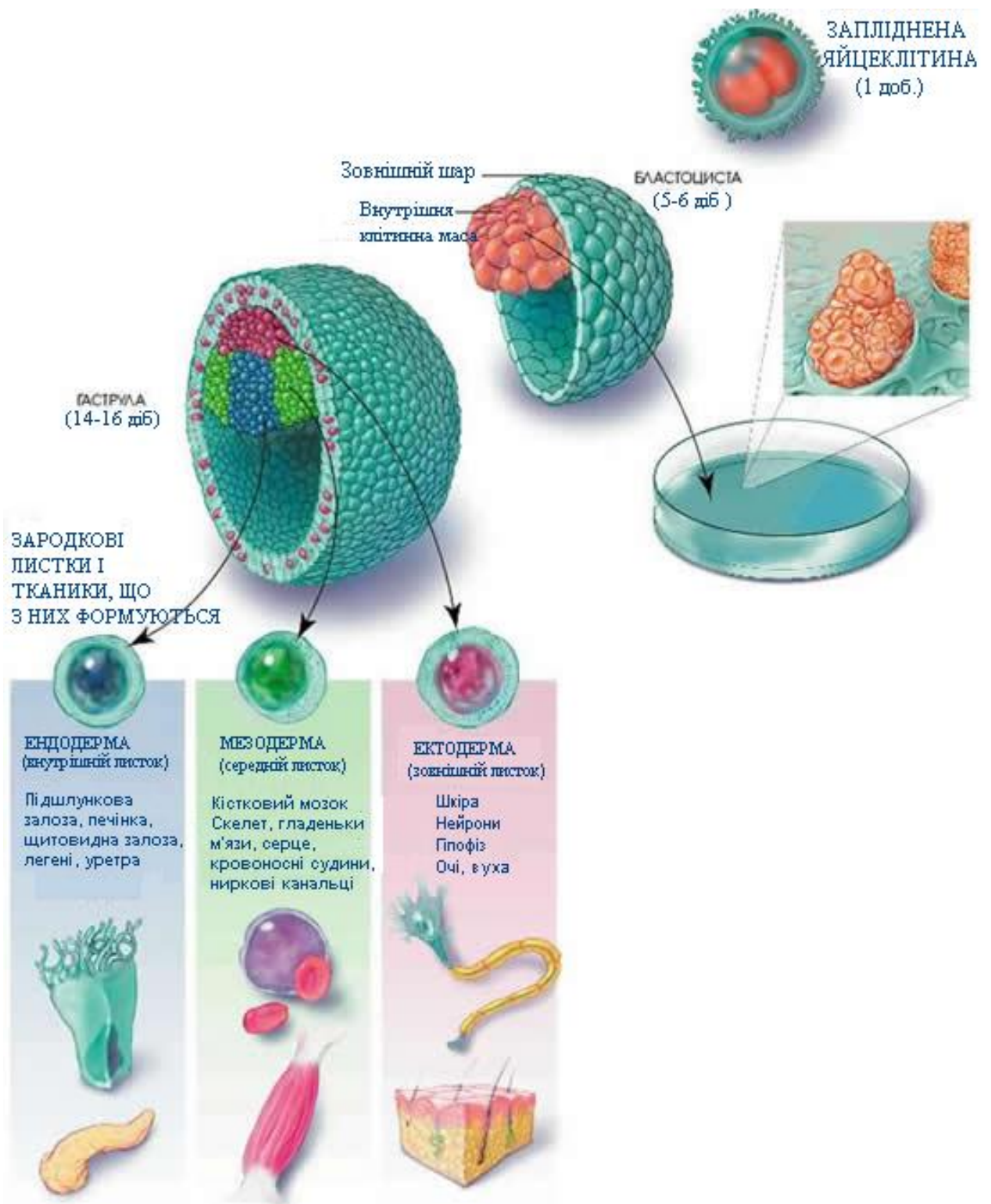


Рис.6 – Гістологічна схема утворення різних тканин.

Частіше за все для переносу гена в гемопоетичні клітини використовують ретровіруси. Але основна маса стовбурових гемопоетичних клітин знаходиться у стані спокою, що перешкоджає транспорту генетичної інформації за допомогою ретровірусу.

На сьогодні популярними стали інші методи переносу генів, зокрема трансфекція та пряма мікроін'єкція ДНК в клітини, ліпофекція, електропорація, „генна рушниця”, механічне з'єднання за допомогою скляних бус, трасфікування гепатоцитів рецепторозалежними сполученнями ДНК з асіалоглікопротеїном, а також аерозольне введення транс гена в клітини альвеолярного епітелію легенів. Ефективність вищенаведених методів знаходиться в межах від 10,0 до 0,01%, тобто, в залежності від метода введення генетичної інформації успіх може спостерігатись у 1- хворих з 100, або у 1 хворого з 10000 пацієнтів. Всі ці дані свідчать про необхідність пошуку нових безпечних і ефективних методів маніпуляції з генами і стовбуровою клітиною.

Неможливо обминути біоетичні аспекти клітинної терапії, оскільки розвиток білетики як одної з форм філософії життя пов'язане з процесом еволюції. Термін „біоетика” сформульован В.Портером в 1969 році, має міждисциплінарний характер і охоплює весь спектр взаємовідносин людини з рослинним і тваринним світом, а також аксіологічних проблем професійної діяльності суміжних з медичною, а також цілу низку соціальних проблем в різних сферах системи охорони здоров'я.

Спектр проблем медичної білетики охоплює моральні і філософські аспекти абортів, контрацепції, нових репродуктивних технологій, проведення експериментів на людині і на тваринах, захист прав пацієнтів, дефініцію смерті, еутаназію, відношення до хоспісів, вакцин і хворих на СНІД. Крім того, до спектру питань білетики належить демографія, планування сім'ї, геномні дослідження, генна інженерія і генна терапія.

Отже, не викликає сумніву, що прогрес медицини неможливий без постійних клінічних випробувань на пацієнтах. В даному випадку отримані об'єктивні знання мають фундаментальну суспільну цінність і виправдовують можливий ризик для фізичного і соціального благополуччя осіб, які виступають в якості об'єктів дослідження. Вважається, що в моральному відношенні прийнятними є умови, при яких індивід інформований відносно всіх медичних і соціальних аспектів дослідження,

має законні права на захист і дає письмову інформовану згоду на експеримент.

Таким чином, розвиток клітинних технологій в експериментальній і клінічній медицині є складним багатоетапним процесом, який передбачає конструктивну співпрацю дослідників і медиків багатопрофільних наукових і лікувальних центрів і міжнародної наукової спільноти. Але можливі результати застосування методів регенеративної медицини для відновлення здоров'я людини варті тих моральних, наукових і практичних затрат, які зараз так активно обговорюються в усьому світі.

Стовбурові клітини і їх відмінні властивості

Розрізняють два типи стовбурових клітин (СК):

1. Плюропотентні стовбурові ембріональні клітини, які отримують з бластоцисти.

2. Дорослі стовбурові клітини (мультипотентні і уніпотентні), які визначаються в різних біологічних тканинах.

Дані групи СК мають відмінності як одна від одної так і від СК нащадків за сполученням фенотипових, морфофункціональних, цитологічних ознак, за рецепторами клітинної поверхні і факторами транскрипції.

Виключно усі стовбурові клітини, незалежно від походження, мають три загальні властивості:

- 1. здібність до ділення і відновлення на протязі тривалого терміну;**
- 2. неспеціалізованість;**
- 3. здібність започатковувати спеціалізовані типи клітин.**

Відносно відмінних властивостей між ЕСК і СК, то вони торкаються питання відносно можливостей ЕСК проліферації без диференціювання в умовах *in vitro* більше року, натомість більшість дорослих СК такої властивості не мають. Під впливом яких чинників в біологічній системі

регулюється швидка проліферація і самооновлення стовбурових клітин. Відповіді на ці питання ще в майбутньому. Розв'язання саме цих питань буде сприяти розумінню механізмів регуляції проліферації клітини на рівні зародкового розвитку або в процесі формування пухлинного клону клітин.

Стовбуровим клітинам притаманна важлива властивість – вони не мають ніяких тканиноспецифічних структур, які виконують спеціальні функції в регуляції імунного гомеостазу. Стовбурові клітини також не мають властивості переносити молекули кисню як еритроцити, не можуть проводити електрохімічні сигнали в інші клітини подібно нервовій, не взаємодіє з іншими клітинами при виконанні функції останніми по здійсненню кровообігу. На відміну від спеціалізованих клітин (клітини крові, нейрони) СК клітина здібна ділитися і відновлюватися навпротязі тривалого часу, тобто – проліферувати.

Популяція стовбурових клітин, які проліферують впродовж багатьох місяців в умовах лабораторії здатні продукувати мільйони клітин. Якщо при цьому кінцеві клітини залишаються неспеціалізованими (як батьківські) то їх вважають здібними до довгострокового самовідновлення.

Плюріпотентні лінії клітин. Лінії плюрипотентних клітин визначаються їх походженням. На даному етапі розвитку біотехнологій по вивченню стовбурової клітини використовують як модель лінії клітин з різнонаправленим потенціалом (рис. 7), оскільки є певні труднощі при використанні для наукових завдань ембріонів ссавців.

Клітини ембріональної карциноми. Клітини ембріональної карциноми (ЕК) можна отримати зі спонтанної тератокарциноми (яєчника). Лінії даних клітин можна отримати також шляхом пересадки нормальних бластоцист або зародкових гонадних гребнів в організм дорослої миші. Клітини ЕК є плюріпотентними. Доведено, що вони здатні інтегрувати до зародкових ліній мишей.



Певні лінії ЕК мають обмежений потенціал розвитку і можуть диференціюватися тільки в одну або дві похідні, інші лінії утворюють лише тератоми. Клітини ЕК знайшли використання в якості моделей лінійної агрегації при диференціюванні під впливом факторів росту.

Рис.7 - Лінії стовбурових клітин з різнонаправленим потенціалом.

Ембріональні статеві клітини. Дана група плюрипотентних клітин може бути отримана при „перепрограмуванні” початкових статевих клітин, з котрих формуються яйцеклітини і сперматозоїди в плюрипотентні ембріональні герменальні клітини (ЕГК) в культуральному середовищі, який вміщує фактор пригнічення лейкемії (LIF), фактор стовбурових клітин і фактор-2 росту фібробластів (FGF-2). Доведено, що клітини втілюються в зародкові лінії у транс генних тварин, але мають обмежені здібності до росту і диференціації. Були отримані лінії ЕГК миші і людини, які диференціювалися як ембріональні тілця в клітини багатьох типів.

Ембріональні стовбурові клітини. На початку 80-х років одразу ж в кількох лабораторіях світу були отримані для культивування в поживному середовищі клітини з серединної клітинної маси 3,5 добового зародку - це бластоцида, яка вміщує близько 50 клітин. З того моменту було отримано ЕСК від багатьох видів тварин, в тому числі і від людини. Найбільш вивченими вважаються ЕСК миші.

Сам по собі потік інформації від ДНК через іРНК в трьохмірний простір конформації білків не може пояснити алгоритм стовбурових клітин, оскільки під впливом екзогенних сигналів одна ЕСК може перетворитись на зародок або в лінію спеціалізованих соматичних клітин. Встановлено, що в

процесі ембріогенезу функцію носія інформації (іРНК) забезпечують клітини провізорних органів з „мінімальним фенотипом”. Клітини провізорних органів зародка існують дуже короткий час тільки для переносу і реалізації програм ембріогенезу.



Ембріональні клітини є безмежним джерелом для генної терапії при умові точного контролю за диференціюванням клітини (рис.8).

Рис.8 – Утворення і диференціація стовбурових клітин.

Дорослі стовбурові клітини. Дорослі стовбурові клітини є недиференційованими і знаходяться серед диференційованих клітин тканини чи організму, мають здатність самооновлюватись, давати початок спеціалізованим клітинам даної тканини або органу і мають означальну функцію – підтримання і встановлення тканини в якій вони знаходяться. На відміну від зародкових СК, походження яких визначено, природа дорослих СК в зрілих тканинах ще невідома. Дорослі СК мають також властивість давати початок іншим спеціалізованим клітинам, які характерні для інших тканин. Це явище отримало назву транс диференціація або пластичність (рис.9).

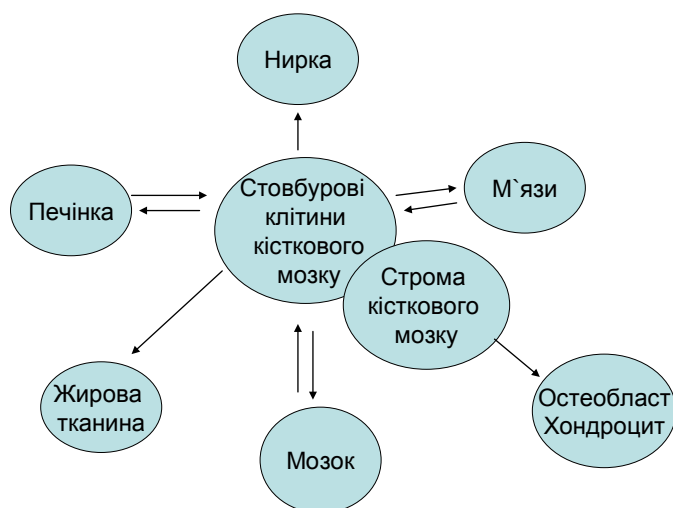


Рис.9 - Пластичність стовбурових клітин [4].

Дорослі стовбурові клітини печінки є клітинами які можуть давати початок клітинам продуцентам інсуліну; гемопоетичні СК, які можуть диференціюватись в клітини серцевого м'язу. Саме за цими властивостями дорослі стовбурові клітини стали пріоритетними у вивченні можливостей використання клітинної терапії у регенеративній медицині.

Прикладом може бути факт лікування нейродегенеративної патології – хвороби Паркінсона, яка викликана прогресивною дегенерацією і втратою дофамін (ДА)- продукуючи нейронів, що є підґрунтям тремору, ригідності і гіпокінезії. Сама хвороба на даний час є поширеною і має тенденції до „змолоджування”, що знижує не тільки медичні, але і потенційні соціальні можливості для індивіда і популяції в цілому. Хоча переважну кількість хворих складають особи з віком від 65 років. Перші спроби лікування даної патології шляхом клітинної терапії свідчать про перспективність лікування шляхом трансплантації СК.

В організмі дорослі СК можуть ділитися протягом тривалого періоду і давати початок іншим зрілим клітинам, які мають характерну будову і специфічні функції.

Розрізняють різні типи СК:

Гемопоетичні СК, як мезенхімальні клітини-попередники є мультипотентними, дають початок усім типам клітин крові – еритроцитам, тромбоцитам, Т і В -лімфоцитам, натуральним кілерам, моноцитам, макрофагам, базофілам, а також спеціалізовані тканинні клітини імунної системи (рис.10). Ще у 1909 р. А. Максимов вперше запропонував гіпотезу відносно існування загального попередника усіх клітин крові і запропонував сам термін «стовбурова клітина». СК мають дуже високий потенціал утворення маси

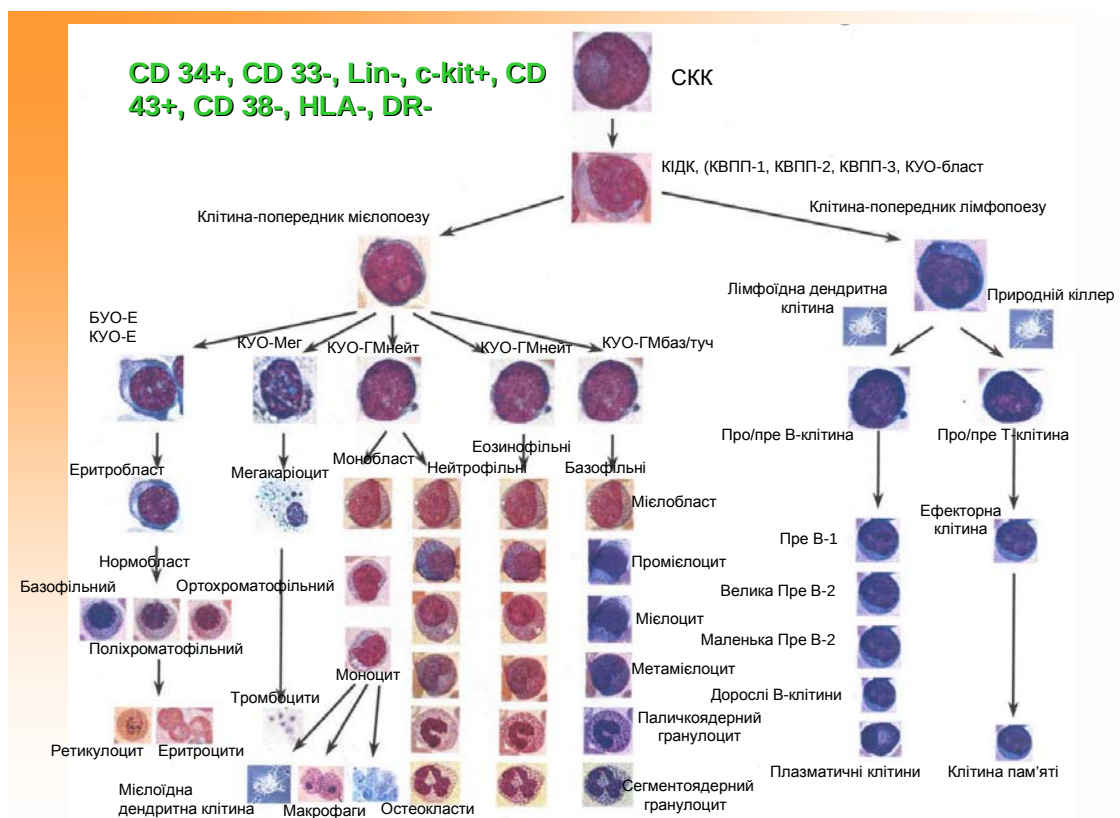


Рис.10. – Гемопоетичні стовбурові клітини.

Основними характеристиками стовбурових гемопоетичних клітин є:

- самопідтримування;
- здатність до диференціювання у всі типи гемопоетичних клітин;
- здатність до репопуляції;
- резистентність до цитотоксичного ефекту

- 5-флюороцилу, бромдеоксиуридину, оксисечовини;
- незначне утримування суправітального флюорохрому родамін-123
- знаходження поза клітинним циклом.

Джерела отримання стовбурових гемопоетичних клітин:

- Кістковий мозок (BM)
- Мобілізована периферійна кров (PBSC)
- Кордова кров (CB)
- Аорто-гонадо-мезонефрос (AGM)
- Клітини ембріональної печінки (FLC);
- Плацента (P)

Трансплантація кровотворних стовбурових клітин є високоспеціалізованим методом лікування, під здійсненням якого мають на увазі приживлення певному індивідууму введених внутрішньовенно ГСК, вилучених із організму самого індивідуума (аутологічна трансплантація), або із організму донора (алогенна трансплантація). Головною метою трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин є відновлення гемопоетичної системи після проведення мієлоаблативного режиму хіміотерапії, або при піражених імунodefіцитах (рис. 11).

Днем народження ТГСК слід вважати 1939 рік, коли вперше повідомлено про внутрішньовенне переливання хворому на апластичну анемію 18 мл кісткового мозку від його брата. Значного розвитку клінічна ТГСК набула після фундаментальних досліджень, зроблених Mathe, McFarland і Thomas на початку 60-х років XX-го сторіччя. Піонери клінічної трансплантології продемонстрували, що гемопоєз опромінених в летальних дозах експериментальних тварин може бути відновлений приживленням гемопоетичних стовбурових клітин. в кінці 60-х здійснено першу повноцінну ТГСК людині.

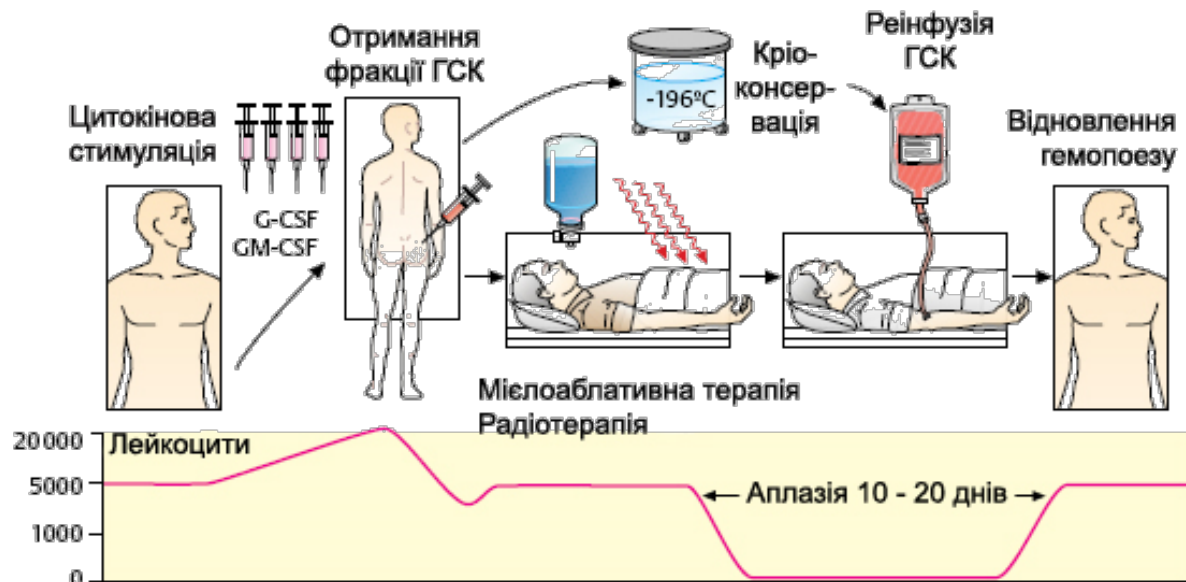


Рис.11 – Трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин.

Починаючи з 70-х років, метод стає рутинною процедурою, яка стала використовуватися для лікування вроджених імунodefіцитів, аплазії кровотворення і пухлинних захворювань системи крові. У 1989 році виконана перша трансплантація пуповинної (кордової) крові дитині з анемією Фанконі. Починаючи з 90-х років, стовбурові клітини периферичної крові витісняють кістковий мозок з числа домінуючих джерел гемопоетичного відновлення під час аутологічних, а з 2000-х років і під час алогенних трансплантацій [4].

Класичним субстратом для трансплантацій стовбурових гемопоетичних клітин, як при алогенній так і при аутологічній трансплантації, є кістковий мозок. Останніми роками переваги набувають СКПК, оскільки на відміну від клітин кісткового мозку, вони сприяють більш швидкому відновленню гемопоєзу реципієнта. На сьогодні при проведенні аутологічної трансплантації периферична кров є джерелом стовбурової клітини приблизно у 95% випадків, значно підвищується також частота застосування СКПК при проведенні галогенної трансплантації.

За даними центру міжнародних досліджень трансплантації кісткового мозку CIBMTR (Center for International Blood and Marrow Transplant Research)

станом на кінець 2010 року загальна кількість алогенних трансплантацій ГСК становить 16 тис. за рік, аутологічних – 14,3 тис. за рік.

Стрімке збільшення числа пересадок гемопоетичних стовбурових клітин у всьому світі, із посиланням на CIBMTR (рис. 12), вимагатиме створення нових стратегічних рішень, удосконалення та універсалізації апаратного забезпечення, для проведення таких трансплантацій

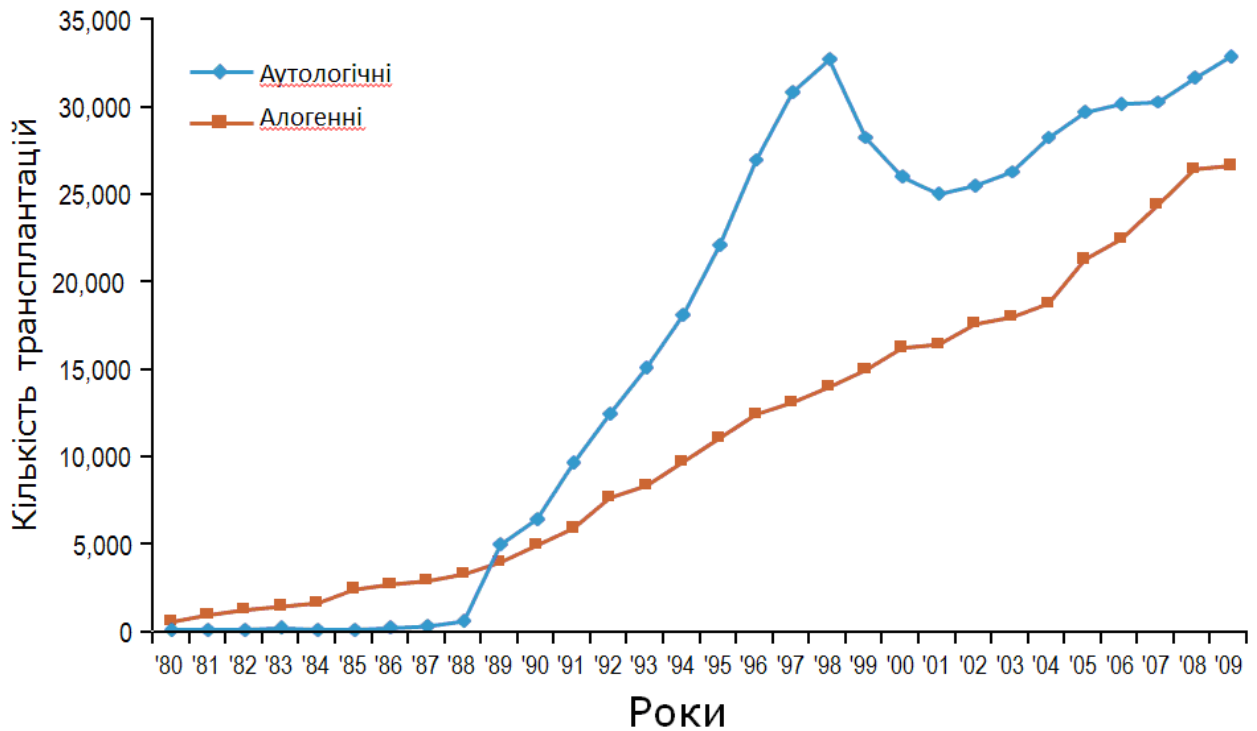


Рис. 12. - Графік, що демонструє зростання кількості алогенних та аутологічних трансплантацій ГСК у світі в період з 1980 до 2009 року (за даними CIBMTR)

На сьогоднішній день існує велике різноманіття методів виділення та очищення кровотворних стовбурових клітин з різних біологічних субстратів, проте існує нагальна потреба у створенні уніфікованої стратегії проведення колекції ГСК, що враховувала б антропологічні особливості пацієнта, характер основного захворювання, його стадії та визначала б оптимальні шляхи одержання високоякісного трансплантату.

Незважаючи на те, що гемопоетичні стовбурові клітини (ГСК) є складовою більшої частини відомих біологічних субстратів, для клінічного

застосування можна використовувати лише клітини кісткового мозку, периферичної крові, плацентарної (пуповинної) крові та мезенхимальні клітини.

Вимогами до кожного субстрату є отримання такої кількості клітин, яка може забезпечити в досить короткий термін (протягом 2–4 тижнів) повне і стійке відновлення гемопоезу і функцій імунітету. При цьому клітини повинні мати певні морфофункціональні та імуногенетичні властивості, незалежно від того, з яких джерел вони були отримані.

Експериментально встановлений факт циркуляції стовбурових кровотворних клітин у периферичній крові дозволив розглядати цю тканину як самостійне джерело кровотворних клітин. Периферична кров дорослої людини містить лише невелику кількість стовбурових клітин (близько 0,1%), однак, при інтенсивній стимуляції ростовими факторами їх вміст підвищується до 1–2%. При обробці 2–4 об'ємів циркулюючої крові можна зібрати достатню для трансплантації кількість ГСК.

Всі основні методи отримання кровотворних стовбурових клітин можна розділити на дві групи (табл. 1).

Таблиця 1

Характеристика основних груп методів виділення ГСК

Характеристики групи методів	Група методів	
	1	2
Природа методу розділення	Фізична	Фізико-імунологічна
Унікальна властивість компонентів цільової фракції	Густина клітин цільової фракції	Наявність поверхневих маркерів CD34
Рушійна сила процесу розділення	Поле гравітаційної або відцентрової сил	Постійне магнітне поле; сила хімічних зв'язків між комплементарними

		антитілом та поверхневим рецептором
Основні методики виділення цільової фракції	1. Розділення в градієнті щільності на основі фіколу; 2. Аферез (лейкоферез); 3. Відстоювання.	Магнетично активоване сортування клітин.

Необхідно зазначити, що кожний наведений метод вилучення гемопоетичних стовбурових клітин має свої унікальні властивості, а також недоліки та переваги стосовно застосування у конкретному випадку. Окрім цього, важливо відзначити, що універсальних методів виділення ГСК на сьогоднішній день не існує, тому поняття оптимального (найефективнішого) методу можна вживати лише у прив'язці до конкретних умов процесу (об'єм, природа субстрату; призначення, а також необхідна чистота кінцевого продукту).

Одержання фракції мононуклеарів шляхом сепарації в градієнті щільності середовища. Для одержання фракції мононуклеарів застосовують декілька методик сепарації в градієнті щільності. Градієнт щільності готується на основі фіколу з додаванням р-ну верографіну. Застосовують розчини різної густини (1,063; 1,077; 1,094 г/мл).

З метою виділення мононуклеарної фракції стерильною піпеткою нашаровують 3 мл гепаринізованої крові, розведеної розчином Хенкса у співвідношенні 1:1 на градієнт щільності фікол-верографін (1,063; 1,077; 1,094 г/мл). Центрифугують при 1500 об/хв впродовж 20 хвилин. Після розділу вмісту пробірок на 4 шари (плазма з розчином Хенкса, кільце мононуклеарів, кільце градієнту щільності, еритроцитарна маса) стерильною пастерівською піпеткою відбирають та переносять кільце ядровмісних клітин в іншу стерильну пробірку (рис. 13).

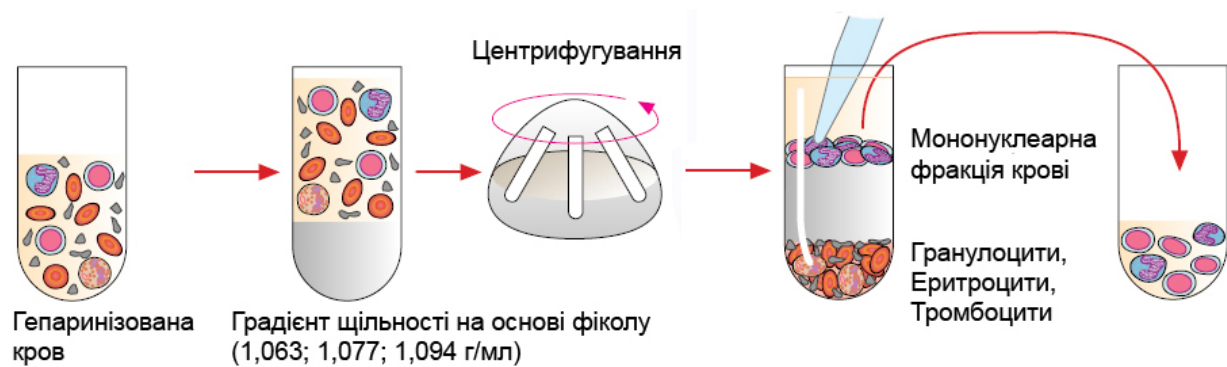


Рис. 13. - Одержання фракції мононуклеарів крові шляхом розділення в градієнті щільності [24]

Відмивають двічі живильним середовищем RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) із додаванням 10% ембріональної телячої сироватки. Кількість мононуклеарів, яка повинна бути не менше 1,5 млн. на 1 мл, підраховують в камері Горяєва. Отримані клітини ресуспендують в культуральному середовищі RPMI із доданням 10% ембріональної телячої сироватки. Для подальшого зберігання при температурі -196°C (у рідкому азоті) в якості кріопротектора до суспензії клітин додають 10% р-н ДМСО.

Одержання фракції мононуклеарів із периферичної крові методом аферезу. Аферез (від гр. αφαίρεσις – відбирання) – це метод отримання окремих фракцій крові шляхом її сепарації на спеціальній центрифугі. Принцип роботи аферезної системи базується різниці густини клітин та швидкості їх осадження за рахунок різних розмірів. Дана методика передбачає використання особливої центрифуги (рис. 14), яка дозволяє в процесі своєї безперервної роботи відбирати необхідні шари плазми і клітинної маси.

Розрізняють декілька різновидів аферезу:

- *плазмаферез* – виділення плазми крові та повернення еритроцитів;
- *тромбоферез* – виділення тромбоцитів з невеликою кількістю плазми та повернення крові з еритроцитами пацієнту;
- *цитаферез (лейкоферез)* – виділення клітинних компонентів крові з метою їх модифікації та повернення пацієнту.

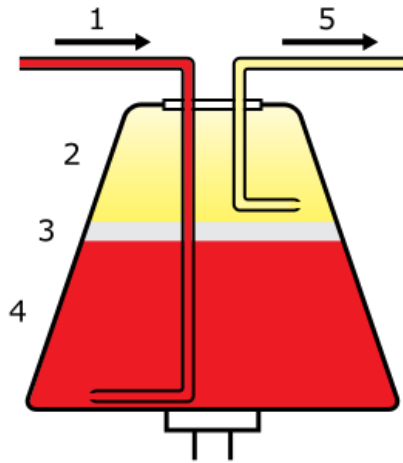


Рис. 14 - Принципова схема аферезного апарату безперервного току, де: 1. Вхід цільної крові від донора/пацієнта. 2. Шар плазми крові. 3. Шар лейкоцитів. 4. Шар еритроцитарної маси. 5. Відбір необхідної фракції.

З метою одержання гемопоетичних стовбурових клітин, проведення аферезу супроводжується підключенням пацієнта до аферезного апарату, який відбирає його венозну кров та виділяє з її складу лейкоцитарну фракцію (лейкоконцентрат). Об'єм крові, з якого вилучили цільову фракцію повертається в кровоносну систему донора. Задля накопичення достатньої кількості трансплантату часто призначають повторні сеанси аферезу.

Для ефективної аутоотрансплантації кровотворних клітин необхідно більше $2 \cdot 10^6$ CD34+ клітин на 1 кг ваги пацієнта. Перед виділенням СКПК необхідно мобілізувати їх із кісткового мозку, що досягається стимуляцією гранулоцит-колонієутворюючим фактором (Г-КСФ). Дана процедура дозволяє зібрати мононуклеари периферичної крові із вмістом стовбурових клітин (CD34+) до 0,1–1%. Об'єм крові, що проходить через сепаратор значно залежить від пацієнта та процедур стимуляції та сепарації. Зазвичай використовують методику великого об'єму лейкоферезу із обробкою від 2 до 4 об'ємів циркулюючої крові, що відповідає 10–15 л та 2–6 год. Після аферезу клітини можуть бути розділені на більш чисті фракції за допомогою методів магнітної сепарації або проточного флуоресцентного сортування.

Аферезні системи Cobe Spectra (Gambro BCT) (рис. 15) спеціалізовані для виділення окремих фракцій клітин. Збагачення СК із периферичної крові

проводиться в два етапи у повністю автоматизованому режимі: перший – відділення еритроцитів та лейкоцитів від плазми з тромбоцитами і накопичення мононуклеарів в окремій зоні камери, другий – продавлювання мононуклеарів плазмою в контейнер-збірник крові, з якого вилучили цільову фракцію повертається в кровоносну систему донора. Задля накопичення достатньої кількості трансплантату часто призначають повторні сеанси аферезу.



Рис. 15-. Аферезна система Cobe Spectra (Gambro BCT)

Перевагою аферезу є те, що ця процедура – нетравматична і безпечна, навіть для дуже маленьких дітей.

Виділення стовбурових клітин за допомогою системи магнетично-активованого клітинного сортування MACS. Технологія MACS (Magnetic-activated cell sorting) дозволяє швидко та легко виділяти необхідні типи клітин за допомогою спеціального комплексу, що складається із колоїдної суспензії нетоксичних біодеградуючих суперпарамагнітних часток, приєднаних до високоафінних моноклональних антитіл MACS MicroBeads;

колонок MACS Columns, в яких відбувається розділення клітин за допомогою магнітного сепаратора MACS Separators.

Суть методу полягає у розділенні суміші клітин на фракції у магнітному полі за допомогою використання імуномагнітної мітки, специфічної для цільових клітин. Для позитивної селекції клітин, що несуть на своїй поверхні антиген CD34, до клітинної суміші додається маркер – анти-CD34 антитіло, що з'єднано з магнітною часткою. Антитіло з'єднується з антигеном надаючи, таким чином, CD34 клітині магнітного маркеру. При здійсненні процедури сепарації клітинна суміш проходить крізь колонку, розміщену у високоградієнтному магнітному полі (рис. 16).



Рис. 16 - Клітинний сепаратор ClinMACS

Мічені клітини затримуються в цій колонці, немічені – проходять крізь неї без затримки, що сприяє сепарації клітинної суміші. Демагнітизація колонки вивільняє клітини окремою цільвою фракції. При проведенні CD34 позитивної селекції для здійснення аутологічної трансплантації ГСК метод

дозволяє досягти чистоти фракції CD34 клітин до 95,7% зі збереженням загальної кількості CD34 клітин у 69,5% від вихідного.

Магнетично-активоване сортування клітин складається із наступних стадій:

1. Магнітне маркування. Клітини, які потребують подальшого виділення з'єднуються із антиген-специфічними частинками MACS MicroBeads (рис. 17 а).

2. Магнітна сепарація. Клітини розділяються на колонці, розміщеній в постійному магнітному полі сепаратора, таким чином, що мічені клітини залишаються на колонці. Решта клітин вільно проходить через колонку сепаратора (рис. 17 б).

3. Елюція магнето-активованої фракції клітин. Колонка демагнетизується та промивається відповідним буферним розчином. Елюат містить цільову фракцію клітин (рис. 17 в).

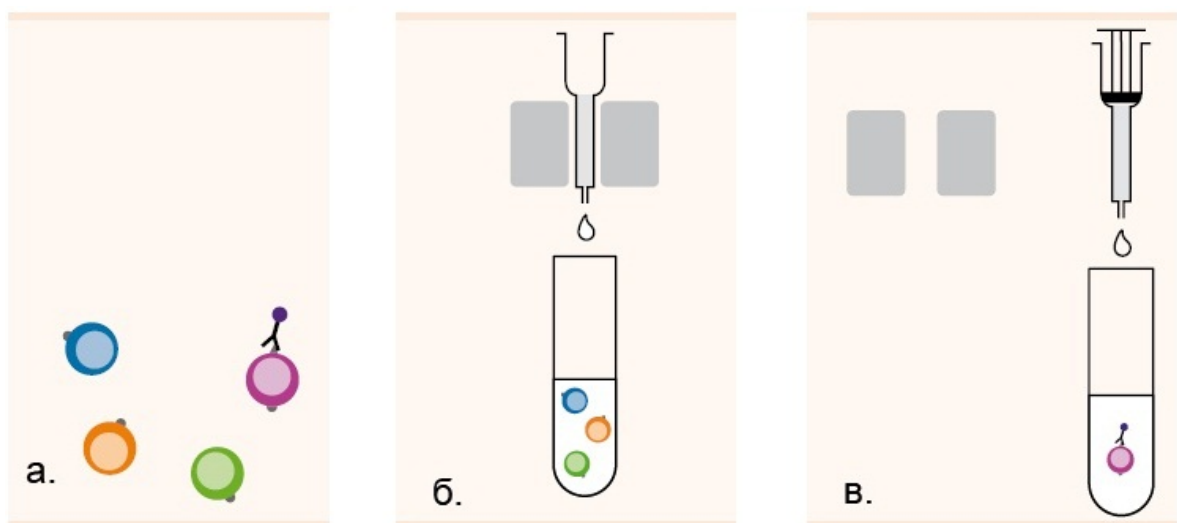


Рис. 17 - Принципова схема магнетично-активованого сортування клітин.

Визначення вмісту CD34+ клітин у виділеній фракції за допомогою проточного цитофлуориметра FACSscan. Проточна цитофлуориметрія – сучасна технологія швидкого вимірювання оптичних параметрів клітини та клітинних елементів, потужний засіб аналізу та контролю процесів, які в них

відбуваються. Зразками для проточної цитометрії може бути широке коло біологічних об'єктів (кров, суглобні та плевральні рідини, кістковий мозок та інші).

Сутність методу полягає у визначенні параметрів розсіювання лазерного променя при проходженні через нього клітини, яка в свою чергу знаходиться в потоці рідини. Ступінь дисперсії променя дозволяє отримати інформацію про розміри та структуру клітини. Метод передбачає процес мічення моноклональними антитілами, кон'югованими з флуорофорами, або барвниками досліджуваних клітин (мікроорганізмів), які потрапляють в потік рідини, що проходить через проточну комірку.

Одним із базових принципів проточної цитометрії є можливість аналізувати окремі частки. Коли об'єкт дослідження завантажується в цитометр, його частки рівномірно диспергуються в суспендуючому середовищі. Умови підбираються таким чином, що частки вишиковуються одна за одною, внаслідок так званого гідродинамічного фокусування струменя в струмені.

Одне або декілька джерел світла спрямовуються на клітинну суспензію в точку де її потік є гідродинамічно сфокусованим та перебуває в ламінарному режимі. Джерелом світла, зазвичай, є лазер або дугова лампа. Лазер випромінює монохроматичний когерентний пучок світла; дугові лампи, що працюють за рахунок світіння газів, іонізованих високою напругою, випромінюють поліхроматичне некогерентне світло, тож потребують використання набору світлофільтрів перед спрямуванням на потік клітинної суспензії. Для фокусування пучка збуджуючого світла використовують системи лінз. Внаслідок проходження окремої клітини через зону сканування, відбувається розсіювання пучка скануючого світла під різними кутами (рис. 18).

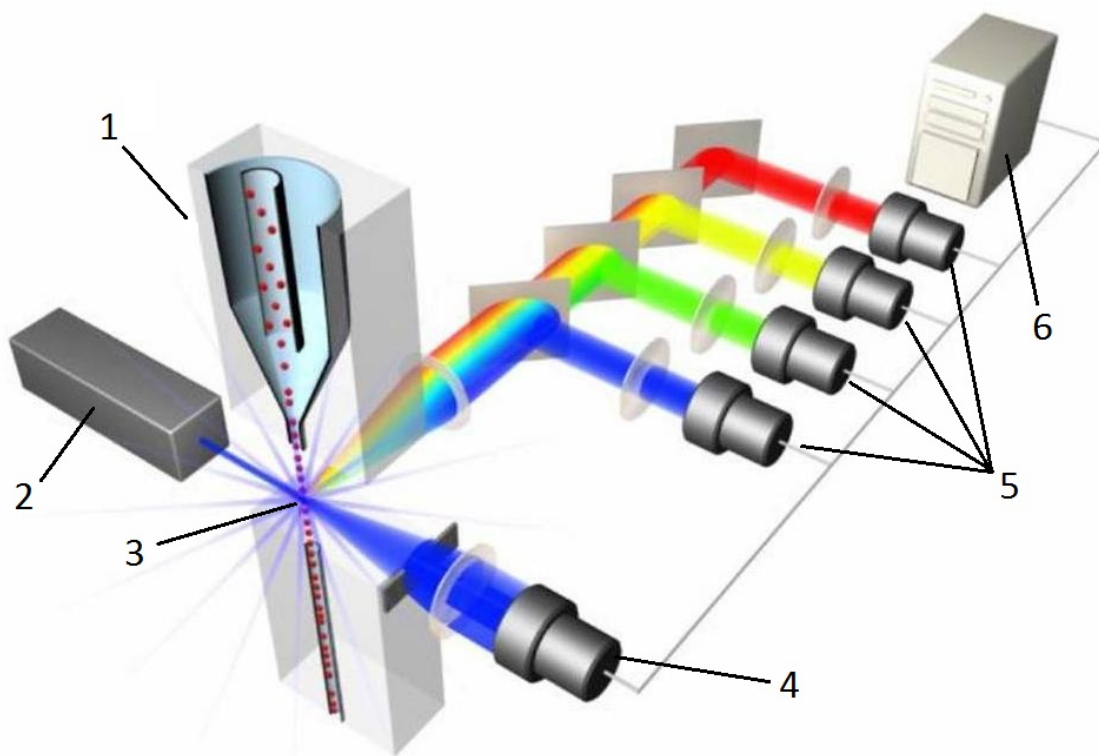


Рис. 18 - Основні складові проточного цитофлуориметра:

1. Камера гідродинамічного фокусування суспензії; 2. Джерело збуджуючого світла; 3. Зона сканування; 4. Фотодетектор, що фіксує розсіювання світла під кутом менше 10° ; 5. Фотодетектори, що фіксують бокове розсіювання світла та флуоресценцію мічених клітин; 6. Блок ЕОМ.

У момент перетину клітиною лазерного променя детектори фіксують:

- 1) розсіювання світла під невеликим кутом ($1-10^\circ$), що використовується для визначення розмірів клітин;
- 2) розсіювання світла під кутом 10° , що дозволяє робити висновки про співвідношення ядро/цитоплазма, а також про неоднорідність та гранулярність клітинного вмісту;
- 3) інтенсивність флуоресценції, що дозволяє визначати субпопуляційний склад клітинної суспензії.

Флуоресценція клітин в умовах проведення лазерної скануючої цитометрії збуджується за допомогою лазерних випромінювачів (одного або більше) і може оцінюватись в чотирьох спектральних областях видимого діапазону.

Серед найбільш використовуваних флуорохромів знаходяться наступні: ізотіоціанат (FITC), фікоеритрин (PE, RD1), перидинінхлорофіл протеїн (Per-CP), алофікоціанін (APC), а також тандемні барвники фікоеритрини Cy5 і Cy7.

Стромальні клітини кісткового мозку (мезенхімальні клітини)- вони дають початок різним типам клітин : кістковим (остеоцити), клітинам хрящу (хондроцити), жировим (адіпоцити), і іншим типам клітин сполученої тканини.

Мезенхимальні стовбурові клітин (МСК) використовуються сьогодні в клітинній терапії. За своїми напрямками ця терапія, яка пов'язана з основними властивостями МСК, може бути розподілена на три групи:

- підтримка гемопоезу при котрансплантації з гемопоетичними стовбуровими клітинами (ГСК);
- заміщення та відновлення функції ушкоджених негемопоетичних тканин (кісток, хрящів, скелетних і серцевих м'язів, нервової тканини, печінки і т.д.);
- пригнічення імунних конфліктів при неродинній трансплантації та тяжких аутоімунних процесах.

Результати доклінічних випробувань котрансплантації МСК з ГСК на експериментальних моделях дозволили прийти до наступних висновків:

- МСК прискорюють і покращують приживлення ГСК;
- дія МСК, які стимулюють приживлення та и проліферацію ГСК, не є лінійно-специфічною, сприяє в рівній мірі проліферації мієлоїдних та лімфоїдних клітин;
- дія МСК реалізується через вивільнення цитокінів, які регулюють приживлення (SDF1), проліферацію і диференціювання кроветворних клітин (ГМ-КСФ, Г-КСФ, SCF, ІЛ-6) та імуносупресивний ефект (активін-А);

- котрансплантація ГСК з МСК забезпечує приживлення навіть відносно невеликої кількості CD34+ клітин.

Ці дані є підставою для запровадження клінічних досліджень використання МСК разом з ГСК з метою покращення ефективності трансплантації гемопоетичної тканини.

Особливі надії покладаються на використання МСК в котрансплантації з алогенними ГСК для лікування тяжкої гострої і хронічної РТПХ. МСК при цьому мають імунну толерантність та не потребують сумісності з тканинами реципієнта. На поверхні МСК спонтанно експресуються антигени HLA класу I, але не HLA класу II.

Використання МСК в модуляції імунної відповіді тільки починається. В механізмах взаємодії МСК з компонентами імунної системи багато чого залишається не з'ясованим. Однак МСК можуть бути активним компонентом в лікуванні імунних конфліктів, індукції імунної толерантності та зниження трансплантаційних ускладнень, пов'язаних з відторгненням трансплантату і розвитком РТПХ.

Нейральні СК- у мозку дають початок головним клітинам – нервовим (нейронам), а також астроцитам і олігодендроцитам.

Відносно можливості регенерації центральної нервової системи були отримані докази навіть раніше, ніж були відкриті ембріональні стовбурові клітини в дослідженнях, які виявили в неокортексі, гіпокампі і нюхальних цибулинах головного мозку дорослик пацюків клітин, які мали властивість захоплювати ³H-тимідин – тобто мали здібність до синтезу білка і поділенню. Тоді мали припущення, що ці клітини є попередниками нейронів і приймають безпосередню участь в процесах навчання і пам'яті. Далі була встановлена наявність синапсів на утворених *de novo* нейронах і з'явилися перші публікації відносно можливості використання ембріональних стовбурових клітин з метою індукції нейрогенеза *in vitro*.

Наприкінці XX століття вже були отримані переконливі докази відносно здібності нервових клітин до регенерації на основі направленого

диференціювання ЕСК в нейральні клітини –попередники, дофамінергічні і серотенінергічні нейрони. Встановили, що нейральні стовбурові клітини експресують гліальний кислий фібрилярний білок, який серед зрілих клітин нейрального ланцюга зберігається тільки на астроцитах. Тобто, стовбуровим резервом в зрілій центральній нервовій системі можуть бути астроцитарні клітини.

Існує думка, що в ЦНС існують дві популяції стовбурових клітин. Питання відносно локалізації СК в субвентрікулярній зоні також лишається нез'ясованим.

Таким чином, дані сучасних досліджень свідчать про існування регіонального стовбурового резерву, регенераційно-пластична ємність якого, на жаль, здатна забезпечити тільки процеси фізіологічної регенерації з утворенням нової нейронної сітки, але не відповідає вимогам репаративної регенерації. Це ставить питання про пошуки можливості збільшення стовбурових ресурсів ЦНС екзогенним шляхом.

Деякі автори вважають, що здібність нейральних стовбурових клітин приживлюватись, мігрувати, інтегрувати в різні регіони нервової тканини при ушкодженні центральної нервової системи відкриває необмежені можливості для клітинної терапії не тільки локальних але і поширених (інсульт або асфіксія), мультиочагових (розсіяний склероз) і навіть глобальних (більшість успадкованих метаболічних порушень або нейродегенеративної деменції) патологічних процесів.

Дійсно, при пересадці клонуваних нейральних стовбурових клітин миши і людини з дегенерацією дофамінергічних нейронів в мезостріальній системі, індукованої введенням метіл-феніл-тетрапірідіна(модель хвороби паркінсона), донорські нейральні стовбурові клітини інтегруються в ЦНС реципієнта. Впродовж місяця трансплантовані клітини локалізуються білатерально вздовж середнього мозку.

Вважають, що ефективність нейротрансплантації залежить від способу введення ембріональної нервової тканини. При пересадці клітин в шлуночкову систему мозку отримані дані відносно позитивного їх впливу на

моторний дефект при паркінсонізмі. Проте деякі дослідження свідчать про незадовільні результати, оскільки встановлено низьке виживання дофамінергічних нейронів, які були трансплантовані в стріатум щурів.

Разом з тим, більшість дослідників вважають, що приживання та інтеграція нейральних стовбурових клітин після трансплантації є стабільними і прижиттєві, оскільки донорські клітини виявляються у реципієнтів на протязі не менш двох років після пересадки і без суттєвого зменшення їх кількості.

Епітеліальні СК- ці клітини локалізовані в глибоких криптах. З них походить декілька типів клітин: всмоктуючи, бокаловидні, клітини Пенета та ентероендокринні клітини. Стовбурові клітини епідермісу знаходяться в базальному шарі епідерміса і в кореневих фолікулах волосся. Епідермальні клітини дають початок кератиноцитам, які мігрують до поверхні шкіри й утворюють захисний шар.

На підставі сучасних наукових здобутків в галузі трансплантації стовбурових клітин різного походження увага вчених світової спільноти трансплантологів, генетиків і імунологів направлена на вивчення механізмів пластичності, що дозволило б у майбутньому керувати ними. Тоді СК, які залишилися у здоровій тканині, могли б бути заселені в ушкоджені зони і відновити тканину.

Незважаючи на досить великі успіхи в розвитку клітинної терапії багато питань, які торкаються дорослих стовбурових клітин лишилися не вирішеними. Наприклад:

1. Скільки різновидів дорослих СК є в організмі і в яких тканинах вони локалізовані.
2. Що є джерелом дорослих СК в організмі? Лишаються вони зародковими чи виникають іншими шляхами?
3. Чи пластичність дорослих клітин притаманна нормальному стану популяції, чи вони транс диференціюються в результаті маніпуляцій з ними *in vitro*?

4. Можливо керувати дорослими СК в контексті прискорення їх проліферації і диференціацію, що значно би підвищило кількість клітин, необхідних для трансплантації?
5. Під впливом яких чинників СК переміщуються до зон ушкодження?
6. Чи єдиний тип СК дає початок усім клітинам органів і тканин?

Ми не випадково завершуємо даний підрозділ питаннями, тому, що саме невирішені питання є стимулом для зацікавленості даним предметом при вивченні основних постулатів трансплантаційного імунітету і спектру можливостей клітинної терапії. Незважаючи на досить великі здобутки в галузі регенеративної медицини ще багато питань знадобиться вирішити і з позицій біоетики, з позицій можливих віддалених наслідків в межах після трансплантаційних ускладнень, віддалених наслідків генної терапії. Але той факт, що майбутнє належить принципам підходам в лікуванні майже всіх патологічних станів з позицій клітинної регенеративної медицини є незаперечним фактом, оскільки саме ця терапія на відміну від застосування хімічних препаратів направлена на стимуляцію особистих сил організму для відновлення нормального гомеостазу.

Питання для самоконтролю

1. Де знаходяться стовбурові клітини епідермісу і яким клітинам вони дають початок?
2. Назвіть відмінності між стромальними клітинами кісткового мозку, нейральними СК і епітеліальними СК.
3. Що таке плюріпотентні лінії клітин?
4. Назвіть два основних напрямки розвитку регенеративної медицини
 5. Які три загальні властивості мають стовбурові клітини, незалежно від походження?
 6. Чи мають стовбурові клітини тканиноспецифічні структури?
 7. Назвіть основні відмінні властивості стовбурових клітин.

8. Що представляє собою стовбурова клітина?

ЛІТЕРАТУРА

1. Абдулкадыров К. М., Романенко Н. А., Старков Н. Н. Получение и клиническое применение периферических гемопоетических стволовых клеток из пуповинной крови // Вопросы онкологии. – 2000. – Т. 46. – №5. – С. 513–518.
2. Бебешко В. Г., Мінченко Ж. М. та ін. Трансплантація стовбурових гемопоетичних клітин у клінічній практиці: сьогодення та перспективи.
3. Бебешко В. Г., Мінченко Ж. М., та ін. Правила трансплантації стовбурових кровотворних клітин: Методичні рекомендації. – К.: Друкарня агенства «Чорнобильінтерінформ», 2003. – 22 с.
4. Кордюм В.А. Наша шегренева кожа – это наша проблема, нам ее и решать// 2006, 263с.
5. Запорожан В.Н., Бажора Ю.И.//Стволовые клетки. 2004 – 227 с.
6. Клиническая гематология / под ред. проф. А.Ф. Романовой. – К.: Медицина, 2006. - С. 416–440
7. Кухарчук А.П., Радченко В.В., Сирман В.И.// Стволовые клетки – эксперимент, теория, клиника., 2004, с. 504.
8. Румянцев А.Г., Масчан А.А.// Трансплантация гемопоетических стволовых клеток у детей , 2003, с 26-49.
9. Юрасов С. В., Владимирская Е. Б., Румянцев А. Г. Выделение гемопоетических стволовых клеток из пуповинной крови человека для трансплантации // Гематология и трансфузиология. – 1997. – № 2. – С. 10–15.
10. Bioindustry defends cloning after Dolly's death// Genet. Eng. News. -2003.- Vol.23. - P.57-58.
11. Burmester G.-R., Pezzutto A.. Color Atlas of Immunology. – Thieme, 2003. – 337p.
12. Cao Y., Vacanti J.P., Payge K. T., Upton J., N. Vacanti C.A. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-sell construct to produce tissue engineering

- cartilage in the shape of a human ear// Plast.Reconstr. Surg.- 1998.- Vol.101. - P. 1745.
13. Hoan Oh., Dong-Wook K., Three dimensional approaches to stemcell therapy// J. Korean Med. Sci. - 2002.-Vol.7. - P.151-160.
14. Huang S., Law P., Young D., Ho A. D *et al.* Candidate hematopoietic stem cells from fetal tissues, umbilical cord blood vs. adultbone marrow and mobilized peripheral blood // Exp. Hematol. – 1998. – Vol. 12. – P. 1162–1171.
15. Glimm H., Eaves C. J. Direct evidence for multiple self-renewal divisions of human *in vivo* repopulating hematopoietic cells in short-term culture // Blood. – 1999. – Vol. 94, № 7. – P. 2161–2168.
16. Gluckman E., Wagner J., Hows J. *et al.* Cord blood banking for hematopoietic stem cell transplantation: an international cord blood transplant registr // Bone Marrow Transplant. – 1993. – Vol. 11. – P. 199–200.
17. Miltenyi S. CD34+ Selection: The Basic Component for Graft Engineering // The Oncologist. December 1997. – Vol. 2. – P. 410–413.
18. Tomas Donall E., Blume Karl G., Forman Stephen J. Hematopoietic Cell Transplantation. – London: Blackwell Science Inc., 2000. – 1260 p.
19. Nakamura Y., Ando K., Chargui J. *et al.* *Ex vivo* generation of CD34(+) cells from CD34(-) hematopoietic cells // Blood. – 1999. – Vol. 94. – P. 4053 – 4059.
20. Wang J. C., Doedens M., Dick J. E. Primitive human hematopoietic cells are enriched incord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by thequantitative *in vivo* SCID-repopulating cell assay // Blood. – 1997. – Vol.4 – P. 3919–3924.
21. <http://www.ld.ru/catalog/rts/stemcells/apheresis.html>

Остання частина XX сторіччя привела до величезного прогресу в розумінні причин виникнення раку, завдяки відкриттю структури ДНК, картируванню генів і дослідженню генетичних кодів, ангіогенезу і передачі сигналів, включаючи клітинні механізми, пов'язані із зростанням і діленням клітини.

Рак характеризується нестримним зростанням і розповсюдженням аномальних клітин, які розвиваються із-за пошкодження і відсутності відновлення ДНК. Рак зазвичай формується як одиночна пухлина, хоча при деяких ракових захворюваннях, як наприклад, лейкемія, пухлини не формуються. Замість того ці ракові клітини, потрапляючи в кров і кровотворні органи, проникають в інші тканини, де продовжують своє зростання.

Зміни дозволяють клітинам розмножуватися нестримним чином, уникати запрограмованої смерті клітини і, на сам кінець, вторгтися в інші частини тіла (метастазувати). Процес приводиться в рух ланцюгом подій. Тепер вважають, що канцерогенні речовини ушкоджують високоспецифічні частини генотипу. Пошкодження (мутація) зачіпає специфічні фрагменти гена ДНК, яка залучена в складні завдання управління диференціюванням і зростанням клітини (наприклад, протоонкогени, що є потенційними генами раку) (рис. 1).

Існує безліч механізмів і чинників, які, з одного боку, сприяють посиленню зростання пухлини за участю клітин системи імунітету, а з іншого — свідчать про широкі можливості пухлинних клітин не тільки інгібувати функції клітин системи імунітету, але і активно їх ушкоджувати.

Якщо розглядати послідовність подій в цілому, слід констатувати, що вислизання пухлини з-під імунологічного контролю — це багатоетапний процес, який починається від недостатності розпізнавання (зниження рівня або втрата пухлинними клітинами антигенів, зниження

експресії антигенів HLA, недостатня активність молекул, що беруть участь у транспорті комплексу пухлинні пептиди/антигени HLA і багато що інше), включає весь комплекс імуносупресуючих впливів і імуностимуляцію до селекції клонів пухлинних клітин, резистентних до дії ефektorних клітин системи імунітету.

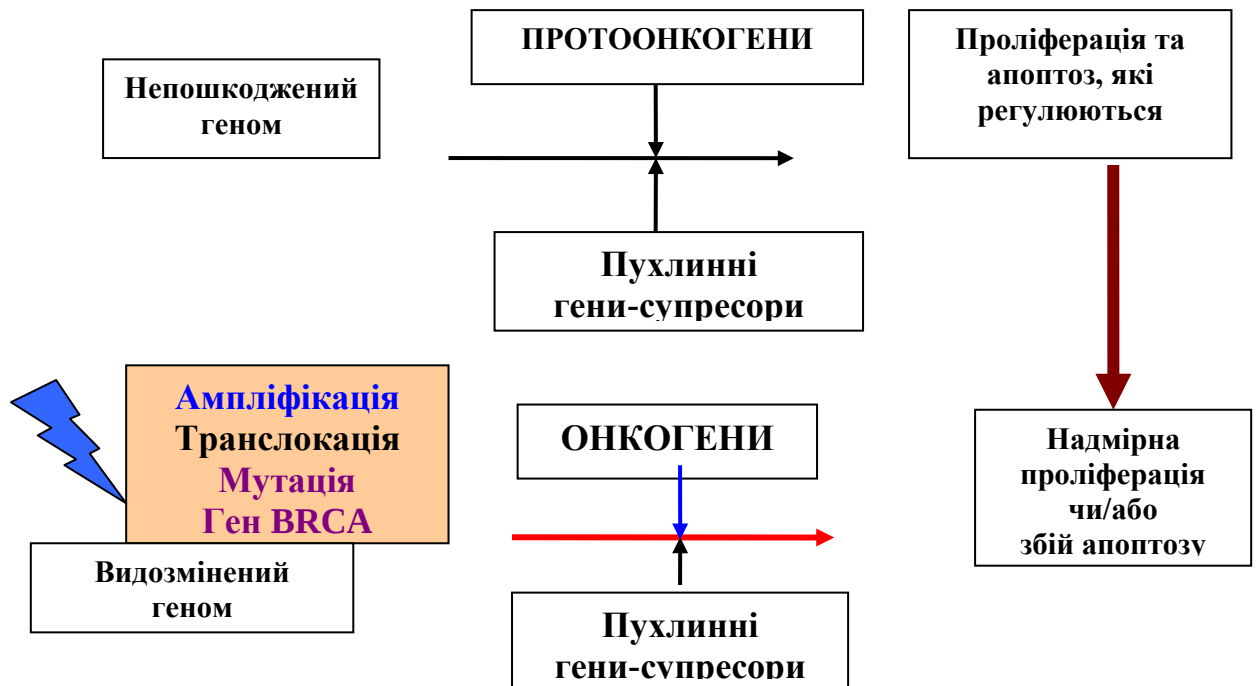


Рис. 1: Взаємодія прото-онкогенів, онкогенів та генів-супресорів пухлини

Окремі етапи цього процесу, а іноді і їх поєднання, можуть спостерігатися практично на різних стадіях злоякісного зростання, що багато в чому ускладнює вивчення всіх аспектів взаємодії пухлини, системи імунітету та системи HLA .

Одним з найбільш важливих і одночасно найбільш складних напрямів онкоімунології як у минулому, так і в сьогоденні, є виділення антигенів пухлинної клітини і їх ідентифікація. Як вважає Н.М. Бережна, необхідно представляти і використовувати в аналізі отриманих результатів багатообразні відомості про пухлинні антигени: яка їх різноманітність, які особливості їх генетичного контролю, яка їх здатність викликати імунологічну відповідь, який характер цієї відповіді і багато інше, що дає

можливість розуміти суть самого пухлинного процесу. Ця область досліджень вимагає знання не тільки імунології, онкоімунології, але і біохімії, генетики, молекулярної біології. Характерною особливістю досягнень в цій області є об'єднання інтересів фундаментальної науки і клініки.

При вивченні загальних тенденцій в дослідженні пухлинних антигенів можна виділити три основні напрями:

- ідентифікація і біохімічна характеристика пухлинних антигенів і генів, що їх кодують;
- виявлення епітопів, які розпізнаються антигенраспізнаючими клітинами, і визначення тих молекул антигенів I і II класів HLA, які представляють ці епітопи;
- експериментальне і клінічне вивчення можливостей використання ідентифікованих антигенів і їх пептидів в імунотерапії.

Вивчаючи антигени клітин, які злоякісно трансформовані, дослідники стикаються з об'єктивними труднощами, що обумовлені особливостями цих кліток. Перш за все до них можна віднести:

- ❖ відсутність у багатьох випадках експресії пухлинних антигенів на поверхні пухлинної клітини або вкрай низький рівень цієї експресії, що особливо характерно для ранніх етапів пухлинного процесу;
- ❖ слабка здатність багатьох пухлинних клітин виділяти окремі пептиди пухлинних антигенів і як наслідок цього — відсутність їх в крові і серозних рідинах, що також особливо характерно для ранніх етапів пухлинного процесу.

Наявність в злоякісно трансформованих клітинах великої кількості детермінант, які властиві антигенам нормальної клітини.

Нестабільність антигенної структури пухлинної клітини, що пояснюється, по-перше, втратою або появою тканиноспецифічних антигенів, а також інших антигенів (наприклад, віруссpezifічних і ін.), властивих ембріональним і нормальним тканинам, і, по-друге, схильністю багатьох

структур, що входять в пухлинні антигени, наприклад вуглеводних, до вираженої мінливості своєї антигенної організації.

Наявність в антигенах пухлинної клітини пептидів, що відрізняються своєю здатністю індукувати імунну відповідь за клітинним або гуморальним типом, а також здатністю одних пухлинних антигенів індукувати протипухлинний імунологічний захист, інших — приводити до стимуляції росту, третіх — формувати резистентність.

Розпізнавання окремих пухлинних антигенів різними субпопуляціями імунокомпетентних клітин і презентація різними молекулами HLA.

Дані про генетичну регуляцію експресії пухлинних антигенів, виділення кодуючих генів і їх характеристика мали вирішальне значення у формуванні підходу до розділення пухлинних антигенів на групи. У зв'язку з цим закономірне розділення пухлинних антигенів на антигени пухлинних клітин, які є продуктами нормальних або мутантів генів.

Багато дослідників вважають, що систематизація пухлинних антигенів залежно від того, продуктами яких генів вони є, принципових відмінностей не має. Проте виникають деякі сумніви щодо доцільності віднесення раково-ембріональних антигенів до групи пухлиноасоційованих специфічних антигенів — продуктів генів немутантів. Це обумовлено тим, що, як відомо, багато раково-ембріональних антигенів з'являються на певних етапах ембріогенезу і в цих випадках розглядаються як фізіологічне явище.

Пухлиноасоційовані антигени можна розподілити на наступні групи:

- раково-тестикулярні пухлиноасоційовані антигени (продукти нормальних генів);
- тканиноспецифічні диференцировочні антигени (продукти нормальних генів);
- специфічні пухлиноасоційовані антигени (продукти генів мутантів);
- раково-ембріональні (онкофетальні) антигени.

Антигени групи раково-тестикулярних пухлиноасоційованих антигенів експресуються злоякісно трансформованими клітинами; виняток становлять нормальні клітини яєчок, у зв'язку з чим вказані антигени нерідко

об'єднуються загальною назвою — раково-тестикулярні — СТ (cancer testis). Експресія їх не пов'язана з мутаціями генів, які їх кодують, і спостерігається в пухлинних клітинах різного генезу, локалізації, первинних і метастазуючих пухлинах: меланоми, раки молочної залози, легені, карциноми стравоходу, яєчника, карциноми в області голови і шиї, раки простати, нирки, сечового міхура і так далі.

У зв'язку з тим, що антигени даної групи — продукти генів немутантів, виникає питання: чому вказані антигени не експресуються нормальними клітинами? Відповідь на нього достатньо проста — ці антигени не експресуються тому, що гени, які кодують їх, в нормальних тканинах "мовчать". Значно важче відповісти на питання: яка ж причина їх активації в кожній конкретній пухлині? Найімовірніше, це викликається тими ж причинами, які приводять до злоякісної трансформації клітини.

До теперішнього часу відомо декілька великих сімейств антигенів, що відносяться до цієї групи: MAGE, BAGE, GAGE, HAGE, PAGE, XAGE, LAGE, NY-ESO-1 і SAGE. На сьогоднішній день найбільш вивчені антигени, кодовані генами сімейства MAGE.

Гени сімейства MAGE і їх продукти — антигени MAGE експресуються багатьма пухлинами різного гістогенезу, і сумарна частка експресії окремих антигенів, що кодуються генами цього сімейства, досягає у ряді випадків 70—80 %.

Дослідження останніх років дозволили встановити, що антигени одного і того ж сімейства, зокрема MAGE, залежно від приналежності до тієї або іншої підгрупи і експресії відповідних молекул HLA можуть (за певних умов) розпізнаватися як CD8⁺, так і CD4⁺ Т-лімфоцитами. А також, що презентація окремих епітопів одного і того ж антигена може здійснюватися різними молекулами HLA.

З часом дослідження по виявленню експресії антигенів MAGE і генів, які їх кодують, дали можливість встановити, що:

1. Переважна більшість злоякісно трансформованих клітин пухлин різного гістогенезу і локалізації експресують або окремі антигени цього сімейства, або їх поєднання.
2. Найбільшого рівня досягає експресія пухлинними клітинами антигенів *MAGE -1* і *MAGE -3*.
3. Практично всі антигени, що входять в сімейство *MAGE*, розглядаються як перспективні для імунотерапії за умови експресії молекул *HLA*, які їх представляють.
4. В окремих випадках рівень експресії цих антигенів може бути використаний для ранньої і диференціальної діагностики.
5. Залежність від гістологічного типу. При дослідженні різних типів карцином шлунку (луската і аденокарцинома) виявлені відмінності в частоті експресії антигенів *MAGE*, *GAGE*, *BAGE*. Показано також, що при дифузній формі карциноми шлунку *BAGE* експресується рідше, ніж при інтестинальній.
6. Значення для прогнозу. При дослідженні експресії антигенів *MAGE*, *BAGE* і *GAGE* різними карциномами стравоходу і шлунку чіткої кореляції з прогнозом не відмічено, але експресія *BAGE* і *GAGE* за відсутності експресії *MAGE* частіше поєднувалася з поганим прогнозом. Вивчення клітин нейробластоми показало, що експресію антигенів *GAGE* можна вважати чітким прогностичним маркером, раннє виявлення якого оцінюється як чинник ризику можливого рецидиву хвороби, що дає можливість прогнозувати його ще до настання клінічних проявів.
7. Можливість оцінки активності злоякісного процесу. Така можливість простежується відносно експресії антигенів *NY-ESO-1*и *CTp11*. Обидва антигени достатньо часто паралельно експресуються клітинами метастатичної і неметастатичної меланоми, проте тенденція до збільшення експресії *CTp11* спостерігається тільки в клітинах первинних меланом, тоді як експресія *NY-ESO-1*превалює в клітинах метастазів. Достовірність цих відмінностей привела до висновку про те, що *NY-ESO-1* може бути маркером активного метастазування, а *CTp11* маркером меншої поширеності процесу.

8. Можливість ранньої і диференціальної діагностики злоякісного процесу. Експресію MAGE -3 клітинами недрібноклітинної карциноми легені можна розглядати як маркер ранньої діагностики, а експресію MAGE -A4 — для диференціальної діагностики доброякісних і злоякісних семіном [15].

Інтенсифікація досліджень по виявленню пухлиноасоційованих антигенів — продуктів нормальних генів привела до виявлення нових сімейств генів, що кодують пухлиноасоційовані антигени: SAGE, HAGE, PAGE, XAGE, LAGE. На даний час інформація про ці гени та їх продукти ще незначні.

Таким чином, пухлиноасоційовані раково-тестикулярні антигени (продукти нормальних генів) представлені різноманітними антигенами, які кодуються відповідними сімействами генів і представляються різними молекулами антигенів HLA. Практично всі ці антигени за відповідних умов розпізнаються лімфоцитами і тому можуть служити мішенню для імунотерапії.

До продуктів нормальних генів відносяться і **тканиноспецифічні диференцировочні антигени**. До теперішнього часу найбільш вивчені антигени меланоми. По частоті експресії вказаних антигенів і генів, які їх кодують, меланома займає провідне місце. Так, частота експресії генів MAGE, BAGE, GAGE і NY-ESO-1 клітинами меланоми достатньо висока і, як мінімум, один з них експресується не менше чим в 50 % випадків меланом. Проте разом з цими антигенами клітини меланоми, а також нормальні меланоцити експресують антигени, відомі як тканиноспецифічні диференцировочні антигени меланоцитів. Антигени даної групи також є продуктами генів немутантів, і до них відносяться: gp100 (Pmel 17), тирозиназа, TRP-1/gp75, TRP-2, MART-1/Melan-A, p-15.

Одним з перших антигенів цієї групи був описаний глікопротеїн gp100, який експресировався не тільки клітками меланоми, але і нормальними меланоцитами, а також клітинами веселкової оболонки ока. Було ідентифіковано ген, що кодує цей антиген, і встановлено, що він розпізнається ЦТЛ, які інфільтрують меланому, лімфоцитами периферичної

крові і представляється молекулами HLA-A2. Проведені дослідження дозволили виділити епітоп цього антигену — gp100, який розпізнається ЦТЛ [23]. Автори наведених даних показали також, що одночасне введення gp 100 у поєднанні з IL-2 викликає регресію метастазів у аутологічних хворих, що відразу ж зумовило можливість його використання для імунотерапії.

На підставі вивчення антигенів меланоми з'явилася можливість оцінити отримані дані з позицій їх клінічного значення.

1. Гени gp100 і TRP-2 найчастіше експресуються клітинами пухлин тих хворих, у яких у момент обстеження мало місце або загострення захворювання, або метастазування.
2. Часта експресія генів gp100, MART-1 і тирозиназа відмічена в клітинах метастазуючої меланоми з відмінностями в рівнях їх експресії у окремих хворих. При цьому є підстави констатувати можливість диференційованого розпізнавання антигенів різними субпопуляціями ЦТЛ: частина ЦТЛ розпізнають одні антигени, а частина — інші.
3. MART-1/Melan-A має високу діагностичну цінність для виявлення мікрометастазів в лімфатичні вузли при меланомі шкіри. Разом з цим виявлено, що при розвитку меланом інших локалізацій, зокрема слизова оболонка рота і синусонозальних порожнин, практично всі синусонозальні меланоми експресують тирозиназу і MART-1/Melan-A (відповідно 100 і 95 %), тоді як для десмопластичних пухлин слизової оболонки його експресія не характерна.
4. Одна з важливих особливостей антигенів меланоми полягає в тому, що практично всі вони розпізнаються не тільки $CD8^+$, але і $CD4^+$ Т-лімфоцитами, що істотно розширює можливості використання їх в імунотерапії [29].

Продуктами генів мутантів є **пухлиноасоційовані специфічні антигени**, які є якісно новими структурами пухлинної клітини і тому розглядаються як дійсні пухлиноасоційовані антигени. Ще на початку 90-х років було відмічено, що поява пухлиноасоційованих білків мутантів може бути пов'язана з точковими мутаціями, транслокаціями в хромосомах,

делеціями і мутагенезом, обумовленим вірусами. В результаті синтезуються нові структури зі зміненою амінокислотною послідовністю.

Добре відомо, що злоякісна трансформація клітки у багатьох випадках супроводжується змінами на рівні генома, що впливає на зростання, диференціювання і багато інших властивостей пухлинних клітин. Проте зміни в геномі пухлинної клітини далеко не завжди супроводжуються, по-перше, появою нових продуктів таких змінених генів, а по-друге, можливістю їх виявлення, що пов'язане із загальними труднощами виділення пухлинних антигенів, а відповідно і продуктів генів мутантів. Це робить зрозумілим, чому в даний час кількість ідентифікованих пухлинних антигенів, мутацій, що з'являються в результаті, невелика.

Перш за все слід вказати, що білки — продукти генів мутантів — мають виражену здатність зв'язуватися з молекулами HLA, утворюючи відповідні комплекси, які розпізнаються лімфоцитами. Білки, що утворилися в результаті пошкодження генів, індукують високу специфічність імунологічної відповіді, опосередковану Т-лімфоцитами, що достовірно показане в сингенних системах. Ізоляція і вивчення особливостей таких антигенів, виділених з пухлин людини і мишей, показують, що пептиди, які з'явилися в результаті соматичних мутацій, є істинно специфічними.

Одна з важливих особливостей пухлино специфічних антигенів — продуктів генів мутантів — полягає в тому, що вони зберігають свою специфічність протягом пухлинного процесу, що дозволяє розглядати їх як стабільні специфічні мішені не тільки для різних імунотерапевтичних дій, але, можливо, і інших. Докази такої стабільності отримані в дослідях на мишах, у яких за допомогою ультрафіолетових променів були індуковані злоякісні пухлини шкіри. З таких пухлин вдалося виділити два пухлиноспецифічних антигени, які є рибосомальними білками, що з'явилися в результаті точкових мутацій у відповідних генах, що супроводжувалося зниженням рівня нормальних алелей; обидва антигени кодувалися різними генами і розпізнавалися CD4⁺ Т-лімфоцитами.

Ідентифікація і виділення пухлиноспецифічних антигенів в даний час проводиться з використанням двох підходів. Перший — сиквенс ДНК відомих мутатних генів з подальшою характеристикою відповідних білків і їх використанням для індукції специфічної Т-клітинної відповіді. Другий — індукція активності Т-клітин під впливом імунізації цілісними пухлинними клітинами. Не дивлячись на те, що обидва підходи дають можливість генерувати специфічну Т-клітинну відповідь, автори проведеного аналізу вважають, що антигени, отримані з використанням вказаних вище підходів можуть мати відмінності.

На теперішній час відомі такі антигени цієї групи: Mut.MUM-1, Mut.cDK-4, Mut. β -катенін, Mut.p16, pRB, CAPS-8, α -актенін-4, продукт мутації гена TGF β RII, Mut.p53.

При порівняно невеликій кількості ідентифікованих пухлинних антигенів — продуктів генів мутантів не всі з них вивчено в рівній мірі. Найбільш вивчені Mut.cDK-4 і Mut.MUM-1, α -катенін, продукти гена мутанта k-ras; є достатньо інформації і про продукти гена-мутанта p53, який індукує імунологічну відповідь, а також щодо продуктів деяких інших мутантних генів, зокрема EGP та IIR TGF β . Останніми роками з'являється інформація і про нові мутантні антигени.

На думку багатьох дослідників, не дивлячись на невелику кількість ідентифікованих антигенів і значне число питань, можна сформулювати ряд положень, що пояснюють функціональні особливості і значущість даних антигенів:

1. Пухлинні антигени — продукти мутантних генів — характеризуються високою специфічністю, її стабільністю і на відміну від багатьох пухлиноасоційованих антигенів — продуктів нормальних генів не експресуються нормальними клітинами.
2. Мутантні антигени мають різну природу і кодуються різними генами, які зазнали мутації.
3. Продукти генів-мутантів можуть розпізнаватися CD4⁺ та CD8⁺ Т-лімфоцитами в комплексі з відповідними молекулами HLA.

4. Унікальність мутантних антигенів (висока специфічність та її стабільність), здатність індукувати імунологічну відповідь різних антигенрозпізнаючих клітин обґрунтовує перевагу їх використання для протиракової вакцинації.

Величезний інтерес представляють **раково-ембріональні (онкофетальні) антигени (РЕА)**. До теперішнього часу відомий ряд антигенів цієї групи: α -фетапротейн (АФП), раково-ембріональний антиген, плацентарна лужна фосфатаза, ембріональний преальбумін, специфічний β -глікопротеїн, NFA, NCA-1, NCA-2 та ін. Головними відмінностями даних антигенів від раніше описаних є: їх синтез починається вже з 4 – 8 тижнів вагітності і відповідно до законів ембріогенезу, ген, який їх кодує, повинен бути репресований відразу після народження. Поява цих антигенів при раковому процесі свідчить про активацію генів, що їх кодують. Очевидно, причиною такої активації є особливості гістогенезу тієї або іншої пухлини, іноді їх поява може бути пов'язана з порушенням синтезу ембріональних білків, а також іншими причинами. Крім того, багато з цих антигенів розглядається як достатньо надійні маркери розвитку злоякісного процесу.

Предметом уваги багатьох дослідників є оцінка діагностичної значущості різних раково-ембріональних антигенів.

Проте виклад загальних відомостей про них представляється доцільним виходячи перш за все з двох положень: перше – достатньо часта поява цих антигенів при деяких пухлинних процесах і біохімічна схожість між ними і пухлинними антигенами, зокрема за ізоферментним складом (піруваткіназа, аденілатциклаза, глютаміназа, лактатдегідрогеназа, ДНК-полімераза і ін.); друге – останніми роками з'явилися дані про те, що певні детермінанти раково-ембріональних антигенів можуть бути мішенями для розпізнавання лімфоцитами.

Отримані дані про те, що рецептор ЦТЛ містить домен, специфічний для РЕА. Цей домен був представлений у вигляді IgG, зокрема CH/CH3 (Fc), який об'єднував сигнальні CD3-зета-ланцюги. Культивування пухлинних клітин, які експресують РЕА, з Т-лімфоцитами, що несуть такий рецептор,

супроводжувалося активацією цитотоксичних клітин, продукцією IFN γ і привело до висновку про використання їх для адоптивної імунотерапії РЕА-позитивних пухлинних клітин.

Розширення досліджень в області вивчення РЕА дозволило отримати нову інформацію: циркулюючий РЕА може бути пов'язаний з розвитком метастазів, зокрема при колоректальному раку; ідентифікований рецептор для РЕА і дві його ізоформи – REAR α та REAR β , які експресуються на поверхні клітин Купфера. Очищення від РЕА відбувається шляхом ендоцитоза макрофагами і клітинами Купфера.

Оскільки ряд пептидів РЕА може розпізнаватися рецепторами Т-лімфоцитів та активувати їх цитотоксичність, цілком обґрунтовано розглядати їх як перспективні для імунотерапії, що підтверджується проведенням відповідних передклінічних випробувань, які вже розпочалися і включають також адоптивну імунотерапію з використанням ЦТЛ, специфічних до РЕА. Цей напрям досліджень успішно розвивається. На даний час отримані різні РЕА-вакцини, які виявилися ефективними в індукції РЕА-специфічної Т-клітинної відповіді, особливо при їх застосуванні з різними ко-стимулюючими молекулами.

На протязі тривалого періоду часу інтерес до вивчення антигенів пухлин все більше і більше зростає. Накопичені в результаті інтенсивних досліджень факти сформували серйозну базу для подальшого вивчення. Орієнтуючись на наявні фундаментальні дослідження, визначаються конкретні можливості зниження ризику вислизання пухлини з-під імунологічного контролю. Принципово важливі докази того, що інформація про експресію тих або інших антигенів пухлинної клітини може служити одним з основних критеріїв проведення імунотерапії. Крім того, можливість експресії клітинами конкретної пухлини різних антигенів визначає доцільність отримання полівалентних вакцин і синтетичних аналогів різних пухлинних пептидів, які також істотно підвищують ефективність імунотерапії. До цього слід додати, що можливості підвищення ефективності протипухлинних вакцин можуть бути істотно розширені, якщо врахувати той

факт, що ряд цитокінів, перш за все, ряд колонієстимулюючих чинників (GM-CSF) й інтерферони (IFN- γ) та ін., здатні підсилювати експресію пухлинних антигенів.

Сучасний рівень досліджень про пухлинні антигени свідчить на користь подальшої ідентифікації антигенів пухлинної клітини і розробки підходів до використання їх для імунотерапії. Об'єм існуючої інформації, її різноманітність, можлива неоднозначність трактувань багато в чому утрудняють формулювання узагальнювальних положень. Але, орієнтуючись на вже відомі факти, можна зробити декілька висновків:

- антигени пухлинної клітини представлені широким спектром субстанцій, які кодуються різними генами, відрізняються біохімічними властивостями, презентуються різними молекулами головного комплексу гістосумісності, розпізнаються різними антигенпрезентуючими клітками і можуть знаходитися в розчинній і мембранно-зв'язаній формах;

- частота і рівень експресії окремих антигенів різних пухлин неоднакові і багато в чому залежать від фенотипічних особливостей пухлинних клітин, гістогенезу і локалізації пухлини, мікрооточення і цитокінової регуляції. У динаміці пухлинного процесу антигенна структура підлягає вираженій мінливості і розрізняється в клітинах первинних пухлин і метастазів;

- дійсними пухлиноспецифічними антигенами є продукти багатьох пошкоджених генів (точкові мутації, трансляція, делеція), які індукують імунологічну відповідь високого ступеня специфічності і стабільності, що дозволяє розглядати їх як надійні мішені для розпізнавання;

- практично всі відомі антигени пухлинної клітини за певних умов можуть розпізнаватися $CD4^+$ або $CD8^+$ Т-лімфоцитами; деякі антигени (окремі пептиди) розпізнаються обома субпопуляціями Т-лімфоцитів;

- диференційований аналіз частоти експресії різних антигенів на клітинах різних пухлин у багатьох випадках може бути використаний для оцінки прогнозу і ступеня злоякісності пухлинного процесу;

– всі відомі антигени пухлин можуть бути мішенню для розпізнавання, що визначає широкі можливості їх використання для отримання як моно-, так і полівалентних вакцин з метою імунотерапії;

– одним з основних критеріїв для призначення імунотерапії з використанням тих або інших антигенів служить інформація про фенотипічні особливості пухлинної клітки взагалі і експресії антигенів пухлини зокрема.

ФОРМИ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ НА ПУХЛИНИ

Оскільки імунні процеси ініціюються чужерідними антигенами, імунна відповідь на пухлинні клітини можлива лише в тому випадку, якщо вони містять антигени, які відсутні в нормальних клітинах даного індивідууму. Існування пухлинних антигенів на даний час доведено.

Вперше продемонстрував антигенні відмінності ракових клітин від нормальних Л.А. Зільбер у 1949 р. Г.І.Абелєв виділив чотири основні групи пухлинних антигенів.

Антигени вірусних пухлин

Синтез цих антигенів детермінований вірусним геномом. Наявність їх показано для ДНК-них (аденовіруси, віруси поліоми, вірус папіломи Шоупа та інші) і РНК-них (вірус пухлини молочних залоз мишей, віруси лейкозу, саркоми Рауса і інші) вірусів. Віруси першої групи індують ядерні і мембранні антигени і знаходяться в клітині. Мембранні антигени відносяться до сильних протекторних антигенів. За їх допомогою можливо ефективно імунізувати тварин проти даного типу пухлин.

Основна особливість антигенів, індукованих пухлинородинними вірусами, полягає в тому, що вони ідентичні для будь-яких пухлин, викликаних даним або родинним вірусом. Тому імунопрофілактика та імунотерапія вірусних пухлин мають більше шансів на успіх.

Антигени „канцерогенних” пухлин

Антигени пухлин, індукованих канцерогенами, жорстко індивідуальні. Вони різні у різних індивідуумів і в різних пухлинах одного і того ж індивідуума, навіть якщо для пухлин використовували один і той же канцероген. Це правило справедливе як для хімічних, так і для фізичних канцерогенних дій.

Роль і значення цих антигенів досліджується. Імунітет, утворений шляхом введення убитих клітин пухлини (наприклад, опромінених), забезпечує резистентність тварини тільки до даної пухлини, тобто, тієї конкретно пухлини, яку брали для імунізації від того ж конкретного донора.

Ізоантигени трансплантаційного типу

Ряд пухлин, які індукуються онковірусами (лейкози і рак молочної залози мишей та ін.), містять антигени трансплантаційного типу.

Трансплантаційні та інші антигени постійно присутні в хорионепітеліомі – пухлини, які складаються з елементів хоріонного епітелію плаценти, що розмножуються, включаючи клітини синцитія і клітини Лангганса, тобто, клітини плідної природи. Ця пухлина має істинно алогенну природу і містить істинні алло-антигени.

Ембріональні антигени

При гепатомах, тератомах, саркомах, карциномах і ряду індукованих вірусами і канцерогенами пухлин виявлені ембріональні антигени, специфічні для ембріональних стадій розвитку даного організму. Вони здатні імунізувати організм проти пухлин. Оскільки такі антигени зникають до або зразу після народження і в нормі ніколи не з'являються, толерантність до них

відсутня. Найбільш вивченими антигенами цього типу є α_1 -фенопротеїн протягом первинної карциноми печінки і карциноембріональний антиген (КЕА) протягом аденокарциноми шлунку, стравоходу або підшлункової залози. При злоякісних пухлинах у дітей з нефробластою, лімфосаркомою, ретикулоклітинною саркомою або з пухлинами мозку виявляється α_2 Н-фенопротеїн, під час раку шлунку – фетальний сульфоглікопротеїн. Ці антигени локалізуються в клітинних мембранах і циркулюють у крові носіїв пухлин.

Крім перерахованих груп пухлинних антигенів, виділяють ще одну – гетероорганні антигени (Е.Д.Дей, 1967). Ці антигени неможливо віднести до чужерідних для даного організму, оскільки крім пухлини, вони присутні в інших нормальних тканинах. Наприклад, гепатома містить органоспецифічний нирковий антиген, аденокарцинома нирки – антигени, типові для печінки і легенів.

В пухлинах знаходиться більшість антигенів, типових для нормальних тканин даного гістологічного типу: видоспецифічні, органоспецифічні, ізоантигени, гетероантигени, тобто, загальні з антигенами інших видів живих істот (в тому числі форсманівський антиген).

Таким чином необхідно підкреслити, що крім пухлинних антигенів, для багатьох форм злоякісних пухлин характерні деякі антигенні спрощення. Наприклад, протягом раку товстого кишечника може відбуватися втрата глікозоаміногліканових антигенів, типових для секретуючих клітин. При карциномі щитовидної залози втрачається типовий для даного органу „мікросомальний” антиген, виявлений за допомогою імунофлуоресцентного методу в мікросомах і не є тіреоглобуліном. Антигенне спрощення відображає, очевидно, втрату певних функцій раковими клітинами.

Доведено наявність двох форм імунної відповіді на пухлини – гуморальної з появою антитіл і клітинної з накопиченням Т-лімфоцитів кіллерів, сенсibilізованих проти пухлинних клітин. Роль антитіл у протипухлинному захисті „двойка”. В одних експериментах виявляється їх захисна дія, в інших – протипухлинні антитіла дають можливість

прогресивному росту пухлин. Роль клітинної імунної відповіді одна – зруйнувати пухлинні клітини.

Імунізацію тварин проти тієї чи іншої пухлини проводять кількома способами. По-перше, роблять щеплення або індукують пухлину канцерогеном з наступним хірургічним видаленням пухлинного вузла або ураженого органу до початку метастазування. По-друге, проводять імунізацію вбитими клітинами пухлини, в якості інактивуючої дії нерідко застосовують опромінення клітин γ - або рентгенівськими променями. По-третє, для імунізації, особливо вірусіндукованими пухлинами, використовують екстракти або фільтрати пухлинних тканин. В даних експериментах необхідно використовувати чистолінійні сингенні тварини. При роботі з безпородними тваринами або використанні в якості донорів і реципієнтів тварин різних генотипів протипухлинна імунна відповідь може не врахуватись. Реципієнти розвивають імунну відповідь проти ізоантигенів і в першу чергу проти нормальних трансплантаційних антигенів головної системи гістосумісності, за якими відрізняються донори і реципієнти.

Сиворотка імунізованих тварин або тварин носіїв пухлин, яка містить протипухлинні антитіла, під час переносу в інший організм може давати двоякий ефект. В деяких випадках імунізація проходить успішно: тваринам не вдається привити відповідну пухлину або для цього необхідне введення клітин первинної пухлини в значно більшій кількості. На відміну від цього, переніс лімфоїдних клітин від імунізованої тварини інтактній, не приводить до розвитку ефекту підсилення, а закінчується розвитком протипухлинної резистентності у тварини, яка отримала імунні лімфоцити.

Великий внесок у вивчення протипухлинного імунітету було внесено в результаті розробки методу інгібування пухлинних клітин *in vitro*. Ефект інгібування колоній жорстко специфічний. Наприклад, лімфоцити, взяті від миші з індукованою метилхолантреном саркомою, пригнічує ріст колоній тільки цієї пухлини, експлантованої *in vitro* від носія пухлини.

K.Hellstrom, і I. Hellstrom навели експериментальні докази на користь імуноглобулінової природи блокуючого фактору. З урахуванням

специфічності його дії, була сформована концепція блокуючих антитіл. Відповідно цій концепції, гуморальна і клітинна форми імунної відповіді на пухлину знаходяться у своєрідних антагоністичних взаємовідношеннях. Імунні лімфоцити розпізнають антигенні детермінанти пухлинних клітин і знищують їх. Доля пухлини і пухлинного носія залежить від співвідношення гуморальний/клітинний імунітет. Наявність блокуючих факторів у крові носіїв пухлин багатократно доведена. Однак питання, чи це антитіла, залишається спірним. У 1974 р. Gorzynski зі співавторами показали, що в сироватці крові блокуючі фактори являють собою не антитіла проти пухлинних антигенів, а самі пухлинні антигени, які циркулюють у крові в комплексі з антитілами. При цьому механізм блокуючої дії інший. Не антитіла закривають антигенні детермінанти пухлинних клітин, роблячи їх недоступними для лімфоцитів, а циркулюючі в крові пухлинні антигени блокують рецептори імунних лімфоцитів. Лімфоцити з заблокованими рецепторами не можуть впливати на пухлинні клітини. І як висновок необхідно підкреслити, що центральний орган імунітету – виличкова залоза – має, очевидно, відношення до проти пухлинної резистентності організму не тільки як генератор Т-лімфоцитів.

Обширні дослідження ролі виличкової залози в онкогенезі у тварин різних генотипів провели Д.К. Біляєв і Е.В. Грунтенко (1970). Показано, що у мишей “низькораккових” ліній відносна маса цього органу значно більша, ніж у “високораккових”. Трансплантація 1-2 додаткових органів зменшує процент розвитку пухлин у “високораккових” генотипів. Е.В. Грунтенко обґрунтував двояку роль виличкової залози в пухлинному рості: вона є центральним органом імунологічного нагляду, який забезпечує елімінацію ракових клітин, за виключенням неоплазм, які індукуються вертикально передаючими онкогенними вірусами, - в цих випадках зареєстрована тимусзалежність пухлин. Під час видалення виличкової залози пухлини виникають рідше і розвиваються повільніше.

ІМУНОДІАГНОСТИКА ТА ІМУНОТЕРАПІЯ ПУХЛИН

Імунодіагностика раку базується на індикації у крові ракових антигенів, виявленні протипухлинних антитіл і виявленні сенсibilізованих до пухлинних антигенів лімфоцитів.

На першому шляху досягнуто успіхів під час діагностики тих пухлин, у яких ідентифіковані конкретні ембріональні антигени. Виявлення $\alpha 1$ -фетопротейну у дорослої людини є підтвердженням наявності у неї первинної гематоми або тестикулярної тератобластоми. Виявлення КЕА свідчить про наявність у хворого аденокарциноми кишечника, шлунку або стравоходу. Однак, виявлення у крові циркулюючих тих чи інших антитіл відноситься до найменш достовірних діагностичних критеріях. Це пов'язано з наявністю у крові людей широкого спектру нормальних антитіл проти ряду мікробних і тканих антигенів, які можуть давати хибно позитивні реакції.

Перспективне виявлення сенсibilізованих лімфоцитів. Методика інгібування росту колоній пухлинних клітин лімфоцитами носіїв пухлин була застосована для діагностики нейробластоми у дітей. Виявилось, що лімфоцити хворих з нейробластомою інгібують ріст колоній пухлинних клітин даного типу, експлантованих від іншого індивідууму. Ці лімфоцити неактивні у відношенні росту колоній клітин інших пухлин.

Методи імунотерапії пухлин

Активна імунізація. Основою є той факт, що в пухлині містяться специфічні антигени, які можна ізолювати: організм має здатність розпізнати і імунологічно відреагувати на них за ефективної імунізації. Імунна відповідь повинна бути ефективною, особливо якщо основна маса пухлини видалена хірургічно або з допомогою радіотерапії. Це направлення може бути ефективним, якщо вдасться ізолювати віруси, індукуючи пухлини у людини. *Пасивна або адоптивна імунізація.* Пропонується введення

хворому донорських сироваток або лімфоцитів, які специфічно реагують проти пухлинних клітин, але не пошкоджують нормальних. У клінічній практиці рішення цього питання ускладнено антигенною гетерогенністю і індивідуальністю кожної людини.

Неспецифічна стимуляція. З цією метою використовують багаторазове введення вакцини БЦЖ, яка ефективно діє на імунну систему. Робляться спроби за допомогою сучасної сепараторної техніки виділення всіх або майже всіх циркулюючих у крові лімфоцитів стимулювати їх ФГА з наступним поверненням у кровообіг хворого.

Одним із ефективних і перспективних методів імунотерапії при порушеннях в імунопоезі та онкогематологічних захворюваннях є метод трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин.

Так, стимуляція імунопоезу при значних розладах за допомогою таких біотрансплантатів вирішує питання корекції стану імунної системи на основі стимуляції своїх потенціальних можливостей, що є запорукою мінімізації ризику реалізації інших захворювань, патогенетичним субстратом яких є імунний гомеостаз. У випадках онкогематологічних захворювань, застосування аутологічних, або гістосумісних алотрансплантатів часто є єдиним шансом на життя.(ми)

В наш час об'єми трансплантацій у Європі і США значно переважили об'єми інших великокошторисних медичних технологій. З того часу, коли було вперше було проведено хворим трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин Ж.Мате (1965-1968рр.), за що останній у 1990 р. отримав Нобелівську премію, трансплантація КМ із допоміжного метода лікування гемопоетичної недостатності, метода другого етапу, стала основним методом лікування багатьох раніше невиліковних захворювань. Розрахунки, які були проведені на конгресі Європейської спільноти ТКМ ще у 2002 році показали, що трансплантації у розвинутих країнах Європи проводять з частотою 1 на 40 – 50 тис. населення, при цьому майже половина усіх процедур відбувається у підлітків і дітей за рахунок більш розширених показань, ніж у дорослих. Сьогодні поширене застосування трансплантації кісткового мозку (ТКМ)

та стовбурових клітин периферичної крові (ТСКПК) при лікуванні життєзагрозливих гематологічних, онкологічних, спадкових та імунологічних захворювань є кульмінацією більш ніж чотирьох декад випробувань великої кількості дослідників різних країн світу.

Перші ефективні трансплантати кісткового мозку були отримані від HLA-сумісних сиблінгів. Оскільки сиблінги не є дуже розповсюдженим явищем, а запит на трансплантацію з кожним роком зростає, то практика потребувала створення реєстру HLA-гістотипованих осіб-волонтерів для забезпечення донорськими СККМ більшої кількості хворих.

Завдяки переходу селекції пар донор-реципієнт на HLA-ДНК-типування, в США сформовано банк на 1,5 млн. HLA-генотипованих зразків. Річна життєздатність пересадженого КМ зросла з 10-20% до 70-80%. Це призвело до підвищення кількості трансплантацій від неспоріднених донорів за останні 10 років більше ніж у 8 разів. Впровадження трансплантаційних методів терапії в Україні є важливим і своєчасним, так як встановлено, що зростає захворюваність на онкогематологічні захворювання і розлади в імунотопії як дорослих так і дітей (наприклад, на лейкемії і лімфоми кожного року в Україні захворює близько 7 500 осіб).

Для розвитку галузі трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин необхідною умовою є своєчасне забезпечення реципієнта сумісними біотрансплантатами. Тому в наш час на світовому рівні приділяється значна увага в галузі створення банків кріоконсервованих гістотипованих аутологічних і алогенних трансплантатів.

Обрання основного джерела ГСК для проведення конкретної трансплантації залежить від характеру основного захворювання та його стадії, клінічного протоколу, наявності клінічних протипоказань, надання переваги певному виду донорства. Для обрання донора має також значення вага донора і реципієнта. Наприклад, ексфузія стовбурових гемопоетичних клітин периферичної крові має переваги перед кістковим мозком для реципієнта,

який має велику вагу. Коли дитина мала, то певні переваги має трансплантація клітин КМ.

Загальна тенденція останніх років це перехід на трансплантацію ГСК периферичної крові, особливо це торкається аутологічних трансплантацій. При алогенних трансплантаціях, відповідно до міжнародних реєстрів кістковий мозок і периферична кров використовується приблизно у рівних пропорціях *Abstracts Book 28-th Meeting of EBMT, 2002,v.29,S.2, p.295*. Достатньо поширеним є заготівля і трансплантація гемопоетичних клітин пуповинної крові, як для аутологічної так і для алогенної трансплантацій.

Питання для самоконтролю

1. Назвіть предмет онкогенетики.
2. Причини утворення пухлин в організмі.
3. Охарактеризуйте онкогени.
4. Що таке «протоонкогени»?
5. Яким чином організм бореться з пухлинами?

ЛІТЕРАТУРА

1. Дати Ф., Метцманн Э. Белки: лабораторные тесты и клиническое применение. – М.:»Лабора», 2007. – 548 с.
2. Бережная Н.М., Чехун В.Ф. Иммунология злокачественного роста. – К., «Наукова думка», 2005. – 792 с.
3. Schreilber K., Wu T.H., Kast W.M., Schreilber H. Tracking the common ancestry of antigenically distinct cancer variants // Clin. Cancer Res. - 2001. - 7. - P. 871 - 875.
4. Schreilber H., Wu T.H., Nachman J., Rowley D.A. Immunological enhancement of primary tumor development and its prevention //Semin. Cancer Biol. -2000.— **10**, N 5. -P. 351 - 357.

5. Seliger B., Wollscheid U., Momburg F. et al. Characterization of the major histocompatibility complex class I deficiencies in B16 melanoma cells // Cancer Res. - 2001. - **61**, N 3. - P. 1095 - 1099.
6. Seliger B., Ritz U., Abele R. et al. Immune escape of melanoma: first evidence of structural alterations in two distinct components of the MHC class I antigen processing pathway // Ibid. - 2001. - **61**, N 24. - P. 8647 - 8650.
7. Van der Bruggen P., Traversari C., Chomez P. et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma // Science. - -1991. -**254**, N 5038. - P 1643 -1647.
8. Chaux P., Vantomme V., Stroobant V. et al. Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4⁺ T lymphocytes // J. Exp. Med. - 1999. - **189**, N 5. - P. 767 - 778.
9. Zeng G., Wang X., Robbins P.F. et al. CD4⁺ T cell recognition of MHC class II-restricted epitopes from NY-ESO-1 presented by a prevalent HLA DP4 allele: Association with NY-ESO-1 antibody production // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. - 2001. - **98**, N 7. -P. 3964 - 3969.
10. Gaugler B., van den Eynde B., van der Bruggen P. et al. Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes // J. Exp. Med. — 1994. - **179**, N3. - P. 921-930.
11. Zambon A., Mandruzzato S., Parenti A. et al. MAGE, BAGE, and GAGE gene expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the gastric cardia // Cancer. - 2001. - **91**, N 10. - P. 1882 – 1888.
12. Li J., Yang K, Fujie T. et al. Expression of BAGE, GAGE, and MAGE genes in human gastric carcinoma // Clin. Cancer Res. – 1996. - **2**, N 9. - P. 1619 - 1625.
13. Cheung I.Y., Chi S.N., Cheung N.K. Prognostic significance of GAGF. detection in bone marrows on survival of patients with metastatic neuroblastoma // Med. Pediatr. Oncol. -2000. -**35**, N6. - P. 632 - 634.

14. Goydos J S., Patel M., Shin W. NY-ESO-1 and CTpl 1 expression may correlate with stage of progression in melanoma // J. Surg. Res. – 2001. – **98**. N 2. - P 76 -80.
15. Aubry F., Satie A.P., Rioux-Leclercq N. et al. MAGE-A4, a germ cell soecific marker, is expressed differentially in testicular tumors//Cancer. — 2001. - **92**, N 11. – P. 2778-2785.
16. Herlyn M. Emerging concepts and technologies in melanoma research // Melanoma Res – 2002. – **12**, N 1. - P. 3 - 8.
17. Van den Eynde B., Peelers O., De Backer O. et al. A new family of genes coding for an anti gen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma // J. Exp. Med. - 1995. - **182**, N 3. – P. 689 -698.
18. Wang R., Johnson S , Zemg G. et al. A breast and melanoma shared tumor antigen: T-cell responses to antigenic peptides translated from different open reading frames // J. Immunol - 1998 - **161**. – P. 3596 - 3599.
19. Kawakami Y., Fliyah S , Delgado CM. et al. Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. - 1994. - **91**, N 14. - P. 6458 - 6462.
20. Robbins P F., Fl-Gamil M., Kawakami Y. et al. Recognition of tyrosinase by tumor infiltrating lymphocytes from a patient responding to immunotherapy // Cancer Res. - 1994. - **54**. N 12. - P. 3124 - 3126.
21. Robbins P.P., El-Gamil M., И Y.F. et al. A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes//J Exp Med. 1996. - **183**, N 3. - P. 1185 -1192.
22. Rosenberg S.A., Yang J.C, White D.E., Steinberg S.M. Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response // Ann. Surg. - 1998. - **228**, N 3. – P. 307 – 319.
23. Spagnoh G.C., Schaefer C., Wdhmann T.E. et al. Peptide-specific CTL in tumor infiltrating lymphocytes from metastatic melanomas expressing MART- 1/Melan-A, gp100 and Tyrosinase genes: a study in an

- unselected group of HEA A2.1-positive patients // *Int. J. Cancer.* - 1995. - **64**, N 5. - P. 309-315.
24. Topalian S.I., Gonzales M.I., Parkhurst M. et al. Melanoma specific CD4+ T cells recognize nonmutated HLA-DR-restricted tyrosinase epitopes // *J Exp. Med.* -1996 -**183**, N 5. - P. 1965 – 1971.
 25. Mullins D.W., Bullock T.N., Colella T.A. et al. Immune responses to the HLA-A*0201 -restricted epitopes of tyrosinase and glycoprotein 100 enable control of outgrowth in HLA-A*0201 transgenic mice // *J. Immunol.* - 2001. - **167**, N 9. - P. 4853 -4860.
 26. Samija A., Juretic A., Solaric M. et al. RT-PCR detection of tyrosinase, gp100, MART1/Melan-A, and TRP-2 gene transcripts in peripheral blood of melanoma patients // *Croat. Med. J.* - 2001. - **42**, N 4. - P. 478 - 483.
 27. Shidham V.B., Qi D. Y, Acker S. et al. Evaluation of micrometastases in sentinel lymph nodes of cutaneous melanoma: higher diagnostic accuracy with Melan-A and MART-1 compared with S-100 protein and HMB-45 // *Amer J. Surg. Pathol.* -2001.- **25**, N8. -P. 1039 - 1046.
 28. Prasad M.L., Jungbluth A.A., Iversen K. et al. Expression of melanocytic differentiation markers in malignant melanomas of the oral and sinonasal mucosa // *Amer J. Surg. Pathol.* - 2001.— **25**, N 6. – P. 782 - 787.
 29. Kobayashi Y., Higashi T., Nouse K. et al. Expression of MAGE, GAGE and BAGE genes in human liver diseases: utility as molecular markers for hepatocellular carcinoma // *J Hepatol.* - 2000. - **32**, N 4. - P. 612 – 617.
 30. Parmiani G. Melanoma antigens and their recognition by T cells // *Keio. J. Med.* — 2001. — **50**, N 2. - P. 86 - 90.
 31. Castelli C, Rivoltini L., Andreola G. et al. T-cell recognition of melanoma-associated antigens // *J. Cell. Physiol.* - 2000. - **182**, N 3. - P. 323 - 331.
 32. Van Aken F., De Wever O., Correia da Rocha A.S., Mareel M. Defective E-cadherin/catenin complex in human cancer // *Virchows Arch.* — 2001. — **439**, N 6. — P. 725-751.

33. Mumberg D., Wick M., Schreiber H. Unique tumor antigens redefined as mutant tumor-specific antigens // *Semin. Immunol.* - 1996. - **8**, N 5. - P. 289 - 293.
34. Beck-Engeser G.B., Monach P.A., Mumberg D. et al. Point mutation in essential genes with loss or mutation of the second allele: relevance to the retention of tumor-specific antigens // *J. Exp. Med.* - 2001. - 194, N 3. - P. 285-300.
35. Dubey P., Meredith S.C., Siegel C. T., Schreiber H. Tumor cells induce cytolytic T cells to a single immunodominant mutant peptide // *J. Immunother.* - 1998. — **21**, N 4. — P. 277 - 282.
36. Zeng G., Touloukian C, Wang X. et al. Identification of CD4+ T cell epitopes from NY-ESO-1 presented by HLA-DR molecules // *Ibid.* - 2000. - **165**. - P. 1153 - 1159.
37. Kirkin A.F., Dzhandihugazyan K., Zeuthen J. The immunogenic properties of melanoma-associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes // *Exp. Clin. Immunogenet.* - 1998. - **15**, N 1. - P. 19 – 32.
38. Mandruzzato S., Brasseur F., Andry G. et al. A Casp 8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma // *J. Exp. Med.* — 1997. — **186**, N 5. - P. 785 -793.
39. Natkunam Y., Warnke R.A , Montgomery K. et al. Analysis of MUM1/IRF4 protein expression using tissue microarrays and immunohistochemistry// *Mod. Pathol.* – 2001. – **14**, N 7. – P. 686 – 694.
40. Yoshida S., Nakazawa N., Iida S. et al. Detection of MUM1/IRF4-IgH fusion in multiple myeloma // *Leukemia.* – 1999. – **13**, N 11. – P. 1812 – 1816.
41. Gaiddon C, Lokshin M., Ahn J. et al. A Subset of Tumor-Derived Mutant Forms of p53 Down-Regulate p63 and p73 through a Direct Interaction with the p53 Core Domain // *Mol. Cell. Biol.* – 2001. – **21**, N 5. - P. 1874 – 1887.
42. Глузман Д.Ф., Абраменко И.В., Склярченко Л.М , Надгорная В.А. Лабораторная диагностика онкогематологических заболеваний. – Киев: Морион, 1998. – 335 с.

43. Агеев А.И. Молекулярная биология и иммунология вирусного канцерогенеза. — М.: Медицина, 1974. — 327 с.
44. Hombach A., Schneider C, Sent D. et al. An entirely humanized CD3 zeta-chain signaling receptor that directs peripheral blood t cells to specific lysis of carcinoembryonic antigen-positive tumor cells // Int. J. Cancer. — 2000. — **88**, N 1. — P. 115 – 120.
45. Bajenova O., Stolper J., Gapon S. et al. Surface expression of heterogeneous nuclear RNA binding protein M4 on Kupffer cell relates to its function as a carcinoembryonic antigen receptor // Exp. Cell Res. — 2003. — **291**, N 1. — P. 228 – 241.
46. Salaiar J., Zaremba S., Arlen P.M. et al. Agonist peptide from a cytotoxic T-lymphocyte epitope of human carcinoembryonic antigen stimulates production of TCl-type cytokines and increases tyrosine phosphorylation more efficiently than cognate peptide // Int. J. Cancer. — 2000. — **85**, N 6. — P. 829 – 838.
47. Marshall J. Carcinoembryonic antigen based vaccines // Semin. Oncol — 2003. — **30**, N 3. — P. 30 – 36.
48. Rosenbergs.A Shedding light on immunotherapy for cancer //N. Engl. J. Med. — 2004. — **350**, N 14. — P. 1461 – 1463.
49. Powell D.J.Jr., Rosenberg S A. Phenotypic and functional maturation of tumor antigen-reactive CD8+ T lymphocytes in patients undergoing multiple course peptide vaccination // J. Immunother. — 2004. — **27**, N 1. — P. 36 – 47.
50. Mate G.,Amiel J.I.,Schwarztnberg/ Bone marrow transplantation and white cell transfusions, Springfield. V.1. 1971. i E.Tomacom Thomas E,D, Storb R., et al. Bone marrow transplantation //N. Tngl. J. Ved, 1975. V. 292.p. 832-643; 895-902./ Thomas E,D. Bone marrow transplantation - past, present and future, 1990,In the Nobel Puzes,Stokgholm.

12. ФАРМАКОГЕНЕТИКА

У сучасному розумінні виділяють декілька прикладних напрямків розвитку генетики сьогодення. Серед них одним з напрямків вважають фармакогенетику, успіхи якої відразу людство втілює в життя. Термін **фармакогенетика** походить від др.-греч. *φάρμακον* — ліки і генетика) — розділ генетики, який вивчає характер реакцій організму на лікарські засоби в залежності від спадкових факторів. Іншими словами, фармакогенетика вивчає спадкові (типові й нетипові) реакції організму при його взаємодії з лікарськими речовинами.

Історія становлення і сучасна проблематика фармакогенетики

Зараз дуже важко стверджувати, хто був першим автором, який запропонував використовувати даний термін. За одними джерелами це був Vogel F. (1959 p.), за іншими - Motulsky AG (1957 p.).

Історію фармакогенетики можна умовно виділити на такі етапи:

I етап - накопичення фармакогенетичних феноменів (1932 - початок 1960-х рр.);

II етап - становлення фармакогенетики як фундаментальної науки (початок 1960-х –1990-і рр.);

III етап - становлення фармакогенетики як прикладної клінічної науки, перехід від фармакогенетики до фармакогеноміки (початок 2000-х рр.- наші дні).

Деякі дослідники, зокрема, В. Вебер (Weber) у своєму підручнику «Фармакогенетика» поділяє історію становлення фармакогенетики більш докладно наступним чином, як це показано в табл. 1.

Провідна проблема клінічної фармакології – визначення ролі генетичних факторів в індивідуальній чутливості – адже кожному хворому – індивідуальна високоефективна і безпечна програма лікування.

Становлення фармакогенетики

1850-1910 рр. Клітинні відкриття	1910-1960 рр. Молекулярні відкриття	1960-1990 рр. Інформаційні відкриття	1990 рр.- теперішній час Геномні відкриття
Відкриття законів Менделя, їх втрата і перевідкриття	Ідентифікація ДНК як спадкового матеріалу	Відкриття гібридизації ДНК-РНК	Відкриті вагомі, високо-продуктивні технології
Біотрансформація хімічних елементів, відкритих у людини Виведені рецептори до ліків	Відкриття подвійної спіралі ДНК Сформульована центральна догма молекулярної біології	Розшифрування генетичного коду ядерних генів Зчитування інформації про роботу ядерних генів	Завершення розшифровки генетичного коду людини Відкриття токсико-геномності лікарських препаратів
Визначення хромосом як локусу спадковості	Встановлений білковий поліморфізм	Створена технологія рекомбінантної ДНК	Конструювання небезпечних профілей для сприйняття ліків
Визначена хімічна індивідуальність людей	Пронумеровані людські хромосоми Асоційовані захворювання з хромосомними абераціями Експериментально виявлена фармакогенетика	Визначена послідовність мітохондріального геному Визначений мітохондріальний генетичний код Відкриття ПЛР Створення геномних інструментів Ідентифікація ДНК-поліморфізму	епігеноміка

		Ініціація початку розшифровки людського геному Епігенетичні модифікації генної експресії	

У вікових категоріях велике значення мають особливості проявів генетичного забезпечення фармакологічних реакцій („тимчасова незрілість” у новонароджених і поступове „в’янення” у осіб старечого віку).

Фармакогенетики використовують весь арсенал методів генетики, зокрема, статистичні методи, методи комп’ютерного аналізу та моделювання та інші.

Фармакогенетика відкрила величезну генетичну розмаїтість людей. Генна інженерія, використовуючи метод молекулярних відбитків, показала, що на Землі немає двох ідентичних за складом і будовою генів представників *H. sapiens*. Геноми різних людей відрізняються в одних випадках більше, в інших – менше. Генетична розмаїтість підтримується еволюцією як селективно корисна ознака.

З урахуванням величини генетичного вантажу в різних популяціях населення підраховано, що кожна людина в середньому несе 10 різних шкідливих генів. Крім розходжень за структурою генів і геномів люди розрізняються також за генетичною активністю.

Генетична розмаїтість визначає надзвичайний фенотиповий поліморфізм людини, що підсилюється факторами зовнішнього середовища, які варіюють у просторі і часі. Саме варіабельною сукупною дією генетичних та екологічних факторів визначається фенотипова розмаїтість людини.

У біології лінією розмежування між нормою і патологією чисто умовно прийнято вважати 95 %-ним рівнем. Це означає, що нормою вважаються ті ознаки, якими володіють 95 % людей досліджуваної популяції. Ті ознаки, які виходять за ці межі, розглядаються як відхилення від норми. Р. Вільямі, узагальнюючи величезний фактичний матеріал, стверджує, що практично

кожна людина представляє собою в тому чи іншому відношенні відхилення від норми.

Якщо зобразити кількісно фенотипові ознаки людини у вигляді відрізків, які виходять веєроподібно з однієї крапки, то вони утворять коло, назване нами «трояндою ознак». «Троянда ознак» ідеальної людини при певних масштабах може нагадувати собою «велосипедне колесо», а реальної людини, народженої у змішаному шлюбі, – «покручене велосипедне колесо» з окремими спицями, що випали.

З огляду на розходження реальних людей за їх «трояндою ознак», можна очікувати, що реакція їхнього організму на вплив різних токсичних або лікарських препаратів буде сильно коливатися. Це в дійсності і було виявлено в багатьох фармакологічних та токсикологічних дослідженнях, які привели до створення нової наукової дисципліни – генетичної токсикології, що вивчає особливості дії отруйних речовин залежно від генетичної розмаїтості організмів. Вперше Дж. Шелленс і Д. Бреймер у 1987 р. опублікували огляд досліджень по вивченню широкої варіабельності швидкості метаболізму лікарських препаратів і ксенобіотиків. У цей час був виявлений величезний поліморфізм метаболізму ксенобіотиків. Встановлено, що частота розподілу фармакокінетичний параметрів звичайно характеризується бімодальністю, тобто наявністю слабого й сильного типу метаболізму. Це було показано на прикладі ацетилювання ізоніазиду, окислювання дебризохіну і спартеїну. Поліморфний характер метаболізму ксенобіотиків визначається гетерогенністю ферментативних систем, особливо цитохрома Р-450.

Індивідуальна чутливість залежить від генотипу. Про сутність варіабельності можна судити після встановлення **ЕД 50** – доза лікарського препарату, яка викликає фармакологічний ефект у 50 % досліджуваних. У окремих індивідуумів реакція на лікарський препарат коливається – для дикумарину у 10-13 раз більша, бутадіону – 6-7, етилового спирту – в 2 р.

На ефективність дії і токсичність лікарських та інших ксенобіотиків впливають не тільки генетичні фактори і чинники зовнішнього середовища,

але й внутрішні біоритми, властиві живим істотам, а також вік, печінкові, ниркові, серцево-судинні функції, споживання певних лікарських препаратів алкоголю, паління, особливості харчування.

Іноді генетичні особливості організму відповідальні за надзвичайно бурхливу відповідну реакцію на певний лікарський препарат. Як приклад можна навести гемоліз еритроцитів у 1 % негрів, арабів, євреїв, греків, курдів, жителів Південно-Східної Азії у відповідь на введення барбітуратів. У цих людей генетично відсутній глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа (Г-6-ФД). Через порушення активності синтетази- δ -амінолевулінової кислоти іноді розвивається внутрішньоутробна порфірія. У деяких осіб фуросемід і вітамін В12 провокують гострі приступи подагри. У інших людей з ідіосинкразією до хініну фенотіазини викликають паркінсонподібні симптоми.

Таким чином, генетична розмаїтість людини ставить перед фармакогенетикою нові проблеми, обумовлені неоднаковою чутливістю різних організмів до тої або іншої хімічної речовини. Вона пояснює, чому різні індивідууми по-різному реагують на однаковий фармакологічний препарат. При цьому відзначається широка індивідуальна непереносимість окремих препаратів, навіть після першого їх вживання - ідіосинкразія. Ця індивідуальна чутливість може бути не тільки вродженою, але й набутою внаслідок перенесених захворювань, особливо захворювань печінки. Вроджена підвищена чутливість до лікарських препаратів може бути пов'язана з порушенням їх всмоктування, порушенням проміжного метаболізму або виділення з організму. Швидкість всмоктування ліків, прийнятих через рот, залежить від їх фізико-хімічних властивостей, а також стану слизової оболонки шлунково-кишкового тракту, його травних соків. Розподіл лікарської речовини в організмі залежить від здатності проникнення її через різні тканинні бар'єри (судинний, гематоенцефалітичний та ін.), а це визначається як станом самих бар'єрів, так і властивістю, концентрацією лікарської речовини. Виділення лікарських речовин й їхніх метаболітів з організму відбувається в основному нирками і печінкою.

У фармакогенетичних дослідженнях прийнято визначення таких показників як $T_{1/2}$ для ЛЗ після одноразового введення медичного препарату у стандартній кількості - дозі: на близнюках дія дикумарину, бутадіону, спирту етилового. Кожен з 28 близнюків отримував одноразово бутадіон по 6 мг/кг, через кілька місяців – антипірин по 18 мг/кг, потім дикумарин по 4 мг/кг. Через відповідні інтервали часу проводили забір крові. Серед однойцевих близнюків показники співпадали, а серед двояйцевих – діапазон індивідуальних відмінностей був великим.

Кількісну залежність між генетичними і зовнішніми факторами в фармакологічній реакції прийнято виражати показником спадковості:

$$(P1-P2)/P1,$$

де $P1$ – відмінність $T_{1/2}$ у пари одно яйцевих, $P2$ – у двояйцевих близнят; 0 – несуттєва роль спадкових факторів, 1 – певна залежність від них.

У однойцевих близнят є повна тотожність у генах, у двояйцевих – такої ідентичності немає, хоча спільних генів не менше 50 %.

Різна активність багатьох ферментів зумовлена існуванням їх у кількох молекулярних формах – ізоферментах. Бутирилхолінестераза існує у 4 ізоферментах, а 10 % населення має ще і 5-у.

Можлива гетерогенність білків, які забезпечують всмоктування і розподіл. Тому можливі ускладнення. Для їх профілактики найкраще визначати концентрацію препарату в крові:

- лікарський анамнез;
- спадковий анамнез;
- відношення до препаратів;
- проведення проби на чутливість (переносимість);
- корекція в процесі лікування.

Більшість лікарських засобів - це високоактивні речовини з чіткою спрямованістю дії, і найменша неточність у призначенні їх може спричинити серйозні порушення в організмі хворого. Часто перед лікарем стоїть складне

завдання - вибрати з великого арсеналу лікарських засобів не тільки найефективніший, а найменш токсичний препарат, а також зменшити ризик його негативного впливу на організм. Це потребує глибокого розуміння того, що одна й та сама речовина за різних умов (наприклад, різні дози, чинники зовнішнього середовища, стан організму тощо) може мати лікувальний або токсичний ефект.

Всмоктування багатьох лікарських речовин у шлунково-кишковому тракті відбувається за допомогою особливих транспортних білків. Так, наприклад, всмоктування гідроокису заліза ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) у кишечнику відбувається за допомогою білка апоферитину. Подальший транспорт атомів заліза до кісткового мозку, печінки й селезінки здійснюється іншим білком - трансферином. При відсутності або дефектності зазначених білків порушується засвоєння заліза, у хворих розвивається дефіцитна анемія.

Одна з форм рахіту (вітамін-D-резистентний рахіт) обумовлена зниженням зворотнього всмоктування фосфатів у дистальних відділах ниркових каналців. Організм хворого втрачає багато фосфору, настає гіпофосфатемія, яка проявляється рахітоподібним захворюванням. Багато лікарських речовин зв'язуються з альбумінами крові. Міцність цього зв'язку багато в чому визначає швидкість і тривалість фармакологічної дії препарату.

Типовим прикладом парадоксальної реакції на ліки є гемоліз еритроцитів у носіїв є мутація в гені Г-6-ФД після використання сульфаніламідів, примахіна та інших препаратів (до 40 назв). Спасти таких хворих можливо тільки терміновим гемодіалізом або обмінним переливанням крові.

Однак в основному індивідуальна чутливість до лікарських препаратів обумовлена різною генетично обумовленою активністю ферментів лікарського метаболізму. У випадках падіння активності зазначених ферментів лікарські речовини накопичуються в організмі в більших кількостях і негативно впливають на людину. При підвищеній активності ферментів швидкість їх розпаду й знешкодження може підвищуватися, що приводить до зниження їх лікувального ефекту.

Порушення активності ферментів може бути викликане зниженням рівня їх утворення, зміною швидкості розпаду або перекрученням нормальної структури. Ці порушення в клініці визначаються як ензимопатії. Розрізняють явні і приховані ферментопатії. До явних ферментопатій відносять дефекти тих ферментів, які беруть участь не тільки в обміні ліків, але й власних компонентів організму (амінокислот, вуглеводів ліпідів). До прихованих - дефекти тих ферментів, які беруть участь в обміні лікарських речовин та інших екзогенних хімічних речовин. Ці приховані ферментопатії виявляються лише при надходженні в організм певних лікарських речовин. Якщо організм не зустрівся з тими або іншими хімічними речовинами у своєму житті, то він може й не виявити свого дефекту.

Знешкодження лікарських речовин в організмі звичайно відбувається у дві фази. У першій фазі завдяки окислюванню, відновленню, гідролізу й іншим хімічним процесам відбувається значна зміна структури лікарської речовини, підвищується полярність його молекули. У другій фазі відбувається приєднання (кон'югація) лікарської речовини або його метаболітів до глюкуронової, сірної кислот або амінокислотам та іншим речовинам.

У результаті зазначеної кон'югації утворюються метаболіти більш складної структури, що мають більшу полярність, вони легше розчиняються у воді і добре виводяться з організму нирками.

Одні лікарські речовини проходять тільки одну фазу хімічної модифікації, інші — обидві. Так, наприклад, етиловий спирт (C_2H_5OH) шляхом окислювання розпадається до $2CO_2 + 3H_2O$, а бензол спочатку окислюється до фенолу, а останній кон'югує з сірчаною і глюкуроною кислотами, перетворюється на фенілсульфат і фенілглюкуронін, відповідно, які виводяться із сечею.

Багато ферментів лікарського метаболізму локалізуються в ендоплазматичних мембранах клітин печінки та інших органів, у формених елементах крові й у її сировотці. Особливо важливо для детоксикації

сторонніх (ксенобіотиків) стан печінки, де локалізується комплекс цитохрома Р-450, що бере участь в їх обміні.

Оскільки фармакогенетика вивчає генетичні особливості пацієнта, які впливають на фармакологічну відповідь, то ці генетичні особливості, як правило, представляють собою поліморфні ділянки генів білків, що беруть участь у фармакокінетиці або у фармакодинаміці лікарських препаратів. До першої групи належать гени, які кодують ферменти біотрансформації та гени транспортерів, які беруть участь у всмоктуванні, розподілі і виведенні лікарських засобів з організму. В наш час, активно вивчається роль генів, що контролюють синтез і роботу ферментів біотрансформації ліків, зокрема, ізоферментів цитохрома Р-450 (CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19) і ферментів II-ї фази біотрансформації (N-ацетилтрансферази, УДФ-глюкуронілтрансферази, тіопуринметил-трансферази, глутатіон SH-S-трансферази і т. д.).

В останні роки розпочато вивчення впливу на фармакокінетику ліків поліморфізму генів, так званих транспортерів лікарських засобів: транспортерів органічних аніонів (OATP-C, OAT-1, OAT-3), транспортерів органічних катіонів (OCT-1) і Р-глікопротеїна (MDR1). До другої групи віднесені гени, які кодують «молекули-мішені» лікарських засобів (рецептори, ферменти, іонні канали) і гени, продукти яких залучені у патогенні процеси (фактори згортання крові, аполіпопротеїни і т. д.). Саме виявлення певних алельних варіантів цих генів і є сутністю фармакогенетичних тестів. Отже, застосування таких тестів дозволяє завчасно прогнозувати фармакологічну відповідь на лікарський препарат та індивідуалізовано підійти до вибору медичного препарату і його режиму дозування, а, в деяких випадках і тактику лікування пацієнтів. Тому фармакогенетику розглядають одним з перспективних напрямків персоналізованої медицини.

Як правило лікар під час лікування хворого стикається з різними ускладненнями лікарської терапії:

- ❖ підвищеною чутливістю хворого до лікарського препарату, як це буває у випадках передозування препарату, хоча людині назначається доза, що відповідає його віку і статі;
- ❖ повною толерантністю хворого до ліків, навіть не дивлячись на збільшення дози;
- ❖ парадоксальними реакціями на ліки, зокрема зовсім інші типи ускладнень, ніж це слід було очікувати, виходячи з механізмів дії препарату.

Розглянемо приклади для вищенаведених трьох груп фармакологічних варіантів реакцій.

На початку 50-х років XX ст. для лікування туберкульозу почали застосовувати новий, ефективний препарат ізоніазид. Проте у деяких хворих після вживання стандартних доз спостерігались токсичні ефекти, які відповідали його багаторазовому передозуванню. Причини цього явища були незрозумілими до тих пір, поки не були проведені клініко-генетичні дослідження. Вони показали, що токсичні ефекти ізоніазиду мають спадковий характер, тобто спостерігається родинне накопичення подібних випадків «передозування» від нормальних доз. Механізм токсичної дії ізоніазиду у відповідних родинах виявився дуже простим: у хворих екскреція даного препарату з організму дуже повільна. При регулярному надходженню препарату в організм низька екскреція призводить до його накопичення в організмі аж до токсичної дози.

Зараз відомо, що виведення ізоніазиду з організму здійснюється після його ацетилювання за допомогою N-ацетилтрансферази печінки. Якщо фермент нормальний, то у таких людей на протязі 2 год ізоніазид виводиться з організму, якщо фермент аномальний (завдяки успадкуванню мутантних алелей відповідальних за синтез ферменту), то ізоніазид ацетилюється і виводиться з організму повільно (через 6 год). Крім того, у таких осіб, помірних ацетиляторів, спостерігаються враження периферійних нервів. Отже, варіанти реакції на даний препарат визначаються генетичним поліморфізмом гена, відповідального за синтез ферменту N-

ацетилтрансферази (швидше і повільніше - ацетилятори). Ця ознака - швидкість ацетилювання – успадковується за аутосомно-рецесивним типом. Патологічні явища, ймовірно, спостерігаються при прийомі не тільки ізоніазиду, але й інших препаратів, зокрема, у.

У деяких родинах поряд зі здоровими зустрічаються особи, резистентні до антикоагулянтним препаратам. Це обумовлене генетично детермінованою мутантною формою метаболізму вітаміну К, який бере участь у коагуляції крові.

Чутливість до суксаметонію пов'язана з мутацією у локусі сивороточної холінестерази, аномальної холінестерази. Ця мутація кодується геном 03q252/CHE1 - butyrylcholinesterase (cholinesterase 1, serum). У таких випадках не інактивується дитилін, який застосовується у хірургії як м'язовий релаксant і проявляється як отрута кураре, що зупиняє дихання.

У нормі цей препарат – дитилін, діє швидко і розкладається сиворотковою холінестеразою. Якщо холінестераза атипова за рахунок мутації у відповідному гені, то у такої людини з таким неактивним ферментом при введенні дитиліну відбувається зупинка дихання на 1 год. Існує два патологічних алеля (Es і Ef; норма Eu), які відрізняються за силою дії. У гетерозигот по алелям Es і Ef повністю проявляється патологічний ефект, а гетерозиготи типу EuEs чи EuEf мають холінестеразу з нормальною активністю. Атипова холінестераза ідентифікується в лабораторних умовах.

Частота гетерозигот з наведеною аномалією у європейських популяціях складає 3-4%, тобто частота клінічно важливих гомозигот буде приблизно 1:3500. У популяціях східних та африканських народів патологічні алелі зустрічаються дуже рідко. Алель Es у гомозиготному стані обумовлює повну відсутність холінестеразної активності, і такі особини високочутливі до дитиліну. Даний алель широко розповсюджений серед ескімосів Аляски. Типовою фармакогенетичною ознакою є злаякісна гіпертермія. Передбачається домінантний тип її успадкування з неповною пенетрантністю і варіюючою експресивністю, проте не виключається і полігенний характер. Первинний механізм враження поки не до кінця зрозумілий. Провокуючими

факторами виступають інгаляційні анестетики (фторотан, етиловий ефір і т.д.) та деякі м'язові релаксанти. У хворих піднімається температура тіла до 44 °С і більше, при цьому спостерігається тахікардія, гіпоксія, ацидоз, гіперкалімія, гіпокальціємія, змінюється ритм дихання. З 200 описаних таких хворих 60% померло від зупинки серця. Хворих можна спасти тільки штучною вентиляцією легень протягом цього періоду.

Закапування очей розчином глюкокортикоїдів у деяких людей викликає сильне підвищення внутрішньо очного тиску, у інших - менше, а у третіх цей тиск зовсім не змінюється (5%, 29% і 66%, відповідно). Особливо виражено на глюкокортикоїди реагують родичі хворих на відкритокутову глаукому. Клінічно-генеалогічний аналіз, проведений у осіб, які реагують на глюкокортикоїди, показує трьохмодальний розподіл за ознакою. Ця ознака, відмічають, сильно проявляється у гомозигот (РнРн) і слабше у гетерозигот (PLPH). Ймовірність захворіти на глаукому у гетерозигот становить у 18 разів, а у гомозигот в 101 раз більше, ніж у гомозигот за нормальним алелем.

Розглянуті вище випадки найбільш досліджених в клінічній патології реакції наведені в табл.2.

Спадково обумовлені паталогічні реакції на ліки

Генетична ознака (варіант)	Провокуючий препарат	Патологічна реакція
Недостатність Г-6-ФД	Примахін, сульфаніламідні препарати (всього 40)	Гемоліз еритроцитів
Знижене ацетилювання (поліморфізм ацетилтрансфераз)	Ізоніазид, гідраніцин, сульфадимезин, дитилін, диафенілсульфон	Побічні ефекти, характерні для кожного препарату
Чутливість до дитиліну (аномальна холінестераза)	Дитилін,	Тривала зупинка дихання
Недостатність мет-гемоглобінредуктази	Примахін, дифеніл-сульфон, осингалін	Цианоз
Злоякісна гіпертермія	Загальні анестетики	Гіпертермія
Підвищений внутрішньо очний тиск після прийому глюкокортикоїдів	Місцеве використання (очі) глюкокортикоїдів	Підвищений внутрішньо очний тиск
Аномальна дегідрогенація спартеїна	Спартеїн	Тяжкі побічні ефекти під час лікування серцевої аритмії
Нестабильні деякі гемоглобіни	Окисники	Гемоліз еритроцитів
Недостатність гідроксилювання дифеніну	Дифенін	Атаксія, нистагм

Поширеність наведених у табл. 2 фармакогенетичних реакцій вивчена не у всіх популяціях, але для деяких популяцій вказані ознаки широко розповсюджені. Для низки мутацій точно ідентифікований первинний

аномальний продукт і механізм розвитку ускладнень, для інших ознак природа аномальної реакції ще не зовсім відома.

Вище були також представлені приклади з усіх трьох груп спадково обумовлених варіацій відповідей на ліки (**збільшена чутливість, толерантність, парадоксальність**). До цього часу розшифровані патофізіологічні і генетичні механізми багатьох з них (декілька десятків). При цьому чим більше спеціалізований новий медичний препарат, тим більше ймовірність його неефективності у певного числа пацієнтів.

Будь-які фармакогенетичні реакції розвиваються на підставі широкого генетичного поліморфізму у людських популяціях, еволюційно сформованих до появи застосовуючих зараз медичних препаратів.

Прогресу фармакогенетики сприяли два принципових підходи:

- розуміння фармакогенетичних закономірностей на підставі різниць у метаболізмі ліків;
- пояснення різниць у реакціях на медичний препарат різницями органів-мішеней, клітин чи рецепторів.

Успіхи, досягнуті фармакогенетикою, дозволили клінічно зрозуміти толерантність медичного препарату і підвищену чутливість до певного препарату у тої або іншої людини. Від прогресу фармакогенетики значно залежить індивідуалізація лікувальної терапії (вибір аналога, доза, спосіб введення). З лікарської практики добре відома значна варіабельність в ефективності і побічних діях ліків серед різних груп населення та різних осіб. При введенні стандартної дози препарату його концентрація в крові у деяких людей через певний проміжок часу виявляється нижче оптимальної, а у інших пацієнтів досягає токсичного рівня. Це може свідчити про полігенний характер успадкування ознаки чи про впливи середовища різного прояву. Виникає питання: чи є генетична компонента, яка визначає концентрацію ліків в крові? За допомогою близнюкового і клініко-генеалогічного методів виявлено, що така варіабельність в значному ступені генетично детермінована.

Як гени впливають на дію ліків? Гени містять інформацію, яка визначає амінокислотну послідовність білків, в тому числі тих, які беруть участь у біологічно важливих реакціях на ліки і складаються і містять такі важливі елементи, як енхансери, промотори, які регулюють експресію гена, 5' і 3' не транслуючі регіони (UTRs), екзони, які кодують білок, та інтрони. Кінцевий результат генної активності – це синтез білків та їх транспорт до їх характерних індивідуальних сайтів в клітинах і тканинах, де вони виконують свої основні функції. Якщо послідовність ДНК змінюється (мутує), білки можуть не експресуватися певним чином або взагалі не функціонувати, або не досягати свого сайту (табл. 3).

Таблиця 3

Дефекти біосинтезу в залежності від місця локалізації мутації в гені

№	Місце локалізації мутації	Дефект білку
1.	Область відкритого зчитування (ОВЗ) кодує-чого регіону, старт-кодон	Білок не синтезується
2.	Стоп-кодон, інш. кодони; промотор, енхансер	Неправильний розмір білка, зміни у функціонуванні, погане зв'язування, нестабільний, з дефектною експресією, не здатний відповідати на нормальний і контрольні сигнали.
3.	3'-сигнал UTR-поліаденілювання	Зменшення/збільшення у стабілізації, дефекти експресії

Мутації ДНК, які зустрічаються з частотою 1% і більше називаються поліморфізмами. Поліморфізм ДНК – це повтори, інсерції, делеції, дуплікації, інверсії і поодинокі нуклеотидні поліморфізми (single nucleotide polymorphisms (SNPs)). Поліморфізми в будь-яких нуклеотидах можуть торкатися інших функцій чи експресії генних продуктів.

Як відмічалось вище, доля ліків в організмі визначається такими процесами, як всмоктування, розподіл (по органам, клітинам, органелам), взаємозв'язок з клітинними елементами, метаболізм і виведення. Всі ступені

кінетики лікарських препаратів і динаміки їх дії відбуваються за допомогою специфічних і неспецифічних ферментів і білків. Враховуючи широкий біохімічний поліморфізм людських популяцій, можна припустити, що доля кожного препарату на якомусь фармакокінетичному чи фармакодинамічному етапі пов'язана з поліморфною системою ферменту, білка, рецептора та інших клітинних мішеней. Це і обумовлює досить різноманітні реакції людей на ліки.

З фармакологічної точки зору варіації відповідей на ліки можуть бути обумовленими або змінами метаболізму препарату (їх доля в організмі), або зміною динаміки їх дії (порушення клітинних мішеней препаратів).

Що стосується аномалій метаболізму ліків можна сказати, що генетична детермінація ферментів, яка забезпечує метаболізм чи фармакокінетику медичних препаратів, не викликає сумнівів. Виникнення мутацій в таких генах призводить до відсутності синтезу фермента або втраті його активності. Як правило, такі мутації успадковуються за аутосомно-рецесивним типом і тому дефект ферменту проявляється тільки у гомозигот, отже, не дуже часто, хоча в деяких популяціях частота мутантного алеля і відповідно число осіб з патологічною реакцією на лікарський препарат можуть бути високими.

Друга група неадекватних реакцій на ліки - фармакологічні ефекти через взаємодію з білками-мішенями, такими, як рецептори, ферменти, білки сигнальної трансдукції, контролю клітинного циклу та інших подій. Молекулярно-генетичні дослідження показали, що більшість генів, які кодують такі лікарські мішені, поліморфні. Їх мутантні форми призводять, відповідно до порушення специфічних взаємодій препарату і мішені, а далі - до аномальної реакції на рівні організму.

Спадкові різниці описані для всіх складових частин фармакокінетичного процесу (всмоктування, розподілу по органам і тканинам, взаємодії з рецептором чи мішенню і т.д.). Їх можна проілюструвати прикладами внутрішньокласових коефіцієнтів кореляції для ступеня виведення ліків між парами моно- і дизиготних близнюків: у

монозиготних близнюків ці показники набагато вищі, ніж у дизиготних. Розрахунки, основані на співставленні коефіцієнтів кореляції, показують, що генетичний контроль процесів виведення багатьох лікарських препаратів не викликають сумнівів. Коефіцієнт успадкування цієї ознаки для багатьох препаратів наближується до 1 (наприклад, для антипірину і фенілбутазона - 0,99, для дикумарола та аспірину - 0,98). Подібний висновок зроблений на підставі результатів використання не тільки близнюкового, але й клініко-генеалогічного методу по відношенню і до інших препаратів. Залишається ще не зовсім зрозумілим, чи існує кореляція у швидкості виведення різних ліків у однієї і тієї ж людини. Проведені дослідження не дали конкретних однозначних результатів.

Всі ферментопатії (ензимопатії) передаються за менделівським або багатофакторним типом і складаються з латентного періоду та загострення патологічного процесу. Приклади найпоширеніших ферментопатій та їх характеристики та особливості представлені у табл. 4.

Таблиця 4

Генетично-обумовлені ферментопатії

Назва ферменту	Роль ферменту у метаболізмі	Лікарський препарат, що проковує	Реакції на препарат у людини, яка має генет. обумовлений Дефіцит ферменту
Г-6-ФД	Стабілізація мембранних еритроцитів	ПАСК, вікасол, сульфаніламід, хінін, нітрати, аскорбінова кислота, левоміцин, аспірин	Гемоліз еритроцитів. Ймовірність зростає при інфекційних захворюваннях і гіпоглікемії.
Тиопуринметил-трансфераза	Метаболізм пуринів в еритроцитах	Меркаптопурин, азатіоприн	Збільшення токсичності препаратів
Метгемоглобін-редуктаза	Метаболізм метгемоглобіну	Хінін, парацетамол, перманганат калію, препарати вісмуту, дьоготь і анестезин (зовнішньо)	Тканинна гіпоксія, ацидоз, цианоз
Уридиндифосфоглюкуронова трансфераза	Глюкуронідація білірубину, кон'югування ряду лікарських препаратів	Парацетамол, ментол, левоміцетин, сульфаніламід, фенофталейн, барбітурати	Збільшення рівня непрямого білірубину у кров, що проявляється ззовні у формі жовтухи

Особливості фармакодинаміки і фармакокінетики

Фармакогенетика оперує рядом фармакологічних термінів, один з яких - **фармакодинаміка** (грец. *pharmakon* — ліки + *dynamis* — сила) — вчення про механізм дії та локалізацію, фармакологічні прояви (терапевтичні і побічні ефекти) ліків. Фармакологічний ефект — це клінічний прояв реакції організму на дію лікарського препарату. В основі його виникнення лежить розвиток первинної фармакологічної реакції, яка є наслідком взаємодії такого препарату з рецепторами клітини, внаслідок чого збуджуються або гальмуються їх функції. В основі однакових фармакологічних ефектів можуть лежати різні первинні фармакологічні реакції. Наприклад, атропін та адреналін розширюють зіницю, перший — за рахунок блокади холінорецепторів, другий — стимуляції адренорецепторів. З іншого боку, різні фармакологічні ефекти можуть бути спричинені однією первинною фармакологічною реакцією. Зокрема, блокада анаприліном бета-адренорецепторів супроводжується зниженням АТ, протиаритмічним ефектом і усуненням нападу стенокардії. Ці відомості необхідні лікареві для раціонального, найбільш ефективного і безпечного призначення ЛП.

З метою аналізу складних і різноманітних явищ виділяють декілька видів дії ліків (види фармакологічних ефектів), які поділяються на місцеву, рефлекторну, резорбтивну, опосередковану, селективну (вибіркову), неспецифічну, основну і побічну, зворотню і незворотню.

Місцева дія проявляється на шляху введення ліків в організм, а саме на шкіру, слизові оболонки, ендотелій судин, у м'яз тощо (мазей, гелей, кремів, розчинів, присипок, паст, лініментів, пластирів). За характером вона може бути в'яжучою, обволікаючою, подразнювальною, припікаючою (некротизувальною), місцевоанестезувальною.

Рефлекторна дія часто буває наслідком місцевої подразнювальної дії. Це непряма дія лікарських препаратів, у механізмі якої беруть участь рефлекси. Рефлекторна дія здійснюється на відстані. При цьому вона збуджує

закінчення чутливих нервів і рефлекторно відбувається зміна функції внутрішніх органів (при вдиханні нашатирного спирту подразнюються рецептори слизової оболонки дихальних шляхів і рефлекторно збуджуються дихальний і судиноруховий центри довгастого мозку).

Резорбтивна дія розвивається після всмоктування або безпосереднього введення у кров ліків. Вона може бути прямою (первинною) і опосередкованою (вторинною). Пряма дія розвивається після зв'язування таких препаратів з рецепторами, які знаходяться в органі, функція якого змінюється. Наприклад, при надходженні серцевих глікозидів у серце збільшується сила його скорочень. Опосередкована дія є наслідком первинних змін. Зокрема, поліпшення серцевої діяльності під впливом серцевих глікозидів сприяє нормалізації кровообігу і збільшенню діурезу.

Вибіркова дія спостерігається, коли медичний препарат впливає на рецептори, групи клітин, певний орган. Так, серцеві глікозиди впливають на серце, холінергічні препарати — на специфічні рецептори, сальбутамол — лише на β_2 -адренорецептори бронхів. Чим вища селективність дії таких препаратів, тим менше він має побічних ефектів. Для деяких ліків характерна неспецифічна дія — на всі клітини організму. Так діють солі важких металів, засоби для наркозу.

Оскільки більшості лікарських засобів вибіркова дія не властива, розрізняють також основну і побічну дії. Основна — це та, яка виявляється під час введення в організм таких засобів. Побічна, як правило, є небажаною. Наприклад, анаприлін знижує артеріальний тиск, усуває серцеву аритмію, полегшує перебіг ішемічної хвороби серця, але одночасно провокує бронхоспазм. Іноді залежно від ситуації основна і побічна дії міняються місцями.

Побічна дія може бути не лише негативною, але й позитивною (фармакотерапевтичною). Фармакотерапевтична дія визначає, на яку ланку захворювання (етіологію, патогенез, симптоми) діють медичні засоби. Прикладом позитивної побічної дії є здатність епінефрину при гіпоглікемічній комі не лише підвищувати артеріальний тиск,

але й збільшувати вміст глюкози в крові. Негативна дія використовується для характеристики безпечного застосування лікарського препарату. Іноді побічна дія медичних препаратів змушує відмовитися від їх застосування.

Ефекти більшості медичних засобів є зворотними: вони зникають після виведення засобу з організму. Деякі ліки мають незворотній вплив. Наприклад, солі важких металів, кислоти у високих дозах проявляють припікальний ефект. Негативна побічна дія ліків також може бути незворотньою, наприклад, глухота, яку викликають аміноглікозиди і фуросемід.

Способи, за допомогою яких досягаються фармакологічні ефекти медичні препарати, є механізмом дії. Більшість таких препаратів, що надходять в організм, взаємодіють з рецепторами. Вони є місцями специфічного зв'язування препаратів з певними структурами тканин організму, до них можна віднести складні макромолекули, деякі ферменти, іонні канали, транспортні системи та гени. Взаємодія між речовиною та рецептором здійснюється за рахунок утворення міжмолекулярних зв'язків різного типу: водневих, ван-дер-ваальсових, іонних, зрідка — ковалентних. Останній зв'язок є надзвичайно міцним. Ліки, які поєднуються з рецепторами таким зв'язком, проявляють незворотню дію. Зокрема, кислота ацетилсаліцилова незворотньо впливає на тромбоцити, що зумовлює її високу ефективність як антиагрегантного препарату, але водночас робить небезпечною в плані розвитку шлункових кровотеч. Інші види міжмолекулярних зв'язків через деякий час розпадаються, що зумовлює зворотню дію більшості лікарських препаратів.

Медикаменти, які зв'язуються з рецепторами й активують їх, називаються агоністами (епінефрин, ізадрин, ацеклідін, цититон та багато інших). Якщо ці засоби, зв'язуючись із рецептором, перешкоджають ефектам їх збудження, вони є антагоністом (атропін, пропранолол, дифенгідрамін тощо). Якщо ліки-антагоністи зв'язуються з тими ж рецепторами, що й ендогенні ліганди, вони називаються конкурентними антагоністами, якщо з іншими ділянками макромолекули, які зв'язані з рецептором

функціонально, — називаються неконкурентними антагоністами. Деякі медичні засоби проявляють властивості агоністів-антагоністів. При цьому вони є антагоністами відносно одного підтипу рецепторів і агоністами — відносно іншого. Зокрема, антигіпертензивний препарат лабетолол є блокатором α_1 -, β_1 -адренорецепторів, але стимулює β_2 -адренорецептори судин скелетних м'язів, що сприяє їх розширенню.

Фактори, здатні впливати на фармакодинаміку лікарського препарату, багатогранні. Їх можна розділити на 2 групи. **Екзогенні фактори** не зв'язані з організмом хворого. До них відносять: хімічну будову, фізичні властивості, лікарську форму і шляхи введення, дозу препарату, склад їжі та режим харчування хворого, метеорологічні показники (циркадний ритм, атмосферний тиск, температура повітря). Хімічна будова лікарського препарату є дуже важливим фактором, який впливає на фармакодинаміку ліків: близькі за хімічною будовою препарати, як правило, проявляють подібні фармакологічні ефекти. При цьому збільшення розмірів молекули пов'язано з блокувальними ефектами, якщо при цьому не збільшується кількість іонізуючих груп (одноатомні спирти проявляють наркотичну дію, а багатоатомні — ні).

Ендогенні фактори пов'язані з організмом хворого, а саме — віком, масою тіла, статтю, фізіологічними (вагітність, гіподинамія, температура тіла) і патологічними (захворювання щитоподібної залози, алкоголізм і т.д.) станами організму. Вік є одним з основних ендогенних факторів, що впливають на фармакодинаміку. Це пов'язано з тим, що в різні вікові періоди відзначаються різні рівні функціонування біохімічних процесів, фізіологічних і морфологічних структур в організмі. Особливу вікову групу становлять діти. Доза для них значно нижча і режим дозування встановлюється індивідуально залежно від віку, маси тіла. У зв'язку з тим, що у дітей протягом перших років життя швидкість біохімічних процесів перевищує таку у дорослих, потім уповільнюється, досягаючи стабільності у віці 20 років.

У похилому віці розподіл медичних препаратів значно гальмується, що позначається на всіх кінетичних характеристиках і призводить до зниження дози таких препаратів. Як у дитячому, так і в похилому віці це пов'язане з відсутністю або порушенням стабільності внутрішнього середовища, недосконалістю бар'єрної функції та функції ЦНС, недостатністю ферментативних процесів.

У статевій реакції на медичні засоби суттєвої різниці немає (жінки більше піддаються дії морфіну, стрихніну, нікотину, менше — дії алкоголю). Частково це пов'язано з тим, що у чоловіків їх біотрансформація відбувається у 2–3 рази швидше, ніж у жінок. Такі фізіологічні стани жінок, як вагітність, годування грудьми й менструальний період підвищують чутливість до лікарських препаратів. Наприклад, застосування антикоагулянтів під час менструації може викликати значну маткову кровотечу. Деякі препарати у цей період провокують виникнення кропивниці.

Гени, поліморфізми яких можуть впливати на фармакологічну відповідь пацієнта на певний лікарський препарат, можна розділити на три групи:

- гени білків, відповідальних за фармакокінетику препарату;

- гени білків, відповідальних за механізм дії препарату (фармакодинаміку);

- гени білків, які беруть участь в патогенезі такого засобу.

Деякі гени можуть при певних умовах виявляти як фармакокінетичні, так і фармакодинамічні властивості.

Фармакокінетика (грец. *pharmakon* - лікарський засіб отриманий із зілля і *kinetikos* - те, що стосується руху) - розділ фармакології, який вивчає надходження (шляхи введення); транспорт (абсорбція, всмоктування); розподіл, перетворення (біотрансформація) лікарських речовин в організмі; виведення (екскреція, елімінація) їх з організму, а також ефективність і переносність препаратів залежно від цих процесів.

Розрізняють клінічну та експериментальну фармакокінетику.

Клінічна фармакокінетика досліджує процеси надходження, розподілу, біотрансформації та екскреції лікарських речовин, а також виявлення зв'язків між концентрацією лікарської речовини і (чи) її метаболітів у біологічних рідинах і тканинах та фармакологічним ефектом. Клінічна фармакокінетика визначає таке дозування лікарських речовин, яке забезпечує їх необхідну концентрацію в середовищах організму для досягнення оптимального лікувального ефекту.

Головне завдання експериментальної фармакокінетики - вивчення трансформації лікарських засобів в організмі тварин у нормі і при моделюванні різних захворювань.

Одним з основних показників, що визначають ефективність лікарських засобів, є концентрація лікарської речовини в ділянці рецептора або тканини, де відбувається їх взаємодія. Визначити концентрацію лікарських речовин в організмі людини, в окремому органі чи тканині практично неможливо. Для визначення фармакокінетичних параметрів реєструють кількість лікарської речовини в крові, оскільки здебільшого існує залежність між концентрацією речовини в крові і в ділянці рецептора. Ґрунтуючись на отриманих даних, будують графік - фармакокінетичну криву. На осі ординат зазначають концентрацію речовини у плазмі крові, а на осі абсцис - термін дослідження.

Отже, відповідь на ліки = Σ фармакокінетики + Σ фармакодинаміка.

У 2008 р. Неберт (Nebert) зі співавторами припустили, що в основі фармакокінетики лежать так звані «фармакокінетичні гени», які схильні до високої пенетрантності та особливої моногенності, на відміну від фармакодинамічних генів, які схильні до полігенності.

Всі відомі фармакокінетичні фармакодинамічні гени представлені фармакогеномною базою даних «PharmGKB», деякі з них представлені в таблицях 3 і 4, відповідно. Частина їх дуже добре описана генетично, інша - представлена тільки назвами. Ця база нараховує біля 385 фармакокінетичних і біля 824 фармакодинамічних генів.

Таблиця 5.

Особливості деяких фармакокінетичних генів

№	Скорочена назва гена	Деякі альтернативні назви даного гена	Локалізація	Деякі захворювання, які пов'язані з цим геном
1.	ABCB1	ABC20; CD243 CLCS	Хромосома 7: q 21.12 – q 21.12	анемія, карцинома, аденокарцинома, хвороба Крона
2.	ABCC1	ABC29; ABCC; MRP	Хромосома 16: p 31.11 – p 31.11	астма, аритмії, псоріаз, ішемічна хвороба серця, кардіоміопатії
3.	ACE	ACE1; DCP; CD143	Хромосома 17: q 23.3 – q 23.3	алкоголізм, артеріосклероз, хвороба Альцгеймера, кардіоваскулярні хвороби
4.	BCHE	CHE1; E1	Хромосома 3: q 26.1 – q 26.1	анемія, хвороба Альцгеймера, лейкопенія, тромбоцитопенія
5.	FPGS	-	Хромосома 9: q 34.11 – q 34.11	ревматоїдний артрит, карцинома, лейкоїмія

Таблиця 6.

Особливості деяких фармакодинамічних генів

№	Скорочена назва гена	Деякі альтернативні назви даного гена	Локалізація	Деякі захворювання, які пов'язані з цим геном
1.	ABCA1	ABC-1; CERP; TGD	Хромосома 9: q 31.1 – q 31.1	Ниркові хвороби, діабет 2-го типу, стеноз сонних артерій
2.	ABCC1	ABC29; ABCC; MRP	Хромосома 16: p 31.11 – p 31.11	анемія, діабет 2-го типу, лейкопенія, гіперхолестеролемія
3.	DBI	ACBD1; CCK-	Хромосома 2:	лімфобластна

		RP; EP	q 14.2 – q 14.2	лейкемія
4.	HFE	HH; HLA-H; MVCD7	Хромосома 6: p 22.2 – p 22.2	хвороба Паркінсона, бронзовий діабет
5.	LPL	LIPD; HDLQ11	Хромосома 8: p 21.3 – p 21.3	кардіоваскулярна хвороба, шизофренія, ліподістрофія

Генетичні порушення, при яких дія ліків зменшується. До них належать:

Дефіцит *каталази*, яка розщеплює перекиси, що утворюються в процесі обміну речовин; бере участь в *гідроксилюванні спиртів* – веде до високої чутливості до алкогольних напоїв.

Різко зменшується гіперглікемічна дія *глюкагону і галактози* при глікогенозі. Це відсутність *глюкозо-6-фосфатази* в печінці і нирках, розвивається гіперліпідемія, жирова дистрофія печінки.

Висока каталітична активність *бутирилхолінестерази* (варіант Цинціана) веде до різко прискореного гідролізу ефірів холіну, дія їх може взагалі не проявитися.

Антикоагулянти стають неефективними (вагітність, ХНК, генетичні порушення), коли організм дуже чутливий до вітаміна К (рецептори печінки, які чутливі до цього вітаміна, резистентні до його антагоністів – антикоагулянтів).

Існує група спадкових захворювань, *резистентних до вітамінів*. До піридоксину – цистатіонурія, ксантуреніурія, піридоксинзалежний судомний синдром – треба піридоксин вживати у великих дозах.

Синдром B₁₂ – полягає у системі синтезу коензиму вітаміну B₁₂ і характеризується відставанням фізичного і розумового розвитку дитини, зростає вміст кетонових тіл у сечі, при цьому кількість цього вітаміну у крові буде нормальною. Не дивлячись на це, призначення вітаміну B₁₂ у великих дозах – 200 – 1000 мкг на добу переборює генетичний ефект.

Висока толерантність до вітаміну Д – при *фосфат-діабеті* – вражається кісткова система, підвищується екскреція фосфатів з сечею, падає

їх рівень в крові. При цьому в крові цей вітамін не руйнується. Лікування звичайними дозами вітаміну Д неефективне – лише у великих – 200 тис. МО на добу.

Генетичні порушення, при яких різко зростає токсичність лікарських засобів. При таких спадкових захворюваннях виникають атипові, негативні реакції на лікарські препарати, які можна розділити на 2 типи:

- ❖ при збереженій фармакодинаміці зростає токсичність навіть при мінімальних дозах;
- ❖ загострюються хвороби, які мали латентний перебіг (провокуюча дія).

Недостатність Г – 6 – ФД викликає токсичність багатьох ліків. Провокується гемолітична анемія з гемолітичним кризом на 2 – 3-й день з болем голови, попереку, розбитістю, температурою, колапсом, жовтяницею, сечою чорного кольору (гемосидерин та уробілін).

У осіб з генетичним порушенням *пуринового обміну* прояви подагри виникають під впливом *етанолу*, діуретиків, солей золота, стрептоміцину і т.д.

У людей зі спадковою некон'югованою гіпербілірубінемією (Кріглера-Наджара, Жільбера, Ротора) багато препаратів підсилюють жовтяницю. Це стрептоміцин, левоміцетин, прогестерон, ПАСК, сульфаніламід, барбітурати, вікасол, етиловий спирт, пероральні естрагонні контрацептиви.

При гемофілії прийом аспірину може призвести до сильних кровотеч.

Фармакогеноміка

Фармакогенетика – наука про спадковість і мінливість організму у відповідь на дію лікарського препарату і в певному ступені використовувалась відносно генів, які визначали метаболізм цього препарату. На початку ХХІ ст. був запропонований термін «фармакогеноміка», який охоплює більш широкий спектр генів у геномі, які можуть визначати

незалежно різні відповіді на медичний препарат. У 2004 р. Розес (Roses) у власній публікації зробив розподіл фармакогенетики на 2 типи: **безпечна фармакогенетика** спрямована на подолання небажаної реакції на дію препарату (ADR), яка як правило присутня і викликає побічні ефекти, наприклад, у психіатрії; **ефективна фармакогенетика** необхідна для того, щоб передбачити відповідь на лікування.

Як відомо, геноміка включає систематичну ідентифікацію всіх генів людини і генних продуктів, дослідження генетичного різноманіття людства, поєднуючи одночасно зі змінами в генній і білковій експресії у здорових та хворих людей.

Фармакогеноміку інколи ототожнюють з однією з галузей фармакології, хоча на нашу думку це не зовсім коректно, оскільки вона вивчає впливи лікарських препаратів на геном, порівнюючи експресії генів у хворих, визначаючи ефективність чи токсичність певного препарату для конкретної людини. Таким чином, фармакогенетика спрямована на розробку раціональних засобів для оптимізації лікарської терапії по відношенню до конкретного генотипу з метою забезпечення максимальної ефективності при мінімальних побічних ефектах. Такі підходи, передбачається, будуть базою для створення «персоналізованої медицини», коли ліки та їх комбінації будуть оптимізованими індивідуально для кожної людини.

На відміну від фармакогенетики, яка розглядає тільки одну взаємодію генів з лікарськими препаратами, фармакогеноміка розглядає всі процеси впливів ліків на рівні геному. Ці результати використовуються при лікуванні онкологічних і серцево-судинних захворювань, діабету, СНІДу, туберкульозу і т.д. Щорічно в США з 2 мільйонів госпіталізованих людей 100 тисяч помирає від шкідливого впливу лікарських препаратів.

Фармакогеноміка використовує низку методів генетики, в тому числі: ПЛР, піросеквенування, мас-спектрометрію, флуоресценцію за допомогою зондів, денатуруючу високоефективну рідинну хроматографію (ДВРХ) і т.д.

Фармакогеномні тести (PGX) широко використовуються для вивчення впливів лікарських препаратів протягом останніх 10-15 років. Традиційно

такий вплив оцінювали за клінічними результатами, які склалися з лабораторних аналізів і терапевтичного моніторингу цих препаратів (TDM). PGX теоретично можуть відображати будь-яку стадію засвоєння ліків: всмоктування, розподіл, метаболізм та екскрецію. На практиці тести для клінічного використання в основному пов'язані з метаболізмом препарату або в індукції імунної відповіді.

Щоб бути корисним, тест PGX повинен надати таку інформацію про лікарський препарат, яку не можна одержати традиційними клінічними методами і терапевтичним моніторингом. Не всі препарати доступні TDM. При застосуванні PGX необхідно провести тільки один раз, в то час як дослідження TDM проводять декілька разів підряд, таким чином збільшуючи їх ефективність і вартість. Так, наприклад, участь ферменту в метаболізмі певного препарату при клінічних дослідженнях не є переконливим доказом його функції. Крім того, навіть якщо було показано, що фермент не працює, це інколи проявляється більшим ефектом, оскільки досліджуваний препарат може метаболізуватися альтернативними шляхами.

Одним з найактуальніших питань фармакогеноміки є розробка біомаркерів, однією з характеристик яких виступає об'єктивне вимірювання та оцінка нормальних біологічних процесів, патогенних процесів чи фармакологічної відповіді на терапевтичне втручання. Навесні 2005 р. адміністрація з питань харчування і ліків (Food and Drug Administration (FDA)) США розробила правила для фармакологічних компаній, згідно яких анотація для кожного препарату має містити інформацію про його вплив на геном. Тобто кожний препарат повинен пройти генетичні дослідження на наявність у його складі варіант алелей 2-х метаболічних ферментів: CYP2D6 і TPMT (С-метилтрансферази і тіопурин метилтрансфераза, відповідно). Оскільки вони добре досліджені їх прийняли за дійсні біомаркери. Документи, які подаються до FDA на реєстрацію нового препарату фармакологічними компаніями повинні містити інформацію про ці «дійсні біомаркери», хоча інші фармакогенетичні дані можуть бути представленими добровільно за бажанням.

CYP – це родина ферментів печінки, цитохрому P450, які відповідають за руйнування більше ніж 30 різних класів лікарських препаратів. Мінливості ДНК у генах, які кодують ці ферменти, можуть впливати на їх здатність до правильного метаболізму цих препаратів. Менш активні форми або інактивовані форми CYP ферментів, які не здатні руйнувати та ефективно елімінувати з тіла такі препарати, можуть бути причиною передозування у пацієнтів.

TPMT відіграє важливу роль у хемотерапевтичному лікуванні загальної дитячої лейкемії, руйнуючи клас терапевтичних компонентів, які називаються тіопурини. Невеликий відсоток кавказців має генетичні зміни, які не дозволяють продукувати активні форми цього білка. Як результат, у таких пацієнтів рівень тіопуринів зростає до токсичних меж, оскільки інактивована форма TPMT не здатна утилізувати ліки. На сьогодні лікарі, використовуючи тести для скринінгу хворих з таким дефіцитом, слідкують за активністю TPMT і рівнем тіопурину.

Підсумовуючи все вище представлене слід відмітити, що фармакогеноміка ще молода наука, яка постійно розвивається. Вона має певні перешкоди, які заважають її розвитку. До них належать:

1. Складність знаходження мінливості гена, які впливають на відповідь ліків – поліморфізми поодиноких нуклеотидів (ППН) є мінливостями послідовності ДНК, які мають місце, коли окремих нуклеотид (А, Т, Ц чи Г) у послідовності геному змінений. ППН мають місце кожні 100 з 300 пар основ на протязі 3-біліонів пар людського геному, тому мільйони ППН повинні бути ідентифікованими та проаналізованими для визначення їх здатності впливати на відповідь на медичні препарати.

2. Обмежений вибір ліків – тільки 1 чи 2 затверджених препарати можуть бути корисними для лікування особливого стану. У пацієнтів з генетичними дефектами, які не дозволяють їм вживати ці ліки, мало шансів знайти альтернативні способи лікування.

3. Перешкоди для фармакологічних компаній виробляти мультіфармакогеномні продукти – Більшість фармакологічних компаній

успішні з їх «один розмір підходить всім», використовують цей лозунг для подальшого розвитку медичних препаратів. Пізніше розробка і впровадження на ринок препарата буде коштувати їм 100 мільйонів доларів США. Чи буде вигідно цим компаніям впроваджувати альтернативні форми препаратів для маленької частки популяції?

4. Навчання медичного персоналу – Впровадження мульті фармакогеномних препаратів для лікування деяких станів представників різних популяцій безперечно ускладнить процес назначення і розповсюдження ліків. Терапевти повинні впровадити екстра діагностичний крок до визначення, який препарат підходить індивідуально для кожного хворого, акуратно інтерпретувати діагностику і рекомендувати для кожного пацієнта найкраще лікування. Для цього весь медичний персонал, не тільки терапевти, має добре знати генетику.

Питання для самоконтролю

1. Дайте визначення фармакогенетиці.
2. Назвіть методи фармакогенетики.
3. Розкажіть про механізм взаємодії ліків і генів, які кодують білки.
4. Що вивчає фармакодинаміка?
5. Що Ви знаєте про фармакокінетику?
6. Чим відрізняється фармакогенетика від фармакогеноміки?
7. Якими питаннями займається персоніфікована медицина?
8. Розкажіть про ферментопатії.

ЛІТЕРАТУРА

1. Лильин Е. Т. Введение в современную фармакогенетику. - М.: Медицина, 1984. - 160 с.
2. Середенин С. Б. Лекции по фармакогенетике. — М.: МИА, 2004. — 303 с.

3. Скакун Н. П. Клиническая фармакогенетика. - К: Здоровье. – 1981. – 200 с.
4. Скакун Н. П. Основы фармакогенетики. - К: Здоровье. – 1976. – 259 с.
5. Соради И. Основы и педиатрические аспекты фармакогенетики. — Будапешт: Издательство Академии наук Венгрии, 1984.- 248 с.
6. Сычев Д. А., Раменская Г. В., Игнатьев И. В., Кукес В. Г. Клиническая фармакогенетика: Учебное пособие/Под ред. академика РАМН В. Г. Кукеса и академика РАМН Н. П. Бочкова.- М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007.- 248 с.
7. Abbott A. With your genes? Take one of these, three times a day// Nature 2003. – V. 425. – P. 760-762.
8. de Leon J. Pharmacogenomics: the promise of personalized medicine for CNS disorders// Neuropsychopharmacology. – 2009. – V. 34. – P. 159–172.
9. Evans WE and McLeod HL. Pharmacogenomics — Drug Disposition, Drug Targets, and Side Effects // New Engl J Med. – 2003.- V. 348.- P. 358-349.
10. Hall I.P., Pirmohamed M. Pharmacogenetics. – New York: Taylor&Francis Group, LLC, 2006. – 324 p.
11. Ingelman-Sundberg M, Rodriguez-Antona C, Pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes: implications for a safer and more effective drug therapy // Phil Trans R Soc B. – 2005. - V.360. – P.1563-1570
12. Lazarou, J, Pomeranz BH, Corey PN, Incidence of Adverse Drug Reactions in Hospitalized Patients: A meta-analysis of prospective studies// JAMA. – 1998. – V. 279. – P.1200-1205.
13. Licinio J., Wong M. Pharmacogenomics. – Weinheim: WILEY-VCH, 2002. – 559 p.
14. Newman W.G. Pharmacogenetics. – UK: Springer Science+Business Media B.V, 2010. - P. 27-44.
15. Phillips KA, Veenstra DL, Oren E, Lee JK, Sadee W. Potential role of pharmacogenomics in reducing adverse drug reactions: a systematic review // JAMA. – 2001.- V.286. – P. 2270-2279.

16. Weinshilboum R. Inheritance and Drug Response.// New Engl J Med. – 2003. – V. 348. – P. 529-537.
17. Zandi P.P., Judy J.T. The promise and reality of pharmacogenetics in psychiatry// Psychiatric Clinics of North America. – 2010.- N 30. – P. 931-974.

РОЗДІЛ 13.

ГЕННА ІНЖЕНЕРІЯ та ГЕННА ТЕРАПІЯ

Генна інженерія це створення біологічно активних рекомбінантних молекул ДНК, їх введення в існуючий геном і отримання клітин з новими спадковими властивостями. Іноді генна інженерія має мету не впровадження яких-небудь генів в клітину, а навпаки - вибірково видалення певних генів з генетичного апарату.

В наш час генна інженерія перетворилась на достатньо розвинуту галузь генетики, з розвитком якої науковці пов'язують великі надії на керування спадковості і мінливістю організмів.

Друга половина XX століття відзначена декількома важливими відкриттями та винаходами. Так, нарешті вдалося «прочитати» біологічну інформацію «записану» в генах. За цю роботу У. Гілберт (американський вчений) та Ф. Сенгер (англієць) в 1980 р. отримали Нобелівську премію. Відомо, що в генах знаходиться інформація - інструкція для синтезу в організмі молекул РНК і білків, в тому числі й ферментів. Щоб примусити клітину синтезувати нову для неї речовину, необхідно синтезувати відповідний набір ферментів. Для цього треба або змінити її власні гени, або ввести нові. Зміни в генах живих клітин – це мутації, які неможливо контролювати, або направляти. Тож зусилля вчених були спрямовані на розробку методів введення в клітину нових необхідних генів.

Такі методи були розроблені наприкінці 60-х, початку 70-х років. Вони включали в себе:

20.Методи руйнування та відновлення ДНК, яка походить від різних організмів (роботи П.Берга 1972 р.) для отримання ізольованого гену.

21.Наявність генного носія (вектору), який міг би реплікуватися автономно, а також разом із гетерологічною ДНК, і таким чином слугувати засобом для введення рекомбінантної ДНК у функціонуючу бактеріальну клітину.

22.Метод селекції клону з великої популяції реципієнтних клітин, що

несуть рекомбінантну химерну ДНК.

Перша проблема була вирішена з відкриттям ферментів - рестриктаз, ендонуклеаз, екзонуклеаз, термінальної трансферази, ДНК-лігаз та інших. За допомогою рестриктаз ген та вектор можна порізати на шматочки, а потім за допомогою лігаз такі шматочки можна з'єднувати в іншій комбінації, конструюючи новий ген, або включаючи його в вектор. За відкриття рестриктаз Вернер Арбер, Данієл Натанс та Хамільтон Сміт у 1978 р. отримали Нобелівську премію.

В якості вектору виявилось зручним використовувати плазмідні ДНК невеликої молекулярної ваги, в якій фрагмент власної ДНК вдається замінити гетерологічною ДНК. Проблема введення вектору була вирішена після того, як з'ясували, що обробка клітин *E.coli* солями Са-фосфату сприяє проникненню рекомбінантної ДНК в бактеріальні та еукаріотичні клітини.

Роздивимось інструменти генної інженерії.

ФЕРМЕНТИ

Ключове значення при конструюванні рекомбінантної ДНК *in vitro* мають ферменти - рестриктази, що розсікають молекулу ДНК на фрагменти по певним сайтам і ДНК - лігази які зшивають молекулу ДНК в єдине ціле.

1.1.Рестриктація ДНК і фрагменти модифікації.

Практично всі види бактерій синтезують по одному або декільком типам специфічних до певної нуклеотидної послідовності ендонуклеаз, які розрізають дволанцюгові ДНК. Ці ендонуклеази називають рестрикуючими ферментами (або рестриктазами) оскільки їх основна функція полягає в обмеженні присутності чужорідної ДНК в бактеріальній клітині (рестрикція буквально означає обмеження). Таким чином, рестриктази захищають ДНК еукаріотичних клітин від чужорідної ДНК.

Розрізана рестриктазами на фрагменти чужорідна ДНК розщеплюються екзонуклеазами. Відкриття закономірностей фагової інфекції призвело не тільки до відкриття систем рестрикції та модифікації ДНК, а також до розробки методів отримання чистих препаратів рестриктаз. Відомі три основних типи ферментів рестрикції:

а) рестриктази першого типу (рестрикуючі ендонуклеази) розпізнають певну послідовність нуклеотидів і розрізають дволанцюгову молекулу ДНК поряд з цією послідовністю хаотично, тому що саме місце розрізу не специфічне;

б) рестриктази другого типу (ендонуклеази рестрикції) розпізнають певну послідовність і розрізають подвійну спіраль у фіксованій точці всередині цієї послідовності.

в) рестриктази третього типу (ендонуклеази рестрикції) розпізнають асиметричні сайти. Точка розрізу подвійної спіралі може співпадати з віссю симетрії, а може бути зсунута відносно неї. В останньому випадку утворюються комплементарні кінці і між відповідними основами можуть спочатку встановлюватися водневі зв'язки, а потім за допомогою ДНК-лігази відбувається зшиття фрагментів з виникненням ковалентних зв'язків між сусідніми нуклеотидами. Ендонуклеази рестрикції третього типу впізнають потрібну послідовність і розрізають подвійну спіраль, відступивши певну кількість нуклеотидних пар від її кінця.

Здатність рестриктаз другого типу специфічно розщеплювати ДНК на фрагменти, які дорівнюють по довжині, відстані між сайтами рестрикції, широко використовується у дослідках по структурі ДНК, а також в маніпуляціях генетичної інженерії.

Властивості ендонуклеаз другого типу мають особливе значення, оскільки саме вони дозволяють, по-перше, отримувати препарати ДНК, які містять фрагменти з однаковими послідовностями нуклеотидів і, по-друге, конструювати химерні молекули ДНК, які складаються з фрагментів, взятих з різних геномів. Рестриктази другого типу впізнають паліндромні послідовності, які мають центральну симетрію та читаються однаково в обидві сторони від осі симетрії.

Ендонуклеази рестрикції другого типу зіграли центральну роль в розробці методів отримання рекомбінантних молекул ДНК. З багатьох ферментів, котрі зараз добре вивчені та доступні, найбільш часто використовуються ендонуклеази E.coli та Hind III. Це пов'язано з тим, що ці

рестриктази були відкриті одні з найперших. При розщепленні ДНК вони дають фрагменти з липкими кінцями і, крім того, розщеплюють ДНК багатьох дрібних плазмід та деяких похідних фагу в неістотних ділянках геному. Ці властивості ферментів дають змогу використовувати їх для отримання векторів.

Ендонуклеази рестрикції третього типу утворюють продукти неповного гідролізу субстрату. У назві ферменту перша буква роду та дві перші букви виду утворюють скорочення назви джерела рестриктаз. Наприклад, *E.coli* - E.co; *Haemophilus aegyptius* - Hae; *Haemophilus haemolyticus* - Hha. Рестрикційні ендонуклеази класифікуються за номенклатурою, яку запропонували Сміт та Натанс у 1973 р. Типова або штамowa ідентифікація іде за родовою та типовою схемою, наприклад, у випадку з *E. coli* В або *E. coli* К.

Рестриктази, які виділені з одного і того ж хазяїна, позначають римськими цифрами: HaeI, HaeII, HaeIII. Якщо рестриктаза виділена з плазмиди або фагу, то за родо-видовою назвою іде символ екстахромосомного елемента. Наприклад, E.co RI. При цьому ідентифікація штаму заключається у дужки: E.co(K)RI. Нуклеази рестрикції позначаються як ендонуклеаза R, ферменти модифікації - метилази, як M з наступною назвою ферменту: R EcoRI, M. hind II. Під час отримання рестриктаз найбільш важливим є вивчення їх специфічної дії. Тому відразу ж досліджується нуклеотидна послідовність ДНК, яка розпізнається та розщеплюється виділеним ферментом. Але буває і так, що декілька ферментів впізнають ідентичну послідовність основ і розщеплюють цю послідовність в одній і тій же точці. Це ферменти R.HpnII, R.HapII, R.MnoI. Вони розщеплюють одну й ту ж саму послідовність в одній і тій же точці :

- c - c - g - g - .

Порівняння розмірів фрагментів ДНК, отриманих після обробки певної ділянки геному набором рестрикуючих нуклеаз дозволяє

побудувати рестрикційну карту, на якій вказано положення кожного сайту рестрикції відносно інших ділянок.

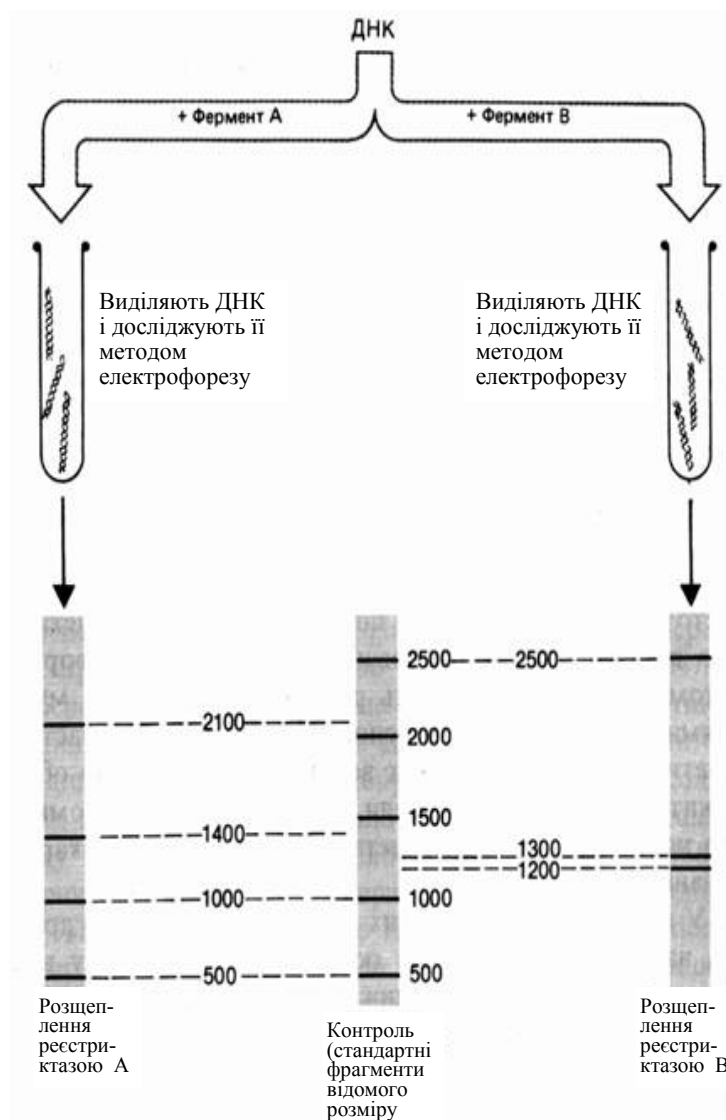


Рис. 1. Результати електрофорезу після обробки фрагменту ДНК різними рестриктазами

Наприклад, молекулу ДНК довжиною 5000 пар нуклеотидів (п. н.) обробляють окремо рестриктазами А і В. Фрагменти розділяють електрофорезом. Фермент А розрізав ДНК на 4 фрагменти розміром 2100, 1400, 1000 та 500 п. н. Обробка рестриктазою В дала 3 фрагменти: 2500, 1300 и 1200 п. н. (мал.1). Для визначення розміщення сайтів рестрикції цих ферментів на наступному етапі

застосовують процедуру подвійного розщеплення – обробляють ДНК двома ендонуклеазами. Обробка досліджуваного фрагменту одночасно двома рестриктазами дала 6 фрагментів: 1900, 1000, 800, 600, 500, 200 п. н. Найбільш повний варіант – елюювати кожен фрагмент, який утворюється завдяки розщепленню однією рестриктазою, а потім обробити його іншою. Суміш фрагментів, отриманих після такої обробки, також аналізують з допомогою електрофорезу. В нашому прикладі отримані наступні результати:

Обробка кожного з 4-х А-фрагментів рестриктазою				В
2100 -	1900	і	200	
1400 -	800	і	600	
1000 -	1000	(змін немає)		
500 -	500	(змін немає)		
Обробка кожного з 3-х В-фрагментів рестриктазою				А
2500 -	1900	і	600	
1300 -	800	і	500	
1200 -	1000	і	200	

Аналіз отриманих результатів показує, що кожен із ферментів, отриманих при розщепленні А-фрагментів рестриктазою В можна виявити в зразках, отриманих при розщепленні В-фрагментів рестриктазою А. Ключем до рестрикційного картування є перекриваючі фрагменти. Саме такими у нашому прикладі є В-фрагмент 2100 та А-фрагмент 2500. Протягом обробки іншою рестриктазою вони дають фрагмент 1900. З даних про розщеплення цих фрагментів ми передбачаємо, що з одного боку на відстані 200 п. н. від фрагмента 1900 знаходиться наступний А-сайт, а з іншого, на відстані 600 п. н. – наступний В-сайт (рис.1). При обробці двома ендонуклеазами фрагмент 200 п. н. утворюється 1 раз, при обробці рестриктазою А з В-фрагмента 1200, тобто фрагмент 1200 лежить зліва. Залишається визначити, як продовжується карта вправо. Очевидно, це А-фрагмент 1400, оскільки він розрізаний

рестриктазою В на фрагменти 600 і 800. З правого боку від фрагмента 2500 слід відкласти, очевидно, фрагмент 1300. Тоді логічна наявність А-фрагмента 500 і розподілу В-фрагменту 1300 рестриктазою А на 800 і 500.

Під час побудови рестрикційних карт зазвичай використовують декілька рестриктаз, тому доводиться аналізувати складні співвідношення між фрагментами, отриманими при дії різних ферментів. Для спрощення процедури картування можна застосовувати неповне розщеплення. За певних умов рестриктаза дізнається і розщеплює не всі сайти в молекулі ДНК. Наприклад, при частковому розщепленні ДНК ферментом А можуть утворюватися фрагменти 3100 п. н., 1400 п. н. і 500 п. н. Зпівставивши їх з даними повного розщеплювання (2100, 1400, 1000 і 500), можна відразу поставити поруч 2100 і 1000 (фрагмент 3100), а отримавши фрагмент 3500 – розташувати поряд 2100 п. н. та 1400 п. н.

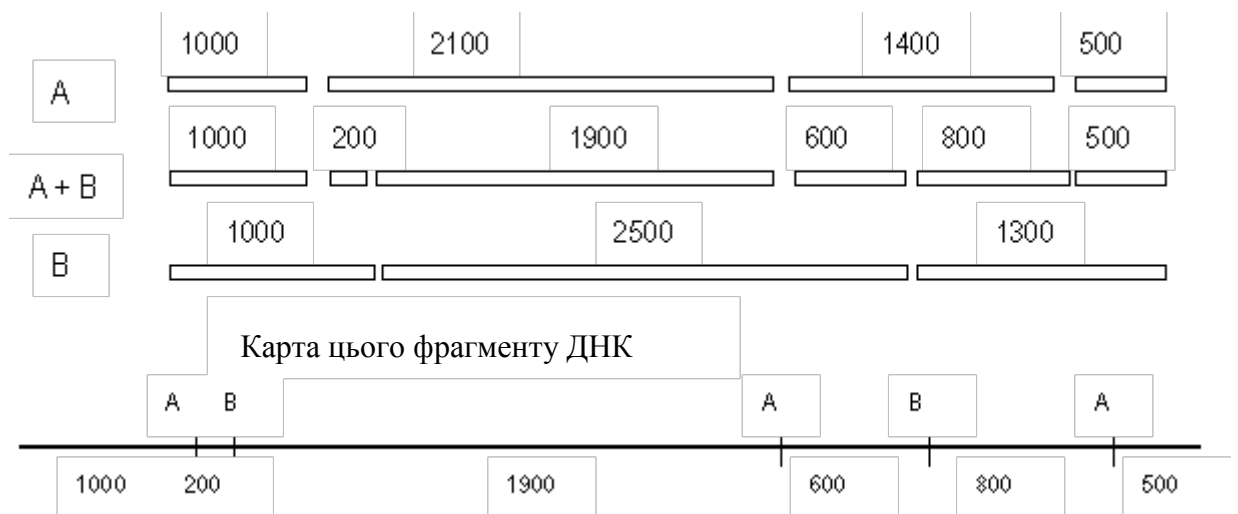


Рис. 2. Аналіз фрагментів рестрикції та карта фрагменту ДНК.

Інший прийом – введення радіоактивної кінцевої мітки: кінцеві фрагменти визначаються в цьому випадку за включенням мітки. Можна також одержати фрагменти шляхом гібридизації нуклеїнових кислот:

фрагменти (в цьому випадку будуть мати молекулярну масу 2100 і 2500), які перекриваються, підпадають під гібридизацію.

Перша карта була отримана для вірусу SV40 (мавпячий вірус, який викликає злоякісну трансформацію), що містить 5423 пари основ. Використовували рестриктазу HIND-II, яка розщеплює кільцеву ДНК вірусу на 11 фрагментів. Порядок їх розташування в ДНК був встановлений шляхом дослідження наборів фрагментів, що утворюються коли розщеплення доходить до кінця. Перший розрив перетворював кільцеву молекулу на лінійну, яка потім розщеплювалася на все менші і менші фрагменти. Досліджували спочатку набори фрагментів, що перекриваються, а потім продукти повного розщеплення. Таким чином була отримана рестрикційна карта кільцевої вірусної ДНК, на яку були нанесені сайти розщеплення рестриктазою.

Повторення подібних експериментів з іншою рестриктазою дозволяє отримати докладнішу карту з сайтами рестрикції. Маючи в своєму розпорядженні таку інформацію, можна ідентифікувати біологічно важливі ділянки на ДНК.

Оскільки рестрикційна карта відображає розташування певної послідовності нуклеотидів даної ділянки, порівняння таких карт для двох або більше споріднених генів дозволяє оцінити гомологію між ними. Аналізуючи рестрикційні карти, можна порівнювати певні ділянки ДНК різних видів тварин без визначення їх нуклеотидної послідовності. Одже, наприклад, було встановлено, що хромосомні ділянки, що кодують ланцюги гемоглобіну у людини, орангутанга і шимпанзе збереглися в практично незмінному вигляді протягом останніх 5 - 10 млн. років.

Метод рестрикційного картування дозволяє побачити значні генетичні зміни, такі як делеції або інсерції. При цьому відбувається зменшення або збільшення рестрикційних фрагментів, а також зникнення або виникнення

сайтів рестрикції. Один з прийомів картування – фінгерпринт («метод відбитків пальців» або DNA-fingerprint). Він має на увазі використання нерегульованих і неповних наборів фрагментів, які є характеристикою генома, хоча описує його не повністю.

Конструювання рекомбінантних ДНК

Під рекомбінантною розуміють ДНК, утворену об'єднанням *in vitro* (у пробірці) двох або більше фрагментів ДНК, виділеної з різних біологічних джерел. Ключовими в цьому визначенні є слова "фрагмент ДНК" і "об'єднання *in vitro*", що вказує на суть генетичної інженерії і її різницю від решти всіх методів отримання гібридних (або химерних) організмів, таких як генетична селекція, ембріональна інженерія. Зшивання фрагментів ДНК проводиться трьома основними методами в залежності від того, які кінці мають фрагменти зшитої ДНК.

Зшивання по одноіменних "липких" кінцях (рестриктазно-лігазний метод)

Цей метод є найпоширенішим і найпопулярнішим. Вперше цим способом була отримана гібридна ДНК С. Коеном із співробітниками в 1973 р. Деякі рестриктази, наприклад Pst I, вносячи до ланцюгів ДНК симетричні, розташовані навскоси один від одного розриви на рівних відстанях від центру сайту розпізнавання і створюють "драбину" (рис. 3). Ці комплементарні одна одній ділянки мають тенденцію до асоціації за рахунок з'єднання основ, і тому їх називають комплементарними або «липкими кінцями».

По'єднання основ відбувається тільки між комплементарними послідовностями, тому ААТТ-кінці, які утворює Eco RI, не з'єднуються. Проте будь-які два фрагменти (незалежно від їх походження), які утворилися під дією однієї і тієї ж рестриктази, можуть злипатися за рахунок утворення водневих зв'язків між одонитковими ділянками комплементарних нуклеотидів (рис. 3). Хоча після такого з'єднання повна цілісність подвійної

спіралі не відновлюється, оскільки залишається два розриви у фосфодіефірному остові. Для його відновлення, тобто зшивання, або лігування ниток використовують фермент ДНК-лігазу. Цей фермент в живій клітині виконує таку саму функцію - зшивання фрагментів ДНК, які синтезується під час реплікації.

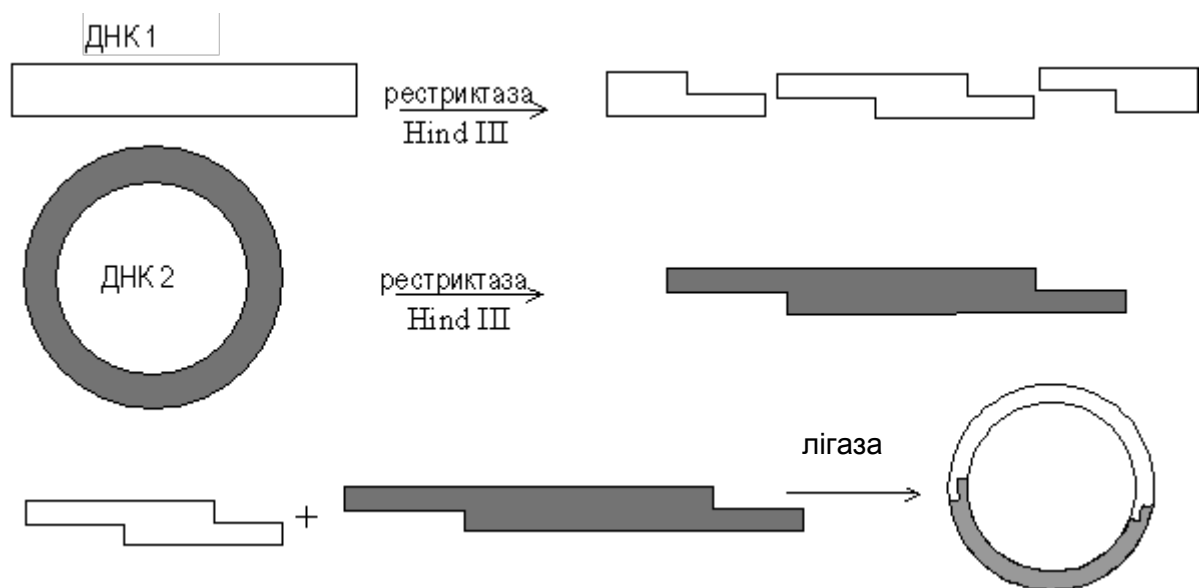


Рис. 3. Схема рестриктазно - лігазного методу

Зшивання за "тупими" кінцями (конекторний метод)

«Липкі кінці» не завжди необхідні для зшивання фрагментів ДНК. Тупі кінці також можуть бути з'єднані за рахунок ДНК-лігази, якщо і лигаза, і тупі кінці присутні в реакційній суміші у високих концентраціях. В цьому випадку реакція з'єднання має свої особливості і її ефективність нижче, ніж при зшиванні по липких кінцях. Вперше такі експерименти були виконані в 1972 р. Полемо Бергом в Стенфордському університеті, США.

«Липкі кінці» також можна ферментативним шляхом приєднати до молекул ДНК з тупими кінцями. Для цього використовують фермент -

кінцеву трансферазу з тимуса теляти, яка приєднує нуклеотиди до 3'-кінцевих ланцюгів ДНК. Якщо до 3'-кінцевих фрагментів ДНК, що рекомбінуються *in vitro*, за допомогою кінцевої дезоксинуклеотидилтрансферази добудувати одноланцюгові оліго (dA) - сегменти певної довжини, а до кінців іншого фрагмента — оліго (dT) - сегменти приблизно такої ж довжини, то при змішуванні отриманих таким чином фрагментів відбувається з'єднання за рахунок створення водневих зв'язків між оліго (dA) - і оліго (dT) - послідовностями (рис. 4).

Для ковалентного з'єднання двох фрагментів використовується ДНК-лігаза. Ці процедури складають основу для другого спільного методу отримання рекомбінантних молекул ДНК.

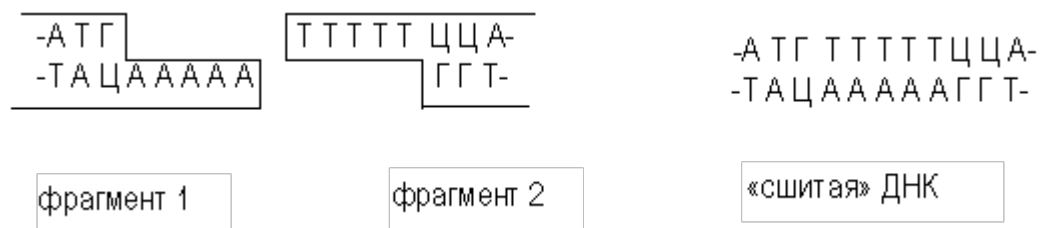


Рис. 4. Пришивання «липких» кінців і зшивання фрагментів ДНК

Зшивання фрагментів з різноіменними «липкими» кінцями

В ситуації, коли необхідно зшити фрагменти, утворені різними ендонуклеазами рестрикції, і які мають різні, тобто некомплементарні один одному липкі кінці, застосовують так звані лінкери (або "перехідники"). Лінкери - це хімічно синтезовані олігонуклеотиди, що є сайтами рестрикції або їх комбінацією. Вперше цю ідею запропонував Шеллер із співробітниками в 1977 р. Існують великі набори таких генних "перехідників".

Природно, що при використанні лінкерів повинна враховуватися необхідність дотримання правил експресії генетичної інформації. Часто в

середину лінкера вміщують який-небудь регуляторний генетичний елемент, наприклад, промотор або ділянку, пов'язану з рибосомою. В цьому випадку лінкери забезпечують не лише зб'єднання генів, але й обумовлюють їх експресію. Існують лінкери "тупий кінець - липкий кінець".

За необхідністю липкі кінці можна перетворити на тупі. Це досягається або відщепленням липких кінців за допомогою ферменту - ендонуклеази S1, яка руйнує тільки одноланцюгову ДНК, або липкі кінці "забудовують", тобто за допомогою ДНК-полімерази I на одониткових липких кінцях синтезують другу нитку.

Визначення нуклеотидної послідовності (секвенування) ДНК

Описані методи, що дозволили ідентифікувати генетично важливі ділянки ДНК, мали велике значення самі по собі. Але вони також проклали шлях до розробки виключно ефективних методів секвенування ДНК і створення рекомбінантних молекул. Секвенування дозволяє досить швидко визначити повну нуклеотидну послідовність сегменту довжиною 100 - 500 нуклеотидних пар, що утворюється при розщепленні ДНК рестрикційними ендонуклеазами.

Метод Маськама і Гілберта (хімічний)

Один з методів, оснований на хімічній деградації ДНК. Він був запропонований в 1976 р. Максамом і Гілбертом і названий їх ім'ям. Суть методу зводиться до наступного: один з кінців фрагмента ДНК мітять за допомогою ізотопу фосфору ^{32}P (останнім часом замість радіоактивної вводять флуоресцентну мітку), її можна «чіпляти» і до нуклеотидів, причому для кожного типу нуклеотидів підбирати різне забарвлення.

Препарат міченої ДНК ділять на чотири порції і кожен з них обробляють реагентом, специфічно руйнівним до одного або двох з чотирьох основ, причому умови реакції підбирають так, щоб на кожен молекулу ДНК

доводилося лише декілька пошкоджень. Руйнування йде в 2 етапи. На першому етапі відбувається модифікація азотистої основи і подальше її вищеплення. На другому етапі проводять гідроліз ДНК в місцях вищеплення. Пуринові основи модифікуються диметилсульфатом.

Аденінові залишки метилуються по третьому атому азоту, гуанінові – по положенню N7. Якщо таку модифікацію обробити 0,1 М HCl при 0°C, то вищеплюється метиладенін. При подальшій інкубації в лужному середовищі (0,1 М NaOH) при температурі +90°C відбувається руйнування цукрофосфатних зв'язків в місцях вилучення основ. Обробка пошкоджених молекул піперидином призводить до гідролізу ДНК по залишках метилгуаніну. Піримідинові основи модифікуються гідразином. У безсольовому середовищі модифікується і цитозин, і тимін, у присутності 2 М NaCl модифікується тільки цитозин. При подальшій обробці піперидином відбувається розщеплення ДНК по точках модифікації.

Можна використовувати й інші реакції хімічної модифікації основ і розщеплення по ним молекул ДНК. В результаті виходить набір мічених фрагментів, довжина яких визначається відстанню від зруйнованої основи до кінця молекули. Фрагменти, що утворилися у всіх чотирьох реакціях, піддають електрофорезу в чотирьох сусідніх доріжках; потім проводять радіоавтографію, і ті фрагменти, які містять радіоактивну мітку, залишають "відбитки" на рентгенівській плівці. За положенням відбитків можна визначити, на якій відстані від міченого кінця знаходилася зруйнована основа, а знаючи цю основу - її положення. Так, набір смуг на рентгенівській плівці визначає нуклеотидну послідовність ДНК. Аналогічно спостерігають флуоресцентне фарбування. Якщо для кожного з чотирьох нуклеотидів був підібраний свій колір флуоресцентної мітки, то при електрофорезі їх наносять на 1 доріжку. Тоді розташування нуклеотидів відмічене штрихами різного кольору, а процедуру читання легко автоматизувати.

Метод Сенгера (ферментативний)

Інший метод, розроблений Сенгером і який носить його ім'я, заснований не на хімічному, а на ферментативному підході. Сенгер використовував ДНК-полімеразу I. У клітині цей фермент бере участь в процесі реплікації, заповнюючи пропуски між знову синтезованими фрагментами ДНК (фрагментами Оказаки).

Для роботи ферменту в пробірці потрібні попередники ДНК - дезоксирибонуклеотидтрифосфат (dNTP), а також одноланцюгова матриця, на якій має бути невелика дволанцюгова ділянка - затравка, з якої починається синтез (рис. 5). Були також синтезовані модифіковані дидезоксирибонуклеотиди, в яких дезоксирибоза 3'-ОН відсутня, для кожної з чотирьох основ ДНК. ДНК-полімераза включає ці попередники в ДНК. Проте, включившись в ДНК, модифікована основа не може утворити фосфодиефірний зв'язок з наступним дезоксирибонуклеотидом. В результаті росту (елонгації) даного ланцюга зупиняється (термінує) в тому місці, де в ДНК включився дидезоксирибонуклеотид (ddNTP). Тому їх називають термінаторами елонгації.

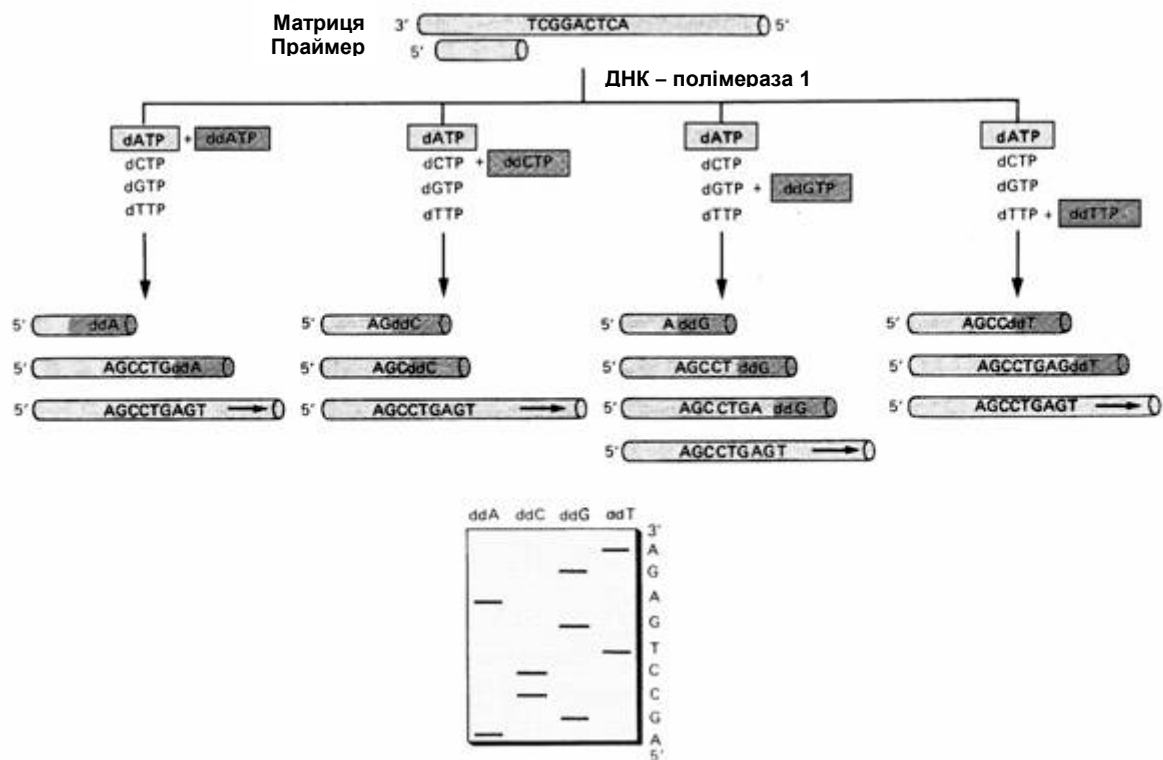


Рис.5 Ферментативний метод секвенування ДНК.

Реакційна суміш за Сенгером складається з ланцюга ДНК, нуклеотидну послідовність якої треба визначити, короткого фрагмента "міченої" ДНК, комплементарної кінцевому відрізку цього ланцюга (затравки), одного з чотирьох ddNTP і відповідного dNTP в певному співвідношенні (щоб вони конкурували), а також останніх три dNTP. Готують чотири суміші, кожна з яких містить один з чотирьох ddNTP.

У кожній з пробірок утворюється набір мічених фрагментів різної довжини. Довжина їх залежить від того, в якому місці в ланцюг включений дефектний нуклеотид. Отримані мічені фрагменти ДНК розділяють в поліакриламідному гелі (з точністю до одного нуклеотида), проводять радіоавтографію і по картині розподілу фрагментів в чотирьох пробах встановлюють нуклеотидну послідовність ДНК (рис. 5).

В наш час визначення точної нуклеотидної послідовності будь-якого сегменту ДНК помірної довжини - цілком вирішуване завдання. Вже визначена послідовність декількох сотень генів про- і еукаріот. Знаючи послідовність гена і генетичний код, легко визначити амінокислотну послідовність кодованого ним білка. Раніше для визначення структури білка доводилося робити ретельний і досить трудомісткий аналіз виділеного і очищеного білка. Зараз часто буває простіше визначити структуру білка через нуклеотидну послідовність, ніж за допомогою прямого секвенування. Визначення послідовності ДНК дозволило виявити області, які не кодують білки, але беруть участь в регуляції експресії генів і реплікації ДНК. У 1996 р. був секвенований геном дріжджів, в 1998 р. – геном арабідопсису, в 2000 р. – геном людини, проте в даному випадку мова йде тільки про встановлення послідовності нуклеотидів, оскільки генетична структура і функції окремих ділянок генома ще не ідентифіковані, це складніше завдання.

Гібридизація як високочутливий метод виявлення специфічних послідовностей нуклеотидів

Якщо водний розчин ДНК нагріти до 100°C і підвищити рН до 13, то ДНК дисоціює на 2 ланцюги (денатурує), оскільки комплементарні зв'язки між основами руйнуються. У 1961 р. було виявлено, що витримка ДНК при температурі 65°C веде до відновлення структури подвійної спіралі. Цей процес називається *ренатурація* або *гібридизація*.

Процеси гібридизації відбуваються між будь-якими одинарними ланцюгами, якщо вони комплементарні: ДНК — ДНК, РНК-РНК, ДНК-РНК. Для тесту необхідно мати чистий одноланцюговий фрагмент ДНК, комплементарний тій послідовності, яку хочемо виявити. Цей фрагмент отримують або клонуванням, або шляхом хімічного синтезу. Одноланцюгова ДНК, яку використовують як індикатор, називається ДНК-зонд. Вона може містити від 15 до 1000 нуклеотидів.

ДНК-зонди застосовуються в різних цілях. Гібридизація ДНК-зонда з РНК, виділеною з аналізованої клітини, може виявити наявність або відсутність експресії гена. Якщо гібридизація не відбувається, це означає, що ген мовчить, тобто не працює. ДНК-зонд також дозволяє проводити діагностику спадкових хвороб. В більшості випадків мутації, що ведуть до спадкових хвороб, рецесивні, тобто хвороба розвивається, якщо людина отримує дефектний ген від обох батьків.

Аномальні ембріони краще виявляти до народження. Наприклад, для серповидноклітинної анемії в гені мутанта, що кодує бета-ланцюг гемоглобіну, послідовність ГАГ замінена на ГТГ. В цьому випадку синтезують олігонуклеотид довжиною близько 20 основ, мітять радіоактивною міткою. З ембріональних клітин, що містяться в амніотичній рідині, виділяють ДНК і використовують її для гібридизації. Якщо ембріон дефектний, то тест буде позитивним.

Аналіз проводять по наступній схемі (рис. 6): досліджувану ДНК гідролізують рестриктазами, фракціонують електрофорезом, переносять розділені фрагменти на фільтр нітроцелюлози і проводять реакцію гібридизації з міченими олігонуклеотидами. Цей метод був розроблений Саузерном в 1975 р. У вітчизняній літературі його прийнято називати «саузерн блоттинг». «Блоттинг» - в перекладі з англійського означає «промокашка», «саузерн» - «південний», в даному випадку гра слів: прізвище ученого переводиться як географічний напрям.

Молекули ДНК розганяють в агарозному гелі електрофорезом. ДНК в гелі денатурує лугом. Луг нейтралізують і пластину гелю покривають листом нітроцелюлози. Зверху на нітроцелюлозу поміщають стопку листів фільтрувального паперу, забезпечуючи повільний струм буферного розчину через гель в напрямі, перпендикулярному напрямку електрофорезу. ДНК дефундує з гелю і зв'язується з фільтром нітроцелюлози. Після прогрівання фільтру при 80⁰С у вакуумі ДНК незворотно зв'язується з нітроцелюлозою. Розташування смуг іммобілізованої ДНК точно відповідає їх розташуванню в гелі. ДНК, зв'язану з фільтром нітроцелюлози, можна гібридизувати з радіоактивно міченою ДНК. Блоттинг за Саузерном корисний також і для локалізації генів, що вивчаються, в певних фрагментах, отриманих в результаті гідролізу різними рестриктазами гібридних молекул ДНК, хромосомної ДНК і т.п.

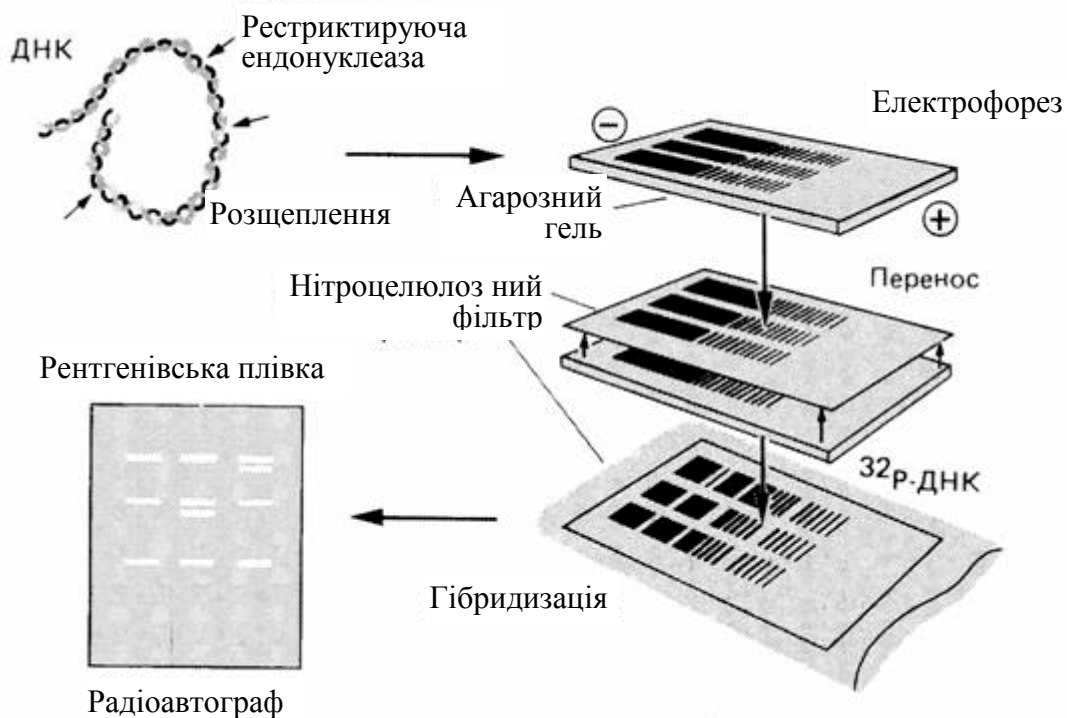


Рис.6. - Блоттинг ДНК по Саузерну

Аналогічним методом на нітроцелюлозу переносять молекули РНК (Північний блоттинг) і білка (Західний блоттинг). З частин світу залишилися вільною тільки західна, хоча вакантними залишилися 2 класи макромолекул - вуглеводи і ліпіди. Одним з найбільш точних і сучасних методів аналізу є використання чіпів. Це пластинки з міченими ДНК-зондами. Кожна така пластинка може містити декілька десятків тисяч зондів, розташованих в певній послідовності. Мітка виявляється тільки у спарених двохланцюгових фрагментах.

Якщо в досліджуваному зразку є послідовності, комплементарні послідовностям зонда, то гібридизацію можна визначити візуально або за допомогою спеціальних приладів. Як правило, детектори під'єднані до комп'ютера, тобто процедура читання і обробки інформації автоматизована.

Такі ДНК-чіпи можна застосовувати для комплексної діагностики інфекційних захворювань, спадкових дефектів, встановлення експресії тих або інших генів (в цьому випадку йде гібридизація з мРНК), тобто відстежувати порушення обміну речовин. Вони дешеві, дуже надійні, прості у використанні і можуть багато разів використовуватися. Недолік – дорога апаратура для детекції.

Бібліотеки геномів, клонування ДНК

Після того, як ДНК зшита в пробірці, її необхідно розмножити. Існує два підходи до клонування ДНК. Перший підхід передбачає використання бактеріальних або дріжджових клітин для розмноження введеної в них чужорідної ДНК. Другий спосіб є ампліфікацією ДНК *in vitro*.

Клонування ДНК in vivo

Використовуючи мікроорганізми, можна створювати два типи бібліотек ДНК: геномну і клоновану (кДНК).

Бібліотека геному. Якщо геном якого-небудь організму розрізати, вставити в плазмідні або вірусні вектори і ввести в клітину, то у такому вигляді його можна зберегти. При розрізанні плазмідною або фаговою ДНК вірогідність випадання цілих і незмінених шматків геному досить висока. Такий спосіб отримання бібліотеки геному отримав назву «Метод дробовика», оскільки геном в даному випадку представлений окремими фрагментами. Принципи створення плазмідних і вірусних векторів спільні, тому розглянемо їх на прикладі плазмідних. Слід зазначити, що з вірусної ДНК краще використовувати ДНК фагів, оскільки вони мають велику ємкість і дозволяють вставляти більші за розміром ділянки геному. Очищені кільцеві молекули ДНК обробляють рестриктазою, отримуючи лінійну ДНК. Клітинну ДНК обробляють такою ж рестриктазою, додають до плазмідної, а також додають лігази.

Таким чином отримують рекомбінантну плазмідну ДНК, яку вводять в бактеріальні або дріжджові клітини. Плазмідна реплікується з утворенням багатьох копій.

Багато плазмід несуть ген стійкості до антибіотиків, і якщо в рекомбінантній плазміді є такий ген, то клітини легко виявляти, вирощуючи на поживному середовищі з антибіотиком. Кожна така колонія є клоном або потомством однієї клітини. Плазмід однієї колонії містять клон ДНК геному, а сукупність плазмід можна назвати бібліотекою ДНК геному. Недолік такого методу в тому, що фрагменти ДНК утворюються у величезній кількості. Розрізання ДНК геному визначається випадково, тому лише частина фрагментів містить повноцінні гени. Деякі фрагменти можуть містити тільки частину гена або ж інтронні послідовності.

Бібліотека кДНК. Створення кДНК починається з синтезу на матриці РНК за допомогою зворотної транскриптази комплементарної нитки ДНК. Потім створюють лужні умови, руйнують ланцюг РНК на нуклеотиди, після чого за допомогою ДНК-полімерази синтезують комплементарний ланцюг ДНК. При цьому утворюється фрагмент ДНК з тупими кінцями. Таку ДНК вбудовують в плазмід і вводять в клітини бактерій. При ампліфікації плазмід утворюється клон комплементарної копії ДНК (кДНК).

Переваги клонової ДНК перед клонами ДНК генома в тому, що нуклеотидна послідовність гена, яка кодує білок, нічим не переривається. Гени еукаріот містять інтрони, які повинні видалятися з транскриптованої РНК перед перетворенням її на матричну, після чого йде сплайсинг (зрощення). Бактеріальні клітини не можуть здійснювати модифікацію РНК, що утворилася шляхом транскрипції гена еукаріотичної клітини. Тому якщо необхідно отримати білок шляхом експресії клонованого гена, то краще використовувати банк кДНК, що отримана на основі матричної РНК.

Методи клонування ДНК

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) - методика

У 1985 році К. Мюлліс із співробітниками розробили метод клонування послідовностей ДНК *in vitro*, який отримав назву полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). До аналізованого зразку ДНК додають в надлишку 2 синтетичних олігонуклеотиди - праймера розміром близько 20 нуклеотидів. Кожен з них комплементарний одному з 3'-кінців фрагменту ДНК. ДНК нагрівають для розділення ланцюгів подвійної спіралі, а при охолодженні відбувається гібридизація праймерів з комплементарними ділянками фрагментів ДНК. В результаті, в розчині знаходяться одониткові ДНК з короткими двуланцюговими ділянками - праймерами. При додаванні нуклеотидів і ДНК-полімерази синтезуються комплементарні ланцюги і утворюються ідентичні фрагменти ДНК (перший цикл, рис. 7). Реакція зупиняється і ДНК знову денатурується нагріванням.

Під час охолодження праймери, які знаходяться у надлишку, знову ефективно гібридизуються, але вже не лише з ланцюгами початкової ДНК, а з знов синтезованими. Внесення до системи ДНК-полімерази ініціює другий цикл полімеразної реакції. Багатократне повторення описаної процедури дозволяє провести 30 і більше циклів ферментативного подовження праймерів. При цьому число сегментів ДНК, обмеженої з обох кінців використовуваними праймерами, з кожним циклом ПЛР збільшується експоненційно (наближається до залежності 2^n , де n — число циклів).

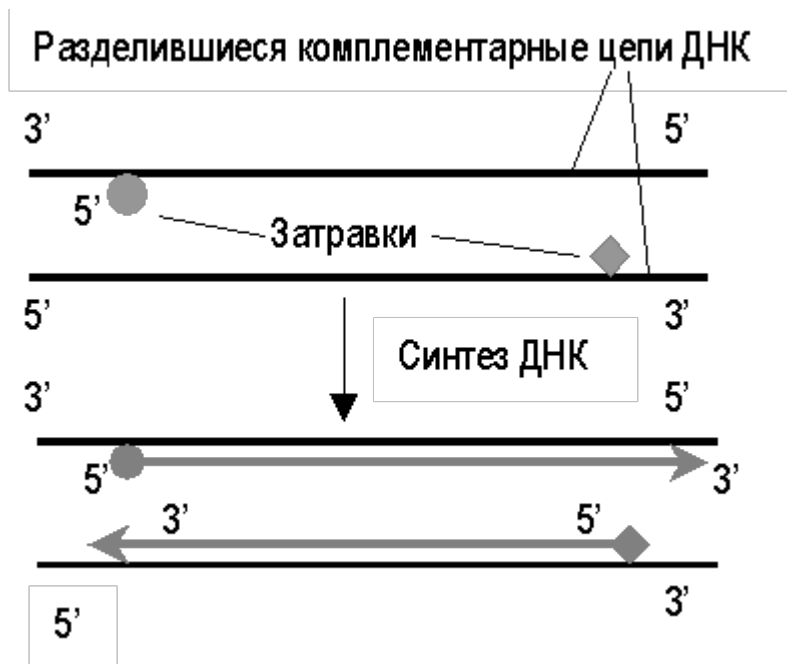


Рис. 7. -Перший цикл полімеразної ланцюгової реакції

Вихід всіх інших продуктів реакції збільшується по лінійній залежності (рис. 8). Таким чином, в процесі даної реакції ефективно ампліфікується тільки та послідовність ДНК, яка обмежена праймерами.

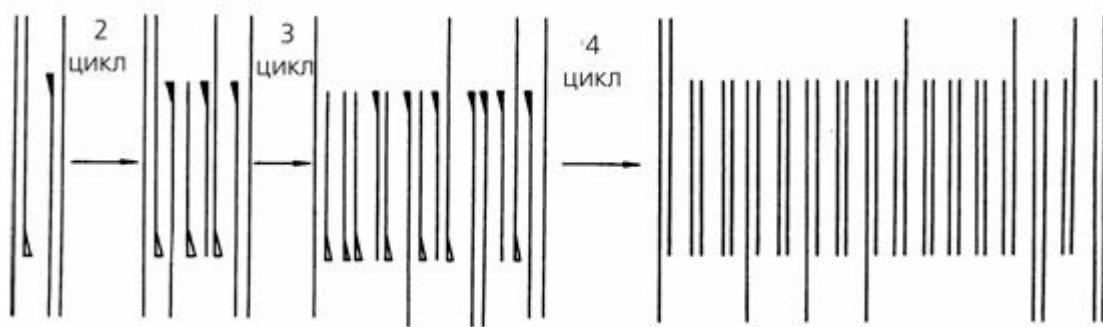


Рис.8. - Схема полімеразної ланцюгової реакції

Спершу для ПЛР використовували фрагмент ДНК-полімерази I *E. coli*. Проте недоліком даного підходу було те, що після кожного циклу реакції необхідно було вносити до реакційної суміші нову порцію ферменту. Крім того, в оптимальних температурних умовах такої полімеразної реакції (37°C)

з'являлися вторинні ділянки з'єднання праймерів і спостерігалася ампліфікація незапланованих сегментів генома, тобто специфічність ампліфікації не була повною.

Істотне поліпшення методу полімеразної ланцюгової реакції було досягнуте після заміни використаного фрагменту на ДНК-полімеразу термофільної бактерії *Thermus aquaticus* (Taq-полімераза). Температурний оптимум реакції з Taq-полімеразою знаходиться в районі 70°C. Іншою важливою властивістю є те, що дана полімераза не інактивується після тривалої інкубації при 95°C. Використовуючи Taq-полімеразу, вдалося вирішити відразу дві проблеми. По-перше, термостабільна полімераза не інактивується на етапі денатурації ДНК, і тому немає необхідності після кожного циклу реакції додавати нову порцію ферменту. Таке спрощення процедури дозволило автоматизувати проведення ПЛР, оскільки тепер було потрібне лише перенесення зразка з певним інтервалом часу в різні температурні умови: 90—95°C (температура денатурації) і 60—70°C (температура ренатурації ДНК і ферментативної реакції). По-друге, високий температурний оптимум реакції Taq-полімеразою, що каталізує, дозволяє підбирати такі температурні умови, що забезпечують гібридизацію праймерів тільки в заданому районі геному, що істотно підвищує специфічність і чутливість методу.

Використовуючи метод ПЛР, можна *in vitro* селективно збагачувати препарат ДНК фрагментом з певною послідовністю в мільйон і більше разів. Це дозволяє надійно виявляти однокопійні гени і їх варіанти в таких великих і складних геномах, яким є геном людини. Чутливість методу така, що ампліфікувати в ПЛР і виявити цільову послідовність можна навіть в тому випадку, якщо вона зустрічається в одному зразку з 100000 клітин.

Отриманий сегмент ДНК достовірно проявляється у вигляді дискретної смуги після електрофоретичного розподілу молекул ДНК і забарвлення їх етидіум бромідом. Якщо до праймеру пришити фермент, то ферментативна

мітка накопичуватиметься при ампліфікації. Продукт ампліфікації перевіряється за принципом ІФА, тобто додається субстрат і оцінюється зміна забарвлення. Як мітку можна використовувати стрептавідин. Його можна пришивати як до праймеру, так і до нуклеотидів. В останньому випадку нуклеотиди, мічені стрептавідином, додаються до звичайних, таких, що йдуть на синтез комплементарного ланцюга ДНК. Цим досягається ще більше посилення сигналу. Розмножений *in vitro* фрагмент отримують в кількостях, достатніх для його прямого секвенування. Автоматизована процедура Таq-полімеразної ланцюгової реакції, що складається з 30 і більше циклів, займає 3—4 години, що істотно швидше і простіше за процедуру клонування певного фрагмента ДНК у складі векторних молекул.

Введення гена в клітину

Селективні і репортерні гени

Ввести рекомбінантний ген в клітину можна 2 способами: використовуючи вектори або шляхом прямого введення.

Вимоги до векторної ДНК, її склад

Вектор - молекула ДНК або РНК, що складається з двох компонентів: векторної частки (носія) і клонованого чужорідного гена. Завдання вектора – донести вибрану ДНК в клітину-рецепієнт, вбудувати її в геном, дозволити ідентифікацію трансформованих клітин, забезпечити стабільну експресію введеного гена.

Таким чином, вектор має бути невеликим, здатним підтримуватися в клітині-господарі (реплікуватися), багато разів копіюватися (ампліфікуватися), експресувати відповідний ген (містити відповідні послідовності регулювальників), повинен мати маркерний ген, що дозволяє розрізняти гібридні клітини для їх ефективною селекції; має бути здатний передаватися в клітину відповідного організму.

Можна виділити 2 групи маркерних генів, які дозволяють відрізнити трансформовані клітини:

1. Селективні гени, що відповідають за стійкість до антибіотиків (канаміцину, тетрацикліну, неоміцину та ін.), гербіцидів. Основний принцип роботи такого маркера – здатність трансформованих клітин рости на селективному поживному середовищі з додаванням певних речовин, що інгібують ріст і поділ нетрансформованих, нормальних клітин.

2. Репортерні гени, що кодують нейтральні для клітин білки, наявність яких в тканинах може бути легко протестована. Найчастіше в якості репортерних використовуються гени β -глюкуронідази (GUS), зеленого флуоресцентного білка (GFP), люциферази (LUC), хлорамфеніколацетилтрансферази (CAT). До теперішнього часу з цього арсеналу найчастіше використовують гени GUS і GFP і, у меншій мірі, LUC і CAT.

Використовуваний на даний час як репортерний ген GUS є модифікованим геном *Escherichia coli*, що кодує β -глюкуронідазу з молекулярною масою 68 кД. GUS активний в широкому діапазоні умов середовища з оптимумом при рН 5-8 і 37°C. Він може гідролізувати широкий спектр природних і синтетичних глюкуронидів, що дозволяє підбирати відповідні субстрати для спектрофотометрії або флуориметричного визначення активності ферменту, а також для гістохімічного фарбування тканин *in situ* (наприклад, в синій колір). Фермент досить стабільний: він стійкий до нагрівання (час напівжиття при 55°C складає близько 2 год) і до дії детергентів. В процесі заморожування-відтавання втрати активності GUS не відбувається.

У складі химерних білків, створених генно-інженерними методами, GUS зазвичай зберігає свою функціональну активність. У живих клітинах

білок GUS також вельми стабільний і активний від декількох годин до декількох діб.

GFP (green fluorescent protein - зелений флуоресцентний білок, або білок зеленої флуоресценції) був виявлений Shimomura з спів. у 1962 р. у здатної до люмінісценції медузи *Aequorea victoria*. Ген GFP був клонований в 1992 р. Prasher і вже через декілька років почалося активне використання цього гена як репортерного в роботах з найрізноманітнішими про- і еукаріотичними організмами. В наш час ген GFP застосовується в сотнях робіт у всьому світі, і число їх швидко наростає. Настільки швидке збільшення викликане особливими властивостями білка GFP, а саме його здатністю до флуоресценції у видимій (зеленій) області спектру при опроміненні довгохвильовим УФ.

Багаточисельні похідні GFP отримали спільну назву AFR (autofluorescent proteins – автофлуоресцентні білки). З морської анемони *Discosoma sp.* недавно виділений ще один білок DsRed, що флуоресціює в червоному світлі. Ще декілька аналогічних флуоресцентних білків було виділено останнім часом ученими Російської академії наук з різних коралових поліпів роду *Anthozoa*. Він може бути денатурований дуже високою температурою, крайніми значеннями рН або сильними відновниками типу Na_2SO_4 . Після повернення до фізіологічних умов GFP в значній мірі відновлює здатність до флуоресценції. У складі химерних білків, створених генноінженерними методами, GFP, як правило, зберігає свою функціональну активність. У живих клітинах білок GFP також дуже стабільний.

Типи векторів для введення гену в клітину

Існує декілька типів векторів:

Бактеріальні плазміди

Основна маса клітинної ДНК бактерій міститься в хромосомі (у хромосомі *E. coli*, наприклад, 4 млн. пар нуклеотидів). Проте окрім хромосом бактерії містять велику кількість дуже маленьких кільцевих молекул ДНК - плазмід завдовжки декілька тисяч пар основ (молекулярна маса від 1,5 до 300 мегадальтон, 1 МД = 1500 п.о). Такі міні-хромосоми називають *плазмідами*.

Як правило, плазмідні мають в своєму складі гени стійкості до антибіотиків, іонів важких металів (R-плазмід), а також гени, що контролюють катаболізм деяких органічних сполук (плазмід біодеградації, або D-плазмід). Оскільки ці гени знаходяться в плазмідах, вони представлені набагато більшим числом копій. Висока копійність плазмід забезпечує клітині синтез великої кількості ферментів, що хімічно нейтралізують антибіотики або ксенобіотики, що і забезпечує стійкість до останніх. Плазмід виділяють з різних штамів і видів бактерій, але вони не є обов'язковими компонентами генома, а в деяких природних штамів плазмід не виявлені взагалі.

Оскільки плазмідна ДНК значно менша хромосомної, її досить легко виділити в чистому вигляді. У присутності іонів кальцію плазмід легко поглинаються бактеріями-рецепієнтами, навіть якщо ті їх ніколи не містили, і в клітинах бактерійного потомства можна виявити багато копій поглиненої плазмід. Проте бактеріальна клітина зазвичай може містити у своєму складі плазмід одного типу. Це явище несумісності плазмід.

Існують групи несумісності (від англійського incompatibility – несумісність). У такій групі може бути декілька плазмід, сумісних між собою, але не сумісних з іншими плазмідами. Число копій плазмід в клітині може істотно варіювати. Це залежить від генетичних особливостей як клітини, так і плазмід.

Плазмід, які знаходяться "під ослабленим контролем", можуть розмножуватися до тих пір, поки їх кількість не досягне 10-200 копій на

клітину. Якщо ж плазмідка знаходиться "під строгим контролем", вона реплікується з тією ж швидкістю, що і головна хромосома. Такі плазмідки містяться в клітині в одній або в декількох копіях.

Природно, що для клонування рекомбінантних ДНК намагаються використовувати плазмідки першого типу. Але це не обов'язково, оскільки плазмідки у присутності хлорамфеніколу можуть збільшуватись незалежно від поділу хромосом. Одна з найбільших плазмід, що часто використовуються, створена на основі плазмід природного походження, виділених з *E. coli*. Ця плазмідка містить гени стійкості до двох антибіотиків: ампіциліну і тетрацикліну, причому в генах стійкості до цих антибіотиків є сайти рестрикції. Якщо фрагмент чужорідної ДНК вбудовується в один з генів стійкості, то останній інактивується. Отже, успішне вбудовування фрагмента чужорідної ДНК в один з цих генів легко детектувати по зникненню у бактерій стійкості до даного антибіотика. Але при цьому зберігається стійкість до іншого антибіотика. Таким чином вектор дає можливість детектувати тільки ті клони бактерій, які містять рекомбінантну плазмідку.

Віруси

Є віруси, зараження якими не призводить до загибелі клітини, але які вбудовуються в геном клітини-господаря і розмножуються разом з нею, або викликають її неконтрольований ріст, тобто перетворюють на ракову. До таких відносяться ДНК-віруси SV-40 і вірус поліоми. Впровадження деяких пухлинних РНК-вірусів веде до відбрунькування вірусних часток від клітини без її лізису. До таких вірусів відносяться, наприклад, ретровіруси (вірус саркоми Рауса і СНІДу). Для бактеріальних клітин як вектор часто використовують бактеріофаги.

Віруси є одними з головних кандидатів на роль векторів для введення чужорідної ДНК. При вірусній інфекції кожна клітина може отримати велике число копій чужорідного гена. ДНК можна вбудовувати так, щоб вона

знаходилася під контролем сильних вірусних промоторів, що забезпечить високий рівень експресії гена, і його продукти будуть доступніші для дослідження.

Останніми роками сконструйовані багаточисельні "човникові" вектори і їх рекомбінантні похідні, здатні до реплікації в тваринній і бактеріальній клітині і ефективної експресії клонованого гену в тваринній клітині. Найбільш поширені вектори складаються з плазмиди pBR322 і інтактного раннього району транскрипції ДНК SV40, а потрібний ген вбудовується під контроль промотору пізніх генів або додаткового раннього промотору. Вірус має бути життєздатним після рекомбінації його ДНК. Найлегше віруси вводяться у бактерії. Недоліком вірусів як векторів є їх невелика ємність. Крім того, віруси заражають невелике коло господарів. Існують гібридні вектори, які містять ДНК фага і плазмиди. До них відносяться, наприклад, косміди і фазміди.

Косміди – плазмідні вектори, в яких вбудована ділянка генома фагу, що забезпечує можливість упаковки цієї молекули ДНК у фагову частку. Фагові частки забезпечують добре проникнення гібридної ДНК в клітину (шляхом ін'єкції), після чого відбувається замикання ДНК в кільце по липких кінцях і реплікація її за плазмідним типом. **Фазміди** також є гібридами між фагом і плазмідною. Після вбудовування чужорідної ДНК в одних умовах можуть розвиватися як фаги, так і плазмиди.

Віроїди із всіх відомих в даний час інфекційних агентів мають ранг найбільш дивних. Відомо, що це найдрібніші віруси, здатні до незалежної реплікації, які мають розміри генома, відповідні молекулярній масі 1 М, тобто близько 1500 тис. пар основ. Вони мають мінімальну кількість генетичної інформації, необхідної для кодування вірусоспецифічних продуктів і пригнічення метаболізму клітини-господаря. У 1971 р. були відкриті інфекційні агенти, які складаються з 270-300 нуклеотидів (на три порядки менше найменших вірусів), не вкриті білковою оболонкою. Це

незвичайні патогени - найпростіші і найменші зі всіх відомих. Яким чином віроїди викликають симптоми хвороби в інфікованих рослинах, не відомо до цих пір. Встановлено, що вони реплікуюються ферментами клітини-господаря, не транслуються у видоспецифічні поліпептиди, інтегруються в геном клітини-господаря.

Віроїди заражають персистентно (не відбувається одужання) і викликають системну інфекцію, тобто мігрують з сайту впровадження в інші частини рослин, переносяться механічно або через клітинний сік, через насіння, пилок. Віроїди також пов'язані з ядерними фракціями рослин і можуть розмножуватися в ядрах.

Плазмідні агробактерій. Як вектори можуть використовуватися пухлиноутворюючі плазмідні бактерій. Види *Agrobacterium* еволюційно споріднені з клубеньковими бактеріями, що відносяться до роду *Rhizobium*, і мають багато спільних з ними рис. Проте характер взаємодії агробактерій з рослиною має своєрідні особливості.

Взаємодія видів *Agrobacterium* з рослинами представляє особливий інтерес, оскільки при цьому виді паразитизму один з партнерів специфічно видозмінює властивості господаря, вбудовуючи свої гени в його геном. Крім того, це служить унікальним прикладом міграції ДНК прокаріот в еукаріотичну клітину.

Хлоропластна та мітохондріальна ДНК також привертають увагу вчених як можливі вектори для перенесення генів в клітину. Структурна організація цих клітинних субгеномів істотно розрізняється. Гени рослин також здатні до експресії в клітинах *E. coli*. Це гени великої субдиниці РБФК.

Переважа хлоропластних генів полягає в тому, що їх експресія в клітинах *E. coli* може бути досягнута шляхом простого об'єднання транскрибованих послідовностей, оскільки в ДНК хлоропластів і бактерій до

початку стартових кодонів трансляції знаходиться однакова нуклеотидна послідовність. Це дає можливість синтезувати рослинні економічно важливі поліпептиди за допомогою клітин прокаріот.

До складу мітохондріальної ДНК входять структурні гени, які кодують поліпептиди, гени рибосомних і транспортних РНК. Проте велика частина білків мітохондрій, як і хлоропластів, кодується ядерними генами. Але якщо геном хлоропластів представлений гомогенною популяцією крупних кільцевих молекул, то в мітохондріях міститься декілька класів кільцевих молекул, не всі функції яких ще відомі.

Транспозони

Транспозони - сегменти ДНК, які контролюють власну транспозицію (переміщення) з одного сайту ДНК в інший, шляхом вирізання з початкового сайту і впровадження в новий сайт хромосоми або плазмиди. Вперше були відкриті в 40-х рр. американською вченою Барбарою Мак-Клінток. Ці гени, ідентифіковані за їх здатністю пригнічувати експресію інших генів кукурудзи, що знаходяться поряд з ними і не мають фіксованого положення в хромосомі. Вони як би пересувалися по всьому геному рослини. Регулюючі елементи можуть вбудовуватися і вищеплюватися, причому після їх вищеплення починають функціонувати гени, що раніше мовчали.

Механізм переміщення фрагментів ДНК по геному до кінця не з'ясований. ДНК переноситься ферментом транспозазою. Фермент кодується послідовністю завдовжки 20 нуклеотидів в середині транспозона. Він специфічно взаємодіє з кінцевими інвертованими повторами мобільного елемента і може вирізати його з хромосоми.

Вирізання може відбуватися точно — з відновленням початкової структури ділянки ДНК, і неточно, тобто з делеціями і вставками від одного до декількох нуклеотидів. Це призводить до появи стабільних мутацій і є одним з механізмів створення нових послідовностей ДНК. Як правило,

мобільні генетичні елементи багато разів повторюються в геномі і утворюють гетерогенні родини, члени яких дисперговані по хромосомах.

Велика частина членів кожної родини є дефектними копіями, які не функціонують, хоча зберігають здатність до переміщення. Поведінку транспозонів можна назвати паразитичною. Довжина їх від 2 до 10 тисяч нуклеотидних пар. У вищих еукаріот транспозонів припадає на частку приблизно 10% ДНК клітини. Більшість їх переміщується не часто, але, оскільки їх в клітині досить багато, транспозиція значно впливає на різноманітність видів.

Оскільки рухливі гени можуть переміщатися в межах генома з одного місця на інше, то вони можуть бути вельми ефективними векторами для передачі рекомбінантної ДНК. Генетична трансформація за допомогою векторів на основі транспозонів була вперше здійснена на дрозофілі, якій був переданий ген, що обумовлював коричневе забарвлення очей. Перенесення генів за допомогою транспозонів має великі переваги, оскільки відбувається з високою частотою і не призводить до значних перебудов інтегрованої ДНК. Крім того, цим методом можна переносити досить великі фрагменти ДНК.

Способи прямого введення генів в клітину

Пряме введення гена в клітину здійснюють декількома способами: трансфекція, мікроін'єкція, електропорація, метод «міні-клітин», упаковка в ліпосоми, електронна гармата.

Під час трансфекції ДНК адсорбується на кристалах фосфату кальцію. Утворюються частки кальцієвого преципітату. Вони поглинаються клітиною шляхом фагоцитозу. Для підвищення ефективності трансформації до специфічної ДНК, що містить ген, по якому буде проводитись селекція, додається неспецифічна ДНК-носій. Зазвичай для цієї мети беруть ДНК з тимуса теляти або сперми лосося.

Частка ДНК зв'язується з мембраною і не потрапляє в клітини. ДНК акцептуює від 15 до 90% клітин. Через декілька діб після введення невелика частка клітин здатна до експресії чужорідних генів, але потім рівень експресії падає і більш менш стабільну трансформацію зазнає $10^3 - 10^5$ клітин. Крім того, для трансфекції використовується і ДЕАЕ-декстран, полімер, що адсорбує ДНК. Ефект введення в клітину, і час експресії високі, але частота стабільної трансформації нижча, ніж при використанні преципітату кальцію.

Частоту трансфекції збільшує гліцериновий шок (4 хвилини в 15% розчині гліцерину в HEPES-буфері). В клітину можна вводити будь-який ген, якщо заздалегідь лігувати його з клонованим селективним маркером. Проте подальші дослідження показали, що робити це не обов'язково. Клітини, що поглинають селективний ген, разом з ним поглинають і іншу ДНК, наявну в кальцієвому преципітаті.

Таким чином, користуючись методом котрансформації, практично будь-який клонований сегмент ДНК можна ввести в культивовані клітини еукаріот, якщо включити цю ДНК разом з селективним маркером до складу суміші для утворення кальцієвого преципітату.

Для трансфекції можна також використовувати хромосоми або фрагменти хромосом. Клітини-донори блокуються на стадії мітозу. Мітотичні хромосоми вивільняються під впливом осматичного шоку і гомогенізації. Їх очищають шляхом диференціального центрифугування. Хромосоми обробляють на поверхні клітин хлористим кальцієм, а через декілька годин додають реагент, здатний перфоровати мембрани (наприклад, гліцерин). Для обробки клітин-реципієнтів використовуються грубо очищені препарати хромосом, оскільки хромосоми при цьому руйнуються менше всього. Кількість хромосом для обробки клітини обмежена. Краще використовувати не більше 20 хромосом на одну клітину-реципієнт, оскільки при високих концентраціях хромосом в суспензії вони аглютинують.

Рецепієнтна клітина містить фрагменти донорських хромосом, які можуть вбудовуватися в геном, можуть реплікуватися самостійно. У введених фрагментах часто спостерігаються делеції. Не всі клітини здатні до трансформації ДНК генома з високою частотою. Людські фібробласти ефективно включають плазмідну ДНК і майже не включають геном.

Мікроін'єкція ДНК в клітини ссавців стала можливою з появою приладу для виготовлення мікропіпеток діаметром 0.1-0.5 мікрона і мікроманіпулятора (рис. 9). Так, плазмиди, що містять фрагмент вірусу герпесу з геном тимидинкінази (ТК) і плазмиду pBR322, були введені в ТК-клітини і було показано, що ТК-ген проник в ядро і нормально в них реплікувався. Метод введення ДНК за допомогою мікроін'єкцій був розроблений на початку 70-х рр. Андерсоном і Діакумакосом.

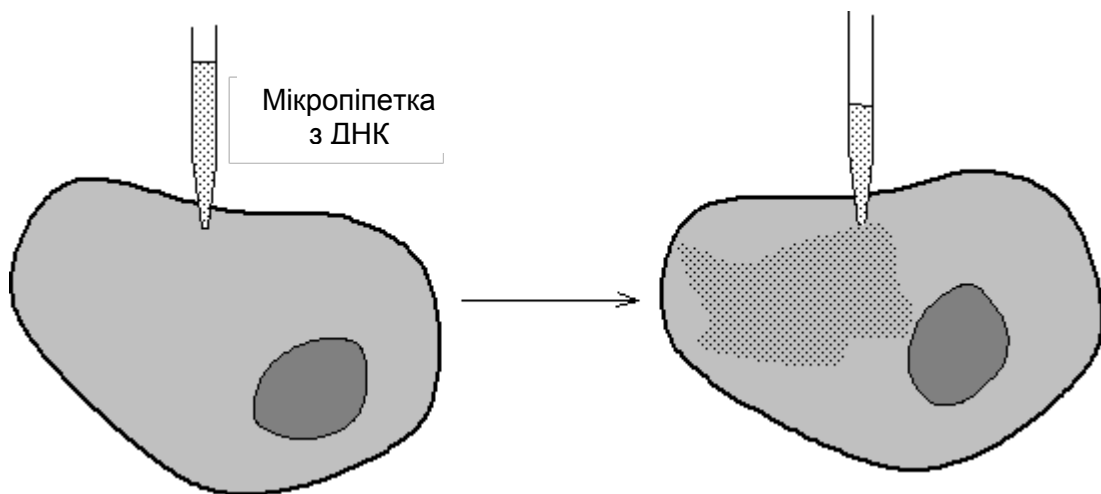
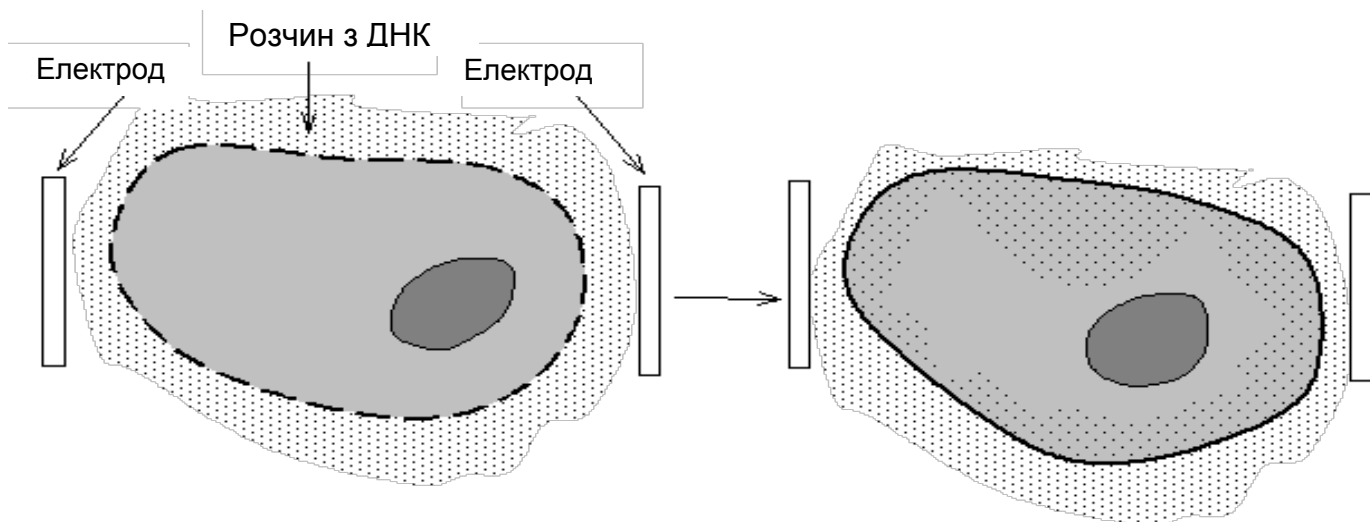


Рис.9. - Введення ДНК шляхом мікроін'єкції

В принципі, за наявності необхідного устаткування можна за 1 годину ін'єктувати 500-1000 клітин, причому в кращих експериментах в 50% клітин спостерігається стабільна інтеграція і експресія ін'єктованих генів. Перевага описаного методу полягає також в тому, що він дозволяє вводити будь-яку ДНК в будь-які клітини.

Електропорація полягає в тому, що імпульси високої напруги зворотно збільшують проникність біомембран. В середовище для електропорації додають клітини і фрагменти ДНК, яку необхідно ввести в клітини (рис. 10). Через середовище пропускають високовольтні імпульси (напруга 200-350В, тривалість імпульсу 54 мс), що призводить до утворення пор (електропробій) в мембрані цитоплазми, час існування і розмір яких достатні, щоб такі макромолекули, як ДНК, могли із зовнішнього середовища потрапити до клітини в результаті дії осмотичних сил. При цьому об'єм клітини збільшується.

Напруженість електричного поля і тривалість його дії, концентрації трансформуючої ДНК і реципієнтних клітин для кожної системи підбирають



експериментально, щоб досягти високого відсотка поглинання ДНК клітинами, що вижили.

Рис. 10. - Метод електропорації

Показано, що за оптимальних умов електропорації кількість трансформантів може досягати 80% клітин, що вижили. Електропорація — фізичний, а не біохімічний метод, і це, мабуть, обумовлює його широке використання. Багаточисельні дослідження продемонстрували, що електропорація може успішно використовуватися для введення молекул ДНК

в різні типи клітин, такі як культивовані клітини тварин, дріжджі, бактерії і протопласти рослин.

«Міні-клітини» отримують шляхом блокування мітозу донорних клітин колцемідом. При тривалій обробці клітин колцемідом в них довкола кожної хромосоми формується нова ядерна мембрана. Обробка цитохалазином В і центрифугування призводить до утворення міні-клітин, що є мікроядрами, інкапсульованими в мембрану цитоплазми. Отримані міні-клітини дуже чутливі до різного роду впливів, тому для злиття підбирають спеціальні м'які умови. Метод важкий, чутливий, ефективність його низька.

Упаковка в ліпосоми використовується для захисту екзогенного генетичного матеріалу від руйнівної дії рестриктаз. Ліпосоми - сферичні оболонки, що складаються з фосфоліпідів. Отримують їх шляхом різкого струшування суміші водного розчину і ліпідів, або обробляючи ультразвуком водні емульсії фосфоліпідів. Ліпосоми, що складаються з фосфатидилсерину і холестерину найбільш придатні для введення ДНК в клітини тварин і рослин. Системи перенесення за допомогою ліпосом низькотоксичні по відношенню до клітин.

Генетична трансформація соматичних клітин ссавців

Культури трансформованих клітин ссавців використовують для отримання різних речовин. Хоча культури клітин тварин, особливо при масовому вирощуванні, менш економічні у порівнянні з бактеріальними та дріжджовими культурами, вони мають істотну перевагу - здатність здійснювати малі, але досить важливі модифікації білків - продуктів генів ссавців. Окрім створення клітин-продуцентів, трансформація соматичних клітин ссавців дозволяє вивчати тонкі механізми регуляції експресії генів і цілеспрямовано модифікувати генетичний апарат клітин тварин, а при необхідності і людини, що має велике значення для медичної генетики.

Культури клітин ссавців можуть виявитися ефективним джерелом виділення деяких вірусних антигенів з метою отримання вакцин для тварин і людини. Отримання таких вакцинних культур здійснено за допомогою техніки рекомбінантних ДНК і ефективних векторів експресії для клітин ссавців і людини. При використанні ДНК-вакцини в організм вводиться не антиген, а ген, що кодує синтез цього антигену. Ген вбудовується в плазмід, а плазмід вводиться в організм шляхом звичайної ін'єкції.

ДНК-вакцини особливо перспективні в тваринництві. Фібер – білок вірусної оболонки. Епітоп фібера кодує синтез протективних антитіл. Одне із захворювань птахів – синдром зниження яйценоскості (ССЯ) викликається вірусом. Після аналізу ДНК цього вірусу був виділений ген, кодуєчий фібер, потім проклонований і вбудований в плазмід. Рекомбінантна вакцина при введенні її в організм приносить ДНК фібера в клітину, накопичення вірусного білка провокує синтез специфічних антитіл, тобто викликає імунну відповідь.

Отримання трансгенних тварин

Якщо вводити ДНК в клітини багатоклітинного організму, то результатом трансформації буде зміна властивостей лише невеликого числа клітин, які отримали новий ген або гени. Отже, для зміни властивостей всього організму слід змінювати геном статевих клітин, які передадуть нові властивості нащадкам. Для рослин і тварин доцільно змінювати такі властивості, як швидкість росту, стійкість до захворювань, здатність адаптуватися до нових зовнішніх умов. Розроблені способи введення генів в ембріональні клітини ссавців, мух і деяких рослин. Від роботи з досить крупними яйцями амфібій перейшли до вивчення яйцеклітин і ембріонів мишей, які найбільш досліджені в генетичному відношенні.

Мікроін'єкцію клонованих генів проводять в один або обидва пронуклеуса щойно заплідненої яйцеклітини миші. Частіше вибирають

чоловічій пронуклеус, внесений сперматозоїдом, оскільки його розміри більші. Після ін'єкції яйцеклітину негайно імплантують в яйцепровід приймальної матери, або дають можливість розвиватися в культурі до стадії бластоцисти, після чого імплантують в матку. Можна вводити ген в сперматозоїди і потім проводити ними запліднення.

Таким чином були ін'єктовані гени інтерферону і інсуліну людини, ген гемоглобіну кролика, ген тимідинкінази вірусу простого герпесу і кДНК вірусу лейкемії мишей.

Число молекул, що вводиться за одну ін'єкцію, коливається від 100 до 300 000, а їх розмір - від 5 до 50 кб. Виживає зазвичай 10 - 30% яйцеклітин, а частка мишей, що народилися з трансформованих яйцеклітин варіює від декількох до 40%. Таким чином, реальна ефективність складає близько 10%.

Інтеграція чужорідних генів неспецифічна по відношенню до хромосом, а число копій чужорідного гена може розрізнятися від декількох до 100 і більше. Ці гени утворюють групу тандемних повторів, об'єднаних за типом "голова до хвоста". Чужерідна ДНК після ін'єкції була виявлена як в соматичних, так і в статевих клітинах. Це означає, що інтеграція проходить на найперших стадіях розвитку зиготи. У декількох випадках гетерологічна ДНК успадковувалася в трьох поколіннях мишей, що свідчить про стабільну інтеграцію ДНК в статеві клітини. Встановлено, що рівень експресії чужерідного гена залежить від місця інтеграції ДНК з хромосомами і від ступеня її метилування, а також від диференціювання тканин. Важливо відзначити, що специфічні чужорідні гени можна вбудовувати в геном клітини таким чином, щоб вони підпорядковувались нормальним сигналам регуляторів.

Встановлено, що інтеграція гена в клітини ссавців відбувається випадковим чином і не пов'язана з конкретними областями хромосоми. Якщо ген нестабільний, він може бути втрачений або стати неактивним. Разом з

геном необхідно вводити послідовності регулювальників. Метод введення генів в ембріональні клітини має обмеження. Не завжди вдається вбудувати чужерідну ДНК в задану хромосомну ділянку. Розроблені методичні прийоми поки що не дозволяють замінити наявний в геномі ген, витісняючи його, або підпорядкувати новий ген системі регуляції організму. При трансгенозі можуть виникати несподівані проблеми. Наприклад, одні з перших робіт по генетичній трансформації тварин проводилися шляхом вбудовування генів гормону росту.

Перенесення гену гормону росту щура мишам збільшувало ріст мишей в 2 рази. Експерименти з трансгенозу генів гормону росту бика кроликам також стали успішними. А ось аналогічні експерименти по модифікації великої рогатої худоби призвели до збільшення приросту всього на 10-20%. У нашій країні отримані свині, що несуть ген соматотропіну. Вони не відрізнялися по темпах росту від нормальних тварин, але зміна обміну речовин позначилася на утриманні жиру. У таких тварин інгібувалися процеси ліпогенезу і активувався синтез білка.

До зміни обміну речовин призводило і вбудовування генів інсуліноподібного чинника. Такі трансгенні свині були створені для вивчення ланцюга біохімічних перетворень гормону, а побічним ефектом було зміцнення імунної системи. Найпотужніша білоксинтезуюча система знаходиться в клітинах молочної залози. Якщо вставити гени чужих білків під контроль казеїнового промотора, то експресія цих генів буде потужною і стабільною, а білок накопичуватиметься в молоці. Вже отримані трансгенні корови, в молоці яких міститься людський білок лактоферин. Цей білок планують застосовувати для профілактики гастроентерологічних захворювань у людей з низькою імунорезистентністю. Це хворі СНІДом, недоношені немовлята, хворі раком, що піддавались радіотерапії. Ведуться клінічні випробування такого молока.

Вже зараз корпорація Genzyme Transgenics планує дослідження з метою створення трансгенної великої рогатої худоби, що містить в молоці людський альбумін. Був куплений патент на отримання ембріонів, що містять геном клітин сполучної тканини (фібробластів), що включає ген, відповідальний за синтез людського білка. Подібна технологія дозволяє збільшити ефективність створення трансгенних молочних тварин, оскільки при звичайному введенні генів в запліднену яйцеклітину народжується тільки 5 - 10% трансформованих тварин, з них - декілька самців, що не дають молока. Використання нової технології клонування дозволяє отримувати тварин тільки жіночої статі, що дають трансгенний протеїн. В Англії створені трансгенні вівці, молоко яких містить фактор згортання крові.

Трансгенних тварин отримують і для ксенотрансплантації. Одним зі зручних донорів органів є свині, оскільки є анатомічна схожість органів і схожість імунологічних властивостей. Реакції відторгнення при трансплантації мають складний механізм. Одним з сигналів для атаки організму на чужерідний орган є білки, локалізовані на зовнішній поверхні мембрани. У трансгенних свиней ці білки замінені на людські.

Ще один напрямок трансгенезу – отримання стійких до хвороб тварин. Тваринництво тримається на вакцинах, оскільки селекція ведеться переважно на такі ознаки, як шерстистість, молочність і так далі. Підвищення стійкості – справа генних інженерів. Інший напрям – введення генів, що кодують антисмислову РНК. Для тваринництва гострою проблемою є лейкоз, що викликається РНК-вірусами. Трансгенні кролики, які несуть гени, що відповідають за присутність в клітині антисмислової РНК, були стійкі до лейкозу. Трансгенних тварин можна використовувати для вивчення спадкових захворювань. Трансгенних тварин почали використовувати для дослідження запальних і імунологічних захворювань людини, наприклад, ревматоїдного артриту. Моделюються хвороби, пов'язані з ліпідним обміном.

Можливості генної інженерії

Перші трансгенні рослини (рослини тютюну з вбудованими генами з мікроорганізмів) були отримані в 1983 р. Перші успішні польові випробування трансгенних рослин (стійкі до вірусної інфекції рослини тютюну) були проведені в США вже в 1986 р. Після проходження всіх необхідних тестів на токсичність, алергенність, мутагенність і так далі перші трансгенні продукти з'явилися у продажу в США в 1994 р. Це були томати із сповільненим дозріванням, створені фірмою "Calgen", а також гербіцид-стійка соя компанії "Monsanto". Вже через 1-2 роки біотехнологічні фірми поставили на ринок цілий ряд генетично змінених рослин: томатів, кукурудзи, картоплі, тютюну, сої, рапсу, кабачків, редису, бавовника. В наш час отриманням і випробуванням генетично модифікованих рослин займаються сотні комерційних фірм у всьому світі з загальним капіталом більше ста мільярдів доларів.

У 1999 р. площа висаджених трансгенних рослин займала порядка 40 млн. га, що перевищує розміри такої країни, як Великобританія. У США генетично модифіковані рослини складають зараз близько 50% посівів кукурудзи і сої, і більше 30-40% посівів бавовника. Це говорить про те, що генно-інженерна біотехнологія рослин вже стала важливою галуззю виробництва продовольства і інших корисних продуктів, що приваблює значні людські ресурси і фінансові потоки. Найближчими роками очікується подальше швидке збільшення площі, зайнятих трансгенними формами культурних рослин.

Перша хвиля трансгенних рослин, допущених для практичного вживання, містила додаткові гени стійкості (до хвороб, гербіцидів, шкідників, псування при зберіганні, стресам). Нинішній етап розвитку генетичної інженерії рослин отримав назву "Метаболічна інженерія". При цьому ставиться завдання не стільки поліпшити ті або інші наявні якості рослини, як при традиційній селекції, скільки навчити рослину синтезувати абсолютно нові сполуки, що використовуються в медицині, хімічному

виробництві і інших областях. Цими сполуками можуть бути, наприклад, особливі жирні кислоти, корисні білки з високим вмістом незамінних амінокислот, модифіковані полісахариди, їстівні вакцини, антитіла, інтерферони і інші "лікарські" білки, нові полімери, що не забруднюють навколишнє середовище і багато іншого. Використання трансгенних рослин дозволяє налаштувати масштабне і дешеве виробництво таких речовин, і тим самим зробити їх доступнішими для широкого споживання.

Поліпшення якості запасних білків

Запасні білки основних культурних видів кодуються сімейством близькоспоріднених генів. Накопичення запасних білків насіння – складний біосинтетичний процес. Перша генноінженерна спроба поліпшення властивостей однієї рослини шляхом введення гена запасного білка від іншої була, проведена Д. Кемпом і Т. Холлом в 1983 р. в США. Ген фазеоліна бобів за допомогою Ті-плазмід був перенесений в геном соняшнику. Результатом цього досвіду була лише химерна рослина, що отримала назву санбін. У клітинах соняшнику були виявлені імунологічно споріднені фазеолінові поліпептиди, що підтверджувало факт перенесення гена між рослинами, що відносяться до різних сімейств. Пізніше ген фазеоліну був введений клітинам тютюну: у рослин-регенерантів ген експресувався у всіх тканинах, хоча і в малих кількостях. Неспецифічна експресія фазеолінового гену, так само як і в разі перенесення його в клітини соняшнику, сильно відрізняється від експресії цього гена в зрілих сім'ядолях бобів де фазеолін складав 25—50% від загальної кількості білка.

Ген, що кодує запасний білок кукурудзи, – зеїн, після інтеграції його в т-ДНК був перенесений в геном соняшнику таким чином. Штами агробактерій, що містять Ті-плазмід з геном зеїну, використовували для індукції пухлин в стеблах соняшнику. Деякі з отриманих пухлин містили мРНК, що синтезується з генів кукурудзи, що дає підставу розглядати ці результати як перший доказ транскрипції гена однодольної рослини в

дводольному. Проте присутність зеїнового білка в тканинах соняшнику не детектувалась.

Більш реальним завданням для генетичної інженерії вважається поліпшення амінокислотного складу білків. Як відомо, в запасному білку більшості злакових спостерігається дефіцит лізину, треонина, триптофана, у бобів — метіоніну і цистеїну. Введення в ці білки додаткових кількостей дефіцитних амінокислот могло б ліквідувати амінокислотний дисбаланс.

Методами традиційної селекції вдалося істотно підвищити вміст лізину в запасних білках злакових. У всіх цих випадках частка проламінів (спирторозчинні запасні білки злаків) замінювалася іншими білками, що містять багато лізину. Проте у таких рослин і зменшувалися розміри зерна і знижувалась врожайність. Мабуть, проламіни необхідні для формування нормального зерна, і їх заміна іншими білками негативно впливає на врожайність. Враховуючи цю обставину, для поліпшення якості запасного білка зернових потрібний такий білок, який не лише відрізнявся б високим вмістом лізину і треоніну, але і міг би повноцінно замінити певну частку проламінів при формуванні зерна.

Рослини можуть синтезувати і білки тваринного походження. Так, вбудовування в геном рослин *Arabidopsis thaliana* і *Brassica napus* химерного гена, що складається з частини гена запасного 25-білка арабидопсиса і кодуєвої частки для нейропептида, — енкефаліна, приводило до синтезу химерного білка до 200 нг на 1 г насіння. Два структурні білкові домени були зв'язані послідовністю, що впізнавалась трипсином. Це давало можливість надалі легко ізолювати чистий енкефалін.

У іншому експерименті вдалося після схрещування трансгенних рослин, в одну з яких був вбудований ген гамма-субодиниці, а в другу - ген каппа-субодиниці імуноглобуліну, отримати у потомства експресію обох ланцюгів. В результаті рослина формувала антитіла, що складали до 1,3%

сумарної ваги білка листя. Також було показано, що в рослинах тютюну можуть формуватись повністю функціональні секреторні моноклональні імуноглобуліни. Секреторні імуноглобуліни зазвичай виділяються в ротову порожнину і шлунок, людини і тварин і служать першим бар'єром на шляху кишкових інфекцій. У згаданій вище роботі отримали продукцію в рослинах моноклональних антитіл, які були специфічні для *Streptococcus mutans*, - бактерій, які викликають зубний карієс. Передбачається, що на основі таких моноклональних антитіл, що продукуються трансгенними рослинами, вдасться створити дійсно антикарієсну зубну пасту. З інших білків тваринного походження, які представляють інтерес для медицини, показана продукція в рослинах людського інтерферона.

Розроблені також підходи, що дозволяють отримувати бактеріальні антигени в рослинах і використовувати їх як вакцини. Отримана картопля, що експресує олігомери нетоксичної субодиниці токсина холери. Ці трансгенні рослини можуть бути використані для отримання дешевої вакцини від холери.

Жири

Найважливішою сировиною для отримання різного роду хімічних речовин є жирні кислоти — основний компонент рослинної олії. По своїй структурі це вуглецеві ланцюги, які володіють різними фізико-хімічними властивостями залежно від своєї довжини і ступеня насичення вуглецевих зв'язків. У 1995 році була закінчена експериментальна перевірка і отриманий дозвіл від федеральних властей США на вирощування і комерційне використання трансгенних рослин рапсу із зміненим складом рослинної олії, що включає разом із звичайними 16- і 18-членними жирними кислотами також і до 45% 12-членних жирних кислот, - лаурата. Ця речовина широко використовується для виробництва пральних порошків, шампунів, косметики.

Експериментальна робота полягала в тому, що був клонований ген специфічної тіоестерази з рослини *Umbellularia californica*, де вміст лаурата в жирі насіння досягав 70%. Структурна частка гена цього ферменту під контролем промотора-термінатора гена білка, специфічного для ранньої стадії утравлення насіння, була вбудована в геном рапсу і арабідопсису, що і призвело до збільшення вмісту лаурата в маслі цих рослин.

З інших проектів, пов'язаних із зміною складу жирних кислот, можна згадати роботи, що ставлять за мету підвищення або зниження вмісту ненасичених жирних кислот в рослинній олії. Інтересними представляються експерименти з петрозеліновою кислотою — ізомером олеїнової кислоти, де подвійний зв'язок знаходиться за шостим вуглецевим членом. Ця жирна кислота входить до складу масла коріандру і визначає його вищу температуру плавлення (33°C), тоді як за наявності олеїнової кислоти температура плавлення складає тільки 12°C. Передбачається, що після перенесення генів, які визначають синтез петрозелінової кислоти в рослини-продуценти, олії зможуть виробляти дієтичний маргарин, що міститиме ненасичені жирні кислоти. Крім того, з петрозелінової кислоти дуже легко отримувати лаурат шляхом окислення озоном. Подальше вивчення специфіки біохімічного синтезу жирних кислот, ймовірно, приведе до можливості управляти цим синтезом з метою отримання жирних кислот різної довжини і різного ступеня насичення, що дозволить значно змінити виробництво детергентів, косметики, кондитерських виробів, затверджувачів, змащувальних матеріалів, ліків, полімерів, дизельного палива і багато чого іншого, що зв'язане з використанням вуглеводневої сировини.

Полісахариди

Проводиться робота із створення трансгенних рослин картоплі та інших культур, що здатні накопичувати крохмаль, в яких ця речовина знаходитиметься в основному у вигляді амілопектину, тобто розгалуженій формі крохмалю, або ж в основному тільки у вигляді амілози, тобто лінійних

форм крохмалю. Розчин амілопектину у воді рідший і прозоріший, чим у амілози, яка при взаємодії з водою утворює ригідний гель. Так, наприклад, крохмаль, що складається в основному з амілопектину, мабуть, матиме попит на ринку виробників різних живильних сумішей, де зараз як наповнювач використовується модифікований крохмаль. Генетичній модифікації можуть піддаватися також геноми пластид і мітохондрій. Такі системи дозволяють значно збільшити вміст продукту в трансгенному матеріалі.

Створення стійких до гербіцидів рослин

У нових, інтенсивних сільськогосподарських технологіях гербіциди застосовуються дуже широко. Це пов'язано з тим, що на зміну колишнім екологічно небезпечним гербіцидам широкого спектру дії, які є токсичними для ссавців і тривало зберігається в зовнішньому середовищі, приходять нові, досконаліші і безпечніші з'єднання. Проте вони мають недолік — пригнічують росту не лише бур'янів, але і культурних рослин. Такі високоефективні гербіциди, як, гліфосат, атразини інтенсивно вивчаються на предмет виявлення механізму толерантності до них деяких бур'янів. Так, на полях, де широко використовують атразин, досить часто з'являються атразиностійкі біотики у багатьох видів рослин.

Вивчення механізму стійкості до гербіцидів з метою отримання методами генетичної інженерії культурних рослин, яким властива ця ознака, включає наступні етапи: виявлення біохімічних мішеней дії гербіцидів в рослинній клітині, відбір стійких до даного гербіциду організмів як джерела генів стійкості, клонування цих генів, введення їх в культурні рослини і вивчення їх функціонування

Існують чотири принципово різних механізми, які можуть забезпечувати стійкість до тих або інших хімічних сполук, включаючи гербіциди: транспортний, елімінуючий, регуляторний і контактний. Транспортний механізм стійкості полягає в неможливості проникнення

гербіциду в клітину. При дії елімінуючого механізму стійкості речовини, клітини, що потрапили всередину, можуть руйнуватися за допомогою індукованих клітинних чинників, найчастіше деградуючих ферментів, а також піддаватися тому або іншому виду модифікації, утворюючи неактивні нешкідливі для клітини продукти. При резистентності регуляції білок або фермент клітини, який інактивується під дією гербіциду, починає посилено синтезуватися, ліквідовуючи таким чином дефіцит потрібного метаболіту в клітині. Контактний механізм стійкості забезпечується зміною структури мішені (білок або фермент), взаємодією з яким пов'язана пошкоджуюча дія гербіциду

Встановлено, що ознака стійкості до гербіцидів є моногенною, тобто ознака детермінується найчастіше одним-єдиним геном. Це дуже полегшує можливість використання технології рекомбінантної ДНК для передачі цієї ознаки. Гени, що кодують ті або інші ферменти деструкції і модифікації гербіцидів, можуть бути з успіхом використані для створення стійких до гербіцидів рослин методами генетичної інженерії.

Традиційні методи селекції створення сортів, стійких до гербіцидів, дуже, тривалі і малорезультативні. Найбільш широко вживаний за кордоном гербіцид глифосат (комерційна назва Roundup) пригнічує синтез найважливіших ароматичних амінокислот, впливаючи на фермент 5-енолпірувілшкімат-3-фосфатсинтазу (Епшф-синтаза). Відомі випадки стійкості до цього гербіциду пов'язані або з підвищенням рівня синтезу цього ферменту (механізм регуляції), або з виникненням ферменту мутанта, нечутливого до глифосфату (контактний механізм). Із стійких до глифосфату рослин був виділений ген Епшф-синтази і поставлений під промотор вірусу мозаїки цвітної капусти. За допомогою Ті-плазмід ця генетична конструкція була введена в клітини петунії. За наявності однієї копії гена в рослинах, регенерованих з трансформованих клітин, синтезувалося ферменту в 20-40

разів більше, ніж в початкових рослинах, але стійкість до глифосфату збільшилася тільки в 10 разів.

До найбільш поширених гербіцидів, які використовувались при обробці зернових культур, відноситься атразин. Він пригнічує фотосинтез, зв'язуючись з одним з білків фотосистеми II і припиняючи транспорт електронів. Стійкість до гербіциду виникає в результаті точкових мутацій в цьому пластохінон зв'язуючому білку (заміна серина на гліцин), унаслідок чого він втрачає здатність взаємодіяти з гербіцидом. У ряді випадків вдалося здійснити перенесення гена білка мутанта в чутливих до атразину рослин за допомогою Ti-плазмиди. Інтегрований в хромосому рослин ген стійкості був забезпечений сигнальною послідовністю, яка забезпечувала транспорт білка, що синтезувався, в хлоропласти. Химерні рослини проявляли значну стійкість до таких концентрацій атразина, які викликали загибель контрольних рослин з геном білка дикого типу. Деякі рослини здатні інактивувати атразин шляхом відщеплювання залишку хлора ферментом глутатіон-S-трансферазою. Цей же фермент інактивує інші споріднені гербіциди триазинового ряду (пропазин, симазин та ін.).

Існують рослини, природна стійкість яких до гербіцидів заснована на детоксикації. Так, стійкість рослин до хлорсульфурону може бути пов'язана з дезактивацією молекули гербіциду шляхом його гідроксилування і подальшого глікозилювання введеної гідроксильної групи. Стійкість рослин до тих або інших патогенів, найчастіше, є складною мультигенною ознакою.

Одночасна передача декількох локусів важка навіть, за умови використання методів генної інженерії, не кажучи про класичні методи селекції. Простішим є інший шлях. Відомо, що у стійких рослин при атаці патогенів змінюється метаболізм. Накопичуються такі з'єднання, як H_2O_2 , саліцилова кислота, фітоалексини. Підвищений рівень цих з'єднань сприяє протистоянню рослини в боротьбі з патогенами.

Ось один з прикладів, що доводить роль саліцилової кислоти в імунній відповіді рослин. Трансгенні рослини тютюну, які містять бактеріальний ген, що контролює синтез саліцилат гідролази (цей фермент руйнує саліцилову кислоту), були нездатні до імунної відповіді. Тому зміна генно-інженерним шляхом рівня саліцилової кислоти або вироблення в рослинах у відповідь на патоген H_2O_2 може бути перспективним для створення стійких трансгенних рослин.

У фітовірусології широко відомий феномен індукованої перехресної стійкості рослин до вірусних інфекцій. Суть цього явища полягає в тому, що зараження рослини одним штамом вірусу запобігає подальшій їх інфекції іншим вірусним штамом. Молекулярний механізм придушення вірусної інфекції поки нез'ясовано. Показано, що для імунізації рослин достатньо введення окремих вірусних генів, наприклад генів капсидних білків. Так, ген білка оболонки вірусу тютюнової мозаїки перенесли в клітини тютюну і отримали трансгенні рослини, у яких 0,1% всіх білків листя було представлено вірусним білком. Значна частина цих рослин при інфікуванні вірусом не проявляла ніяких симптомів захворювання. Ймовірно, білок оболонки вірусу, яка синтезується в клітинах, заважає вірусній РНК нормально функціонувати і формувати повноцінні вірусні частки.

Встановлено, що експресія капсидного білка вірусу тютюнової мозаїки, вірусу мозаїки люцерни, вірусу огіркової мозаїки, Х-вірусу картоплі у відповідних трансгенних рослинах (тютюн, томати, картопля, огірки, перці) забезпечує високий рівень їх захисту від подальшої вірусної інфекції. Причому у трансформованих рослин не спотерігалось зниження фертильності, небажаної зміни ростових і фізіологічних характеристик початкових екземплярів і їх потомства. Вважають, що індукована стійкість рослин до вірусів обумовлена особливим антивірусним білком, дуже схожим на інтерферон тварин. Представляється можливим методом генетичної

інженерії підсилити експресію гена, який кодує цей білок, шляхом його ампліфікації або підстановки під сильніший промотор.

Слід зазначити, що використання генетичної інженерії для захисту рослин від різних патогенних мікроорганізмів значною мірою стримується недостатністю знань про механізми захисних реакцій рослин. Для боротьби з комахами-шкідниками в рослинництві використовуються хімічні засоби — інсектициди. Проте вони шкідливо впливають на ссавців, вбивають також і корисних комах, забруднюють навколишнє середовище, і крім того, комахи досить скоро пристосовуються до них. Відомо більше 400 видів комах, стійких до інсектицидів, що використовуються на теперішній час. Тому всю більшу увагу привертають біологічні засоби боротьби, що забезпечують чітку вибірковість дії і відсутність адаптації шкідників до кожного конкретного біопестициду.

Вже досить давно відома бактерія *Bacillus thuringiensis*, яка продукує білок, що є дуже токсичним для багатьох видів комах, в той же час безпечним для ссавців. Білок (дельта-ендотоксин, CRY-белок) продукується різними штамми *B. thuringiensis*. Взаємодія токсину з рецепторами строго специфічно, що ускладнює підбір комбінації токсин-комаха. У природі знайдена велика кількість штамів *B. thuringiensis*, чиї токсини діють тільки на певні види комах. Препарати *B. thuringiensis* протягом десятиліть використовували для контролю комах на полях. Безпека токсину і його складових білків для людини і інших ссавців повністю доведена. Вбудовування гена цього білка в геном рослин дає можливість отримати трансгенні рослини, які не їдять комах.

Окрім видоспецифічності щодо дії на комах, вбудовування прокаріотичних генів дельта-токсинів в геном рослин навіть під контролем еукаріотичних промоторів не призвело до високого рівня експресії. Припускають, що таке явище виникло у зв'язку з тим, що ці бактеріальні гени містять значно більше аденінових і тимінових нуклеотидних підстав, ніж

рослинна ДНК. Ця проблема була вирішена шляхом створення модифікованих генів, де з природного гена вирізали і додавали ті або інші фрагменти зі збереженням доменів, які кодують активні частки дельта-токсину. Так, наприклад, за допомогою таких підходів була отримана картопля, стійка до колорадського жука. Отримані трансгенні рослини тютюну, здатні синтезувати токсин. Такі рослини були нечутливі до гусениць *Manduca sexta*. Останні гинули протягом 3 діб контакту з токсинпродукуючими рослинами. Токсинування і обумовлена ним стійкість до комах передавалась у спадок як домінуюча ознака.

В даний час так звані Bt-растения (від *B. thuringiensis*) бавовни і кукурудзи займають основну частину в спільному об'ємі генетично модифікованих рослин цих культур, які вирощують на полях США.

У зв'язку з можливостями генної інженерії конструювати ентомопатогенні рослини на основі токсину мікробного походження, ще більший інтерес до себе викликають токсини рослинного походження. Фітотоксини є інгібіторами білкового синтезу і здійснюють захисну функцію, направлену проти комах-шкідників, мікроорганізмів і вірусів. Краще за всіх серед них вивчена рицина, що синтезується в рицині: його ген клонований і встановлена нуклеотидна послідовність. Проте висока токсичність рицини для ссавців обмежує генноінженерні роботи з ним тільки технічними культурами, що не використовуються в їжу людині і на корм тваринам. Токсин, що виробляється фітолаккою американською, ефективний проти вірусів і нешкідливий для тварин. Механізм його дії полягає в інактивації власних рибосом при проникненні в клітини різного роду патогенів, у тому числі фітовірусів. Уражені клітини некротизуються, запобігаючи розмноженню патогена і його поширенню по рослині. В даний час проводяться дослідження по вивченню гена цього білка і передачі його в інші рослини.

Для боротьби з комахами-шкідниками можна використовувати їх природні віруси, препарати яких називають вірусними пестицидами. На відміну від отрутохімікатів вони володіють вузьким спектром дії, не вбивають корисних комах, вони швидко руйнуються в зовнішньому середовищі і безпечні для рослин і тварин. Поряд з вірусами комах використовуються як біопестициди деякі гриби, що знешкоджують комах-шкідників. Біопестициди, які зараз використовують, є природними штамми ентомопатогенних вірусів і грибів, проте не виключене створення в майбутньому методами генетичної інженерії нових ефективних біопестицидів.

Підвищення стійкості рослин до стресових умов

Рослини дуже часто піддаються дії різних несприятливих чинників навколишнього середовища: високі і низькі температури, нестача вологи, засолення ґрунтів і загазованість середовища, нестача або, навпаки, надлишок деяких мінеральних речовин і так далі. Цих чинників безліч, тому і способи захисту від них різноманітні — від фізіологічних властивостей до структурних пристосувань, які дозволяють долати їх шкідливий вплив.

Стійкість рослин до того або іншого стресового чинника є результатом дії безлічі різних генів, тому говорити про повну передачу ознак толерантності від одного виду рослини іншому генноінженерними методами не доводиться. Проте у генна інженерія робить можливою підвищення стійкості рослин. Це стосується роботи з окремими генами, які контролюють метаболічні відповіді рослин на стресові умови, наприклад надпродукцію проліну у відповідь на осмотичний шок чи дію засолення, синтез особливих білків у відповідь на тепловий шок. Подальше поглиблене вивчення фізіологічної, біохімічної і генетичної основи у відповідь реакції рослини на умови середовища, поза сумнівом, дозволить застосовувати методи генетичної інженерії для конструювання стійких рослин.

Насьогодні можна відзначити лише непрямий підхід для отримання морозостійких рослин, заснований на генноінженерних маніпуляціях з *Pseudomonas syringae*. Цей мікроорганізм, що співіснує з рослинами, підсилює їх чутливість при ранніх заморозках. Механізм явища пов'язаний з тим, що клітини мікроорганізму синтезують особливий білок, який локалізується в зовнішній мембрані і є центром кристалізації льоду. Відомо, що формування льоду у воді залежить від речовин, які можуть слугувати центрами утворення льоду. Білок, що викликає формування кристалів льоду в різних частинах рослини (листя, стебла, коріння), є одним з головних чинників, відповідальних за пошкодження тканин рослин, чутливих до ранніх заморозків. Багаточисельні експерименти в суворо контрольованих умовах показали, що стерильні рослини не ушкоджувалися заморзками аж до -6 -8° C, тоді як у рослин, які мають відповідну мікрофлору, пошкодження виникали вже при $-1,5$ -2° C. Мутанти цих бактерій, що втратили здатність синтезувати білок, що викликає формування кристалів льоду, не підвищували температуру утворення льоду, і рослини з такою мікрофлорою були стійкі до низьких температур. Штам таких бактерій, розпорошений над бульбами картоплі, конкурував із звичайними бактеріями, що приводило до підвищення морозостійкості рослин. Можливо, такі бактерії, створені за допомогою методів генної інженерії і використовувані як компонент зовнішнього середовища, слугуватимуть для боротьби з чутливістю до заморозків.

Підвищення ефективності біологічної азотфіксації

Добре вивчено фермент відповідальний за відновлення молекулярного азоту до амоніа — нітрогеназу. Структура нітрогенази однакова у всіх азотфіксуючих організмів. При фіксації азоту неодмінною фізіологічною умовою є захист нітрогенази від руйнування під дією кисню. Краще за всіх серед азотфіксаторів вивчені ризобії, які утворюють симбіоз з бобовими рослинами, і вільноживуча бактерія *Klebsiella pneumoniae*. Встановлено, що у

цих бактерій за фіксацію азоту відповідальні 17 генів — так званих *nif*-генов. Всі ці гени зчеплені один з одним і розташовані в хромосомі між генами ферментів біосинтезу гістидину і генами, які відповідають за засвоєння шикімової кислоти. У швидкорослої ризобії *nif*-гени існують у формі мегаплазмід, що містить 200—300 тисяч пар нуклеотидов.

Серед генів азотфіксації виявлені гени, які контролюють структуру нітрогенази, білковий чинник, що бере участь в транспорті електронів, гени регулювальників. Регуляція генів азотфіксації досить складна, тому генноінжеукариотынерне перенесення азотфіксируючої функції від бактерій безпосередньо вищим рослинам в даний час вже не обговорюється. Як показали експерименти, навіть в найпростішому еукаріотичному організмі — дріжджах, не вдалось досягти експресії *nif*-генів, хоча вони і зберігалися протягом 50 генерацій.

Ці дослідження показали, що діазотрофність (азот-фіксація) властива виключно прокаріотичним організмам, і *nif*-гени не змогли здолати бар'єр, який розділяє прокаріоти і еукаріоти, через дуже складну структуру і регуляцію генами, розташованими поза *nif*-області. Можливо, вдалішим виявиться перенесення *nif*-генов за допомогою *Ti*-плазмід в хлоропласти, оскільки механізми експресії генів в хлоропластах і в клітинах прокаріот близькі. У будь-якому випадку нітрогеназа має бути захищена від інгібіторної дії кисню. Крім того, фіксація атмосферного азоту — дуже енергоємний процес. Навряд чи рослина під впливом *nif*-генів може так кардинально змінити свій метаболізм, щоб створити всі ці умови. Хоча не виключено, що в майбутньому методами генетичної інженерії можна буде створити більш економно працюючий нітрогеназний комплекс.

Реальніше використання генноінженерних методів для вирішення наступних завдань: підвищення здатності ризобії колонізувати бобові рослини, підвищення ефективності фіксації і асиміляції азоту шляхом дії на генетичний механізм, створення нових азотфіксуючих мікроорганізмів

шляхом введення в них піф-генів, передача здатності до симбіозу від бобових рослин до інших.

Першочерговим завданням генетичної інженерії для підвищення ефективності біологічної фіксації азоту є створення штамів ризобії з посиленою азотфіксацією і колонізуючою здатністю. Колонізація бобових рослин ризобіями протікає дуже повільно, лише одиничні з них дають початок бульбам. Це відбувається тому, що місцем інвазії ризобії є тільки одна невелика ділянка між точкою росту кореня і найближчим до неї кореневим волоском, який знаходиться на стадії формування. Решта всіх частин кореня і розвинутих кореневих волосків рослини нечутлива до колонізації. Бульби, що у ряді випадків сформувалися, виявляються нездатними фіксувати азот, що залежить від багатьох рослинних генів (виявлено не менше п'яти), зокрема від несприятливого поєднання двох рецесивних генів.

Традиційними методами генетики і селекції вдалося отримати лабораторні штами ризобій з вищою колонізуючою здатністю. Але вони в польових умовах не витримують конкуренцію з боку місцевих штамів. Підвищення їх конкурентноспроможності, ймовірно, можна здійснити генноінженерними методами. Підвищення ефективності процесу азотфіксації можливо використанням генноінженерних прийомів, заснованих на збільшенні копій гена, посиленні транскрипції тих генів, продукти яких утворюють «вузьке» місце в каскадному механізмі азотфіксації, шляхом введення сильніших промоторів, тощо. Важливе підвищення коефіцієнта корисної дії самої нітрогеназної системи, що здійснює безпосереднє відновлення молекулярного азоту в аміак.

Підвищення ефективності фотосинтезу

C4-рослини характеризуються високими темпами росту і швидкістю фотосинтезу, у них практично відсутнє видиме фотодихання. У більшості

сільськогосподарських культур, що відносяться до С3-рослин, висока інтенсивність фотодихання. Фотосинтез і фотодихання — тісно пов'язані процеси, в основі яких лежить біфункціональна активність одного і того ж ключового ферменту — рибулозобисфосфат-карбоксилази (РУБФК). РУБФ-карбоксилаза може приєднувати не лише CO_2 , але і O_2 , тобто здійснює реакції карбоксилювання і оксигенування. При оксигенуванні РУБФ утворюється фосфогліколат, який служить основним субстратом фотодихання — процесу вивільнення CO_2 на світлі, внаслідок чого втрачається частка фотосинтетичних продуктів. Зниження у С4-рослин пояснюється не відсутністю ферментів гліколатного шляху, а обмеженням оксигеназної реакції, а також реасимиляцією CO_2 фотодихання.

Одним із завдань, що стоять перед генетичною інженерією, є дослідження можливості створення РУБФК з переважаючою карбоксилазною активністю.

Отримання рослин з новими властивостями

Останніми роками вчені використовують новий підхід для отримання трансгенних рослин з "Antisense RNA" (оберненою або антисмисловою РНК), який дозволяє управляти роботою вибраного гена. В цьому випадку при конструюванні вектора копію ДНК (к-ДНК) вбудовуваного гена перевертають на 180° . В результаті в трансгенній рослині утворюється нормальна молекула мРНК і обернена, яка через комплементарність до нормальної мРНК утворює з нею комплекс і закодований білок не синтезується.

Такий підхід використаний для отримання трансгенних рослин томатів з вищою якістю плодів. Вектор включав К-ДНК гена PG, який контролює синтез полігалактуронази, - ферменту, що бере участь в руйнуванні пектину, основного компоненту міжклітинного простору рослинних тканин. Продукт гена PG синтезується в період дозрівання плодів томатів, а збільшення його

кількості приводить до того, що томати стають м'якішими, що значно скорочує термін їх зберігання. Відключення цього гена в трансгенах дозволило отримати рослини томатів з новими властивостями плодів, які не лише значно довше зберігалися, але і самі рослини були стійкіші до грибкових захворювань.

Цей же підхід можна застосувати для регулювання термінів дозрівання томатів, а як мішень в такому випадку використовують ген EFE (ethylene-forming enzyme), продуктом якого є фермент, що бере участь в біосинтезі етилену. Етилен - це газоподібний гормон, однією з функцій якого є контроль за процесом дозрівання плодів.

Стратегія антисмислових конструкцій широко застосовна для модифікації експресії генів. Ця стратегія використовується не лише для отримання рослин з новими якостями, але і для фундаментальних досліджень в генетиці рослин. Слід згадати ще про один напрям в генній інженерії рослин, який до недавнього часу в основному використовували у фундаментальних дослідженнях - для вивчення ролі гормонів в розвитку рослин. Суть експериментів полягала в отриманні трансгенних рослин з комбінацією певних бактеріальних гормональних генів, наприклад тільки *iaaM* або *ipt*, тощо. Ці експерименти зробили істотний внесок на доказ ролі ауксинів і цитокінінів в диференціюванні рослин.

Останніми роками цей підхід почали застосовувати у практичній селекції. Виявилось, що плоди трансгенних рослин з геном *iaaM*, який знаходиться біля промотора гена *Def* (ген, що експресується тільки в плодах), є партенокарпічними, тобто такі, які сформувалися без запилення/запліднення. Партенокарпічні плоди характеризуються або повною відсутністю насіння, або дуже невеликою його кількістю, що дозволяє вирішити проблему "зайвих кісточок", наприклад в кавуні, цитрусових, тощо. Вже отримані трансгенні рослини кабачків, які в цілому не відрізняються від контрольних, але практично не містять насіння.

Обеззброєну, позбавлену онкогенів Ті-плазмиду вчені активно використовують для отримання мутацій. Цей метод носить назву Т-ДНК-ІНСЕРЦІЙНОГО мутагенезу. Т-ДНК, вбудовуючись в геном рослини, вимикає ген, в який вона вбудувалася, і при втраті функції можна легко відбирати мутанти (явище сайленсингу – замовкання генів). Цей метод чудовий також тим, що дозволяє відразу виявити і клонувати відповідний ген. Останнім часом таким способом отримано безліч нових мутацій рослин, а відповідні гени клоновані. М. А. Раменською на основі Т-ДНК мутагенезу отримані рослини томатів з неспецифічною стійкістю до фітофторозу.

Не менш цікавий і інший аспект робіт - отримані трансгенні рослини із зміненими декоративними властивостями. Один з прикладів - це отримання рослин петунії з різнокольоровими квітками. На черзі блакитні троянди з геном, контролюючим синтез блакитного пігменту, клонованим з дельфініума.

Генну терапію (ГТ) визначають як сукупність підходів, спрямованих на корекцію захворювання шляхом введення в клітину-мішень функціонального гена, який експресується. Основною метою ГТ є відновлення послідовності, заміни гена або забезпечення синтезу терапевтичних білків.

Для переносу генів з метою корекції дефекту використовують декілька підходів, найбільш популярними з яких є *ex vivo* та *in vivo*. У першому випадку проводять трансфекцію видалених з організму пацієнта клітин та наступне повернення їх назад до організму. Цей підхід є досить складною процедурою. А перелік клітин організму, які використовують в цьому підході, обмежений клітинами, які здатні до активної проліферації *in vitro*. Певні переваги цього підходу пов'язані з можливістю контролю ефективності генетичної трансформації клітин перед їхньою імплантацією пацієнту.

Стратегія доставки генів *in vivo* забезпечується при безпосередньому введенні генетичного вектора у тканини або кровообіг організму. Нещодавно

було запропоновано також *in utero* стратегія переносу генів, яка передбачається для лікування та/або попередження спадкових захворювань, наслідки яких можуть бути катастрофічні вже у дитинстві. Дозвіл на таке втручання дано у 1998 році в США Комітетом по рекомбінантним молекулам.

Перше клінічне дослідження з генно-терапевтичної корекції захворювання було здійснено у 1990 р. з використанням ретровірусного вектора. З того часу і до 2008 р. їх провели більше 1340. Більшість з них проводилась з метою корекції різних форм раку (66,5%), серцево-судинних (9%), моногенних (8,2%), інфекційних (6,6%) та нейрологічних (1,3%) захворювань. Найбільші успіхи з ГТ було одержано для лікування різних форм злоякісних пухлин. Так, для їх лікування у 2003 році було схвалено в Китаї перший генно-терапевтичний препарат - «Gendicine» (SiBiono Genetech, Китай), що представляє собою рекомбінантний аденовірусний вектор, що містить ген *p53* людини.

Крім того, починаючи з 1990 р. проведено 24 клінічних досліджень III фази (остання фаза клінічних досліджень) для лікування різних форм злоякісних пухлин. Серед інших захворювань, для яких вже проводились клінічні дослідження III фази - синдром набутого імунodefіциту (6 клінічних досліджень), серцево-судинні захворювання 4 клінічні дослідження). Проте, за даними The Journal of Gene Medicine лише невеликій кількості розробок вдалося успішно подолати навіть першу фазу клінічних досліджень. Першопричиною цього є недоліки генетичних векторів, які використовуються для доставки терапевтичних генів до клітин організму. А саме, низька ефективність трансфекції клітин людини вірусними та невірусними векторами, наявність у пацієнтів нейтралізуючих антитіл проти вірусних векторів, індукція імунної відповіді у пацієнтів проти білків рекомбінантного вірусу або трансгена, що експресується і як наслідок недостатній для досягнення терапевтичного ефекту та нетривалий рівень експресії трансгена у випадку ГТ *in vivo*; низька кількість трансфікованих клітин, що приживається у організмі (0,1-2%) за даними клінічних

досліджень лікування зчепленого зі статтю важкого комбінованого імунodefіциту, небезпечність розвитку викликаних інсерційним мутагенезом злоякісних пухлин у випадку ГТ *ex vivo*.

Так, у 1999 р. помер пацієнт з дефіцитом орнітин транскарбомілази після введення рАД, а у чотирьох з одинадцяти пацієнтів, яких лікували від зчепленого зі статтю важкого комбінованого імунodefіциту введенням трансфікованих рекомбінантними ретровірусними векторами клітинами кісткового мозку, через три роки після лікування розвинулась лейкеміє-подібна лімфобластома. Невдачі ГТ зобов'язали дослідників ретельніше вивчати механізми переносу генів в організми та створювати більш безпечні вектори.

Для подолання недоліків існуючих векторів та засобів доставки в ГТ перспективним вважається зміна капсидів рекомбінантних вірусних векторів (псевдотипування та ін.), використання нових більш перспективних невірусних носіїв (PEI, модифікований різними лігандами полі-L-лізин та ін.), введення до складу рекомбінантної ДНК інсуляторів, локус-контролюючих (LCR) чи матрикс-зв'язуючих (MAR) послідовностей, а також елементів, що забезпечують сайт-специфічну інтеграцію трансгена у геном клітини.

Перенос генів *in vivo* за допомогою плазмідних векторів

При необхідності синтезу всередині клітини терапевтичних білків трансген, крім частини, що кодує цільовий пептид, повинен також містити елементи регуляції транскрипції та трансляції, таким чином, у більшості випадків, він має розміри у декілька тисяч пар нуклеотидів. Найбільш поширеним шляхом перенесення генів *in vivo* у клітини є створення векторних молекул, що містять цільові гени під контролем всіх необхідних регуляторних елементів, хоча існують і інші підходи: наприклад введення фрагментів отриманих шляхом ПЛР.

До плазмідних векторів для ГТ *in vivo* висувається ряд вимог, зокрема: здатність забезпечувати високий рівень та стабільний характер експресії цільових генів; висока ефективність трансфекції; неінтеграція у

хромосомальну ДНК клітини або високоефективна сайт-специфічна інтеграція; відсутність трансформуючого потенціалу. Для конструювання експресуючих векторів звичайно використовують рекомбінантні плазмиди, що здатні до автономної реплікації в бактеріальних клітинах.

У досліджах на тваринах було показано, що внутрішньовенне введення «голої» ДНК призводить або до відсутності експресії трансгена або до незначного її рівня. При введенні «голої» ДНК ін'єкцією у м'язи експресія трансгена спостерігалась впродовж 15-27 днів, хоча інші дослідники спостерігали її більш тривало - до 19 місяців. Слід зазначити, що ін'єкція у м'язи «голої» плазмідної ДНК активно використовується як метод введення ДНК вакцин для отримання імунної відповіді на продукт експресії трансгена.

За весь час плазмідна ДНК використовувалась без носіїв у 17,8% (246 клінічних досліджень) та у комплексі з ліпосомами - у 7,4% (102 дослідження) клінічних дослідженнях з ГТ. Це дослідження з ГТ муковісцидозу, дефіциту α -1 hAAT, міодистрофії Дюшена, захворювання коронарних артерій, захворювання периферійних артерій, гемофілії А та Б, лікування різних типів злоякісних пухлин та інші. З них три дослідження (з лікування захворювання периферійних артерій та два - злоякісних пухлин) було проведено на III фазі клінічних досліджень. Перевагами використання рекомбінантних плазмід є безпечність порівняно з рекомбінантними вірусними векторами, відсутність токсичності, значно менша вартість їх отримання, висока копійність, зручність роботи.

Регуляторні елементи рекомбінантних плазмід, які забезпечують реплікацію плазмід у клітинах. Плазмиди - це позахромосомні дволанцюгові кільцеві молекули ДНК, що здатні до автономної реплікації в клітинах прокаріотів. Клонування плазмідних ДНК в клітинах тварин обмежено високою вартістю та малою ефективністю процедури, тому плазмідні вектори використовують для експресії в клітинах тварин, а сам процес їх клонування проводять у бактеріях.

Переважає більшість рекомбінантних плазмід, що використовуються для експресії білків *in vivo*, містять регуляторні елементи, які забезпечують

стабільну їх реплікацію в клітинах *E. coli* (ori) та гени селективних генетичних маркерів, а також послідовності, що відповідають за забезпечення експресії трансгена в клітинах еукаріот та інші функції (експресуюча касета). Максимальний розмір фрагмента ДНК для клонування у плазмідах обмежений 10-15 тис.п.н. Плазмідні вектори, для експресії рекомбінантних білків в клітинах ссавців *in vivo* пропонують такі фірми, як GE Healthcare (США), Promega США), Stratagene (США), Sigma-Aldrich (США), Clontech (США), Invitrogen США), InvivoGen (США) та ін.

Основною проблемою для використання *in vivo* плазмід, реплікативно-активних у клітинах еукаріот, є необхідність наявності транс-діючих факторів, які, в свою чергу, підвищують ризик трансформації клітин. Особливо це стосується векторів, що базуються на системі реплікації вірусу SV40. Транс-діючим фактором системи реплікації SV40 є великий Т-антиген, що здатний опосередковано викликати хромосомальні аберації чи впливати на експресію генів клітини через втручання у роботу клітинних транскрипційних факторів. Інша річ плазмідні вектори створені на базі вірусу Епштейна-Бар (EBV). Так, транс-діючий фактор - білок ядерного антигену 1 EBV (EBNA-1) не володіє трансформуючою здатністю. Було показано, що вектори на основі EBV здатні до стабільної реплікації у печінці.

З іншого боку, дослідження *in vitro* виявили здатність EBNA-1 зв'язуватись з мРНК клітин, що може впливати на рівень синтезу білків в клітині на посттранскрипційному етапі та функціональну подібність сайту реплікації EBV до енхансеру гена *c-myc*, що є протоонкогеном. На даний момент для експресії трансгенів *in vivo* серед реплікативно-активних векторів використовують лише плазмідні створені на основі EBV.

Оскільки однією з рекомендацій до препаратів, які проходять клінічні дослідження, є виключення із складу вектора генів резистентності до антибіотиків, а також наявні відомості про те, що велика за розміром частина плазмідного вектора, яка відповідає за реплікацію у прокаріотах, здатна репресувати експресію трансгена призвели до конструювання нових типів плазмідних векторів (плазмідні *pCOR*-серії та «мінікільця»).

Було запропоновано схему плазмідного вектора, що містить мінімальну послідовність регуляторних елементів, які забезпечують стабільну реплікацію в клітинах *E. coli*. Вектори *pCOR*-серії містять три бактеріальні елементи: *ori* γ плазмиди R6K (400 п.н.), ген супресор тРНК (*sup Phe*) (200 п.н.) та *ser* фрагмент 400 п.н.) з плазмиди *E. coli colE1*. Для ампліфікації цей вектор потребує штаму *E.coli* ХАС-1pir116, який містить у своєму геномі ген *pir116* та несе амбер-мутацію (Tyr->Phe) в гені *argE*, продукт якого приймає участь у біосинтезі аргініну. Ген *pir116* кодує ініціаторний білок R6K п, який необхідний для функціонування *ori* γ , а ген *sup Phe*, який знаходиться у плазміді, забезпечує синтез продукту з *argE* гена клітини. Цей вектор є низькокопійним у *E.coli*, однак за останні роки копійність вдалось підвищити у 3-5 разів. Вектори серії *pCOR* було використано для експресії гена люциферази у мишей, гена фактору росту фібробластів у м'язах серця кролів, гена β -галактозидази у м'язах миші та ін.

Альтернативним підходом зменшення розміру елементів плазмідних векторів є створення мінікільцевих рекомбінантних ДНК, що містять лише експресуючу касету. Такі «мінікільця» ДНК можна отримати шляхом сайт-специфічної рекомбінації між *attP* та *attB* послідовностями плазмід, що забезпечується інтеграцією бактеріофага λ в клітинах *E.coli* штаму D1210НР. Показано, що «мінікільцева» ДНК забезпечує вищий рівень експресії трансгена порівняно із звичайною плазмідною. Недоліком є складність одержання вектора, адже рекомбінація відбувається *in vivo* у клітинах *E.coli*, крім того «мінікільця» ДНК необхідно очищувати від «мініплазмиди» (рис. 11), це збільшує вартість виробництва вектора.

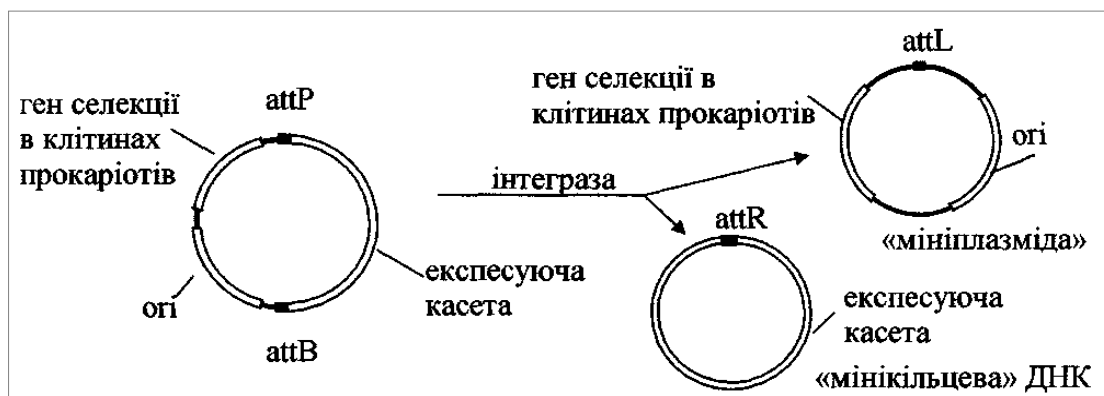


Рис. 11. Схема формування «мінікільцевої» ДНК при сайт-специфічній рекомбінації між сайтами attB та attP за допомогою інтегрази бактеріофага λ *E.coli*

Регуляторні елементи рекомбінантних плазмід, які забезпечують транспорт до ядра. Дослідження свідчать, що плазміда, яка була ін'єктована у ядро клітин, ефективно експресується на відміну від введеної у цитоплазму (лише 0,1% «голої» ДНК або 1% плазмиди у комплексі з носієм досягають ядра). Покращення транспорту плазмідної ДНК до ядра можливо досягнути введенням до вектора енхансеру SV40. Ефект даної послідовності на локалізацію вектора у клітині продемонстровано як в експериментах *in vitro* в різноманітних типах клітин, включаючи епітеліальні, ендотеліальні та клітини гладких м'язів різних організмів, так і *in vivo*.

Вважається, що серед транскрипційних факторів, які зв'язуються з послідовністю енхансеру, деякі містять послідовності ядерної локалізації та здійснюють транспорт вектора до ядра. З іншого боку, інші вірусні та клітинні промотори/енхансери, які також містять багаточисельні сайти зв'язування транскрипційних факторів, не виявляють такої здатності. Варто зазначити, що широкого використання цей метод не набув.

Будова експресуючої касети векторів для ГТ. При використанні рекомбінантних плазмідних векторів однією з основних частин вектора є експресуюча касета. Будова експресуючої касети однакова для плазмідних та рекомбінантних вірусних векторів.

Елементи, які забезпечують стабільне існування вектора в епісомальному чи інтегрованому стані в клітинах ссавців. Питання тривалої експресії трансгенів намагаються вирішити введенням до експресуючої касети таких послідовностей, як інсулятори, LCR чи MAR, або послідовності, які забезпечують інтеграцію експресуючої касети у геном. Для цього у геном клітин *in vivo* запропоновано систему на основі транспозону «Sleeping beauty». Ця система створена на основі не активного Tc1-подібного мобільного елемента риб. Вона складається із двох компонентів, що

знаходяться у різних плазмідах (рис. 12): експресуючої касети, фланкованої інвертованими повторами, та транспозази. Транспозаза для цього була реконструйована з консенсусних послідовностей декількох неактивних мобільних елементів.

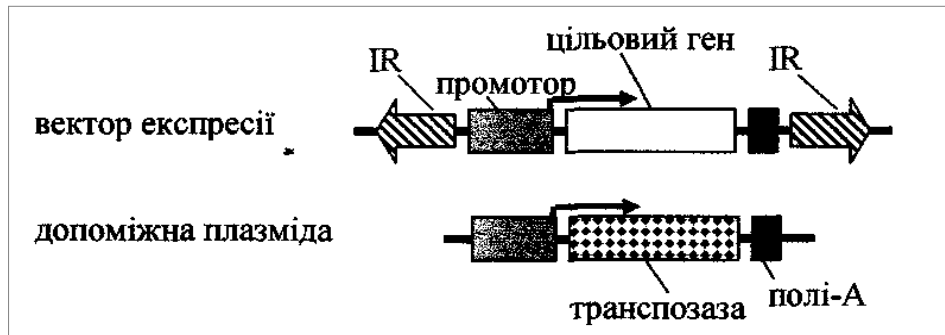


Рис.12. Схема будови експресуючих касет плазмідних векторів для забезпечення їх інтеграції у геном еукаріотів за допомогою транспозона «Sleeping beauty», IR - інвертовані повтори транспозона.

Така система дозволяє вбудовувати експресуючу касету у геном клітин ссавців із частотою у 100 разів більшою ніж частота випадкової рекомбінації. При цьому в геном клітини вбудовується, звичайно, одна-дві копії цільової послідовності.

Відомо, що частота транспозиції залежить від розміру експресуючої касети. При збільшенні розміру експресуючої касети до 5,6 тис.п.н. транспозаза «Sleeping beauty» підвищувала ефективність інтеграції касети, однак при розмірі касети більше 9,1 тис.п.н. частота інтеграції зменшувалась. Ця система була випробувана на різних культурах клітин мишей та людини. При підході *in vivo* «Sleeping beauty» вбудовували у рекомбінантні плазміди, які використовували для корекції дефіциту таких продуктів, як фактор VIII, фактор IX, фумарилацетоацетат гідролаза та інсулін.

Як альтернатива зазначеного підходу було показано, що введення LCR гена аполіпопротеїну Е (*APOE*), ДНКза-чутливої послідовності 4 (HS-4) β-глобінового локусу курча та MAR гена лізоциму курчати до складу вектора

(рис.13) призводить до збільшення рівня та тривалості експресії *in vivo* з використанням різних векторів. MAR - це послідовності геному, які забезпечують асоціацію хроматину з ядерним матриксом. Такі послідовності можуть мати розмір у декілька сотень нуклеотидів та містять АТ-багаті ділянки і кластери сайтів для топоізомерази II. MAR здійснюють глобальний контроль змін структури хроматину та пов'язаних з ними змін експресії генів на рівні транскрипції.

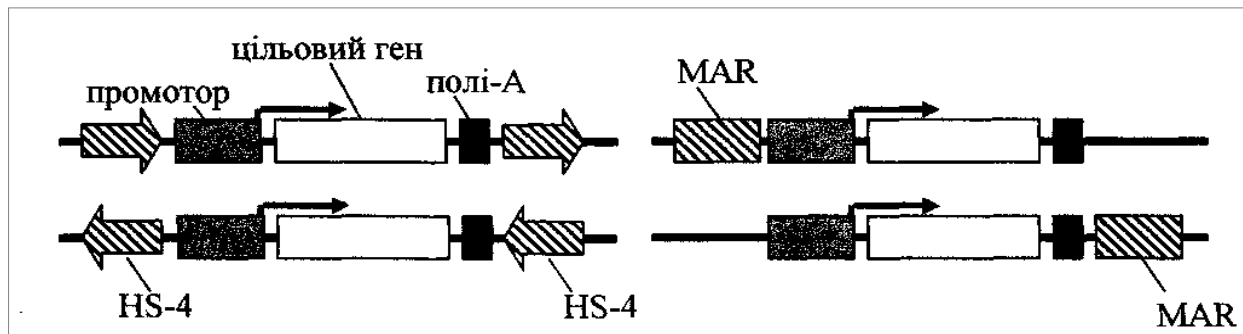


Рис. 13 Схема будови експресуючих касет плазмідних векторів, що «сять» LCR та MAR

Деякі з MAR та LCR можуть виконувати функції інсуляторів, тобто здатні блокувати взаємодію енхансеру з промотором, коли знаходяться між ними та нівелювати ефект положення гена на експресуючу касету. Раніше було показано позитивний вплив таких послідовностей на тривалість збереження експресуючого трансгена та його експресії в клітинах при отриманні трансгенних тварин.

Елементи регуляції експресії трансгена на етапі транскрипції. Через обмежену місткість векторів неможливо використовувати для регуляції експресії трансгенів послідовності, які в нормі контролюють експресію цих генів. Тому при створенні векторів найчастіше всього використовують компактні за розміром регуляторні генетичні елементи генів еукаріотичних клітин або вірусів тварин.

Вірусні промотори. Вірусні промотори використовують для конструювання великої кількості векторів для експресії генів у клітинах

ссавців, у тому числі, комерційних. Їх загальною рисою є невеликий розмір, відсутність тканинної специфічності, висока швидкість транскрипції.

Для регуляції транскрипції гетерологічних генів, найчастіше виористовується hCMV-IE. Крім hCMV-IE, для експресії трансгенів *in vivo* також використовуються такі вірусні промотори, як hCMV-IE з інтроном А середньораннього гена цитомегаловірусу людини (hCMV-IA), промотор SV40, промотор довгого термінального повтору вірусу лейкемії Молоні миші, промотор довгого термінального повтору вірусу саркоми Рауса миші та багато інших.

Однак, деякі автори пов'язують затухання синтезу трансгена саме з використанням вірусних промоторів. Було показано, що hCMV-IE чутливий до інактивації шляхом метилування цитозинів у CpG динуклеотидах. Крім того, відомо, що деякі вірусні промотори (hCMV-IE, SV40, довгі термінальні повтори), що широко використовуються, інгібуються інтерфероном- γ або фактором некрозу пухлин- α . З іншого боку, існують роботи, в яких при використанні вірусних промоторів спостерігалась достатньо тривала експресія трансгена.

Відсутність клітинної специфічності та можливість інактивації вірусних промоторів стимулює пошук сильних промоторів генів ссавців.

Промотори генів ссавців. Промотори генів ссавців, що використовуються для експресії трансгена *in vivo*, можна розділити на: промотори генів „домашнього господарства”, тканино- або стадієспецифічні промотори та промотори, що індукуються.

Промотори генів ссавців, що забезпечують конститутивний синтез. Промотори генів «домашнього господарства» використовують для конструювання еукаріотичних векторів експресії оскільки вони здатні забезпечувати на високому рівні стабільний синтез продукту, протягом тривалого часу без затухання. В нормі ці промотори забезпечують транскрипцію генів, продукти яких грають важливу роль у базових процесах життєдіяльності клітини, наприклад: фактор елонгації-1 α , убіквітини А, Б, С або β -актин.

Найбільш «сильним» вважається промотор гена фактору елонгації- 1 α , однак він забезпечує експресію трансгена на нижчому рівні порівняно з промотором hCMV-ГЕ.

Тканино-специфічні клітинні промотори. Існує велика кількість клітинно-специфічних промоторів для різноманітних типів тканин та клітин: нейрон- (промотори генів гліального фібрилярного кислого білку людини, тромбоцитарного фактору росту людини та ін.), гепато- (промотори генів *APOA1*, *hAAT* та ін.), ендотелій-, епітелій-, м'язо-специфічні та ін. Ці промотори слабкіші за конститутивні, однак специфічність їх активності є безумовною перевагою у випадку синтезу цитотоксичних продуктів, наприклад для терапії раку, чи продуктів, які для терапевтичного ефекту повинні синтезуватись в певних типах клітин, наприклад дистрофія, що виконує важливі функції у м'яких тканинах.

Клітинні промотори, що індукуються. Промотори, що індукуються, дозволяють проводити контроль за експресією трансгена після введення генетичного вектора в організм. Така система робить можливим синтез токсичних трансгенів. Вимогами до таких промоторів є мінімальна базальна експресія та здатність до простої та ефективної індукції.

Деякі клітинні промотори здатні активуватись у відповідь на різні фактори: на підвищення температури вище 39 °C (промотор гена білка hsp70), у відповідь на радіоактивне опромінення (фактор, який індукується у відповідь на підвищення рівня p53 дикого типу), у відповідь на введення певних лікарських засобів (промотор гена резистентності до лікарських засобів (*mdrl*)). Такі промотори найчастіше використовували *in vivo* в протипухлинній ГТ для індукованого, тимчасового синтезу токсичних для клітин продуктів: синтетази оксиду азоту, фактору некрозу пухлин- α , інтерлейкіну-12. Індукція таких промоторів (крім hsp70) відбувається засобами, що звичайно використовуються для лікування пухлин: радіоактивне опромінення, хіміотерапія (доксирубіцин, вінкрістин, етопозід (для *mdrl*)). За експериментальними даними, використання системи експресії

токсичних трансгенів, яка індукується, дало кращі результати у лікуванні пухлин на мишах ніж застосування лише опромінення та хіміотерапії.

Гібридні промотори. Через здатність до взаємної заміни регуляторних послідовностей (енхансер - проксимальні промоторні елементи - коровий промотор - перший інтрон гена) у дослідників з'явилась можливість конструювати гібридні промотори з вже відомих елементів регуляції транскрипції прусів та клітин еукаріот. Це дозволило отримати конструкції з заданими властивостями. Такі промотори отримали назву гібридних. Серед основних стратегій конструювання гібридних промоторів можна підкреслити такі, як «покращення» енхансера/промотора приєднанням послідовності інтрона, посилення за рахунок енхансерів генів вірусів або ссавців слабких промоторів та створення цілих систем (гібридний промотор - гібридні транскрипційні фактори) з заданими властивостями.

Оскільки послідовності енхансерів здатні підвищувати рівень експресії трансгена їх часто розміщують у експресуючій касеті. За їхньої участі створюють сильні гібридні промотори, в яких енхансери можуть бути розміщені перед базовим промотором або у першому інтроні деяких генів, що також вводять до послідовності промоторів. Слід зазначити, що крім цього, енхансери можуть бути розміщені і поза промотором, наприклад у 3'-кінці експресуючої касети та бути представлені більш ніж однією копією (рис.14).

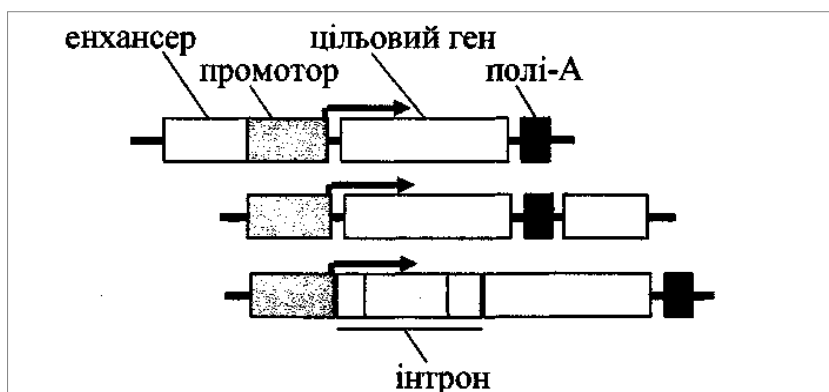


Рис. 14. Схема будови експресуючих касет плазмідних векторів, що містять енхансер

Велика кількість гібридних промоторів була створена на основі hCMV-IE. Так, додаванням до hCMV-IE енхансера/промотора послідовності інтрону гена β -глобіну або гормону росту людини створено промотори, які забезпечили стабільну довготривалу експресію трансгена у складі рААВ вектора у нервових клітинах. З використанням hCMV-IE енхансера було підвищено транскрипційну активність конститутивних та тканино-специфічних клітинних промоторів: β -актину курки (CAG), убіквітину Б людини, α -актину, *APOA1* та ін.

Конструювання гібридних послідовностей дозволяє створювати не лише гібридні промотори, а навіть цілі гібридні системи регуляції експресії. Серед таких гібридних систем, що використовуються *in vivo*, є тетрациклін (tet) on/off система; система, що індукується в присутності рапаміцину; система, що індукується в присутності міфепристону. Звичайно, таким чином намагаються проводити контроль експресії таких продуктів, як гормони (еритропоєтин, гормон росту, інсулін), які потребують тонкої регуляції експресії і надлишок експресії яких призводить до патології. Транскрипційна активність або репресія такої системи досягається за рахунок зв'язування комплексу гібридних транскрипційних факторів із специфічними сайтами у ділянці перед ТАТА-послідовністю гібридного промотору. Успішне функціонування таких систем *in vivo* потребує наявності одного чи двох генів, що кодують гібридні транскрипційні фактори, та послідовності промотору, яка індукується.

Для забезпечення регуляції експресії *in vivo*, з використанням такої системи, застосовують котрансфекцію двома векторами, один з яких містить цільовий ген під регуляцією гібридного промотору, що індукується, а другий - забезпечує експресію гібридних транскрипційних факторів. Альтернативою є розміщення генів в одному векторі. Система промоторів, які індукуються, використовується для конструювання різних векторів: рААВ, рАд, векторів на базі вірусу звичайного герпесу, лентівірусів та плазмід. Введення індукторів або репресорів експресії (тетрациклін, рапаміцин та ін.) тваринам проводять внутрішньочеревною ін'єкцією чи орально.

Елементи регуляції експресії трансгена на етапі модифікацій премРНК. Більшість еукаріотичних матричних РНК (мРНК) мають полі-А 27 послідовність (приблизно 200 н.) на їх 3'-кінці. Ця послідовність важлива для стабільності та забезпечення трансляції мРНК, в кінцевому рахунку, для ефективної експресії трансгена. Сигнали поліаденилювання в мРНК ссавців визначені: один компонент складається з висококонсервативної послідовності AAUAAA, що знаходиться за 20-30 нуклеотидів перед 3'-кінцем мРНК, інший компонент представлений неконсервативною GU-багатою послідовністю відразу за сайтом поліаденилювання. Для конструювання векторів використовують декілька полі-А сигналів: SV40, гену гормону росту бика, гена (β -глобіну кроля, гена β -глобіну миші, гена тимідин кінази вірусу звичайного герпесу та ін.).

Колообіг мРНК є важливим пост-транскрипційним механізмом фізіологічного контролю експресії генів. Потенційно, збільшення часу напівжиття транскрипту може підвищити синтез цільового білка в клітині. Одним із показників лабільності мРНК є наявність AU-багатих послідовностей на її 3'-нетранслюючому кінці (UUAUUUAUU або UUAUUUA(U/A)(U/A)). Видалення цих елементів з послідовності нестабільних мРНК може призвести до збільшення рівня синтезу білка. Іншою стратегією, що була використана для покращення рівня експресії люциферази *in vivo*, є введення до цільового транскрипту послідовностей, що нетранслюються, стабільних мРНК, наприклад β -глобіну. Однак, ці стратегії, які ефективні у деяких випадках, не є універсальними, оскільки деградація мРНК в клітинах ссавців забезпечується багатьма шляхами.

Елемент посттрансляційної регуляції вірусу гепатиту байбака (WPRE), який необхідний для акумуляції РНК вірусу гепатиту у цитоплазмі клітин, використовується для підвищення рівня експресії трансгенів. Як показують експерименти, розміщення WPRE елементу на 3'-кінці цільового гена призводить до підвищення рівня експресії цього гена *in vitro* та при *ex vivo* підході у клітинах ссавців при використанні різних векторів. Дослідниками було показано, що даний елемент здатен підвищувати ефективність

транспорту РНК із ядра до цитоплазми. Нещодавно WPRE елемент успішно використали *in vivo* при забезпеченні експресії трансгена за допомогою рАД.

Методи трансфекції клітин ссавців *in vivo*

ДНК потребує при введенні до організму певних засобів для підвищення її стабільності, ефективності та специфічності переносу. Методи введення, які використовуються, можна поділити на фізичні та хімічні.

До фізичних методів переносу нуклеїнових кислот, що найчастіше використовуються для трансфекції клітин ссавців *in vivo*, відносяться електропорація, бомбардування клітин металевими часточками (золоті або вольфрамові) з нанесеним на них генетичним матеріалом та гідродинамічна ін'єкція. Методи електропорації та бомбардування дозволяють плазміді з більшою ефективністю подолати мембрану клітини та призводять до підвищення кількості ДНК, що потрапляє до ядра. Однак, слід зазначити, що електропорація підвищує частоту інтеграції плазмідного вектора в геном у випадкові ділянки. За даними літератури перенос плазмідної ДНК за допомогою електропорації здійснювали локально у клітини м'язів, шкіри, печінки, мозку, пухлини та роговиці ока тварин *in vivo*.

Під гідродинамічною ін'єкцією «голої» ДНК розуміють швидке введення ДНК у великому об'ємі фосфатного буферу (~1,6 мл) у вену миші. При такому методі введення характер розповсюдження плазміді по організму не змінюється, але, як стверджують автори, змінюється механізм та специфічність транспорту ДНК до клітин [ПО], що призводить до збільшення рівня експресії трансгена. Наразі, існує лише припущення про покращення проходження плазміді ендотеліального бар'єру при такому її введенні. У модифікованому вигляді цей метод також було використано для введення ДНК свиням, але існують застереження щодо його використання для людей.

Використання хімічних реагентів для покращення переносу ДНК є одним з перших підходів, який був запропонований. Найчастіше класифікацію носіїв проводять за хімічною природою, відповідно до неї розрізняють: ліпідні, синтетичні катіонні полімери, білки та пептидні послідовності. Найбільш досліджений засіб для доставки ДНК у клітини є так

звані «катіонні ліпіди». До основних класів синтетичних полікатіонних полімерів, що використовуються для трансфекції *in vivo*, належать ПЕІ, поліамінокислоти та ін.

Вважається, що взаємодія між комплексами ДНК/катіонний носій та клітинами відбувається неспецифічно через сумарний позитивний заряд носія. Так само як і «гола» ДНК, комплекси з катіонними носіями потрапляють до клітин шляхом ендоцитозу. Однак механізми вивільнення комплексів із ендосоми, дезинтеграції комплексів та транспорту плазмідної ДНК до ядра залежать від носія. Деякі полімери, наприклад ПЕІ, володіють великою буферною ємністю. Вважають, що завдяки зазначеній властивості цей носій здатний викликати дифузію води до везикул та руйнувати їх, хоча така здатність не завжди була підтверджена.

Включення до складу катіонних ліпосом допоміжного нейтрального ліпиду DOPE, за припущенням, підвищує обмін ліпідами та здатність до злиття комплексу та ліпідної мембрани ендосоми, що може призводити до руйнування мембрани ендосоми та ефективного вивільнення комплексу у цитоплазму. Утворення комплексів з катіонними носіями призводить до значної компактизації великих молекул ДНК, що може позитивно вплинути на їх рухливість у цитозолі. Для катіонних ліпідів показано взаємодію з f-актиновими волокнами цитоскелету, що також може обумовлювати рухливість комплексів. Носії захищають ДНК від дії внутрішньоклітинних нуклеаз. Важливим бар'єром на шляху комплексів є ядерна мембрана. Лише для комплексів з лінійним ПЕІ (22 кДа) показана здатність ефективно доставляти ДНК до ядра незалежно від фази клітинного циклу, в той час як для інших носіїв такої властивості не виявлено. Дослідники спостерігають агрегати комплексів ДНК/носій переважно у перинуклеарній області клітини.

При системному введенні деяких комплексів, спостерігається неспецифічна взаємодія їх з компонентами сироватки крові, що дестабілізує препарати у кровообігу або суттєво змінює їхні властивості. Також проблемним залишається подолання ендотеліального бар'єру великими за розмірами комплексами.

Показано, що після внутрішньовенного введення у організм препарат ДНК/катіонний носій переважно потрапляє до легенів, однак частина препарату розподіляється між іншими органами. Експресія трансгена також відбувається переважно у легенях, але її виявляли і в клітинах інших органів. Крім експресії трансгена в ендотеліальних клітинах її спостерігали також і в клітинах всередині тканин легенів, що свідчить про здатність деяких комплексів долати ендотеліальний бар'єр або пасивно, завдяки їх невеликому розміру, або за рахунок транспортної системи для поліамінів. Деякі дослідники спостерігали інший характер розповсюдження комплексів в організмі та експресії трансгена. Так, при системному введенні ДНК за допомогою ліпосом DOGS/DOPE більша експресія трансгена спостерігалась у клітинах легенів або печінки залежно від методу приготування препарату.

Як показали дослідження для внутрішньовенного введення ДНК, серед катіонних ліпідів краще використовувати ліпіди з двома гідрофобними залишками (DOTAP, DMIRE та ін.) ніж із залишком холестерину. Використання нейтрального допоміжного ліпиду DOPE ефективно для формування препаратів для доставки ДНК у дихальні шляхи або для локального ведення, однак, не прийнятно для системного введення, де рекомендується використовувати для цього холестерин.

Для стабілізації комплексів з катіонними полімерами для переносу ДНК при системному введенні було проаналізовано введення до складу носіїв декількох стабілізуючих комплекси речовин: поліетиленгліколю (ПЕГ), трансферину, полі(N-(2-гідроксіпропіл(метакріламід) та зв'язаних поперечними зв'язками первинних амінів. ПЕГ виявив здатність збільшувати час напівжиття комплексів у кровообігу *in vivo*, зменшував токсичність комплексів та рівень експресії трансгена клітинами легенів. Приєднання трансферину до ПЕІ/ДНК комплексів *in vivo* призвело до зміни характеру розподілу комплексів у організмі - вони накопичувались у печінці (клітинах Купфера) та тканинах пухлин. Це в свою чергу забезпечило у 100-500 разів більший рівень експресії трансгена клітинами пухлин порівняно з іншими клітинами організму. Полі(N-(2-гідроксіпропіл(метакріламід) не виявив

очікуваних ефектів на стабілізацію комплексів *in vivo*, а зв'язані поперечними дисульфідними зв'язками первинні аміно/полі-L-лізин/ДНК комплекси показали підвищення у 10 разів часу напівжиття комплексів у кровообігу, та забезпечили рівень експресії трансгена *in vivo*, що відповідав результатам *in vitro*.

Для здійснення специфічної доставки ДНК *in vivo* проаналізовано ефект використання різних лігандів, які звичайно ковалентно приєднують до носіїв: глікопротеїнів (трансферину, асіалоглікопротеїду), вуглеводів (манозу, галактозу), фолієву кислоту тощо. Як вже відмічалось раніше, за допомогою трансферину можливо забезпечити пухлино-специфічну доставку препарату, таку саме специфічність мають і носії з залишками фолієвої кислоти. Асіалоглікопротеїн, маноза та галактоза використовуються як ліганди для доставки ДНК до гепатоцитів.

Для покращення доставки препаратів ДНК використовуються також деякі пептиди - сигнали ядерної локалізації, які можуть бути ковалентно з'єднані або з плазмідною ДНК, або з катіонним носієм. Вони використовуються для забезпечення активного транспорту ДНК до ядра та демонструють підвищення рівня експресії трансгена *in vivo*. Однак, всі вищезазначені методи потребують ковалентного зв'язування білків, пептидів або вуглеводів з носіями, що з фармацевтичної точки зору є небажаним. Так, було показано, що після повторних введень носія асіалоглікопротеїн/катіонний ліпід/плазмідна ДНК внутрішньовенною ін'єкцією у мишей було виявлено антитіла проти асіалоглікопротеїну.

Для переносу ДНК за допомогою катіонних носіїв також використовується метод локального введення: ін'єкцією у мозок, у пухлину, нирки, серце та інші органи. При такому введенні комплекси плазмідна ДНК/катіонний ліпід залишається звичайно у місцях ін'єкції. Для трансформації клітин епітелію дихальних шляхів також застосовуються розпилення або інгаляції.

Основні переваги використання носіїв для трансфекції є вища ефективність доставки порівняно з «голою» ДНК, можливість специфічної

заставки, відносно низька вартість носіїв. Носії порівняно з рекомбінантними вірусними векторами менш імуногенні. Однак, експериментами було показано, що комплекси ДНК з катіонними ліпідами викликають запалення, яке призводить до синтезу інтерферону- γ та фактору некрозу пухлин- α , та загибелі трансфікованих плазмідною клітин в результаті некрозу або апоптозу. Наслідком цих процесів є припинення синтезу трансгена *in vivo*. Крім імунної відповіді при зведенні катіонних носіїв звичайно виявляють їх дозозалежну токсичність, що проявляється у зменшенні циркулюючих у крові лейкоцитів та підвищенні рівня ферментів печінки у крові, а іноді у видимому некрозі тканин печінки.

Для трансфекції тканин тварин *in vivo* існують комерційні препарати, наприклад: «MegaFectin» (Qbiogene Inc., США) (DOTAP/холестерин) для доставки ДНК у клітини легень при внутрішньовенній ін'єкції; «ExGen500» (Fermentas, Литва) та «*in vivo*-jetPEI» (Qbiogene Inc.) (лінійні 22 кДа ПЕГ), які були використані на великій кількості тварин для внутрішньовенного [185, 186] та локального введення у мозок, пухлину, легені.

Такі катіонні ліпіди, як DC-Chol/DOPE, EDMPC та DOTAP використовувались для доставки ДНК при клінічних дослідженнях ГТ муковісцидозу. Препарат ДНК/носії вводили у легені людини шляхом внутрішньовенної ін'єкції та при інгаляції верхніх дихальних шляхів. Експресія трансгена була виявлена у більшості випадків, однак, мала транзиторний характер та була недостатньою для досягнення терапевтичного ефекту. DMIRE/DOPE використовували в клінічних дослідженнях в ГТ з лікування меланоми та карцином шляхом локального введення препаратів у пухлину, а комерційний препарат «-jetPEI» - у дослідженнях з ГТ карциноми на двох пацієнтах де було одержано позитивні результати.

Питання для самоконтролю

23. Які системи рестрикції Ви знаєте?

24. Що таке рестриктази?

- 25.3 якою метою використовують віроїди в молекулярній біології і генетиці?
- 26.Розкажіть про транспозони.
- 27.Що таке вектор?
- 28.Розкажіть про використання тлазмід.
- 29.Як будуються рестрикційні карти?
- 30.Яким чином одержують штучно гени, праймери?

ЛІТЕРАТУРА

1. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки. Т. 1 - 3. - М.: Мир, 1994.
2. Анализ генома. Методы / Под ред. К. Дейвиса. - М.: Мир, 1990. - 246 с.
3. Атанасов А. Биотехнология в растениеводстве. - Новосибирск: ИГиГСО РАН, 1993. – 241 с.
4. Барановов В. С. Генная терапия – медицина XXI века // Соросовский образовательный журнал. - 1999. - № 3. - С. 3 – 68.
5. Бекер М. Е., Лиепиныш Г.К., Райпулис Е.П. Биотехнология. - М.: Агропромиздат, 1990. - 334 с.
6. Борисюк Н.В. Молекулярно - генетическая конституция соматических гибридов// Биотехнология. Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР. - М.: 1988. - Т. 9. - С. 73 -113.
7. Валиханова Г. Ж. Биотехнология растений. - Алматы: Конжык, 1996. - 272 с.

8. Глеба Ю. Ю. Биотехнология растений // Соросовский образовательный журнал. - 1998. - № 6. - С. 3 – 8.
9. Глебов О. К. Генетическая трансформация соматических клеток// Методы культивирования клеток. - Л.: Наука, 1988.
10. Гольдман И. Л., Разин С. В., Эрнст Л. К., Кадулин С. Г., Гращук М. А. Молекулярно-биологические аспекты проблемы позиционно-независимой экспрессии чужеродных генов в клетках трансгенных животных// Биотехнология. - 1994. - № 2.
11. Дыбан А. П., Городецкий С. И. Интродукция в геном млекопитающих чужеродных генов: пути и перспективы// Молекулярные и клеточные аспекты биотехнологии. - Л.: Наука, 1986. - С. 82 - 97.
12. Егоров Н. С., Самуилов В. Д. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов// Биотехнология. Кн. 2. - М.: Высшая школа, 1988. - 208 с.
13. Зверева С. Д., Романов Г. А. Репортерные гены для генетической инженерии растений: характеристика и методы тестирования// Физиология растений. - 2000. - Т. 47, № 3. - С. 479-488.
14. Лещинская И. Б. Генетическая инженерия// Соросовский образовательный журнал. - 1996. - №1. - С. 33 - 39.
15. Ли А., Тинланд Б. Интеграция т-ДНК в геном растений: прототип и реальность// Физиология растений. – 2000. – Т. 47, № 3. - С. 354-359.
16. Лутова Л. А., Проворов Н. А., Тиходеев О. Н. и др. Генетика развития растений. - СПб.: Наука, 2000. - 539 с.
17. Льюин Б. Гены. - М.: Мир, 1987. - 544 с.

18. Пирузян Э. С., Андрианов В. М. Плазмиды агробактерий и генная инженерия растений. - М.: Наука, 1985. - 280 с.
19. Пирузян Э. С. Генетическая инженерия растений. - М.: Знание, 1988. - 64 с.
20. Пирузян Э. С. Основы генетической инженерии растений. - М.: Наука, 1988. - 304 с.
21. Пирузян Э. С. Проблемы экспрессии чужеродных генов в растениях// Итоги науки и техники ВИНТИ. Сер. Биотехнология. - 1990. - Т. 23. - 176 с.
22. Попов Л. С., Языков А. А. Трансгенные животные как модели для изучения репродукции эмбрионального развития и заболеваний человека// Успехи современной биологии.- 1999. - Т 119, № 1. - С. 30-41.
23. Романов Г. А. Генетическая инженерия растений и пути решения проблемы биобезопасности// Физиология растений. - 2000. – Т. 47, № 3. - С. 343-353.
24. Сельскохозяйственная биотехнология: Учеб. / В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, С. В. Дегтярев и др.: Под ред. В. С. Шевелухи. - М.: Высш. школа, 1998. - 416 с.
25. Сингер М., Берг П. Гены и геномы. Т. 1-2.- М.: Мир, 1998.
26. Томилин Н. В., Глебов О. К. Генетическая трансформация клеток млекопитающих// Молекулярные и клеточные аспекты биотехнологии. Л.: Наука, 1986. - С. 62 - 82.
27. Фаворова О. О. Лечение генами – фантастика или реальность?// Соросовский образовательный журнал. - 1997.- № 2. - С. 21 – 27.

28. Щелкунов С. Н. Генетическая инженерия. Ч. 1. - Новосибирск: изд-во Новосибирского ун-та, 1994. – 304 с.

РОЗДІЛ 15. «Етичні аспекти медичної генетики»

У медичній генетиці спостерігається зв'язок наукових досліджень з питаннями етики. Генетика як наука досягла такого прогресу, який дозволяє людині вирішати власну біологічну долю. Реалізація цього потенціалу можлива тільки при чіткому дотримуванню певних етичних норм. Масове використання в медицині принципово нових генетичних технологій (штучне запліднення, сурогатне материнство, генотерапія, генетичне тестування, трансплантація, клонування), комерціалізація медико-генетичної допомоги і генетичних технологій, масштабність наукових досліджень, які торкаються інтересів суспільства, призвело до появи нових взаємовідносин між лікарем і пацієнтом, лікарем/науковцем і суспільством. Оскільки медична генетика має справу з хворим чи його родиною, вона повинна опиратися на моральні принципи, які напрацьовувались століттями. Такі сучасні моральні принципи зобов'язують шукати компроміс між інтересами суспільства та особистістю. Більш того, інтереси пацієнта повинні бути вищими за інтереси суспільства.

Генетична інженерія здатна, з одного боку, призвести до позбавлення людства від багатьох бід, зокрема від спадкових хвороб, а з іншого боку, в результаті експериментів і маніпуляцій з генами призвести до наслідків, які можуть загрожувати окремій людині і всьому людству. Етична оцінка вже досягнутого відрізняється різноманітністю точок зору. Оптимісти бачать величезні перспективи, які відкриваються в області генетичної терапії і біотехнології. Оптимістичне відношення більше властиве науковцям – безпосереднім учасникам робіт, молекулярним біологам, генетикам. Інша

точка зору більше поширена серед юристів і філософів. Ті, хто її підтримують, дуже стурбовані можливістю генетичних змін, які, одного часу розпочавшись, можуть “змінити генетичний портрет людства настільки, що по відношенню до наслідків такої «революції» можуть виявитися незначними наслідки війн і катастроф, які відбулися».

Отже на сучасному етапі суспільство має певні питання, які стосуються медико-генетичної етики:

Чи може людина (науковець, дослідник-генетик, політик) стати співавтором біологічної еволюції?

Чи може і повинна реальність біогенетичної нерівності (таланти, здоров'я) стати підставою соціальної нерівності?

Чи може держава і суспільство регулювати процес наукових досліджень, і якщо «так», то «як»?

Чи повинно генетичне обстеження стати доступним для кожного й охоплювати всю популяцію?

Чи повинно воно стати обов'язковим для людей, які вступають у шлюб або під час вагітності?

Чи правильно розглядати генетичну діагностику підставою для абортів?

Етично повідомляти людині про спадкову схильність до того чи іншого захворювання, які вона має? Особливо, якщо медицина не здатна ще запобігти його розвитку?

Допустимо те, що дані генетичного обстеження («генний паспорт») використовувались страховими компаніями і роботодавцями?

Етично створювати «запасні частини» для ринка органів, тканин, генів, використовуючи абортуси?

Допустимі подібні процедури з ембріональним матеріалом взагалі?

Чи може геном стати критерієм оцінювання особистості?

Як гарантувати і забезпечувати конфіденційність матеріалів генетичного тестування?

Чи повинна інформація про результати генетичного обстеження бути доведена до всіх членів сім'ї?

Чи повинні люди знати своє генетичне майбутнє?

Чи можуть вони обирати – знати це чи ні?

Чи можна інформувати їх про це примусово?

Чи може генетичне тестування населення стати підставою класифікувати групи населення і підставою для представників влади обмежувати свободу «неблагополучних» людей?

Чи обмежиться наука розшифруванням патологічних генів чи піде далі, до пошуку генів, відповідальних за поведінку людини?

Чи можна покращити або «гармонізувати» людину і рід людський шляхом вибіркового схрещування певних особистостей?

Ці питання складають сутність етичної проблематики генних технологій. Вони тісно пов'язані між собою, і кожне з них є не довільною конструкцією талановитого людського розуму, але природним наслідком вже існуючої наукової практики.

Відомо, що головною *небезпекою генної терапії* пов'язані з вірусною природою носія трансгену. Такий вірус не повинен бути загрозою інших людей і не повинен інфікувати статеві клітини пацієнта, щоб не передати трансген нащадкам і зробити їх трансгенними. Проте вважається, що в наш час технології генної терапії, при їх розумному виборі, не несуть пацієнтам загрози, яка б виходила за рамки звичайних медичних процедур [3].

Питання медико-генетичної етики пов'язані з біоетикою (від др.-грец. βίος — життя та ἠθική — етика, наука про добродійність) — вченням про моральний бік діяльності людини в медицині і біології.

Історія біоетики

Біоетика відносно молода наука, яка, на сьогоднішній день досить популярна у світі. Коло її питань пов'язане з біологією, медициною, філософією, соціологією, богослов'єм. Біоетику викладають в різних

навчальних закладах Європи та Америки. На протязі декілька останніх років даний предмет поширюється серед університетів України.

Коріння біоетики сягає стародавніх часів, коли склалися відношення лікаря, пацієнта і держави. Так, у 1750 році до н.е. був створений Кодекс Хаммурапі, який містить норми праці лікаря і плату за його допомогу. Пізніше у 460-370 роках до н.е. Гіппократ створив Клятву, яка стала законом для лікарів на протязі багатьох століть і на сьогоднішній день не втратила своєї актуальності. Особлива та її частина, де мова іде про повагу до лікаря, зберігання ним лікарської таємниці, обов'язок лікаря поважати пацієнта і не завдавати йому своїм лікуванням ніякої шкоди ні на прохання пацієнта, ні за власним бажанням.

Асклепід у свої працях підкреслював, що «надмірна поспішність і бажання догодити хворому – небезпечність».

Біоетичні концепції можна зустріти у працях Платона, Сократа, Аристотеля, Сміта та інш. У минулому столітті у 1946 році був створений Нюрнбергський кодекс під час суду нациських лідерів. Тоді вперше розгорнуто обговорювались проблеми біоетики, оскільки німці під час другої світової війни проводили медичні експерименти над полоненими. На Нюрнберзькому процесі були пред'явлені обвинувачення 23 німецьким вченим-медикам. В їх числі - особистий лікар Гітлера і голова Комісаріату охорони здоров'я і санітарії - К. Брандт, особистий лікар Гімmlера, президент німецького Червоного Хреста К. Гебхард та інш. Згідно вироку Трибуналу, сімом німецьким медикам був винесений вирок про страту.

В Кодексі вказувалося на необхідність під час проведення експериментів на людях дотримуватися ряду етичних критеріїв, таких як, добровільна згода піддослідного, його дієздатність, інформування піддослідного про мету, методах і можливих наслідках експерименту. Такий експеримент повинен приносити користь суспільству, яка не може бути досягнута іншими методами дослідження. Піддослідний повинен бути позбавленим від надмірних фізичних і психічних страждань і пошкоджень, а обладнання повинне забезпечувати захист піддослідних від віддаленої

можливості поранення, інвалідності, смерті. Заборонялось проведення експериментів, які передбачали смерть для піддослідних. Обговорювалася можливість припинення проведення експерименту за бажанням піддослідного.

У 1948 був опублікований Кодекс медичинської етики у Женеві.

У широкому розумінні вважають, що біоетика народилася у США, коли у 1969 році філософ Даніель Келлехен і психіатр Уїллард Гейлін створили Institute of Society, Ethics and the Life Sciences (пізніше Hastings Center) з метою розробки правил, які стосувалися етичного боку біомедичних досліджень. На той час у Сполучених Штатах накопичилось чимало випадків зловживання експериментування на людині з негативними наслідками. Так, наприклад, у 1963 році в одній з лікарень Брукліна пацієнтам похилого віку без їхньої згоди ввели клітини пухлин. Ці та інші експерименти нагадали багатьом людям про жахливі досліди на людях, які проводили німці у концентраційних таборах під час Великої Вітчизняної війни. У 1971 році був створений The Joseph and Rose Kennedy Institute for the Study of Human Reproduction and Bioethics на кошти родини Кеннеді, який у 1979 році був приєднаний до Джорджтаунського університету. Даний інститут раз на два місяці видає бібліографічний збірник «New Titles in Bioethics».

Передумови до виникнення біоетики були: екологічний і правозахисний рухи. Поштовхом до першої передумови стала талідамідова катастрофа 1966 року, коли народилися діти без кінцівок у матерів, які вживали під час вагітності талідамід, як снотворне. Після цієї події метою медичної науки стала не тільки розробка нових терапевтично ефективних лікарських засобів, але й запобігання їх негативних побічних впливів.

Правозахисний рух ставить своїм завданням відстоювати права пацієнтів. На сьогоднішній день існує багато міжнародних, національних і регіональних організацій з захисту прав пацієнтів, які страждають на онкологічні захворювання, цукровий діабет, астму тощо. Існують організації, які захищають права пацієнтів в цілому як особливої соціальної групи.

У 1987 році у Парижі був опублікований документ «Принципи європейської медичної етики».

Біотичні центри були створені в 60-70 роках минулого століття у США, а пізніше в європейських країнах. Так, наприклад, у 1983 році був створений Centre d'Etudes Bioethiques, а у 1985 році у Маастріхті (Нідерланди) – перший інститут з біоетики. У 1993 році в Іспанії була створена Sociedad Andaluze de Investigacion Bioetica, яка видає журнал «Bioetica y Ciencias de la Salud». Подібні заклади створені і в інших західноєвропейських країнах і в Австралії. Як правило такі центри видають періодичні видання. Наприклад, крім вищезгаданих видань, в Англії друкуються журнали «Ethics and Medicine» і «Journal of Medical Ethics», в Австралії – «Bioetics».

Термін «біоетика» запропонував у 1971 році онколог Ван Ренсселер Поттер у своїй праці «Bioethics: bridge to the future» для позначення біологічної науки, яка поєднує у собі біологічні знання і систему людських цінностей. На його думку науково-технічний прогрес може призвести до неминучої катастрофи, якщо не створити «міст» між наукою і духовними цінностями. У науковій і навчальній літературі більш поширеним виявився термін «білетика», який запропонував майже одночасно з Поттером, американський лікар Андре Хеллегерс. Він використав даний термін для позначення междисциплінарних досліджень моральних проблем біомедицини, пов'язаних з необхідністю захисту прав пацієнтів. Велику роль в цьому відіграв правозахисний рух в 60-х роках минулого століття, який істотно вплинув на формування біоетики.

До 60-х років медична спільнота в цілому дотримувалась тої точки зору, що на користь «людства» завжди можна пожертвувати добробутом окремої людини. Національні інтереси чи інтереси людства в одержанні наукових знань дуже часто домінували над інтересом у зберіганні здоров'я окремої людини.

Після революції в Радянському союзі поширилась так звана медична деонтологія. Медична етика стала називатися деонтологією з легкої руки академіка Петрова (1876-1964) – засновника онкології в СРСР («Вопросы

хирургической деонтологии», 1946). У Росії у 1976 р. МОЗ СРСР затвердило «Міжкафедральну програму з медичної етики і деонтології» для студентів вищих медичних і фармацевтичних навчальних закладів. З 2001 р. МОЗ РФ прийняло Програму з біоетики. 25 квітня 2006 р. заснований Російський комітет з біоетики при Комісії Російської Федерації зі справ ЮНЕСКО. Російський комітет з біоетики – це загальний експертно-консультативний орган, в задачі якого входить розробка національної позиції з ряду міжнародних документів, експертна оцінка міжнародного і російського законодавства і висування нормотворчих ініціатив в галузі біоетики, підготовка книг, посібників і рекомендацій у цій галузі, популяризація основ біоетики у суспільстві, робота з біотичними комітетами, розглядання актуальних біотичних проблем та участь у нарадах і конференціях, та їх організація.

Викладання біоетики у вищих навчальних закладах сприяє чіткому визначенню цієї дисципліни, а накопичення етичних проблем медицини і біології створює передумови для створення «етичних комітетів» в медичних закладах як України, так і решти держав світу. З 1999 р. курс біоетики викладається в усіх медичних закладах Росії.

Щорічно в різних країнах проходять міжнародні конференції і симпозіуми, присвячені біоетичним проблемам, виходять друком монографії і статті з даної тематики. До біотичних проблем відносять моральні і філософські проблеми абортів; контрацепція і нові репродуктивні технології (штучне запліднення); проведення експериментів на тваринах і людині; одержання інформованої згоди і забезпечення прав пацієнтів (у тому числі з обмеженою компетентністю – наприклад, дітей чи психічно хворих); евтаназії і самогубства; проблеми відношення до помираючих хворих (хосписи); вакцинації і СНІД; проблеми демографічної політики і планування сім'ї; генетичні питання (зокрема, проблеми гемотерапії і генної інженерії, клонування); трансплантологія; маніпуляції зі стовбуровими клітинами тощо.

Біоетика тісно пов'язана з філософією. Проте, до сих пір у науковій і філософській літературі не існує чіткого та однозначного визначення предмета і методів біоетики. Більш того, спеціалісти з різних областей по-різному розуміють задачі, які постають перед біоетикою. Існують різноманітні підходи до вирішення проблем біоетики, пов'язані з філософськими, релігійними, науковими, національними, соціально-економічними, правовими та етичними підставами.

Біоетика - продовження медичної етики, а предмет аналізу вони мають загальний - здоров'я людини. Хоча виділення біоетики в окрему дисципліну сприяло появі нових галузей знань (крім медичного), таких як, наприклад, генна інженерія.

Біоетика розглядає всі питання класичної і надсучасної лікарської етики по відношенню до людського життя. Причиною, яка викликала надзвичайну цікавість до біоетики - це стрімкий розвиток біології і використання її розробок у медицині. Отже, біоетика представляє собою розширену розробку медичної етики, і в центрі її уваги стоять питання, підняті головним чином під впливом біології на сучасне життя з використанням надсучасних медичних технологій на протязі всього життя людини, від її народження до смерті.

Спеціально біоетика досліджує моральні питання, які пов'язані, по-перше, зі штучним заплідненням, лікуванням безпліддя, дородовими дослідженнями плода, контролем над народжуваністю, перериванням вагітності, по-друге, з підтримкою та покращенням біологічного розвитку людини, клонуванням, пересаджуванням тканин чи органів, і по-третє, з завершенням людського життя, з пасивною або активною евтаназією та пов'язаними з цим питаннями.

Методи, які дозволяють визначити шляхи вирішення біоетичних проблем, можуть бути об'єднані у групи: 1) філософські методи і філософсько-наукові — метод моральної рефлексії, системний, оптимологічний, прагматичний, діалектичний; 2) загальнонаукові —

експеримент, моделювання, гіпотетико-дедуктивний, метод гуманітарної експертизи, історичний; 3) частково/вузько наукові (не тільки біологічні і медичні) - емпатія, соціологічне опитування, метод культивування тканин і клітин *in vitro* та *in*. 4) методи міждисциплінарного дослідження.— метод ситуаційних досліджень або *case studies*. В якості опосередкованого методу може використовуватися суспільне обговорення.

Етичні проблеми генної інженерії та клонування

На сьогоднішній день генна інженерія технічно не зовсім досконала тому, що вона не завжди може передбачити наслідки, а інколи і місце вбудовування нового гена. Навіть у тому випадку, якщо відоме місце знаходження гена після його вбудовування в геном, відомості про його ДНК дуже неповні для того, щоб передбачити результати. Ніхто не запевнить на 100%, що вбудований ген не привнесе в організм якесь захворювання, алергію і т.д.

Технологія клонування викликало шалений ажіотаж в області релігії, етики, захисту прав людини. Практично всі релігійні вчення настоюють, що людина з'являється на світ по волі вищих сил. Її зачаття, розвиток і смерть має відбуватися природним шляхом. Клонування посягає на божественну сутність походження людини, що є гріхом. Воно може не тільки зруйнувати інститут шлюбу, але привести до поширення невідомих хвороб. Вчені ж стверджують як раз про "виправлення" тих генетичних дефектів, які і виникли завдяки природі, вищим силам.

З етичного боку клонування людини також викликає певні страхи [17]. По-перше, становлення людини як особистості, базується не тільки на біологічній спадковості, вона визначається також родинним, соціальним і культурним середовищем. Отже, ніким чином не можна добитися повної відповідності копії з прототипом (донором).

Виростає клон з дорослої клітини, в генетичній структурі якої на протязі багатьох років відбувалися так звані соматичні мутації. Під час

природного запліднення гени, які мутували одного з батьків компенсуються нормальними аналогами іншого. При клонуванні такої компенсації не відбувається, що небезпечно для клону: виникає ризик захворювань, які викликаються соматичними мутаціями: рака, артриту, імунодефіцитів. Таким чином, клонований організм буде нести вантаж генетичних мутацій донорської клітини, як наслідок, її хвороби, ознаки старіння і т.п.

Отже, онтогенез клонів не ідентичний онтогенезу їх батьків: клони проходять інший, скорочений і насичений хворобами життєвий шлях. Відома вівця Доллі, з'явилася на світ в результаті клонування у 1997 р., стала старіти з неймовірною швидкістю. Через два календарних роки, у 1999 р. виявилось, що її біологічний вік складав цілих шість років! Донором клітини, з якої була скопійована Доллі, була на той час як раз шестирічною вівцею, – отже, новонароджена швидко досягла закладені в її геномі данні про вік. Таким чином, даний експеримент з вівцями вказує на те, що клонування не несе омолодження, повернення молодості, безсмертя, і цей метод не можна вважати абсолютно безпечним для людини.

З іншого боку, результатом клонування може стати збідніння генофонду. Протягом безстатевого розмноження запрограмованість генотипу визначає меншу різноманітність взаємодій організму, який розвивається з умовами середовища, яке змінюється.

Що стосується методичного аспекту проблеми, то очевидно, що завдяки недостатньо досконалій технології клонування сотні невинних дітей будуть страждати від страшних патологій. Статистика показує, що, якщо зараз хтось спробує створити точну копію людини, то у нього є тільки один шанс з трьохсот можливих (коефіцієнт виходу живих особин 0,36%, процент загибелі реконструйованих яйцеклітин, які розвиваються у плідний період розвитку 62%). Отже, під час клонування людини кожна "недосконала копія" виявиться фізично чи розумово неповноцінною, але при цьому за рівноправність такої людини і за її відповідальність буде відповідати фактично все людство.

Таким чином, для клонування людини дуже важливо звести до мінімуму ризик, який, тим не менше, в певному степені все рівно залишається, ризик дефектного розвитку реконструйованої яйцеклітини, головною причиною якого може бути неповне репрограмування генома донорського ядра.

Етичні аспекти пренатальної діагностики

Пренатальна діагностика створює ряд етичних проблем. Одна з таких проблем пов'язана з її прямим наслідком – з абортom зародків з вадами розвитку, тобто з так званим євгенічним абортom.

Технологія пренатальної діагностики включає в себе, по-перше, пренатальне генетичне тестування, яке проводять в певний період розвитку людського зародку для того, щоб виявити відхилення у розвитку і дефекти. По-друге, таке діагностування включає й інші методики, коли мова іде про можливу патологію зародка, яка викликана не генетичними, а соматичними причинами (1).

Пренатальна діагностика увійшла в практику в 1968 р., після того, як була удосконалена техніка вирощування клітин зародку в амніотичній рідині, яка використовувалась для дослідження хромосом. Розвиток методики ЕКЗ (екстракорпорального запліднення) дозволив проводити діагностування ембріону, заплідненого *in vitro*, до перенесення його в матку. З 1971 р. стала входити у практику технологія амніоцентезу. Поштовхом до вдосконалення цих діагностичних процедур була мотивація виявлення ембріонів, вражених генетичними хворобами, аналізом хромосомної статі і вибором статі майбутньої дитини. В наш час за допомогою цих технологій передбачається вирішувати соціальні та індивідуальні задачі. Соціальні задачі пов'язані перш за все з покращенням показників суспільного здоров'я, в тому числі зниженням показників дитячої смертності. Індивідуальні — з позбавлення батьків важкого піклування про хвору дитину.

У 1979 р. у Квебеку відбулася міжнародна конференція з проблем пренатальної діагностики, яка ухвалила медичні показники до неї (2). До них належать наступні:

- вік матері перевищує 36 років;
- наявність у одного з батьків структурної хромосомної компенсованої аберації;
- наявність в однієї дитини, вже народженого в сім'ї, трисомії за 21-ю хромосомою чи синдрому Дауна;
- порушення обміну речовин в одній дитини чи факту, що один з батьків є носієм гену (гетерозиготи), який викликає подібне порушення;
- суттєва гемоглобінопатія у одній дитини (альфа чи бета-таласемія) або той факт, що батьки є носіями гена даної хвороби;
- наявність в одній дитини хвороби, яка пов'язана з хромосомою X, чи її матір є носієм вказаного гену;
- наявність у однієї дитини вади нервової системи, яка проявляється як *anencephalia* або *spina bifida*.

Дані показання є підставою для генетичного консультування, яке передуює власне генетичній діагностиці. Мета генетичного консультування полягає ще і в тому, щоб надати детальну інформацію про небезпеку, проблеми, межі необхідних аналізів жінкам чи подружнім парам, які звернулися з проханням про діагностування.

На нараді ВОЗ «Етичні дослідження в медичній генетиці» у 1997 р. у Женеві були затверджені основні етичні принципи пренатальної генетичної служби:

- генетична служба і пренатальна діагностика повинні бути доступними всім в рівному ступені, але в першу чергу надається тим, хто в них має потребу, незалежно від того, чи в змозі вони оплатити необхідні процедури;
- пренатальна діагностика повинна бути добровільною; якщо існують медичні показання, надати можливість обстеження незалежно від того, як родина відноситься до абортів. Така пренатальна діагностика допомагає підготувати сім'ю до народження хворої дитини;

- пренатальну діагностику проводять тільки для того, щоб забезпечити родину і лікаря інформацією про стан плоду;
- пренатальна діагностика за відсутністю медичних показників (тільки якщо вагітна наполягає або занепокоєна) повинна проводитися в останню чергу;
- МГК (медико-генетичне консультування) повинно передувати пренатальній діагностиці;
- лікар повинен роз'яснити сім'ї всі результати пренатальної діагностики. Родина, а не лікар, повинна вирішити як себе поводити з урахуванням результатів пренатальної діагностики.

Всім відомо, що кожна вагітна жінка повинна пройти трьохкратне ультразвукове (УЗ) обстеження на строках вагітності 10-14, 20-24 і 30-34 тижня. За допомогою такого тестування можна виявити до 70% плодів з видимими дефектами (вадами розвитку), можна визначити стать і вік дитини, кількість плодів у матці, чи є вагітність маточною або поза маточною, чи не має загрози викидня. Крім того, на 16-20 тижні вагітності у всіх вагітних визначають вміст у крові альфа-фетопротеїну (АФП), хоріонічного гонадотропіну людини (ХГЛ). Певні відхилення у показниках біохімічних маркерів по відношенню до середньо-популяційного рівня свідчать на користь того, що у обстеженої жінки підвищена ймовірність народження дитини з деякими генетичними захворюваннями або вадами розвитку.

Біохімічний скринінг має на меті, в першу чергу виявити найпоширенішу хромосомну хворобу — синдром Дауна (зустрічається з частотою — 1 на 700 новонароджених). Масові біохімічні та УЗ-скринінги на рівні жіночих консультацій не є діагностичними тестами, а служать тільки для «формування груп ризику». Жінок з груп ризику визначають на медико-генетичному консультуванні, де оцінюється ризик народження плода з хромосомним захворюванням за спеціальними алгоритмами. Якщо цей ризик перевищує певне пограничне значення (загальноприйнятим вважається співвідношення 1:270) то жінці рекомендують пройти процедуру інвазивної

пренатальної діагностики, що дозволяє одержати клітини плода для аналізу хромосом.

Процедура інвазивної пренатальної діагностики, передбачає, по-перше, біопсію хоріона під контролем ультразвукового сканування. Ворсини хоріона мають той же генетичний матеріал, що і плід, і тому можуть використовувати для генетичного аналізу. Біопсію хоріона проводять на строках 10–11 тижнів вагітності. Після цієї процедури можливі такі ускладнення:

- ризик викидня (від 2 до 7% за матеріалам різних клінік);
- ризик інфікування плода;
- ризик кровотеч у жінки;
- випадкове пошкодження плідного пухиря;
- підсилення резус-конфлікту на протязі резус-конфлікту між матір'ю і плодом;
- відхилення у розвитку плода при тривалому впливі ультразвуку на плід.

Інколи, за технічними обставинами, не вдається провести аналіз зразків тканини. Результати одержують на протязі 3-4 днів після забору матеріалу.

По-друге, проводиться амніоцентез — пункція навколоплідного пухиря з забором невеликої кількості навколоплідних вод на 16–24 тижнях вагітності і цитогенетичне дослідження виділених зародкових клітин. Можливості амніоцентезу дещо більші, ніж біопсії хоріону, але необхідно більше часу (2–3 тижня) для культивування клітин. Небажаним моментом є тривалий вплив ультразвуку на плід. Дещо збільшується ризик народження дитини з маленькою вагою і ризик дихальних порушень у новонародженого. Деякі дослідження свідчать про підвищення ризику спонтанного викидня до 20 тижня вагітності і ризику еквіноварусної косолапості.

По-третє, це плацентоцентез і кордоцентез — біопсія плаценти і забір пуповинної крові плода. Плацентоцентез проводять як правило у другому триместрі вагітності, як і амніоцентез. Кордоцентез — пункція пуповини плода і забір крові. Оптимальний строк виконання кордоцентезу — 22–25 тижнів вагітності. Процент ускладнень (частіше за все переривання

вагітності) при плаценто- і кордоцентезі дорівнює 5% (за іншими джерелами до 10%). Дослідження виконуються під наркозом, амбулаторно або з короткочасною госпіталізацією. Методи дозволяють діагностувати хвороби, пов'язані зі змінами кількості і якості хромосом, а за наявності молекулярно-генетичної лабораторії — і більшість генних хвороб. Недоліком є великий строк вагітності, на якому ці дослідження проводяться. У випадку підтвердження діагнозу грубої патології, переривання вагітності у цей період потребує тривалої госпіталізації і може мати ускладнення.

Слід відмітити, що всі інвазивні втручання проводять зі згоди вагітної. Проведення таких маніпуляцій здійснює спеціаліст, який володіє інвазивними методами діагностики, за участю лікаря ультразвукової діагностики, лікаря-лаборанта. Результати проведеного дослідження в доступній формі заносяться до бланку лабораторно-генетичного аналізу. Якщо виявляється у плода якась аномалія, родина одержує інформацію про діагноз, прогноз розвитку захворювання, а також рекомендації про подальше ведення вагітності. Якщо вагітна приймає рішення про переривання вагітності, їй надається направлення до акушерсько-гінекологічного закладу для переривання вагітності за медичними показаннями.

Кожна жінка, її родина вправі самостійно обирати долю вагітності, спираючись на її/їх матеріальні, моральні, соціальні можливості, якщо мова іде про народження хворої людини. Не кожне суспільство добре сприймає людину з вадами розвитку.

Етичні аспекти ДНК-діагностики

ДНК – діагностика людини на різних етапах його життя застосовується з метою виявлення генетичного обумовлення захворювання, яке має людина, а також під час аналізу органів і тканин, які необхідні для трансплантації.

Використання ДНК-діагностики дозволяє виявити наявність хвороб, викликаних генетичною патологією, і схильність до ряду соматичних і

психічних захворювань. Виявлення схильності до розвитку тої чи іншої хвороби дозволяє прийняти відповідні профілактичні заходи. Вона торкається галузі життєвих цінностей і стратегій поведінки тільки однієї людини, яка приймає рішення про те, як використати одержану нею інформацію про власне здоров'я.

Під час генетичного діагностування ДНК дорослої людини на перший план виходить проблема зберігання тайни медичної інформації і проблеми використання одержаної такої інформації. Можливості сучасних генетичних технологій, які дозволяють одержати інформацію про генетичні хвороби і схильності людини та пов'язані з цим ймовірності розвитку того чи іншого захворювання, ставлять питання про необхідність і бажаності для пацієнта такої інформації. Це питання є частиною більш широкого етико-філософського питання про бажання людини знати своє майбутнє, особливо неприємного. Чи хоче людина знати, що вона не дивлячись ні на що захворіє і на яку саме хворобу? Чи бажає людина знати час своєї смерті? Такі питання мають велике значення для розуміння необхідності людини в тих чи інших біомедичних технологіях та організації їх застосування на практиці. В реальному житті людина ж у більшості випадках підлягає медико-генетичному обстеженню у відповідності до власного добровільного, рішення, тобто бажаючи одержати таку інформацію про себе.

Медико-генетичне консультування і діагностика, про які вже йшла мова вище, проводяться у відповідності з принципами добровільної інформованої згоди, з обов'язковим дотриманням правил конфіденційності.

Генетичний скринінг представляє собою тести, які проводяться для систематичної ранньої діагностики спадкових хвороб, резистентності до захворювання або виявлення носійства мутантного гена, який може призвести до хвороб у нащадків. Його мета може бути не тільки запобігання чи лікування захворювання; результати скринінгу дозволяють прийняти рішення людині, яка досліджується, відносно репродуктивної поведінки або вибору певного образу життя.

До числа можливих негативних наслідків генетичного скринінгу входять: психологічний стрес, викликаний інформацією, яку не можна використовувати для певного особистого вибору або яку важко зрозуміти та інтерпретувати; надмірний тиск на особистий вибір з боку суспільства, лікарів, членів родини; соціальна стигматизація осіб з підвищеним генетичним ризиком або осіб, які ухиляються від запропонованого генетичного скринінгу; розкриття генетичної інформації про членів родини, які не дали згоди на тестування; неправомірне використання інформації і дискримінація на підставі результатів тесту при використанні даних третіми особами, наприклад, співробітниками страхових компаній чи роботодавцями.

Не дивлячись на прийняті постанови постають етичні проблеми генетичного скринінгу: добровільність або обов'язковість, проблеми особистого вибору і різні форми примушення членів суспільства, захист конфіденційності одержаних даних, дискримінації і стигматизації за генетичними ознаками.

Введенню генетичного скринінгу повинно передувати створення відповідної медичної інформаційної служби і системи генетичних консультацій для консультування родин за результатами тестування. Програмі масового скринінга завжди повинна передувати пілотна фаза, яка проводиться з частиною популяції з оцінюванням позитивних і негативних результатів скринінгу на всіх рівнях, в тому числі:

- ❖ оцінка ефективності тесту, його надійність, можливості і недоліки;
- ❖ використання результатів таких тестів у процесі прийняття рішень;
- ❖ простота процесу скринінгу;
- ❖ психологічні і соціальні наслідки скринінгового тесту та його клінічна досконалість;
- ❖ економічна ефективність програми скринінгу;
- ❖ укомплектованість штату, необхідного для початку роботи програми;
- ❖ загальну вартість програми.

Результати пілотної фази є основою для прийняття остаточного рішення про впровадження програми, яке здійснюється спеціалістами, що

забезпечують медичне обслуговування та особами, які представляють інтереси пацієнтів.

Інформація про цілі, задачі скринінгу, можливих альтернативах для родини повинна передувати скринінгу, як добровільному, так і обов'язковому. Як вже говорилося раніше, результати тестів повинні супроводжуватися генетичним консультуванням. Такі результати тестів, в тому числі обов'язкового скринінгу, повинні бути частиною медичної документації, і на них поширюється та ж ступінь захисту конфіденційності, як і на будь-які медичні документи.

Скринінг новонароджених на виявлення хвороб, які лікуються, прийнятий як частина рутинної допомоги немовлятам і у більшості держав не потребує письмової згоди батьків. Загально прийнято, що участь у скринінгу новонароджених є обов'язковим в інтересах виявлених хворих дітей для своєчасної діагностики і лікування. Батьки інформуються про такі програми; якщо вони не згодні на обстеження своєї дитини, то для захисту її інтересів проти них можуть застосовуватися правові акції згідно законодавству.

Скринінг дітей для ранньої діагностики і своєчасного лікування в інтересах їх здоров'я і суспільства повинні бути не тільки обов'язковими, але і безкоштовними. Обов'язковою умовою його проведення є доступність своєчасного та адекватного лікування хвороби. Запроваджуючи скринінг новонароджених на певні хвороби, держава бере на себе етичну згоду забезпечити доступне і своєчасне лікування всіх хворих, або захворювання не повинне включатися в обов'язковий скринінг.

Всі інші види скринінгу повинні бути добровільними і їм повинні передувати консультація і процедура одержання інформованої згоди. Всі особи, які проходять генетичне тестування, в тому числі батьки новонароджених, повинні одержати інформацію до скринінга про головні характеристики хвороби, обмеження тесту (можливих ложнопозитивних, ложнонегативних або невизначених результатах), ймовірність одержання несприятливих результатів тесту і можливих наслідків таких результатів. Можливі соціально-економічні наслідки негативних результатів тесту, такі як

зміни у страхуванні здоров'я або життя, відмову у працевлаштуванні, дискримінація у школі і т.д. повинні включатися в опис ризиків. Якщо можливі протирічні результати, люди повинні знати про це. Жінки, які направляються на біохімічне тестування під час вагітності, повинні знати до скринінгу про те, що вони можуть встати перед проблемою абору. Всі повинні знати, що можуть відмовитися від скринінгу.

Таким чином, кожне суспільство має бути підготовлене для проведення та інтерпретації будь-яких генетичних досліджень, перш ніж їх використовувати. Не всі країни мають таку підготовку за різних причин, можливо тому, вони і не поспішають запроваджувати різні генетичні тестування. Результати генетичних досліджень людина, яка обстежується, має знати, якщо вона готова до цього і тільки вона може їх використовувати при потребі. Медичному персоналу слід навчитися бути конфіденційними за будь-яких обставин.

Сурогатне материнство і донорство стовбурових клітин

Чи замислювались Ви над питанням: чи може жінка – донор яйцеклітини висунути свої права на дитину, яка з'явилася в результаті штучного запліднення і у якої не має жодної її хромосоми, проте присутня її особиста – мітохондріальна – ДНК? Молекули ДНК у людини містяться, як відомо, не тільки в ядрі клітини, але і в цитоплазмі, в мітохондріях – органелах, що відповідають за клітинну енергетику. На відміну від ядерної, мітохондріальна ДНК (мтДНК) потрапляє до наступного покоління тільки через материнську яйцеклітину. Батько ніколи не передає свої мітохондрії дітям. Як мтДНК бере участь у спадковості поки не відомо. Але якось бере участь, якщо передається від матері всім її дітям, а потім від доньок до їх дітей і т.д. Іншими словами, всі ми маємо у своїх клітинах мтДНК загальну для всіх нас праматері Єви. Якщо так, то і всі розмову про клонування організмів – поки що пусті мрії. Пересаджують зараз тільки ядерні гени, а мітохондріальні гени у клонованого організму будуть від тої клітини, куди

пересадили ядерні гени, тобто чужі. Дитина, в свою чергу, може сказати, що у неї є дві генетичні матері – за хромосомною і за мітохондріальною ДНК. Отже, можливо, що з часом юристам прийдеться розглядати питання про право власності на ДНК — клітини можуть бути взяті без згоди людини.

Юридична сторона проблеми повинна торкатися також питання клітин мертвої людини. Постає питання: хто має право власності на генетичний матеріал померлого для наступного його клонування? Чи може особа, чий клітини були клонованими після смерті, вважатися батьком/матір'ю? Виникає необхідність створення правової бази, на підставі якої можливо уникнути зловживання клонуванням. Наприклад, деякі дослідники поведінки людини вважають, що риси характеру, поведінка, схильність до жорстокості, алкоголізму і т.д. генетично обумовлюються. Тому клонування засуджених насильників, алкоголіків, наркоманів і т.д. дуже небезпечно.

Етичні проблеми, які стосуються стовбурових клітини, відрізняються певними особливостями. Як правило в клініці виникають етичні колізії, між двома учасниками — пацієнтом і лікарем. У випадку ж застосування стовбурових клітини приєднується третя сторона — донор цих клітини. Проблема одержання стовбурових клітини, їх культивування і трансплантація складають самостійний потік складних етичних проблем.

Головне питання, навколо якого ведуться дебати по ембріональним стовбуровим клітинам, - це моральний та юридичний статут ембріона. Одержання колонії стовбурових клітини з раннього ембріона означає загибель цього ембріона, відмова йому у можливості розвитку у повноцінний організм. Якщо ембріон - це людська істота, особистість, то з ним недозволено робити нічого, що недопустимо робити з людиною (навмисно убивати, завдавати шкоди, причиняти біль і т.д.). Якщо ембріон на ранній стадії розвитку - це лише скупчення клітин, то ні етичні норми, ні закон не зможуть заборонити використовувати його для різних суспільно корисних цілей. Якщо це проміжна форма життя, то використання його в принципі можливе, але з певними обмовленнями.

Тема статуту ембріону пов'язана з питанням про законність довільних абортів. Але у випадку стовбурових клітин проблема статусу ембріона набуває нового виміру. Це зв'язано з мотивацією даного роду наукових досліджень - пошуку нових, більш ефективних способів лікування важких хвороб, для яких об'єктивно не існує засобів у сучасній медицині. Тому, на думку багатьох, традиційні аргументи проти абортів чи репродуктивного клонування не можуть бути повністю застосованими до досліджень стовбурових клітин.

Питання правового і морального статусу ембріона - це питання не тільки природниче, скільки біоетичне і релігійне. Тут стикаються дві ідеологічні установки, за кожною з яких стоїть глибоке проникливе моральне обміркування. З одного боку, це установка на благоговіння перед людським життям, вихідним пунктом якого, як би це не заперечувалось, все ж таки є запліднення. З іншого боку, це намагання позбавити хворих людей від страждань.

Хоча для більшості людей питання про використання ембріональних стовбурових клітин є надзвичайно складним і вибір того або іншого рішення не однозначний. У різних релігійних течіях вже склалася досить визначена думка з цього приводу.

Римо-католицька і православна церкви, а також більшість протестантів говорять про те, що життя людської істоти починається у момент запліднення яйцеклітини. Ембріон – це вже індивід, особистість, тільки на ранній стадії розвитку. У цьому випадку знищення ембріона рівноцінне вбивству людини. При такому баченні використання людського ембріона незалежно від цілей є аморальним.

Протилежна позиція належить широкому спектру ліберальних протестантських традицій і полягає у тому, що становлення особистості не прив'язано до певного моменту у часі, а залежить від досвіду спілкування з оточуючим світом, від здатності сприймати те, що надає життю змісту і цінність. Поява людини тут розглядається саме як становлення, як поступовий процес, розтягнутий у часі, який протікає вже після народження

дитини. В такому розумінні ранній ембріон не є людиною, і немає нічого поганого у використанні його у благодійних медичних цілях.

Більш ліберальний по відношенню до цієї проблеми сучасний іудаїзм, оскільки у талмудичній традиції запліднення яйцеклітини взагалі не розглядається як початок життя людської істоти. Людський статус набувається на більш пізній стадії розвитку ембріона. До того ж, за межами жіночого організму у ембріона взагалі немає ніякого правового статусу, а значить ембріон, одержаний *in vitro* і не запланований для імплантації, може без будь-яких перешкод використовуватися в медичних дослідженнях, що відповідає іншій важливій іудаїстській концепції: зберігання життя і здоров'я людини - першочергова моральна задача.

За уявленнями мусульман, ембріон набуває душі лише на 40-й або 120-й день після запліднення (в залежності від конкретної трактовки Корану), що знімає будь-які обмеження, бо стовбурові клітини культивуються з 5-6-денного ембріона.

Наявність значних ідеологічних розбіжностей з біоетики стовбурових клітин викликає необхідність суттєвого державного регулювання. Проблематика статусу ембріона і стовбурових клітини є загальнолюдською дилемою, яка по різному звучить в різних суспільствах. У всьому світі на національному, релігійному і міжнародному рівнях намагаються, з одного боку, підвести проблематику стовбурових клітини під існуючу нормативно-правову базу, а з іншого - створити нове законодавство і відомчу базу спеціально для регулювання досліджень зі стовбуровими клітинами. В принципі, терапія стовбуровими клітинами може бути дуже корисною для відновлення пошкоджених функцій печінки, головного мозку.

На сьогодні вже є великий досвід відновлення пошкоджень хрящової тканини суглобів при механічних травмах. Перспектива прикладного застосування таких досліджень непогана, але ще не відпрацьовано чимало аспектів, зокрема, не досить вивчені віддалені наслідки такої маніпуляції. Існує думка, що під час цієї процедури можливе перенесення чужого

генетичного матеріалу, проникнення генома донора у геном реципієнта. Які будуть наслідки такого втручання? Сьогодні передбачити це доволі складно.

Законодавча база України з питань біоетики

Нормативно-правової бази з біоетики Україна поки що не має. На сьогоднішній день є законопроект, які присвячений біотичним питанням, але поки що він обговорюється на різних рівнях державної влади. Законодавство України в галузі охорони здоров'я згідно ст. 9 Основного закону України адаптується до відповідних міжнародних документів, якщо є згода на це Верховної Ради. Через законодавство України втілюються основні документи міжнародних організацій щодо дотримання біоетичних норм і принципів у практиці охорони здоров'я. Основою таких нормативних актів є право людини на гідне життя і повага до людської особистості.

Логічним доповненням до Європейської конвенції з прав людини та Європейської соціальної хартії є Європейська конвенція «Про захист прав та гідності людини у зв'язку з використанням досягнень біології і медицини», яку підписала Україна разом із 22 державами. Це означає, що законодавчі акти стосовно охорони життя і здоров'я повинні формуватися згідно з вимогами останньої Конвенції, заснованої на принципах біоетики. Погляд біоетики на медицину спрямовує увагу на високу цінність служіння життю, бо це є основою гуманізації суспільства.

Законодавство України про охорону здоров'я базується на Конституції України, де одним із головних принципів є забезпечення пріоритету загальнолюдських цінностей над іншими інтересами. У медичній практиці дозволене застосування медико-біологічних досліджень з суспільно корисною метою за умови їх наукової обґрунтованості, переваги успіху над ризиком, заборонене проведення експериментів над хворими, ув'язненими, військовополоненими

Рекомендація парламентської Асамблеї Ради Європи № 1046/1986 проголошує, що і зародкам та ембріонам людини властива людська гідність,

тому за всіх умов слід ставитися до них з належною повагою і будь-яке втручання в їх організм, навіть нежиттєздатних, повинно бути заборонене (експерименти, взяття органів для трансплантації тощо) (п. 10), а забезпечити це мають законодавчі органи кожної окремої країни.

Особливої уваги органів державного управління заслуговує законодавство щодо трансплантації органів. У відповідному Законі України існують деякі суттєві етичні обмеження щодо трансплантації органів та інших анатомічних матеріалів людини (№ 1007-XIV/1999), хоча практика пересадки у медицині України дещо відстає від інших країн. Дія цього Закону не поширюється на аутотрансплантацію, імплантацію та трансплантацію статевих залоз, репродуктивних клітин та живих ембріонів.

Закон України про охорону здоров'я дозволяє штучне запліднення та імплантацію ембріона за згодою подружжя та при збереженні анонімності донора (ст. 48). Законом України про охорону здоров'я також дозволений аборт.

Органи державного управління України в процесі законотворчості досить енергійно й результативно працюють над втіленням принципів біоетики. Це помітно, зокрема, у посиленій увазі до біоетики як дослідницької дисципліни. При Кабінеті Міністрів України у 2001 р. створена Комісія з питань біоетики, яку очолив віце-президент АМН України Ю. І. Кундієв. Діяльність комісії визначають такі основні завдання: підготовка рекомендацій для проведення біоетичної експертизи в Україні; розробка пропозицій до законодавчого регулювання в галузі біоетики; забезпечення участі України у міжнародному співробітництві з питань біоетики; інформування населення про досягнення і наявні проблеми в галузі біоетики тощо. Комісія з питань біоетики може спиратися у своїй роботі на практику функціонування Української асоціації з біоетики, Інституту біоетики ім. Ярослава Базилевича, що взяли на себе обов'язок розповсюдження ідей біоетики в Україні та зарубіжного досвіду впровадження їх принципів у практику охорони здоров'я, спільно з

державними органами системи охорони здоров'я пропагують створення комітетів біоетики в усіх закладах охорони здоров'я.

Головний принцип діяльності Інституту біоетики — це повага до гідності людини як особистості у своїй інтегральності (тобто духовній, душевній і тілесній єдності), збереження життя та здоров'я людини з моменту запліднення до природної смерті. При цьому інтереси людини повинні бути вищими за інтереси науки чи суспільства.

Лише за останні роки помітно зросла кількість опублікованих статей та монографій з біоетики, перекладаються праці відомих мислителів заходу, ідеї яких стають доступними широкому загалу суспільства. В Україні були проведені: Перший українсько—британський симпозіум з біоетики (м. Київ, 2000 р.); Міжнародний симпозіум «Біоетика на межі III тисячоліття» (м. Харків, 2000 р.); Перший національний конгрес з біоетики з міжнародною участю (м. Київ, 2001 р.); Другий міжнародний симпозіум з біоетики, присвячений пам'яті Р. Поттера (м. Київ, 2002 р.); Міжнародна науково-практична конференція «Формування особистості студентів як майбутніх фахівців лікарської справи, працівників охорони здоров'я та інших соціально-орієнтованих у установ у контексті біоетики» (м. Львів, 2003 р.) і т.д.

Утверджується біоетика як навчальна дисципліна, чому сприяє Центральний методичний кабінет з вищої медичної освіти Міністерства охорони здоров'я України. На рівні державних освітніх програм поступово впроваджується предмет «Біоетика», однак біоетичне мислення ще не стало надбанням не тільки широких верств населення, але не одухотворило працю і творчу думку багатьох представників науки і освіти.

Згідно наказу Міністерства охорони здоров'я України від 01.11.2000 р. за № 281 «Про затвердження Інструкції до лікарських засобів та експертизи матеріалів клінічних випробувань і типового положення про комісію з питань етики» в Україні розпочатий процес формування етичних комітетів на базі установ охорони здоров'я. Інструкція містить основні вимоги до проведення клінічних випробувань лікарського засобу, які можуть проводитися на

пацієнтах (добровольцях) за повною чи скороченою програмою, а також наголошує на необхідності створення спеціальних комісій з питань біоетики для проведення експертизи клінічних випробувань. Функції цих комісій співпадають з основними завданнями комітетів з етики, передбаченими міжнародними нормами.

Питання для самоконтролю

1. Дайте визначення біоетиці.
2. Розкажіть про етичні аспекти ДНК-діагностики.
3. Що Ви знаєте про законодавство щодо трансплантації органів?
4. Розкажіть про етичні аспекти сурогатного материнства і донорства стовбурових клітин.
5. Що Вам відомо про біоетичні заходи в Україні?

ЛІТЕРАТУРА

1. Антологія біоетики / За ред. Ю. І. Кундієва. — Львів: БаК, 2003. — 592 с.
2. Бюлетень законодавства і юридичної практики України: Законодавство України про охорону здоров'я від 22.02.2000 р. — № 7. — 528 с.
3. Верхратський С.А. Історія медицини. — К.: Вища школа, 1974. — 336 с.
4. Верхратський С.А., Заблудовський П.Ю. Історія медицини. — К.: Вища школа, 1991. — 431 с.
5. Закон України «Про трансплантацію органів та інших анатомічних матеріалів людини»// Законодавство України про охорону здоров'я. — К.: Юрінком-Інтер, 2000. — С. 367—374.

6. Европейская Комиссия. Независимая экспертная группа. 25 рекомендаций по этике, юридическим и социальным последствиям генетического тестирования. Люксембург: Отдел официальных публикаций Европейского сообщества, 2004. 26 с.
7. Етичні комітети. Становлення, структура, функції / Під. ред. В. Л. Кулініченка, С. В. Вековшиніної. — К.: Видавець Карпенко В. М., 2002. — 160 с.
8. Программы массового скрининга: технические, социальные и этические вопросы. Рекомендации Европейского общества по генетике человека. // Медицинская генетика. 2006. Т. 5, № 3. С. 21–23.
9. Про порядок штучного переривання вагітності: Постанова Кабінету Міністрів № 992 від 16.03.2000 р.
10. Сгречча Е, Тамбоне В. Биоэтика. — М.: Из-во Библийского-Богословского института, 2002. — 420 с.
11. Смольняков А.И, Федоренко Е.Г. Врачебная этика. — К.: Здоров'я, 1982. — 96.
12. Судо Ж. Аборт // Семья и биоэтика: Матер. междун. симпозиума 20—23 мая 1998 года. — СПб., 1998. — 312 с.
13. Этическая экспертиза биомедицинских исследований. Практические рекомендации / Под общ. ред. Ю.Б.Белоусова. Изд. 2-е. М., 2006. С. 92–115.
14. Чикин С.Я. Врачи-философы. — М.: Медицина, 1990. — 384 с.
15. Potter V.R. Bioethics: the science of survival// Perspectives in biology and medicine. — 1970. — N 14, V.1. — P.127-153.
16. World Medical Association. Declaration of Helsinki, Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. 2000.
17. <http://www.dt.ua/articles/29959?section=newspaper#article>
18. <http://www.pediatr-site.ru/tags/%CC%C3%CA/>
19. <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=n0001100-00>

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АпоЕ - аполіпопротеїн Е

АФП - α -фетапротеїн

ВВР - вроджені вади розвитку

ГКГ=МНС - головний комплекс гістосумісності

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

іРНК – інформаційна рибонуклеїнова кислота

ІХС - ішемічна хвороба серця

КЗЛЛ - комплемент залежного лізису лімфоцитів

ЗЗК – запрограмована загибель клітин мРНК – матрична РНК

МАР - малі аномалії розвитку

МВВР - множинні вроджені вади розвитку

МТЗ – мітохондріальні захворювання

мтДНК – мітохондріальна ДНК

ПДГ - піруватдегідрогенази

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

п.н. – пари нуклеотидів

РЕА - раково-ембріональні антигени

СД - синдром Дауна

СТГ - соматотропний гормон

ЦНС – центральна нервова система

ядНК – ядерна ДНК

ISBT - міжнародне товариство переливання крові

СЛОВНИК НАУКОВИХ ТЕРМІНІВ

Аберация хромосомна (або хромосомна аномалія) – узагальнена назва будь-якого типу хромосомних мутацій: делецій, транслокацій, інверсій, дуплікацій та інш. Інколи цим терміном також позначаються і геномні мутації (анеуплоїдії, гаплоїдії, трисомії тощо).

Аденовіруси, adenovirus – група ДНК-вмісних вірусів збудників захворювань дихальних шляхів і очей людини, великої рогатої худоби, собак, мишей, птахів. Розмножуються у ядрі і потрапляють у цитоплазму вже зрілими.

Активний домен – місце, що є на кожній хромосомі людини, куди може вмонтуватися чужорідний ген.

Алелізму критерії – тест для виявлення алельності мутацій, які мають подібний фенотиповий прояв.

Алелі множинні – різні мутантні стани одного й того самого гена, який займає певний локус у хромосомі.

Алель – одна з двох чи більше альтернативних форм гену, кожна з яких характеризується унікальною послідовністю нуклеотидів.

Алельні гени, allelic gene – гени, які займають ідентичні локуси в парі гомологічних хромосом; кожен член цієї пари називається алелем.

Алерген – антиген навколишнього середовища, що ініціює реакцію гіперчутливості негайного типу. Алергени, які проникають в організм через дихальні шляхи, мають наступні особливості: 1) усі вони є білками, що відносяться до категорії Т-залежних антигенів; 2) висока розчинність в умовах вологого середовища дихальних шляхів сприяє швидкій дифузії алергенів із часток, які потрапили до дихальних шляхів; 3) низька молекулярна маса забезпечує алергенам відносно вільне проникнення у слизову; 4) низька

провокуюча доза сприяє включенню у відповідь хелперних CD4 Т-клітин; продукція цими клітинами інтерлейкіна-4 забезпечує переключення синтезу імуноглобулінів в В-клітинах на IgE-ефекторну молекулу алергічних реакцій.

Алергія (грецьк. *allos* – інший та *ergon* – дія) – змінена форма реакції організму при повторній зустрічі з антигеном, або гіперчутливість I типу, форма імунологічної відповіді, що виявляється у підвищеній чутливості організму до різноманітних антигенів (т. зв. алергенів); при алергії організм відповідає на специфічний алерген надмірною реакцією, яка пошкоджує його власні тканини внаслідок набряку та запалення, спазму й розслаблення гладенької мускулатури, порушень мікроциркуляції та гемодинаміки.

Алогенний – термін, що відображає генетичну відмінність між індивідами одного виду.

Алоантигени – антигени, які кодуються генами, що в даного виду зустрічаються в алельній формі.

Ампліфікація генів, *gene amplification* – розмноження гена шляхом створення експериментальних копій в клітині та пробірці методом полімеразної ланцюгової реакції.

Аналізуюче схрещування – схрещування гібрида першого покоління з рецесивною ознакою батьків.

Антиген – будь-яка молекула, що може бути розпізнана антитілами, або антигенрозпізнавальним Т-клітинним рецептором; може мати як екзогенне, так і ендогенне походження.

Антикодон – триплет нуклеотидів на одній з кінцевих ділянок транспортної РНК, комплементарний певному кодону іРНК.

Антитіла – глобулярні білки (глікопротеїни) класу імуноглобулінів, що володіють здатністю до специфічного зв'язування з антигеном і утворюються в організмі у відповідь на введення у нього чужорідних речовин для нейтралізації їх шкідливої дії.

Антитіло моноклональне – антитіло, штучно одержане із клітинного клону і тому містить тільки один тип імуноглобуліну. Моноклональні антитіла утворюються шляхом з'єднання антитіло-утворювальних лімфоцитів, що є в

селезінці миші, із клітинами мишачої мієломи. Гібридні клітини, що утворюються в результаті такого з'єднання, починають швидко розмножуватися (аналогічно злоякісним клітинам) і виробляти те саме антитіло, що і лімфоцити, з яких вони походять.

Антропогенетика (генетика людини) це галузь генетики, яка вивчає спадковість і мінливість у людини, а її результати мають практичне значення для медицини, для вирішення соціологічних, юридичних та інших проблем.

Аутбридинг – віддалене, не споріднене схрещування.

Аутосома – звичайна, не статева хромосома.

Аутосомно-рецесивні ознаки чи захворювання проявляються лише тоді, коли відповідні гени знаходяться в гомозиготному стані (aa).

Біоетика — вчення про моральний бік діяльності людини в медицині і біології.

Біохімічна генетика людини досліджує біохімію нуклеїнових кислот, білків і ферментів у здорових і хворих людей.

Близнюковий метод запропонував англієць Ф. Гальтон для визначення ролі спадковості і середовища у розвитку психічних властивостей людини.

Вектори – нехромосомні елементи (плазміді, лізогенні віруси) здатні переносити штучно приєднаний до них ген у геном реципієнта.

Взаємодія генів – розвиток ознаки під спільним впливом двох або кількох генів.

В-клітини – одна з популяцій лімфоїдних клітин, яка взаємодіє з Т-лімфоцитами і макрофагами для забезпечення імунологічних реакцій, що розвиваються у відповідь на генетично чужорідні субстанції – антигени. Після контакту з антигеном В-лімфоцити перетворюються в плазматичні клітини, які починають продукувати специфічні імуноглобуліни – антитіла.

Видова специфічність – специфічність, завдяки якій представники одного виду організмів відрізняються від іншого.

Вставка, інсерція – вбудовування довгих фрагментів додаткового генетичного матеріалу в геном.

Галактоземія – спадкове захворювання, під час якого порушується обмін галактози.

Гамета – статеві клітини.

Гаметогенез – процес утворення гамет шляхом кількох мейотичних поділів після спорогенезу – утворення клітин-спор в результаті мейозу.

Гаметогенофонд – генофонд статевих клітин.

Гемоглобінопатії – спадкові захворювання, які найчастіше є результатом порушення структури і регуляції синтезу глобінів.

Гемофілія – спадкове захворювання зчеплене з Х-хромосомою, для якого характерна порушення згортання крові.

Ген – послідовність нуклеотидів у ДНК або РНК, котра забезпечує певну функцію в клітині чи в організмі шляхом контролю синтезу білка (або РНК).

Генеалогічний аналіз полягає у дослідженні генеалогічних дерев. завдяки йому можна отримати інформацію про характер тої чи іншої ознаки (спадкова вона чи ні), тип спадкування (аутосомно-домінантна, аутосомно-рецесивна чи зчеплена зі статтю), зиготність пробанда (гомо- чи гетерозиготний за даною ознакою), а також про ступінь пенетрантності та експресивності певного гену.

Генетика поведінки – це наука про спадкові фактори, що визначають поведінку здорових і хворих людей.

Генетичний код – спосіб переведення послідовності розміщення нуклеотидів у молекулі ДНК у послідовність амінокислот білкової молекули.

Генетичний скринінг полягає у тестах, які проводяться для систематичної ранньої діагностики спадкових хвороб, резистентності до захворювання або виявлення носійства мутантного гена, який може викликати захворювання у нащадків.

Гени комплементарні – неалельні гени, наявність домінантних алелів яких (хоча б по одному для кожного гена) зумовлює такий прояв ознаки, який не спостерігається за наявності лише одного з домінантних алелів окремо.

Гени-модифікатори – гени, які змінюють прояв ознаки, що контролюється іншими неалельними їм генами.

Гени полімерні – неалельні гени однакової дії, що зумовлюють розвиток однієї ознаки.

Генна інженерія – сукупність заходів, методів і технологій отримання рекомбінантних РНК і ДНК, виділення генів з організму (клітин), здійснення маніпуляцій з генами, введення їх в інші організми з метою їх експресії.

Генна терапія – введення рекомбінантної ДНК чи РНК у клітину, функцію якої вони нормалізують .

Геном – загальна генетична інформація, яка знаходиться у генах організму, або генетичний склад клітини. Інколи термін «геном» використовується для позначення гаплоїдного набору хромосом.

Геномна інженерія — це створення нового геному в клітині.

Геномні мутації – полягає у зміні плоїдності хромосом.

Генотип – 1) вся генетична інформація організму; 2) генетична характеристика організму за одним або декількома локусами, які вивчаються.

Генофонд – генетична різноманітність популяції або виду.

Генні мутації викликаються змінами структури ДНК, що призводить до порушень синтезу поліпептидних ланцюгів білкових молекул, структурних транспортних білків і білків-ферментів.

Гетерозиготність – генетична особливість організму, який виник від злиття гамет з різними алелями.

Гетерозиготний організм – організм, який має дві різні форми певного гену (різні алелі) у гомологічних хромосомах.

Гібридома – гібридна лінія клітин, одержаних від злиття нормальних лімфоцитів з пухлинними клітинами мієломи, здатними до безконтрольного синтезу антитіл і необмеженого росту на штучному поживному середовищі.

Голандричне успадкування – успадкування генів Y-хромосоми.

Гомозиготність – генетична однорідність зиготи (організму), яка виникла від злиття гамет, ідентичних за якісним, кількісним складом і структурним розміщенням усіх або частини генів

Група зчеплення – сукупність усіх генів, локалізованих в одній хромосомі.

Дальтонізм – спадкове захворювання, зчеплене з X-хромосомою і характеризується нездатністю людини розрізняти кольори.

Дизиготні близнюки (ДБ) розвиваються внаслідок одночасного запліднення двох чи більше яйцеклітин. Це може відбутися завдяки одночасному утворенню двох яйцеклітин у двох фолікулах, або внаслідок того, що друге редукційне тільце такого ж розміру, як і нормальне яйце.

Делеція – втрата (випадання) внутрішньої ділянки хромосом.

Дефішенсі – структурна зміна хромосом, за якої відбулась втрата кінцевої ділянки хромосом.

Дискордантність – прояв у однайцевих близнюків несхожості за якоюсь з ознак.

Дрейф генів – зміни генетичної структури невеликої за чисельністю популяції, викликані дією випадкових причин.

Екзони – послідовності структурних генів еукаріот, які представлені в молекулі іРНК і кодують структуру кінцевого продукту гена.

Екотип – група організмів, генетично пристосованих до певних умов середовища.

Експресивність гена – ступінь фенотипового прояву гена, міра сили гена, яка визначається за ступенем розвитку ознаки.

Електропорація – різновид електрофорезу ДНК.

Ідіограма – зображення каріотипу у вигляді діаграми.

Ідіотип – сукупність усіх спадкових факторів організму, зосереджених у геномі.

Ізоантигени – антигени, завдяки яким різні особини або групи тварин одного виду різняться між собою.

Імунітет – спосіб захисту організму від живих тіл і речовин, котрі несуть на собі ознаки генетичної чужорідності.

Імунітет гуморальний – імунітет, основним ефектором якого є антитіла.

Імунітет клітинний – імунітет, основним ефектором якого є клітини, сенсibilізовані лімфоцити та продуковані ними лімфокіни.

Імунна відповідь – реакція імунної системи організму на агенти, що несуть ознаки генетично чужерідної інформації.

Імунна система – сукупність всіх лімфоїдних органів і скупчень лімфоїдних клітин тіла.

Імуногенетика – наука, яка вивчає закономірності спадкування антигенної специфічності і роль генетичних механізмів у здійсненні імунних реакцій.

Імуногенетика людини – це в значній мірі генетика груп крові, імуноглобулінів і тканинних антигенів.

Імунна інженерія – створення гібридної клітини (гібридоми) шляхом злиття клітини мієломи, здатної до безмежного розмноження, з лімфоцитом імунізованої тварини, що виробляє антитіла проти певного антигену.

Імуноглобуліни (Ig) – сукупність білків сироватки, котра несе активність «антитіл», раніше називались γ -глобулінами.

IgA – димерний імуноглобулін, існує в сироватковій і секреторній формі; ефектор місцевого імунітету на слизових оболонках та в секретах слинних, слюзових і молочних залоз, здатний до аглютинації; володіє антивірусною, антибактеріальною (за наявності лізоциму) та антитоксичною дією.

IgD – рецептори В-лімфоцитів, які, взаємодіючи між собою, здійснюють контроль за активацією та супресією лімфоцитів, володіють здатністю до спонтанного протеолізу.

IgE – реагіни, ефектори алергії та протипаразитарного імунітету, які розповсюджені на базофілах, тучних клітинах, у носових, слюзових і слинних секретах.

IgG – основні ефекторні молекули імунітету, здатні проникати крізь плаценту, становлять 80% від загальної кількості імуноглобулінів; розповсюджені інтра- та екстравакулярно, здатні до фіксації комплексу та приєднання до макрофагів і нейтрофілів, володіють аглютинаційною здатністю, мають сильну антивірусну, антибактеріальну та антитоксичну дію.

IgM – ефекторні молекули раннього протиінфекційного імунітету, розміщені інтравакулярно; здатні до фіксації комплексу та аглютинації мікроорганізмів, мають антивірусну та антибактеріальну (за наявності комплексу) активність.

Імунодефіцитні стани (імунологічна недостатність) – стан імунної системи, який характеризується недостатністю функції або дефектністю однієї чи декількох її одиниць.

Імуногенність – властивість викликати імунні реакції, опосередковані В- і/або Т-клітинами.

Імунологічна реактивність – специфічна реакція організму на антиген, метою якої є специфічна блокада, нейтралізація, руйнування або елімінація саме тих субстанцій, які стимулювали імунну відповідь.

Імунологічна толерантність – це розпізнавання чужорідного і специфічна терплячість до нього, тоді як імунітет – розпізнавання чужого і нетерпимість до нього.

Імунопатологія – наука, котра вивчає різноманітні захворювання, у генезі яких лежить розлад імунологічних механізмів.

Інбридинг – близько споріднене схрещування.

Інверсія – зміна положення фрагмента хромосоми внаслідок двох розривів, поворот фрагмента на 180° і наступне з'єднання розірваних кінців.

Індуковані мутації викликаються променевою, тепловою і механічною енергією, а також хімічними речовинами, в тому числі і медикаментозними препаратами, і деякими біологічними факторами.

Каріотип – сукупність особливостей хромосомного набору соматичної клітини організму, типова для даного виду організмів.

Кіборг – гібрид між організмом та кібернетичним пристроєм.

Клінічна генетика вирішує завдання діагностики, прогнозування і, в певних межах, лікування різних спадкових хвороб.

Клітини пам'яті – утворюються при первинній імунізації та зберігаються в організмі тривалий час. Клітини пам'яті забезпечують прискорену, більш сильну імунну відповідь при повторній зустрічі організму з антигеном (патогеном), застосованим при первинній імунізації.

Клон – вегетативне або апоміктичне покоління від однієї особини.

Кодон – триплет нуклеотидів, що кодує певну амінокислоту, наприклад, УУУ кодує фенілаланін, ААГ - лізин.

Коефіцієнт інбридингу – це імовірність того, що два алельних гена даного локуса, розміщеного у двох гомологічних хромосомах даної людини, ідентичні, тобто, одержані від одного предка. Це доля всіх локусів, які є гомозиготними у даного індивіда.

Комплемент – система сироваткових білків свіжої крові, фактор природного імунітету тварин і людини; складається з дев'яти компонентів, що включають 11 білків (перший компонент представлений трьома субодинацями) і, приєднуючись до комплексу антиген-антитіло на поверхні клітинної мембрани, викликає лізис бактерій, еритроцитів та інших клітин. Активація комплементу відбувається в результаті взаємодії його компонентів з імунними комплексами (класичний шлях активації).

Кордоцентез — забір пуповинної крові плода.

Критичний вік – період, коли проявляється більшість домінантних захворювань.

Легенда родоводу – письмовий додаток до родоводу, в якому лікар-генетик, спираючись на результати клінічних досліджень, описує особисті дані обстеження про банду та його родини і надає висновок про тип спадкування досліджуваної ознаки чи захворювання.

Леталь – мутація, яка викликає загибель клітини чи особини перед досягненням репродуктивного віку.

Летальні алелі – це алелі, які сприяють внутрішньоутробній смерті або смерті у дитячому віці.

Лімфоцити Т (Т-клітини) – один із класів лімфоцитів, провідна роль яких належить тимусу. Т-лімфоцити – головні учасники Т-системи імунітету, що здійснюють клітинну форму імунного захисту. Основна ознака Т-клітин – наявність Т-клітинного антигенрозпізнавального гетеродимерного рецептора, асоційованого з однодоменними С3-білками, а також маркера Thy-1 (у мишей).

Локус – місце у хромосомі, де міститься ген (два алелі у диплоїдних клітинах).

Маркер – алель (чи ознака), успадкування котрого простежується у нащадків.

Медико-генетичне консультування – спеціалізований вид медичної допомоги – є найпоширенішим видом профілактики спадкових хвороб.

Медична генетика – галузь генетики людини, яка вивчає залежність хвороб людини від спадкових факторів, причини їх виникнення і розробляє запобіжні заходи для дії мутагенних факторів на організм людини.

Мейоз – поділ клітинного ядра, який передуює утворенню статевих клітин – гамет.

Методика екстракорпорального запліднення – запліднення *in vitro* і перенесення ембріону в матку.

Мітоген – субстанція, що викликає неспецифічну проліферацію лімфоцитів (фітогемаглютинін, конканавалін А, мітоген лаконоса).

Мієлома – тип злоякісної пухлини, коли з невідомих причин розростається клон плазматичних клітин, що синтезують повністю однакові молекули γ -глобуліну.

Мієломи клітинна лінія – пухлинна лінія клітин, яка бере початок від одного лімфоцита і продукує лише один певний імуноглобулін.

Моніторинг – постійний контроль, система спостережень за станом довкілля або за окремими його параметрами (рівень радіації, генетичні зміни природних популяцій, хімічний стан води та ін.).

Моногенні захворювання обумовлені порушенням генної експресії на рівні ДНК.

Монозиготні близнюки (МБ) походять з однієї яйцеклітини, заплідненої одним сперматозоїдом, завдяки поділу зиготи на два зародка. Тому їх генотип ідентичний (вони завжди однієї статі).

Моноклон – культура антитілопродуцентів, котрі походять з одного лімфоциту.

Моноклональні антитіла – антитіла однієї специфічності, які продукуються одним клітинним В-клоном і мають назву гібридома. Належать до класу імуноглобулінів і мають одну антигензв'язуючу специфічність.

Моносомік – організм або клітина, в диплоїдному хромосомному наборі якої втрачена одна хромосома.

Мутант – організм, котрий несе мутантний алель.

Мутагенез – процес виникнення спадкових змін – мутацій.

Мутагени – фактори, які викликають мутації – різні види випромінювань, деякі хімічні речовини (гідроксиламін, етиленімін та ін.), віруси.

Мутація – зміна у спадкових структурах (ДНК, гені, хромосомі, геномі).

Незалежне успадкування – успадкування конкретного гена (ознаки) без впливу інших генетичних факторів (іншого гена або статі), як правило, в цих випадках говорять про гени, які входять в різні групи зчеплення.

Незалежний розподіл – розподіл генів, локалізованих на різних хромосомах, в гаплоїдні гамети, тобто наявність числа гамет АВ, аВ, Ab, ab у індивіда з генотипом AaBb. Н.р. лежить в основі закону Менделя про незалежний розподіл ознак.

Незамінні амінокислоти – амінокислоти, які не синтезуються в організмі, але необхідні для його нормальної життєдіяльності. Наприклад – валін, ізолейцин, лейцин, метіонін, треонін, триптофан, фенілаланін, аргінін, гістидин поступають до організму людини (і не тільки) з їжею. Інші амінокислоти відносяться до замінних, деякі з них – умовно; наприклад, тирозин, який утворюється в організмі тільки з фенілаланіну і при недостатньої кількості у їжі може стати незамінним.

Неменделівський фактор – зовнішньоядерний ген, який локалізований у цитоплазматичних органелах.

Неменделівське успадкування – відхилення від очікуваного, згідно законам Менделя, співвідношення частот фенотипів в результаті схрещування, або поява незвичайних фенотипів.

Нулісомік – організм, який втратив пару гомологічних хромосом.

Нуклеосома – основна структурна одиниця хроматину еукаріот у вигляді дисків діаметром біля 10 нм; нуклеосомна структура хроматину сприяє компактизації ДНК.

Онтогенез – індивідуальний розвиток особини (організму) з моменту зародження до природної смерті або до припинення існування одноклітинного організму в наслідок поділу.

Опсоніни (бактеріотропіни) – білкові фактори сироватки крові, які, взаємодіючи з поверхнею чужорідних часток, полегшують їхнє захоплення фагоцитами.

Панміксія – вільне схрещування особин у популяції, основною умовою якого є рівноімовірна зустріч гамет; тобто, всі комбінації спарювання мають однакову ймовірність.

Пенетрантність – це частота чи ймовірність прояву певного гена в популяції. Визначається у процентному співвідношенні у осіб, які несуть даний ген і він у них проявився.

Пігментна ксеродермія – сублетальне захворювання, проявляється у гомозиготних носіїв дефектних генів. У гетерозигот за цим типом дефектна алель викликає сильне ластовиння.

Поліморфізм – визначає наявність багатьох алельних варіантів одного і того ж гена.

Плацентоцентез – біопсія плаценти плода.

Плейотропія – здатність гена зумовлювати не одну, а кілька ознак організму.

Полігенія – наявність декількох неалельних близько зчеплених генів, які контролюють ізогенні ознаки.

Популяційна генетика людини з'ясовує поведінку генів у великих популяціях і, крім того, вивчає дію в людських популяціях таких факторів, як дрейф генів, міграції, мутації та ін.

Популяція – сукупність особин одного виду, які займають певну територію, відрізняються за генотипом і здатні вільно схрещуватись між собою.

Пробанд, або пропозит – людина, родовід якої аналізується під час складання родоводу.

Резус-конфлікт – несумісність в системі мати-плід за антигенами системи резус (мати резус-негативна; плід резус-позитивний), що призводить до розвитку гемолітичної хвороби немовлят, або мертвонародженню.

Реакція трансплантат проти хазяїна (РТПХ) – відбувається внаслідок антигенної несумісності за тканинною специфічністю імунокомпетентних клітин донора і реципієнта. Внаслідок несумісності донорські Т-лімфоцити

атакують Т-лімфоцити реципієнта, що призводить до відторгнення трансплантата і формування тяжкої імунопатології.

Реверсія – зворотна мутація, повернення мутантного алеля в нормальний стан, тобто до, так званого, дикого типу.

Редукція – зменшення вдвічі соматичної кількості хромосом у першому поділі мейозу.

Репарація – самовідновлення первинної структури ДНК після пошкодження її мутагенами.

РНК – рибонуклеїнова кислота, полінуклеотид, який складається, на відміну від ДНК, з однієї нитки–ланцюжка нуклеотидів, але замість тиміну РНК містить урацил, а замість дезоксирибози – пентозний цукор рибозу. РНК міститься в хромосомах, ядерці та цитоплазмі; в клітині є три типи РНК: інформаційна, транспортна та рибосомальна.

Ретровіруси (РТВ) - це віруси, що містять РНК, яка в клітині в процесі зворотної транскрипції переписується в ДНК-копію (кДНК).

Рецептор – молекула на поверхні клітини, яка має здатність зв'язувати специфічні білки або пептиди.

Родовід – схематичне зображення поколінь в межах роду (родів) для генетичного аналізу ознаки чи захворювання у пробанда.

Сайт – найменша ділянка гена, яка функціонує як єдине ціле при кросинговері.

Сибси – рідні брати і сестри пробанда.

Сингенний – генетична ідентичність. Для тварин прикладом є «чисті лінії тварин», для людини – одно яйцеві близнюки.

Синдром В₁₂ – полягає у системі синтезу коензиму вітаміну В₁₂ і характеризується відставанням фізичного і розумового розвитку дитини, зростанням вміст кетонових тіл у сечі. При цьому кількість цього вітаміну у крові буде нормальною.

Соматична гіпермутація – посилення швидкості точкових мутацій в генах варіабельних регіонів імуноглобулінів. Спостерігається після антигенної стимуляції і діє як механізм підвищення різноманітності антитіл.

Спадковість – здатність живих організмів передавати особинам наступного покоління морфоанатомічні, фізіологічні, біохімічні особливості своєї організації, а також характерні риси становлення цих особливостей у процесі онтогенезу.

Спадкові захворювання – захворювання, які існують від народження і для яких етіологічним фактором є генна, хромосомна або геномна мутація.

Специфічність – ті антигенні особливості, завдяки наявності яких антигени відрізняються один від одного.

Специфічний імунітет – набутий, адаптивний імунітет, у процесі якого для кожного типу антигену організм виробляє певні специфічні антитіла; основні його ефектори – Т- та В-лімфоцити.

Спонтанні мутації виникають спонтанно у будь-який час, з приблизною частотою 10^{-5} і 10^{-10} на ген протягом 30 років.

Соматогенофонд – генофонд соматичних клітин.

Статевий хроматин – спаралізована Х-хромосома, яка в інтерфазному ядрі забарвлюється ядерними барвниками

Стовбурова гемопоетична клітина – клітина, яка є «пращуром» для всіх клітин крові; знаходиться в кістковому мозку людей і тварин.

Сублеталі або полулетальні алелі є причиною смертності людини при досягнення нею періоду статевої зрілості.

Тетрасомік – організм, у соматичних клітинах якого одна з хромосом представлена не двома гомологами, а чотирма.

Толерантність – стан відсутності специфічної імунологічної відповіді на власні антигени організму, який розвивається в процесі дозрівання імунної системи.

Трансгенний – термін, який визначає факт переносу генів, які отримані в одному організмі, до іншого. Дані гени включаються до ДНК хазяїна.

Транскрипція – перенесення (переписування) генетичної інформації з ДНК на інформаційну РНК, за участю ферменту РНК-полімерази.

Транслокація – перенесення генетичного матеріалу з однієї хромосоми до іншої, не гомологічної їй.

Трансплантація – пересадка тканини або органу у рослин, тварин і людини.

Транспозони – сегмент ДНК здатний змінювати локалізацію в межах геному.

Уроджені хвороби – такі стани, які існують з народження дитини. Вони можуть бути обумовлені спадковими і не спадковими факторами.

Фактор некрозу пухлин – група прозапальних цитокінів, які кодуються генами МНС. Синтезується макрофагами/моноцитами і бере участь у регуляції імунної відповіді (підсилює запальні й цитотоксичні реакції), а також руйнує пухлинні клітини.

Фармакогенетика – розділ генетики, який вивчає характер реакцій організму на лікарські засоби в залежності від спадкових факторів.

Фармакогеноміка вивчає впливи лікарських препаратів на геном, порівнюючи експресію генів у хворих, визначаючи ефективність чи токсичність певного препарату для конкретної людини.

Фармакогеномні тести широко використовуються для вивчення впливів лікарських препаратів на людський геном.

Фармакологічний ефект – це клінічний прояв реакції організму на дію лікарського препарату.

Фенілкетонурія – захворювання, яке пов'язане з структурними порушеннями ферментів, які регулюють обмін фенілаланіну, і які призводять до перетворень цих ферментів через ряд етапів на тирозин і меланін.

Фенотип – сукупність властивостей і ознак організму, що склалися на основі взаємодії генотипу з умовами зовнішнього середовища.

Ферментопатії – спадкові захворювання, які пов'язані з порушеннями структури і/або функцій ферментів.

Хроматин – комплекс біополімерів (нуклеопротейди), в якому здійснюються головні генетичні процеси клітини. Він знаходиться у хромосомах ядра клітини тваринних і рослинних організмів.

Хромосоми – структури клітинного ядра, які забезпечують передавання спадкової інформації від клітини до клітини та від покоління до покоління.

Хромосомна інженерія – конструювання хроматину (складання нуклеосом з ДНК і гістонів, більш складних структур) і цілих хромосом.

Хромосомні аберації – це зміна структури хромосом: делеція (відрив частини хромосоми), дуплікація (подвоєння частини хромосоми), інверсія (поворот частини хромосоми на 180° , транслокація (переміщення частини однієї хромосоми на іншу) та ін.

Целіакія – спадково обумовлена несприйнятливість деяких білків, які є в хлібних виробах із пшениці.

Цитогенетика людини вивчає хромосоми в нормі і патології.

Ядро клітинне – найважливіший структурний компонент клітин еукаріотичних організмів, основною функцією якого є збереження і передавання генетичної інформації.

Якірні амінокислоти – амінокислотні залишки лінійного пептичного фрагменту антигена, які утворюють зв'язок з амінокислотами в щілині молекули І класу МНС, внаслідок чого формується імуноген – лінійний пептид антигена з молекулою І класу, експресований на поверхні клітини для розпізнавання цитотоксичними CD8 Т-лімфоцитами.