

Федченко С.Н.

Общая и медицинская генетика

Учебное пособие
для студентов медицинских вузов

Луганск
2003

УДК 575.113(07)

Федченко С.Н.

Общая и медицинская генетика // Учебное пособие для студентов медицинских вузов – Луганск, 2003. - 480 с.

Учебное пособие содержит современные данные о строении гена, биосинтезе белка. Изложены новые данные о строении промотора, энхансера, о свойствах генетического кода (колинеарности, непрерывности и т.д.), рассмотрены источники сложности транскрипции, трансляции, репликации ДНК. На основе новых медико-генетических знаний изложены современные методы диагностики наследственных заболеваний. Учебное пособие содержит сведения о генетической инженерии. Большое внимание уделено генной терапии и связанным с ней морально-этическим проблемам. В книге сформулированы основные положения молекулярной биологии и гентики, что делает ее незаменимым руководством для специалистов и самым современным пособием для студентов медиков, связывающих свое будущее с медициной 21 века. Пособие составлено в полном соответствии с программой Минздрава Украины для студентов медицинских и фармацевтических вузов IV уровня аккредитации.

Рекомендовано научно-методической комиссией Министерства здравоохранения Украины (протокол № 3 от 26.06.2002 г.)

Рецензенты:

Доктор биол. наук, профессор **Воробец З.Д.** Зав. кафедрой медицинской биологии, генетики и паразитологии Львовского государственного университета.

Доктор биологических наук, профессор **Романенко А.В.** Зав. кафедрой медицинской биологии, генетики и паразитологии Национального медицинского университета им. А.А.Богомольца.

ISBN 966-7709-17-5

СОДЕРЖАНИЕ

Раздел 1. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ	10
1.1. Альтернативы в молекулярной биологии	10
1.2. Основная догма молекулярной биологии.....	13
1.3. Нуклеиновые кислоты как генетический материал.....	15
1.3.1. Особенности структуры ДНК	15
1.3.2. Химический состав молекулы ДНК	16
1.3.3. Сателлитная ДНК	18
1.3.4. Репликация ДНК	19
1.3.5. Рибонуклеиновые кислоты. Виды РНК	25
1.4. Синтез белка. Транскрипция ДНК	29
1.4.1. Основные этапы транскрипции	30
1.4.2. Структура и функция промотора	34
1.4.3. Структура и функция энхансеров.....	35
1.4.4. Метилирование генома эукариот. CG-островки.....	39
1.4.5. Процессинг. Сплайсинг	40
1.4.6. Эпигенетическая регуляция активности генов. Геномный импринтинг.....	46
1.4.7. Этапы синтеза белка	51
1.4.8. Регуляция биосинтеза белков.....	57
1.4.9. Рибосомы. Роль рибосом в биосинтезе белка	59
1.4.10. Гистоновые и негистоновые белки в регуляции функции генов.....	60
1.5. Генетический код и его свойства	62
1.5.1. Современное представление о генетическом коде	64
1.5.2. Мобильные хромосомные элементы, или странствующие гены.....	66
1.5.3. Стратегия генетического контроля, или генная экспрессия.....	68
1.5.4. Регуляция экспрессии генов у прокариот	69

1.5.5. Особенности экспрессии генов у эукариот.....	72
1.5.6. Современное представление о гене.....	74
1.5.7. Функциональные свойства генов.....	78
1.6. Хромосомный уровень организации генетического материала.....	79
1.7. Геномный уровень организации генетического материала.....	93
1.7.1. Геном. Кариотип. Геномика.....	93
1.7.2. Прионные болезни человека.....	95
1.8. Молекулярные основы патологии апоптоза.....	107
1.9. Внеядерная (цитоплазматическая) наследственность.....	112
1.9.1. Митохондриальный геном человека.....	113
1.9.2. Митохондриальные болезни.....	114
1.9.3. Митохондрии и старение.....	114

Раздел 2. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ИЗМЕНЧИВОСТИ.

2.1. Источники изменчивости.....	119
2.2. Мутации ДНК. Классификация мутаций.....	120
2.2.1. Геномные мутации.....	122
2.2.2. Генные мутации.....	122
2.2.3. Хромосомные мутации, или хромосомные абберации.....	125
2.2.4. Рекомбинация наследственного материала в геномном типе. Кроссинговер хромосомная теория наследственности.....	133
2.2.5. Генетические карты хромосом.....	138
2.2.6. Хромосомная теория наследственности.....	140
2.2.7. Конверсия гена.....	143
2.2.8. Причины мутаций. Геномные мутации.....	144
2.3. Репарация ДНК. Классификация репараций.....	146
2.3.1. Репарация ДНК и канцерогенез.....	151
2.4. Генная инженерия.....	154
2.4.1. Трансгенные организмы.....	161
2.4.2. Основные направления генной инженерии.....	164
2.4.3. Генная терапия человека.....	197
2.4.4. Биотехнология.....	169

2.5. Экологическая генетика	176
2.6. Фармакогенетика	177
Раздел 3. НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ И ВРОЖДЕННЫЕ ПОРОКИ РАЗВИТИЯ	183
3.1. Груз генетических ошибок	183
✓ 3.2. Хромосомный комплекс и хромосомные болезни человека	185
3.3. Гаметогенез. Сперматогенез. Овогенез	189
3.3.1. Оплодотворение у человека	196
3.4. Мейоз	202
3.5. Принципы классификации хромосомной патологии	210
✓ 3.6. Хромосомные болезни, связанные с нарушением аутосом	212
/ 3.6.1. Лишняя 21-я хромосома. Синдром Дауна (СД)	212
3.6.2. Нарушения в других парах хромосом	218
✓ 3.6.3. Синдром Патау	219
✓ 3.6.4. Синдром «Кошачьего Крика», синдром 5p-	222
3.6.5. Болезни геномного импринтинга. Синдром Прадера-Вилли (СПВ), Синдром Ангельмана (СА)	223
3.6.6. Другие микроцитогенетические синдромы	225
✓ 3.7. Хромосомные болезни, связанные с нарушением половых хромосом	277
✓ 3.7.1. Синдром полисомии X	228
✓ 3.7.2. Синдром Ретта	232
✓ 3.7.3. Синдром Мартина-Белла	234
3.7.4. Синдром Шерешевского-Тернера	237
3.7.5. Трисомия X	241
3.7.6. Полисомия по Y-хромосоме	242
✓ 3.8. Генные болезни	245
3.8.1. Наследственные болезни обмена аминокислот. Фенилкетонурия (ФКУ)	247
3.8.2. Альбинизм	251
3.8.3. Серповидно-клеточная анемия	251
3.8.4. Наследственные болезни обмена липидов. Ганглиозидозы	253

3.8.5. Наследственные гиперлипопротеидемии	255
3.8.6. Болезни нарушения обмена стероидов	257
3.8.7. Нарушение обмена пуринов и пиримидинов	258
3.8.8. Наследственные болезни обмена углеводов	259
3.8.9. Наследственные болезни обмена веществ соединительной ткани	261
3.9. Просеивающие (скринирующие) программы по выявлению наследственных болезней обмена веществ (НБО)	266
3.10. Наследственная предрасположенность к болезням. Мультифакториальные заболевания (МФЗ)	271
3.10.1. Генетические болезни соматических кислот	274
3.10.2. Новые подходы в изучении генетики мультифакториальных заболеваний	276
3.10.3. Другая модель полигенного наследования	280
3.11. Врожденные пороки развития	281
3.11.1. Классификация пороков развития	281
3.11.2. Фетальный алкогольный синдром (алкогольная эмбриофетопатия)	287
3.11.3. Мониторинг врожденных пороков развития новорожденных	291
Раздел 4. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ	293
4.1. Клинико-генеалогический метод	293
4.1.1. Родословные с аутосомно-рецессивным типом наследования	294
4.1.2. Родословные с аутосомно-рецессивным типом наследования	294
4.1.3. Родословные при доминантном X- сцепленном типе наследования	296
4.1.4. Родословные при рецессивном X- сцепленном наследовании признаков	298
4.1.5. Y-сцепленный (голандрический) тип наследования	298

4.1.6. Митохондриальная наследственность	300
4.1.7. Митохондриальные болезни	301
4.2. Цитогенетический метод.....	302
4.2.1. Окраска препаратов	303
4.2.2. Метод определения полового хроматина	308
4.3. Биохимические методы	313
4.4. Молекулярно-генетические методы	319
4.4.1. Основные этапы молекулярно-генетических методов	323
4.4.2. ДНК-диагностика наследственных заболеваний	324
4.4.3. Генодиагностика в онкологии	325
4.4.4. Генодиагностика инфекционных болезней	328
4.5. Секвенирование генома человека	328
4.6. Картирование генома человека	337
4.6.1. Генетическое картирование генома человека	337
4.6.2. Физическое картирование генома	338
4.7. Близнецовый метод	338
4.8. Популяционно-статистический метод	346
4.9. Методы дерматоглифики и пальмоскопии	352
4.10. Методы генетики соматических клеток (ГСК)	355

**Раздел 5. МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ
 КОНСУЛЬТИРОВАНИЕ (МГК). ПРЕНАТАЛЬНАЯ
 ДИАГНОСТИКА ВРОЖДЕННЫХ И
 НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ.....**

5.1. Расчет риска при доминантном и рецессивном типе наследования	360
5.2. Расчет риска при полигенном типе наследования	364
5.3. Влияние генотипической среды и факторов внешней среды на проявление признаков	367
5.4. Гетерозиготные носители и наследственная предрасположенность	371
5.5. Пренатальная диагностика	372
5.5.1. Показания для пренатальной диагностики.....	374
5.5.2. Неинвазивные методы пренатальной диагностики	376

5.5.3. Просеивающие методы. Скрининг – программы	378
5.5.4. Скрининг на фенилкетонурию.....	379
5.5.5. Скрининг на врожденный гипотиреоз	380
5.5.6. Скрининг на муковисцидоз	381
5.5.7. Скрининг на органические ацидемии (ацидурии)	383
5.5.8. Скрининг на дефицит α 1-антитрипсина.....	384
5.5.9. Скрининг на другие наследственные болезни обмена веществ.....	384
5.5.10. Скрининг на другие скрытые заболевания.....	385
5.5.11. Скрининг на гиперхолестеринемию	386
5.5.12. Скрининг анеуплоидий у плода.....	386
5.6. Инвазивные методы исследования в пренатальной диагностике врожденных пороков развития и наследственных заболеваний	388
5.7. Алгоритм пренатального мониторинга	392
5.7.1. Расширение воротникового пространства: взаимосвязь с хромосомными аномалиями и врожденными пороками развития	393
5.7.2. Медико-генетическое консультирование при экстракорпоральном оплодотворении методом интрацитоплазматической инъекции сперматозоида	401
5.8. Биоэтические проблемы медицинской генетики.....	409
5.8.1. Проблемы, связанные с генетическим скринингом	418
<i>Заключение. Вклад генетики в медицину.....</i>	<i>421</i>
<i>Приложения</i>	
Проблемные вопросы (III–IV уровень)	424
Тесты программированного контроля для углубленного изучения студентами раздела «Молекулярная генетика» (II уровень)	426
Задачи (III–IV уровень)	450
Основы генетики человека. Краткий словарь новых терминов	463
Список рекомендованной для углубленного чтения литературы	470

Раздел 1

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ

*«Нет новых знаний
без новых проблем»*

Начало нового тысячелетия ознаменовалось значительным событием в научной и общественной жизни сообщества развитых стран – была прочитана полная нуклеотидная последовательность генома человека. Расшифровка полной информации, заключенной в геноме, явилась настоящим триумфом целого ряда биологической науки, получившего название геномика. Развитие акушерства, педиатрии в 21-м столетии будет в значительной степени определяться практическим использованием методов молекулярной, клеточной и биохимической генетики.

Расшифровка молекулярного строения генома человека – создание полной библиотеки нуклеотидных последовательностей ДНК человека – стало подлинным революционным событием на рубеже столетий. Однако это не означает раскрытия полной структуры генов человеческого организма, так как функции многих нуклеотидных последовательностей в молекуле ДНК остаются неизвестными. Согласно новейшим данным, геном состоит из 30000–36000 генов, хотя совсем недавно предполагалось, что у человека имеется около 100000 генов. К концу 2001 г. в Международном банке генов (Genbank) было зарегистрировано чуть больше 6000 нуклеотидных последовательностей как генов, т.е. их молекулярная структура и функции установлены. Чтобы составить полный каталог генов, предстоит выяснить функциональное назначение еще около 30000 уже известных нуклеотидных цепей.

В середине 90-х годов в биологии возник новый раздел – протеомика, выявляющий качественный и количественный состав белков, синтезируемых клеткой. Сравнение протеом различных клеток в норме и при патологиях позволяет

расшифровывать механизмы, участвующие в развитии патологических реакций.

К 2002 году с помощью протеомики охарактеризовано более 300 различных типов посттрансляционных модификаций белков. Первостепенно значимо медицинское приложение протеомики, в частности, выявление «молчащих» опухолевых клеток по их белковым профилям. Эти возможности открывают совершенно новые перспективы как для диагностической медицины, так и для индустрии фармацевтической в плане создания новых лекарственных препаратов.

Достижения генетики привели к изменению парадигм (концепций) клинической медицины (акушерства и педиатрии). Стала ясной необходимость перехода от использования сложнейших и очень дорогих технологий, направленных на продолжение жизни зачастую безнадежно больных, таких как трансплантация органов, гемодиализ, интенсивная терапия и реанимация, к другим технологиям профилактической и превентивной медицины, методам пренатальной диагностики врожденных и наследственных болезней, расширению программ массового и селективного скрининга на эти болезни, внедрению методов трансплантации генов, клеток, тканей, хирургической коррекции врожденных пороков на ранних этапах жизни. Другими словами, следует сосредоточить значительно большее внимание и ресурсов на превентивных технологиях в начале, чем на «спасительных» мерах при ее преждевременном конце. И хотя этот подход не сулит удивления или каких-либо экономических преимуществ для медицины и общества, но с гуманистических позиций он более оправдан и более совершенен. Это именно тот путь, по которому пойдет клиническая генетика в 21-м столетии.

1.1. Альтернативы в молекулярной биологии

Молекулярная биология динамично вошла в семью биологических наук в 1953 г. после выяснения физической структуры ДНК Уотсоном и Криком. Этот год стал официальным годом рождения молекулярной биологии.

Термин «молекулярная биология» появился в литературе впервые в 1938 г. ДНК была открыта в 1869 г. швейцарским врачом Мишером. Убедительные доказательства того, что именно с ДНК связана передача наследственной информации, получены после работы английского микробиолога Грифита. Доказательства генетической роли ДНК были получены в ряде опытов по заражению вирусами бактериальных клеток.

Вирусы, поражающие бактерии, называют бактериофагами. Они состоят из белковой капсулы правильной геометрической формы и молекулы нуклеиновой кислоты, свернутой в виде спирали. Фаг прикрепляется своими отростками к клеточной оболочке, с помощью ферментов разрушает участок клеточной мембраны и через образовавшееся отверстие вводит ДНК в клетку.

Проникшая внутрь клетки нуклеиновая кислота прекращает синтез собственных бактериальных белков, и весь контроль над биохимическими процессами в клетке переходит к вирусной ДНК.

С помощью радиоактивной серы (метка белков фага) и радиоактивного фосфора (метка ДНК) было показано, что наследственная информация от внедрившегося фага его потомкам передается только нуклеиновой кислотой, а не белком.

Доказали значение ДНК в передаче наследственной информации обнаруженные у микроорганизмов явления трансформации, трансдукции и конъюгации.

Трансформация – это перенос и включение наследственной информации в виде чужеродной ДНК в ДНК ядра клетки хозяина.

Трансдукция – (лат *transductio* - перемещение) заключается в том, что вирусы, покидая бактериальные клетки, в которых они паразитировали, могут захватывать с собой часть их ДНК и, перемещаясь в новые клетки, способны передавать новым хозяевам свойства прежних. Это явление впервые было обнаружено в опытах по заражению бактерий вирусами.

Конъюгация – это перенос генетического материала (фактора F) от одной бактерии к другой путем образования

цитоплазматического мостика.

В 1962 г. Крик, Уотсон и Уилкинс были удостоены Нобелевской премии. Способность ДНК воспроизводить себе подобную структуру стала основанием для рождения новой науки – молекулярной биологии.

Впоследствии были установлены канонические постулаты структурной организации и функции нуклеиновых кислот – ДНК и РНК. Это также относилось ко многим канонам биосинтеза белка. Со временем наряду с открытием тех или иных закономерностей в молекулярной биологии одновременно накапливались так называемые «интересные исключения» – альтернативы.

Но сначала об основных канонических представлениях в молекулярной биологии, сформировавшихся в 60-70 гг. нашего столетия:

1. ДНК – двухцепочная правозакрученная спиральная структура;

2. ДНК отличается от РНК не только сахарным компонентом (в ДНК – дезоксирибоза, в РНК – рибоза), но и присутствием тимина, которого не бывает в составе РНК;

3. Определяется последовательностью нуклеотидов в кодонах одной из двух полинуклеотидных цепей молекулы ДНК, т.е. молекула ДНК и закодированная в ней будущая полипептидная цепь колинеарны;

4. Генетический код универсален в живой природе;

5. Основная догма: ДНК служит матрицей матричной РНК (мРНК), а последняя служит матрицей для белка (ДНК→мРНК→белок); обратного пути нет;

6. Нонсенс – кодоны (UAG, UAA, UGA) не кодирует никаких аминокислот и выполняет роль терминаторов, определяя окончание синтеза пептидной цепи;

7. Гены располагаются в хромосомах ядер клеток в постоянной линейной последовательности;

8. Белковые молекулы синтезируются только на мРНК в рибосомах соответственно генетическому коду;

9. Антикодон тРНК взаимодействует с кодоном мРНК в соответствии с правилами Чаргаффа: А – Т; G – С.

Вся молекулярная биология базируется на так называемом **принципе комплементарности**, впервые открытом в структуре ДНК. Известно, ДНК – это двойная спираль, если спираль ДНК раскручивается и две ее цепи расходятся, то на каждой из них к А пристроится только Т, к Т – А, к Г – Ц, а к Ц – Г. Это есть принцип комплементарности. На принципе комплементарности базируется не только репликация ДНК, но вся так называемая молекулярная биология гена.

1.2. Основная догма молекулярной биологии

Одним из основных этапов развития молекулярной биологии было создание концепции генетической информации. Эта концепция получила название «Центральной догмы молекулярной биологии». Ее суть сводилась к представлению о том, что биосинтезу белковой молекулы присущ однонаправленный характер, т.е., согласно существующим на то время представлениям, ДНК является матрицей для биосинтеза всех видов РНК, в том числе и мРНК. Последняя, в свою очередь, является матрицей для биосинтеза белка на рибосомах. Вся догма укладывалась в короткую схему: ДНК → мРНК → белок.

Существовала твердая уверенность в том, что такая схема белковых молекул носит необратимый характер на всех этапах. В начале 70-х годов украинский ученый, академик НАН Украины С.Н. Гершензон предложил гипотезу, согласно которой РНК некоторых вирусов может служить матрицей для синтеза ДНК-копии по схеме: ДНК ↔ мРНК → белок. Именно это и было доказано в 1970 г., когда Темин и Балтимор независимо друг от друга выделили из вирусов саркомы Рауса и лейкоза мышей Раушера новый фермент – РНК-направленную ДНК-полимеразу, осуществляющую обратную транскрипцию. Со временем фермент начали называть обратной транскриптазой, или **ревертазой**.

В 1975 г. Темин и Балтимор были удостоены Нобелевской премии. Значение этого открытия трудно переоценить. Ревертаза предоставила бесконечные возможности для

получения любых структурных генов, вследствие чего возникли новые направления молекулярной биологии, в частности, современная генно-инженерная биотехнология. Необходимые структурные гены, которые можно синтезировать с помощью ревертазы, используют для получения новых полезных свойств живых организмов. На сегодня в мире существуют около трех тысяч трансформированных сельскохозяйственных растений, животных, цветов, микроорганизмов и др. Ревертазу используют как один из инструментов в решении одного из самых грандиозных научных проектов на нашей планете: «Геном человека», основной целью которого является расшифровка последовательности нуклеотидов всех генов человека. Основная догма молекулярной биологии была уточнена, но никак не отменена, так как передача информации от белка к РНК или ДНК и не была никогда показана, и в принципе, как можно полагать, невозможна. Отцов и матерей молекулярной биологии интересовали, главным образом, детали организации структур отдельных молекул, что, несомненно, важно было понять прежде, чем двигаться дальше. Значение этих структур легло в основу представлений о возможности их взаимодействия друг с другом и возможности предсказания того, какие молекулы способны комбинировать свои структуры для выполнения функций в клетке. Блестящие исследования той поры привели к замечательным лозунгам: «Один ген – один фермент» и «Что справедливо для бактерий, то справедливо для слонов», которые сыграли важнейшую роль в исследованиях общих принципов молекулярной организации живых клеток. Но сейчас мы знаем, что тот и другой лозунги верны, скорее, в исключительных случаях, чем как правило.

Сегодня эта наука вышла уже за рамки исследования структур отдельных, пусть даже и очень важных, молекул. Смысл исследований сегодняшней молекулярной биологии и генетики заключается в попытках расшифровать множественные взаимодействия, совершающиеся во времени и пространстве в живой клетке и между клетками многоклеточных организмов. И это другая философия, чем та, которой пользовались создатели молекулярной биологии.

Сейчас начинается совсем другой период в науке, которая, продолжая называться молекулярной биологией и генетикой, на самом деле все в большей степени становится клеточной биологией, рассматривающей множественные взаимодействия молекул и надмолекулярных структур внутри клеток и между клетками. Этой науке еще только предстоит понять связь «Один геном – один организм». Она должна ответить на множество вопросов. В первую очередь, на вопрос о степени вовлеченности генома в процессы, происходящие в клетке. В какой степени он программирует их, и в какой степени они проходят независимо от генома? Например, в какой степени организация и функционирование цитоскелета зависит от клеточного ядра, и в какой степени он функционирует автономно, как самособирающаяся и самообучающаяся система? Известно ведь, что цитоскелет материнской клетки может передавать информацию об особенностях своей структурной организации непосредственно цитоскелету дочерней клетки. И цитоскелет и многие клеточные органеллы, включая ядро и аппарат Гольджи, не могут быть синтезированы полностью *de novo*, но требуют хотя бы фрагментов предсуществующих структур. Процессы их самосборки, возможно, идут по принципу матричной сборки одной структуры на другой. Все это очень напоминает самообучающуюся, независимую от генома систему.

1.3. Нуклеиновые кислоты как генетический материал

1.3.1. Особенности структуры ДНК

Строение ДНК.

Уотсон и Крик в 1953 г. предложили пространственную молекулярную модель ДНК.

Основные черты модели заключаются в следующем:

Каждая молекула ДНК состоит из двух длинных антипараллельных полинуклеотидных цепей, образующих двойную спираль; 5'-конец одной цепи соединен с 3'-концом другой и наоборот (рис. 1). Генетическая информация записана последовательностью нуклеотидов в направлении от 5'-конца

к 3'концу. Такая нить называется «смысловой», именно здесь расположены гены (матричная цепь). Вторая цепь в направлении 5'–3' считается «антисмысловой». Она необходима в качестве «эталона» хранения генетической информации. Ей принадлежит основное значение в процессах репликации и репарации.

Каждый нуклеотид расположен в плоскости, перпендикулярной оси спирали.

Две цепи скреплены водородными связями.

Соотношение сахар, (фосфат), азотистое основание 1:1:1.

Спаривание оснований высокоспецифично. Пуриновое основание может соединяться только с пиримидиновым. (Пуриновое основание – аденин, гуанин; пиримидиновое основание – тимин, цитозин). Между А и Т образуются 2 водородные связи, а между Ц и Г – три.

Последовательность оснований вдоль одной полинуклеотидной цепи может варьировать, но последовательность их в другой цепи должна быть комплементарна. На этом основано свойство ДНК к авторепродукции. Работет фермент полимеразы.

Открытие закономерностей в нуклеотидном составе ДНК (правила Чаргаффа).

В отношении нуклеотидного строения ДНК эти правила следующие:

1) сумма пиримидиновых нуклеотидов равна сумме пуриновых нуклеотидов. ПУР = ПИР, т.е. $A + G = T + C$;

2) содержание тимина равно содержанию аденина, а содержание гуанина – содержанию цитозина: $T = A, G = C$;

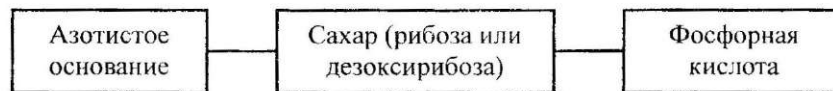
3) отношение $\frac{A+T}{G+C}$ видоспецифично.

Для ДНК высших растений, животных это отношение 1, у большинства микроорганизмов особенно бактерий и грибов, преобладает ГЦ – тип ДНК.

1.3.2. Химический состав молекулы ДНК

С химической стороны каждая цепь ДНК – полимер, мономерами которого являются нуклеотиды.

Каждый нуклеотид состоит из 3-х компонентов: молекулы сахара, молекулы азотистого основания и молекулы фосфорной кислоты.



Нуклеозиды, присоединяя к своей гидроксильной группе ОН фосфорную кислоту образуют фосфорные эфиры, которые называют нуклеотидами.

Следовательно, по химическому составу любой нуклеотид – это кислота – фосфорный эфир нуклеозидов.

Соединение нуклеотидов в молекуле ДНК происходит в результате взаимодействия фосфата одного нуклеотида с гидроксильной группой дезоксирибозы другого. В результате образуется фосфодиэфирная связь, объединяющая нуклеотиды в длинную цепочку. Синтез полинуклеотидной цепи происходит при участии фермента ДНК-полимеразы. Этот фермент осуществляет присоединение фосфатной группы одного нуклеотида к гидроксильной группе дезоксирибозы последующего. Общая длина молекул ДНК в спермии, яйцеклетке около 180 см. В ядре любой клетки человека содержится $6,6 \times 10^{12}$ г ДНК; в половых $3,3 \times 10^{12}$ г.

Полиморфизм ДНК: Полиморфизм ДНК – это способность молекулы существовать в различной конфигурации в зависимости от окружающих условий. Известно несколько форм ДНК: а) В-форма – имеет стандартную структуру в соответствии с моделью молекулы Уотсона и Крика. В нормальных физиологических условиях является основным структурным типом; б) А-форма – обнаружена в более обезвоженных средах, при более высоком содержании калия и натрия. Такая ДНК имеет несколько измененную спирализацию; в) С-форма – имеет меньше оснований на один виток; г) Z-форма – имеет закрученность в левую сторону, в отличие от других форм.

В молекуле ДНК можно выделить первичную структуру – последовательность нуклеотидов в цепи, вторичную структуру

– две комплементарные антипараллельные цепи, соединенные водородными связями и третичную структуру – двойную спираль. Геометрия спирали ДНК зависит от последовательности нуклеотидов. Есть последовательности ДНК, которые склонны всегда оставаться изогнутыми. К числу последних принадлежат последовательности, в которых через 10-11 нуклеотидов встречаются повторы АААААNNNNN (где N – любой нуклеотид).

1.3.3. Сателлитная ДНК

Сателлитная ДНК или фракция ДНК с часто повторяющимися последовательностями, не участвует в синтезе основных типов РНК в клетке, не связана с процессом синтеза белка. На сателлитной ДНК нет последовательностей, отвечающих за синтез клеточных РНК, т.е. эти ДНК не являются матрицами для синтеза РНК, не участвуют в транскрипции. Авторадиографически было обнаружено, что эта ДНК локализуется в зоне первичных перетяжек хромосом, в зоне их центромерных участков. Центромерная ДНК человека (сателлитная) состоит из тандема мономеров по 470 н.п. организованных в группы димеров и пентамеров; самая большая единица повторена 100 – 1000 раз.

С этой специфической центромерной ДНК комплексируются особые центромерные белки, участвующие в образовании кинетохора – структуры, обеспечивающей связь хромосом с микротрубочками веретена ДНК с часто повторяющимися последовательностями обнаруженными в теломерных участках хромосом. Здесь встречаются повторы, в которые входят 3-4 гуаниловых нуклеотида. У человека теломеры содержат 250-1500 повторов ТTAGGG.

Эти участки ДНК выполняют особую роль: они ограничивают хромосому с концов и предотвращают ее укорачивание в процессе многократной репликации. В настоящее время рассматривается роль нестабильности минисателлитов в этиологии ряда заболеваний человека.

1.3.4. Репликация ДНК

Репликация ДНК – повторение, процесс биосинтеза молекул ДНК в результате которого из одной молекулы образуются 2 дочерние, полностью идентичные материнской.

Репликация ДНК обеспечивает передачу полного комплекса наследственной генетической информации от поколения к поколению.

В процессе репликации водородные связи между парами нуклеотидов разрываются и к ним присоединяются новые, комплементарные.

Процесс соединения нуклеотидов в полинуклеотидную цепь происходит с отщеплением пирофосфата. Репликация ДНК носит характер полуконсервативного процесса, т.е. каждая дочерняя двойная спираль включает в себя одну материнскую и одну вновь синтезированную полинуклеотидную цепь. Репликация происходит в ядре во время S-фазы клеточного цикла.

Основные этапы репликации.

Распознавание точки инициации. Для репликации необходима специальная последовательность, которая выполняет роль участка инициации репликации ДНК (точка начала репликации). Определяют точку инициации специфические белки – инициаторы.

Двойная спираль ДНК раскручивается и разворачивается в одиночные нити ДНК с помощью фермента геликазы. Топоизомеразы разрывают и заново сшивают отдельные нити ДНК, помогая раскручиванию спирали. Образуются репликационные вилки. Одна цепь называется отстающей, другая (новая нить) называется ведущей (рис. 1). Образование новых цепей ДНК катализирует фермент ДНК-полимераза (рис. 2).

Принципы репликации.

Процесс репликации ДНК основан на следующих принципах.

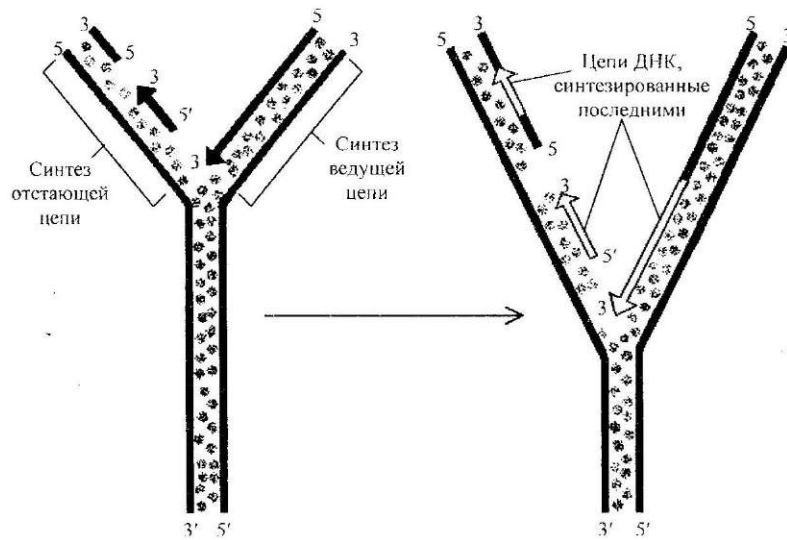


Рис. 1. Строение репликационной вилки. Обе дочерние цепи строятся в направлении $5' \rightarrow 3'$. Для этого отстающая цепь ДНК должна синтезироваться в виде коротких фрагментов (Оказаки)

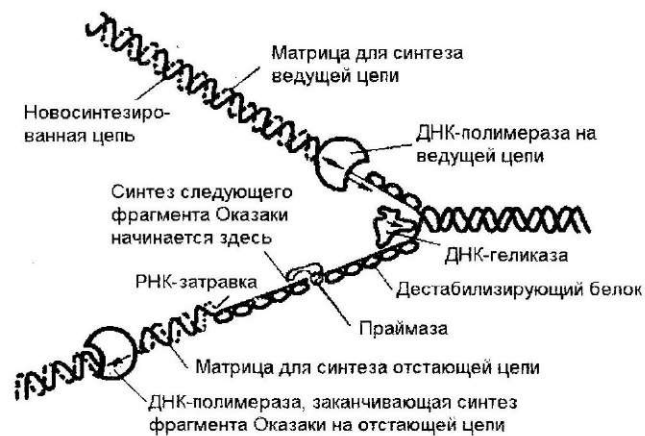


Рис. 2. Главные типы белков, действующих в области репликационной вилки

Комплементарность. Каждая из двух цепей «материнской» молекулы ДНК служит матрицей для синтеза дополняющей ее, то есть комплементарной, «дочерней» цепи.

Полуконсервативность. В результате репликации образуются две дочерние спирали, каждая из которых сохраняет (консервирует) в неизменном виде одну из цепей материнской ДНК. Вторые цепи дочерних молекул синтезируются из дезоксирибонуклеотидов заново по принципу комплементарности к нитям материнской ДНК. Дочерние ДНК ничем не отличаются друг от друга и от материнской двойной спирали.

Антипараллельность и униполярность. Каждая цепь ДНК имеет определенную ориентацию. Один конец несет гидроксильную группу (ОН), присоединенную к 3'-углероду в сахаре дезоксирибозе, на другом конце цепи находится остаток фосфорной кислоты в 5'-положении сахара. Две комплементарные цепи в молекуле ДНК ориентированы в противоположных направлениях – антипараллельно (при параллельной ориентации напротив 3'-конца одной цепи находился бы 3'-конец другой). Ферменты, синтезирующие новые нити ДНК, называемые ДНК-полимеразами, могут передвигаться вдоль матричных цепей лишь в одном направлении – от их 3'-концов к 5'-концам. При этом синтез комплементарных нитей всегда ведется в 5'→3' направлении, то есть униполярно. Поэтому в процессе репликации одновременный синтез новых цепей идет антипараллельно.

Прерывистость. Для того чтобы новые нити ДНК были построены по принципу комплементарности, двойная спираль должна быть раскручена и между родительскими цепями должны отсутствовать водородные связи. Только в этом случае ДНК-полимеразы способны двигаться по материнским нитям и использовать их в качестве матрицы для безошибочного синтеза дочерних цепей. Но полное раскручивание спиралей, состоящих из многих миллионов пар нуклеотидов, сопряжено со столь значительным количеством вращений и такими энергетическими затратами, которые невозможны в условиях клетки. Поэтому репликация начинается одновременно в

нескольких местах молекулы ДНК. Участок между двумя точками, в которых начинается синтез дочерних цепей, называется репликоном. В эукариотической клетке в каждой молекуле ДНК в зависимости от размеров имеются, как правило, тысячи репликонов. Репликоны в одной молекуле активируются по расписанию, заданному генетической программой.

В каждом репликоне можно видеть репликативную вилку – ту часть молекулы ДНК, которая под действием специальных ферментов уже расплелась. Каждая нить в вилке служит матрицей для синтеза комплементарной дочерней цепи. В ходе репликации вилка перемещается вдоль материнской молекулы, при этом расплетаются новые участки ДНК. Так как ДНК-полимеразы могут двигаться лишь в одном направлении вдоль матричных нитей, а нити ориентированы антипараллельно, то в каждой вилке одновременно ведут синтез два по-разному организованных репликативных ферментативных комплекса. Одна дочерняя цепь (лидирующая) растет непрерывно, а другая (отстающая) – в виде фрагментов длиной в несколько сот нуклеотидов, названных в честь открывшего их японского ученого фрагментами Оказаки (рис. 2). После действия ферментов, изменяющих структуру фрагментов, они сшиваются ДНК-лигазой, образуя непрерывную цепь. Механизм синтеза дочерних цепей ДНК фрагментами называют прерывистым.

Потребность в затравке. ДНК-полимераза не способна начать синтез ни лидирующей цепи, ни фрагментов Оказаки отстающей цепи. Она может лишь наращивать уже имеющуюся полинуклеотидную нить, последовательно присоединяя дезоксирибонуклеотиды к ее 3'-ОН-концу. Откуда же берется начальный 5'-концевой участок растущей цепи? Его синтезирует особая форма РНК-полимеразы, называемая ДНК-праймазой (от англ. primer – затравка). Размер рибонуклеотидной затравки невелик (< 20 нуклеотидов) в сравнении с размером цепи ДНК, образуемой ДНК-полимеразой. Выполнившая свою функцию РНК-затравка удаляется специальным ферментом, а образованная при этом брешь заделывается ДНК-полимеразой, использующей в качестве затравки 3'-ОН-конец соседнего фрагмента Оказаки.

Удаление крайних РНК-праймеров, комплементарных 3'-концам обеих цепей линейной «материнской» молекулы ДНК, приводит к тому, что дочерние цепи оказываются короче на 10-20 нуклеотидов (у разных видов размер РНК-затравок различен). В этом и заключается проблема недорепликации концов линейных молекул. В случае репликации кольцевых бактериальных ДНК этой проблемы не существует, так как первые по времени образования РНК-затравки удаляются ферментом, который одновременно заполняет образующуюся брешь путем наращивания 3'-ОН-конца растущей цепи ДНК, направленной в «хвост» удаляемому праймеру.

Проблема недорепликации 3'-концов линейных молекул ДНК решается эукариотическими клетками с помощью специального фермента – теломеразы.

Теломераза является ДНК-полимеразой, достраивающей 3'-концы линейных молекул ДНК хромосом короткими (6-8 нуклеотидов) повторяющимися последовательностями (у позвоночных TTAGGG). Согласно номенклатуре, этот фермент называют ДНК-нуклеотидилэкзотрансферазой или теломерной терминальной трансферазой. Помимо белковой части теломераза содержит РНК, выполняющую роль матрицы для наращивания ДНК повторами. Длина теломеразной РНК колеблется от 150 нуклеотидов у простейших до 1400 нуклеотидов у дрожжей, у человека – 450 нуклеотидов. Сам факт наличия в молекуле РНК последовательности, по которой идет матричный синтез куска ДНК, позволяет отнести теломеразу к своеобразной обратной транскриптазе, то есть ферменту, способному вести синтез ДНК по матрице РНК (рис. 3).

В результате того, что после каждой репликации дочерние цепи ДНК оказываются короче материнских на размер первого РНК-праймера (10-20 нуклеотидов), образуются выступающие однонитевые 3'-концы материнских цепей. Они-то и узнаются теломеразой, которая последовательно наращивает материнские цепи (у человека на сотни повторов), используя 3'-ОН-концы их в качестве затравок, а РНК, входящую в состав фермента, в качестве матрицы. Образующиеся длинные одноцепочечные концы, в свою очередь, служат матрицами для

синтеза дочерних цепей по традиционному репликативному механизму.

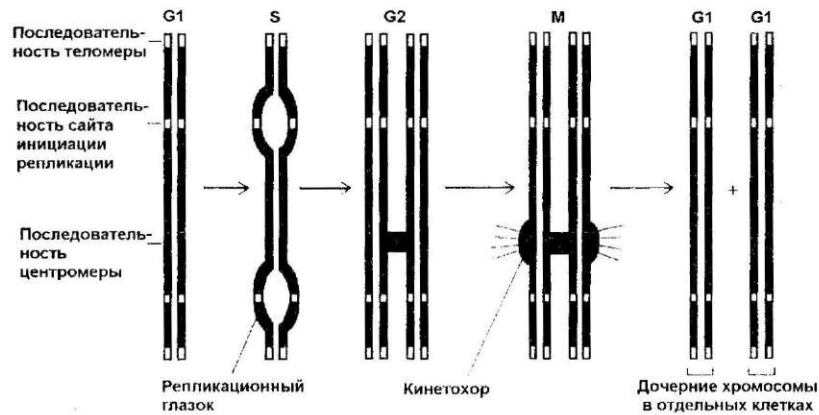


Рис. 3. Теломеразные последовательности предотвращают укорачивание хромосом. Центромеры служат для выстраивания молекул ДНК в ходе М-фазы. Сайты инициации репликации нужны для формирования репликационных вилок

Схема удлинения концов линейных молекул ДНК: сначала происходит комплементарное связывание выступающего конца ДНК с матричным участком теломеразной РНК, затем теломераза наращивает ДНК, используя в качестве затравки ее 3'-ОН-конец, а в качестве матрицы – РНК, входящую в состав фермента. После этого происходит транслокация – перемещение ДНК, удлиненный на один повтор, относительно фермента. Следом идет элонгация и очередная транслокация. В результате образуется специализированные концевые структуры хромосом - теломеры. Они состоят из многократно повторенных коротких последовательностей ДНК и теломерсвязывающих белков. Поскольку теломерные последовательности нуклеотидов не являются кодирующими, они выступают в роли буферной зоны как защита от проблемы концевой репликации.

Укорочение ДНК в ходе каждого раунда репликации лишь сокращает нетранскрибируемый текст теломеры, но не приводит к утрате смысловых последовательностей – генов и регуляторов их экспрессии. Таким образом, репликация обеспечивает передачу генетического материала в поколениях клеток и организмов.

Хромосомы соматических клеток человека несут на концах многократно повторенные гексамеры – TTAGGG, общая длина которых может достигать 10 тыс. пар нуклеотидов. В комплексе со специфическими белками такие tandemные повторы образуют теломеры, защищающие концы ДНК от действия экзонуклеаз, предотвращающие неправильную рекомбинацию и позволяющие концам хромосом прикрепляться к ядерной оболочке. Известно, что в ходе пассирования некоторых клонов нормальных клеток (например, фибробластов человека) происходит укорочение теломер в среднем на 50 пар нуклеотидов за каждый цикл деления. Подобное укорочение хромосом происходит *in vivo* в лейкоцитах периферической крови, клетках эндермиса кожи, в эпителии толстого кишечника человека.

1.3.5. Рибонуклеиновые кислоты (РНК). Виды РНК

В отличие от ДНК, РНК представлена одиночными нитями. Исключение составляет лишь РНК эритроцитов высших позвоночных, которые в зрелом состоянии не имеют ядер – они замещены гемоглобином. Информация о строении глобиновых цепей гемоглобина сохраняется в РНК и используется по мере изнашивания молекул гемоглобина для синтеза новых белковых цепей. Эта РНК эритроцитов, подобно ДНК, состоит из двух нитей, соединенных комплементарно и свернутых в спираль. В работе, посвященной строению ДНК, Крик предложил схему передачи генетической информации от гена к молекуле белка:

ДНК \rightarrow \leftarrow РНК \rightarrow белок.

Видно из схемы, что на первом этапе информация может быть обратимой (ДНК \rightleftharpoons РНК). На втором этапе только в I-м направлении, что обнаружено Тимином при изучении онковирусов. После проникновения в клетку высшего

организма, РНК таких вирусов становится матрицей для обратной транскрипции и создания ДНК с помощью РНК-зависимой ДНК-полимеразы. РНК – полимер из рибонуклеотидов, которые состоят из азотистого основания (аденин, гуанин, цитозин, урацил) рибозы и остатка фосфорной кислоты.

Полинуклеотидные цепи РНК обладают гибкой структурой, их длина в зависимости от вида РНК может варьировать от нескольких десятков тысяч нуклеотидных остатков, молекулярный вес (масса) РНК в среднем 10^4 , 10^6 . Последовательность нуклеотидных звеньев, соединенных фосфорэфирной связью в непрерывную и неразветвленную полинуклеотидную цепь, называется первичной структурой РНК, она строго специфична и уникальна для каждого вида природной РНК.

Молекулы РНК, состоящие из 2-х комплементарных полинуклеотидных цепей, обнаружены в некоторых вирусах растений и животных.

Кроме того, двуцепочные молекулы РНК образуются как промежуточные продукты биосинтеза многих вирусных РНК в клетке; их называют репликативными формами РНК.

Подавляющее большинство РНК относится к одноцепочным полинуклеотидам. Содержится РНК в живых клетках (за искл. сперматозоидов), значительно выше, чем содержание ДНК и распределение их внутри клетки сложнее.

Основная масса РНК локализована в цитоплазме, они входят в состав собственно цитоплазматических рибосом, а также рибосом митохондрий и присутствуют в свободном виде или в виде нерибосомных комплексов с белками.

В ядре РНК является составной частью хроматина. Имеется специальная форма хроматиновой РНК, играющей регуляторную роль.

Большинство РНК животных клеток, бактерий синтезируется на матрице двуцепочечной ДНК в процессе транскрипции.

Матричный синтез одноцепочных РНК существенно отличается от репликации ДНК: он является консервативным, а не полуконсервативным, т.е. продукт синтеза не включает в

себя каких-либо компонентов матрицы.

В клетке биосинтез РНК на матрице ДНК осуществляют ферменты РНК-полимеразы. Синтезированная РНК комплементарна матрице ДНК. РНК синтезируются в виде молекул-предшественников (пре-РНК) имеющих большой молекулярный вес. Эти молекулы предшественники проходят многостадийный процесс созревания – так называется посттранскрипционный процессинг, который сводится к вырезанию специализированными клеточными ферментами некоторых последовательностей.

Функции РНК в клетке сложны и многообразны. В соответствии с функциональным назначением и структурными особенностями в любой клетке различают виды РНК: **рибосомные РНК, транспортные и матричные.**

Рибосомальная РНК (рРНК). Образуется на особых генах ДНК в ядрышке. рРНК – крупная одноцепочная разветвленная молекула, включающая 3000-5000 нуклеотидов. Из общей массы РНК, на ее долю приходится до 90%. Рибосомальная РНК образует структурный каркас рибосомы, ей принадлежит важная роль в инициации, элонгации и терминации процесса синтеза белков. рРНК обеспечивают связывание и РНК с рибосомами с помощью определенных последовательностей нуклеотидов. Многие белки рибосом выполняют не только структурную, но и ферментативную роль.

Транспортная РНК (тРНК). Молекулы тРНК образуются на особых генах ДНК. тРНК короткие, одонитевые, имеют форму клеверного листа из-за комплементарного соединения оснований на разных участках цепи (рис. 4). Состоит из 75-90 нуклеотидов. Из общей массы РНК, тРНК составляет 10-15%. Молекулы тРНК переносят к местам синтеза белков соответствующие только им аминокислоты из фонда аминокислот в цитоплазме. Каждой аминокислоте соответствует своя тРНК, имеющая некоторые особенности нуклеотидной последовательности и пространственной структуры.

Молекулы тРНК имеют четыре ключевые области:

а) Несущий конец. В этом месте к ней присоединяется специфическая аминокислота. Он образован двумя

комплементарными концевыми участками РНК. Состоит из семи пар оснований 3'-конец этого участка длиннее и формирует одноцепочечный участок, заканчивающийся ЦЦА последовательностью со свободной ОН-группой. К этой группе присоединяется транспортируемая аминокислота;

б) Распознающий участок. Состоит из пяти нуклеотидов. В центре имеет 3 специфических рибонуклеотида (триплет). Это триплет называется антикодоном. Азотистые основания антикодона комплементарны триплету на цепи иРНК;

в) Участок связывания с рибосомой. Особая часть молекулы (определенная последовательность нуклеотидов) тРНК служащая для прикрепления к рибосоме.

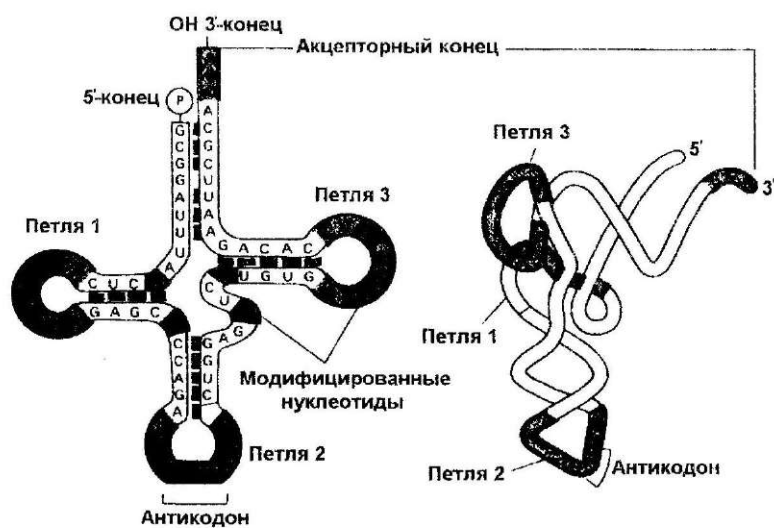


Рис. 4. Строение типичной молекулы тРНК.

А – механизм спаривания оснований. Б – общая трехмерная конформация молекулы. Аминокислота присоединяется к остатку А последовательности ССА на 3'-конце молекулы.

г) Участок присоединения фермента. Специальная часть молекулы тРНК для специфического связывания с ферментом аминоксил-тРНК-синтеазой, который катализирует

присоединение аминокислоты к молекуле тРНК. Основной функцией тРНК является точное узнавание определенного кодона в иРНК и доставка строго определенной аминокислоты к месту синтеза полипептида.

Матричная РНК (мРНК). Молекулы мРНК образуются на специфических участках ДНК, называемых структурными генами. Они несут в цитоплазму закодированную инструкцию о первичной структуре белков.

Матричная РНК является шаблоном, на котором строятся полипептиды в соответствии с заложенной в ней генетической информацией. Обычно она несет информацию о синтезе только одной молекулы белка – это так называемая *моноцистронная иРНК*. Иногда она содержит несколько вариантов соседствующих цистронов для разных белков и известна под названием *полицистронная иРНК*. Информационная РНК несет информацию о порядке расположения аминокислот в синтезируемом белке: порядок расположения аминокислот кодирует последовательность нуклеотидов молекулы иРНК (генетический код). Каждой аминокислоте соответствует свой триплет нуклеотидов (кодон). Молекулы мРНК состоят из 300-3000 нуклеотидов. В общей массе они составляют 0,5-3,0% от общего количества РНК клетки. мРНК образуется в ядре в виде незрелой про-иРНК. В результате процессинга она «созревает» и поступает в цитоплазму, где сразу прикрепляется к рибосомам.

Четыре разновидности нуклеиновых кислот имеют много общего в строении, но выполняют разные функции (табл.1).

1.4. Синтез белка. Транскрипция ДНК

Источники сложности транскрипционного процесса

35000 генов нашего организма должны экспрессироваться в строго контролируемом режиме. Особенно сложно если представить только на минуту, что развивающийся эмбрион начинается с единственной зиготы. Каждый ген должен экспрессироваться строго в определенный момент времени, на определенной стадии развития, в определенном месте (типе клеток, ткани, органе). Клетка должна изменять уровень

транскрипции в ответ на изменение окружающей среды, она должна регулировать клеточный цикл в ответ на стрессы.

Таблица 1
Сравнительная характеристика нуклеиновых кислот

Название	Тип молекулы	Локализация в клетке	Функции
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота	Макромолекула в форме двойной спирали со многими тысячами субъединиц (нуклеотидов)	В основном в ядре, а также в митохондриях и хлоропластах	Действует как хранилище закодированных инструкций для синтеза всех белков, необходимых клетке. Способна к репликации, транскрипции, мутации и репарации.
иРНК – информационная рибонуклеиновая кислота	Однонитевый линейный полимер с тысячами субъединиц	В ядре и цитоплазме, в особенности, на рибосомах	Образована по подобию одной из цепей ДНК, несет закодированные инструкции для синтеза одного или более белков.
рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота	Однонитевый разветвленный полимер с тысячами субъединиц. Молекула тесно связана с белками рибосом	Только в рибосомах	Совместно с белками образует рибосомы. Обеспечивает правильное расположение иРНК на поверхности рибосомы.
тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота	Однонитевый полимер состоит из 70-90 нуклеотидов. Имеет форму клеверного листа.	В нуклеоплазме и цитозоле	Все виды тРНК действуют как переносчики аминокислот.

Неудивительно, что для строгого контроля над этими процессами требуется очень сложный аппарат. В геноме человека 3-5% генов кодируют белки, вовлеченные в контроль инициации транскрипции. Эта сама по себе цифра еще более поражает, если учесть, что эти белки могут комбинироваться в разных сочетаниях, обеспечивая специфичность транскрипции определенных генов в определенных типах клеток.

1.4.1. Основные этапы транскрипции

Образование молекул РНК на матрице ДНК называется **транскрипцией**. Этот процесс происходит главным образом во время интерфазы. На генах матрицы ДНК образуется все три типа РНК: мРНК; тРНК и рРНК.

Считывание наследственной информации с генов регулируется специальными белками. Начало считывания генетической информации связано с освобождением определенного участка цепи ДНК (гена) от гистонов. Этот процесс осуществляется следующим образом. Негистоновые белки прикрепляются к определенным участкам цепи ДНК. Прикрепившиеся молекулы белка фосфорилируются и приобретают отрицательный заряд, благодаря чему вступают в соединения с положительно заряженными гистонами и убирают их с нити ДНК. Освободившийся от гистонов ген активируется и с него начинается считывание наследственной информации.

Инициация. При помощи фермента геликазы, которая связывается с ДНК, последняя разделяется на две цепи. Одна нить, называемой матричной ДНК, функционирует как матрица.

Транскрипцию генов производит фермент – РНК-полимераза II (pol II). Это сложный белок, состоящий примерно из 12 субъединиц. Она производит транскрипцию генов, кодирующих белки и несколько малых ядерных РНК. Но самостоятельно она не в состоянии производить транскрипцию. Чтобы РНК-полимераза могла транскрибировать ген специфическим образом, требуется взаимодействие около 40-50 белковых молекул. РНК-полимераза связывается с определенным участком кодирующей цепи – промотором.

Для инициации транскрипции требуется две группы таких белков:

белки, необходимые для взаимодействия РНК – полимеразы со специфическими промоторными последовательностями;

белки, необходимые для изменения характера экспрессии индивидуальных генов в зависимости от сигналов, поступающих в клетку извне через сигнальные системы (рис.5).

Основные стадии транскрипции:

- Образование преинициаторного комплекса (Pre-initiation complex-РІС).
- Инициация, под которой подразумевают образование первой фосфодиэфирной связи.

- Очистка промотора (promoter clearance). Момент, когда РНК-полимераза оставляет промотор и начинает элонгацию.
- Элонгация транскрипции.
- Терминация.

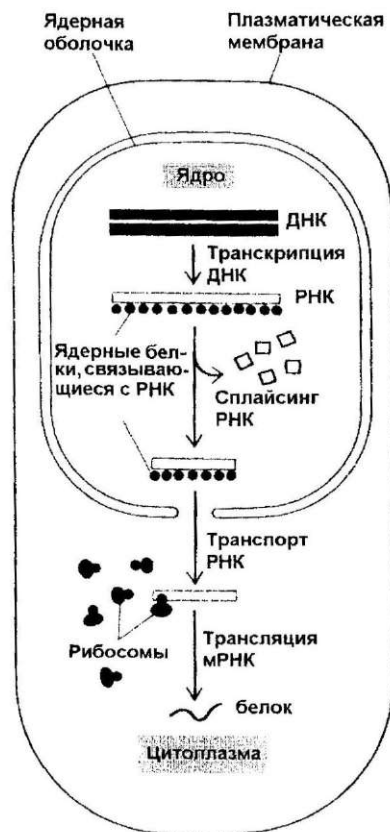


Рис. 5. Обобщенная схема процесса белкового синтеза (ДНК–РНК–белок) у эукариот.

Транскрипция – фундаментальный процесс, общий для всех живых организмов, является промежуточным звеном на пути превращения генетической информации, зашифрованной в ДНК, в реальный признак, свойственный организму. Конечно, такой процесс должен быть высококонсервативным в эволюции. Даже между такими удаленными организмами, как

бактерии и человек, в механизмах транскрипции и ферментах, которые осуществляют этот процесс, есть много общего. Однако есть и фундаментальные различия между процессами транскрипции в эукариотической и прокариотической клетках. Эти различия связаны, прежде всего, с тем, что ДНК в эукариотической клетке упакована в хроматиновые структуры. *Прокариоты* используют, как правило, *полицистронный (оперонный)* принцип организации генома. Это означает, что группы генов транскрибируются под контролем общего промотора. Образуется общая мРНК, которая затем транслируется, давая разные белки. В *эукариотической клетке*, напротив, в огромном большинстве случаев каждый ген имеет свою систему регуляции транскрипции и синтезируемая мРНК является *моноцистронной*. Ее трансляция начинается только с одного места, узнаваемого трансляционным аппаратом. Точка начала трансляции находится не очень далеко от 5'-концевой части мРНК.

Ключевым в процессе инициации транскрипции является присоединение *фактора транскрипции TF II H*. Одна из его субъединиц, обладающая протеинкиназной активностью, фосфорилирует молекулу РНК-полимеразы II.

Установлено, что фосфорилирование освобождает РНК-полимеразу II и позволяет начать транскрипцию.

Контролирующей зоной для РНК-полимеразы называют последовательности ДНК, необходимые как для инициации транскрипции, так и для регулирования ее скорости и интенсивности. Контролирующий район состоит из промотора, на котором образуется комплекс из РНК-полимеразы II и общих факторов транскрипции (рис. 6).

Общие факторы транскрипции выделены и очищены (их шесть). В состав комплексов общих факторов транскрипции и РНК-полимеразы II входит до 50 белков, иногда эти комплексы называют *транскриптосомами*.

Кроме промотора в контрольной зоне находятся регуляторные последовательности. Транскрипция, возможно, протекает на внешней поверхности хромосомной территории.

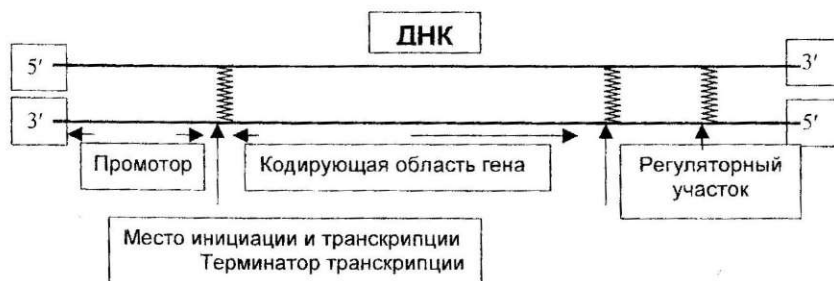


Рис. 6. Схема структурно-функциональной организации гена (транскриптона). Каждый из элементов гена имеет сложное строение и определенные функции.

1.4.2. Структура и функция промотора

Промотор у каждого из 30 000 генов свой. Все 30 000 промоторов отличаются друг от друга очень сильно. Их длина варьирует от нескольких сотен до нескольких тысяч пар оснований. Для осуществления правильной транскрипции необходимы регуляторные элементы 2-х типов:

Цис-регуляторы – представляют собой специфические последовательности ДНК на данной хромосоме; оказывают действие только на ближние гены.

Транс-регуляторы – растворимые молекулы (включая белки и РНК), которые продуцируются одним геном, а взаимодействуют с другими генами на той же хромосоме или на других хромосомах.

В эукариотических генах, кодирующих мРНК, обнаружены два типа цисрегуляторных последовательностей ДНК-промоторы и энхансеры («усилители»). Промоторы обычно располагаются непосредственно перед сайтом, в котором начинается транскрипция, и длина их составляет ~100 пар оснований. Участок промотора необходим для присоединения РНК-полимеразы II и точной инициации транскрипции. Энхансер контролирует эффективность и скорость транскрипции. Энхансеры активируют только лежащие в цис-положении промоторы (т.е. промоторы на той же самой хромосоме), но они могут функционировать и на больших расстояниях.

1.4.3. Структура и функция энхансеров

Помимо промоторов обеспечивать механизм дифференциальной транскрипции генов может другой тип цис-регуляторных участков. Эти последовательности называются – *энхансерами*. Существуют энхансерные последовательности, которые регулируют или время экспрессии генов, или специфичность экспрессий, или то и другое одновременно.

Энхансеры могут объяснить также тканеспецифическую транскрипцию. Например: в поджелудочной железе гены экзокринных белков (химотрипсина, амилазы и трипсина) имеют энхансеры, отличающиеся от энхансеров эндокринного белка инсулина. Таким образом, экспрессия генов в экзокринных и эндокринных клетках поджелудочной железы контролируется различными энхансерами.

Энхансер – (от англ. enhance – усиливать) это регуляторная последовательность ДНК, которая:

а) активирует транскрипцию со связанного с ней промотора, причем транскрипция начинается с обычного сайта инициации синтеза РНК.

б) оказывает влияние, находясь на расстоянии > 100 нуклеотидных пар в обе стороны от промотора.

Как энхансеры, так и элементы, расположенные перед промотором, соединяются с сайт-специфическими ДНК-связывающими белками, которые и опосредуют их действие.

Активность каждого энхансера и элемента расположенного перед промотором, обычно направлена на участок последовательности длиной от 100 до 200 н.п.

Энхансеры могут располагаться как перед, так и после кодирующей последовательности (рис. 7).

Энхансеры и регуляция транскрипции.

Энхансеры – это цис-действующий регуляторный элемент, регулирующий активность промотора путем активации или супрессии и могущий оказывать влияние на экспрессию удаленных от него генов.

Селективность энхансеров по отношению к промоторам.

Для регуляции транскрипции важно, чтобы энхансер активировал нужный промотор даже на большом расстоянии.

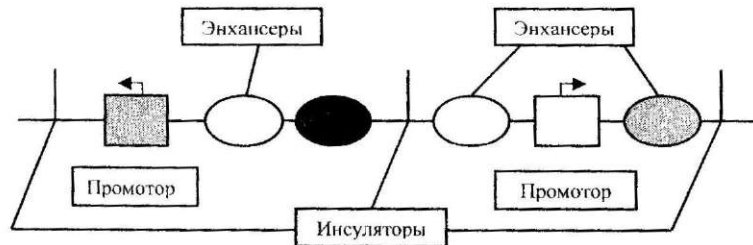


Рис. 7. Схема расположения промоторов, энхансеров и граничных элементов – инсуляторов, составляющих регуляторные области генов.

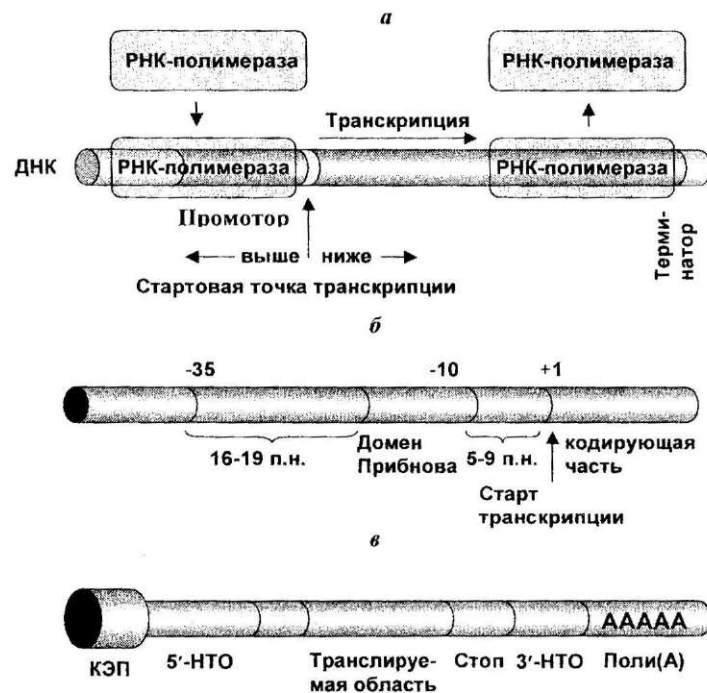


Рис. 8. Элементы организации транскрипции у прокариот (а, б) и у эукариот (в): а – единица транскрипции, содержащая различные элементы гена; б – схема наиболее типичного промотора прокариот; в – схема расположения некоторых функциональных участков в молекуле мРНК эукариот.

В настоящее время обсуждают два возможных механизма осуществления энхансер-промоторной селективности.

Специфические взаимодействия между белками, связывающими энхансер, факторами, взаимодействующими с промотором. Например, рядом с энхансером могут располагаться два промотора, связывающих разные факторы, и энхансеосома (белковый комплекс на последовательностях энхансера) предпочитает взаимодействовать с белками, связанными с одним промотором, но не с другим.

Район действия энхансера ограничивают специальные пограничные элементы, которые назвали инсуляторами, в переводе – изоляторами. Внедряясь между энхансером и промотором, инсулятор блокирует способность энхансера активировать транскрипцию с данного промотора. Схема расположения всех трех элементов приведена на рис.7.

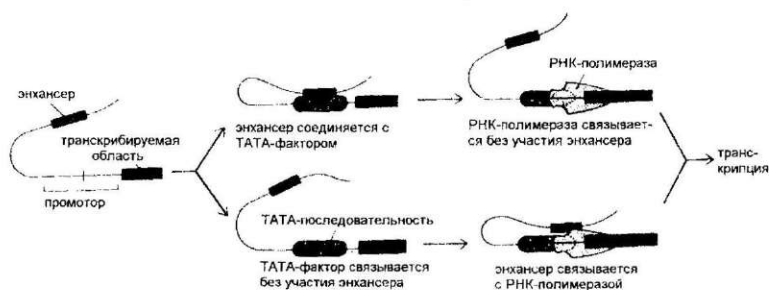


Рис. 9. Две модели действия энхансеров в эукариотических клетках. Энхансер расположен перед кодирующей последовательностью, однако петля может образоваться, и если энхансер расположен позади кодирующей последовательности.

На расстоянии 19-27 нуклеотидов от стартовой точки против хода транскрипции у многих генов эукариот обнаружена последовательность ТАТА-блок, или блок Хогнесса.

Перед инициацией синтеза РНК необходимо, чтобы фактор, играющий важную роль в транскрипции (ТФИД), образовал стабильный транскрипционный комплекс. Последовательности, примыкающие к ТАТА – боксу,

формируют нужный для транскрипции элемент (элемент перед промотором), рис. 10.

Вторую последовательность, встречаемую во многих промоторах эукариот обозначают как ЦААТ-блок. Она занимает положение между -70 и -80 нуклеотидами.

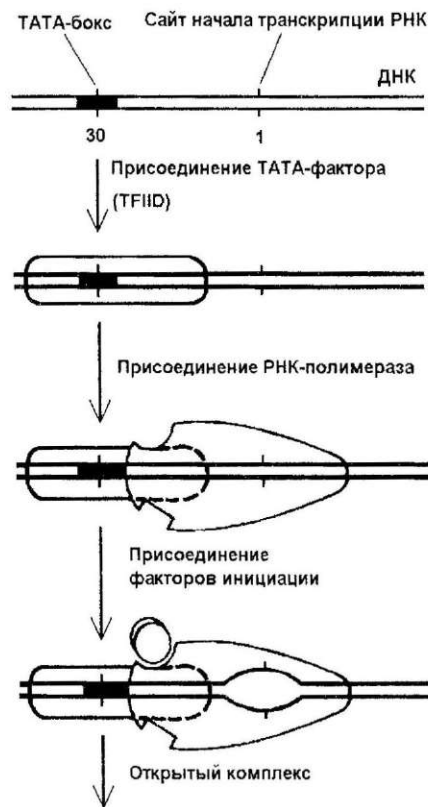


Рис. 10. ТАТА-фактор остается связанным с ТАТА-боксом во время синтеза РНК, что облегчает использование промотора многими молекулами РНК-полимеразы.

Элонгация. Процесс катализируется ферментом РНК-полимеразой и требует присутствия ионов Mg^{2+} или Mn^{2+} . Образование мРНК происходит на основе принципа комплементарности цепей ДНК и РНК.

И энхансер, и предпромоторный элемент содержит серию коротких нуклеотидных последовательностей, связывающихся с соответствующим регуляторными белками. Эти белки

взаимодействуют друг с другом; в результате этого взаимодействия происходит включение или выключение генов. С помощью методов рекомбинантной ДНК показано, что регуляторные белки часто состоят из нескольких доменов, каждый из которых обладает своей функцией.

У прокариот недалеко от стартовой точки транскрипции располагается последовательность из шести нуклеотидов ТАТААТ, которая называется блоком Прибнова. Последний располагается в положении –11 до –5 или от –14 до –8, то есть стартовой точкой транскрипции. Обнаруживая эту последовательность, РНК-полимераза прочно связывается с ней и начинает синтез РНК (рис. 8).

Терминация. РНК-полимераза продвигается вдоль цепи ДНК и постепенно переписывает информацию на РНК. Этот процесс завершается при достижении ферментом специфической нуклеотидной последовательности (терминаторы транскрипции АТТ, АУГ и АТЦ).

1.4.4. Метилирование генома эукариот. CG – островки

Метилирование ДНК важно для регуляции транскрипции.

Контролировать транскрипцию может *метилирование ДНК* (менять структуру гена). Открытие «пятого основания» – 5-метилцитозина показало, что после репликации ДНК, около 5% цитозинов в ДНК млекопитающих переводится в 5-метилцитозин.

Метилирование является одной из модификаций ДНК, приводящих к изменению ее структурного и функционального статуса. Наиболее изучено метилирование CG-последовательностей эукариот. Большинство метильных групп найдено в дуплетах CG (у человека метилировано 70% CG пар), образующих короткие палиндромы.

Последовательности CG неравномерно распределены по геному: существуют отдельные области длиной 1000-2000 нуклеотидов в которых содержание CG в 10-20 раз выше, чем в среднем по геному. Эти островки окружают промоторы так называемых генов «домашнего хозяйства», т.е. тех генов, которые кодируют белки, необходимые для жизнедеятельности

клетки. Геном млекопитающих в среднем содержит порядка 3000 CG-островков, каждый из которых имеет длину около 1000 пн. Установлена роль метилирования ДНК в процессах рекомбинации, репликации, регуляции, транскрипции генов и импринтинга (ядерная память).

В норме большая часть CG-островков, расположенных в хроматине и в кодирующих последовательностях генов метилирована. В последнее время доказано участие метилирования ДНК в возникновении и развитии опухолевых заболеваний. В неопластических клетках общий уровень метилирования генома опухолевых клеток значительно ниже, чем нетрансформированных, при одновременном повышении активности метилазы. Представляет интерес предположение, согласно которому сильно метилированные участки генома опухолевых клеток могут служить маркерами областей хромосом, которые в дальнейшем будут делетированы. Во многих опухолях человека показана потеря аллелей генов, особенно при дальнейшей прогрессии опухоли. ДНК между энхансером и промотором образует петлю, в результате чего белки, связанные с энхансером, непосредственно взаимодействуют с одним из общих факторов транскрипции или с молекулой самой РНК-полимеразы (рис. 11). Комплекс, который называют ТАТА-фактор, т.к. он может связываться с консервативной АТ-богатой последовательностью, называется ТАТА-бокс, которая, расположена за 25 нуклеотидов до сайта начала транскрипции. Транскрипты, синтезированные в ядре РНК-полимеразой II называют гетерогенной ядерной РНК (гЯРНК, рис. 11).

1.4.5. Процессинг, сплайсинг

Перед тем, как выйти из ядра и стать мРНК, 5'конец молекулы РНК кэпируется, т.е. достраивается с образованием особой структуры, ответственной за последующее связывание молекулы мРНК с рибосомой. Кэпирование (добавление метилированного G-нуклеотида) происходит почти сразу после синтеза первых 30 нуклеотидов РНК.

5'КЭП играет роль в инициации белкового синтеза и

защите транскрипта РНК от деградации. Образующие КЭПы обеспечивают узнавание молекул мРНК малыми субъединицами рибосом.

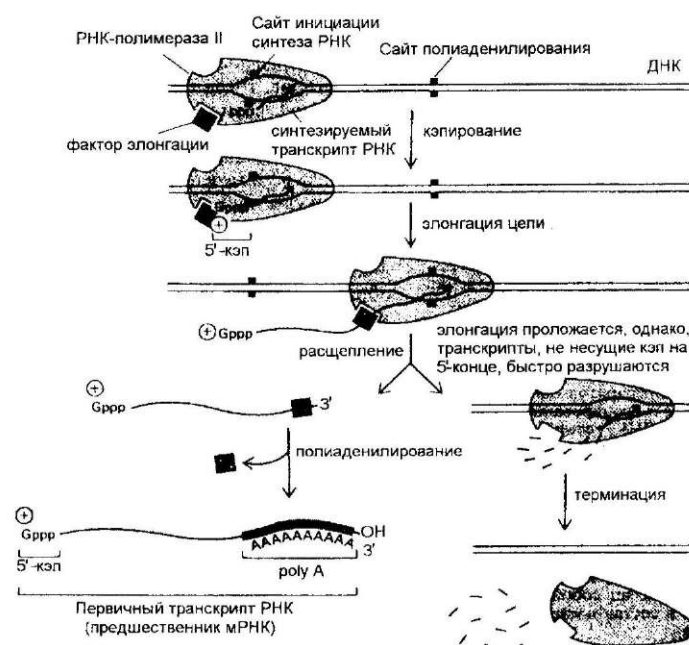


Рис.11. Синтез молекулы гяРНК с помощью РНК-полимеразы II

К 3'-концу с помощью специальной полимеразы добавляется poly A-последовательность. Сигналом к разрезанию служит появление на цепи РНК участка ААИААА (за 10-30 нуклеотидов до сайта расщепления), сделав разрез, фермент poly A полимераз присоединяет от 100 до 200 остатков адениловой кислоты (т.н. poly A – «хвост») к 3'-концу цепи РНК, чем завершает образование первичного транскрипта РНК. Предполагают, что функция хвоста состоит в транспорте зрелой мРНК из ядра и замедляет деградацию в цитоплазме некоторых молекул мРНК.

В ходе процессинга РНК из середины молекулы удаляются

длинные последовательности нуклеотидов (интроны). Поскольку кодирующие последовательности с обеих сторон интрона после его удаления соединяются друг с другом, эту реакцию назвали сплайсингом РНК (to splice - сращивать). Последовательности интронов удаляются в виде лассоподобных РНК-структур (рис. 13). Один и тот же транскрипт РНК может сплайсироваться по-разному, при этом образуются мРНК, кодирующие разные белки (рис. 12). Одновременно с удалением интронов происходит ферментативное сшивание экзонов.

Итак, процессинг включает следующие процессы: а) копирование РНК; б) удаление части нуклеотидов на 3'-конце; в) присоединение к этому концу «хвоста» поли А; г) сплайсинг.

Значение процессинга – эукариотическая клетка может дополнительно контролировать процессы образования белков, а значит лучше регулировать свой метаболизм, структуру и функции.

Экспорт РНК из ядра может регулироваться. Первичный транскрипт РНК в среднем в 10 раз длиннее, чем зрелая молекула РНК, образующаяся при сплайсинге. Пределы клеточного ядра покидает 1/20 часть всей гетерогенной ядерной РНК (Г Я РНК).

Экспорт мРНК в цитоплазму происходит только после завершения сплайсинга. Молекулярные механизмы, связанные с «созреванием» различных типов РНК, называются процессингом. Он осуществляется в ядре перед переходом РНК из ядра в цитоплазму. Синтез молекул про-мРНК осуществляется под действием фермента – РНК-полимеразы-II.

Молекула про-мРНК содержит не только экзоны, но и интроны (не кодирующие участки). В процессе «созревания» мРНК ферменты вырезают интроны и сшивают экзоны. Этот процесс называется сплайсингом (рис.13).

Экзоны, как правило, имеют небольшую длину, от 100 до 600 п.н., а длина интрона может варьировать. Общая длина всех интронов зачастую значительно превышает суммарную длину экзонов. Например, из 7000 пар нуклеотидов гена овальбумина курицы на долю экзонов приходится всего 1872 п.н., то есть

почти 75% длины ДНК составляют интроны (рис. 14). Интроны обычно отделяются от экзонов парой нуклеотидов, содержащих Г и Т на 5'-конце и А – Г на 3'-конце.

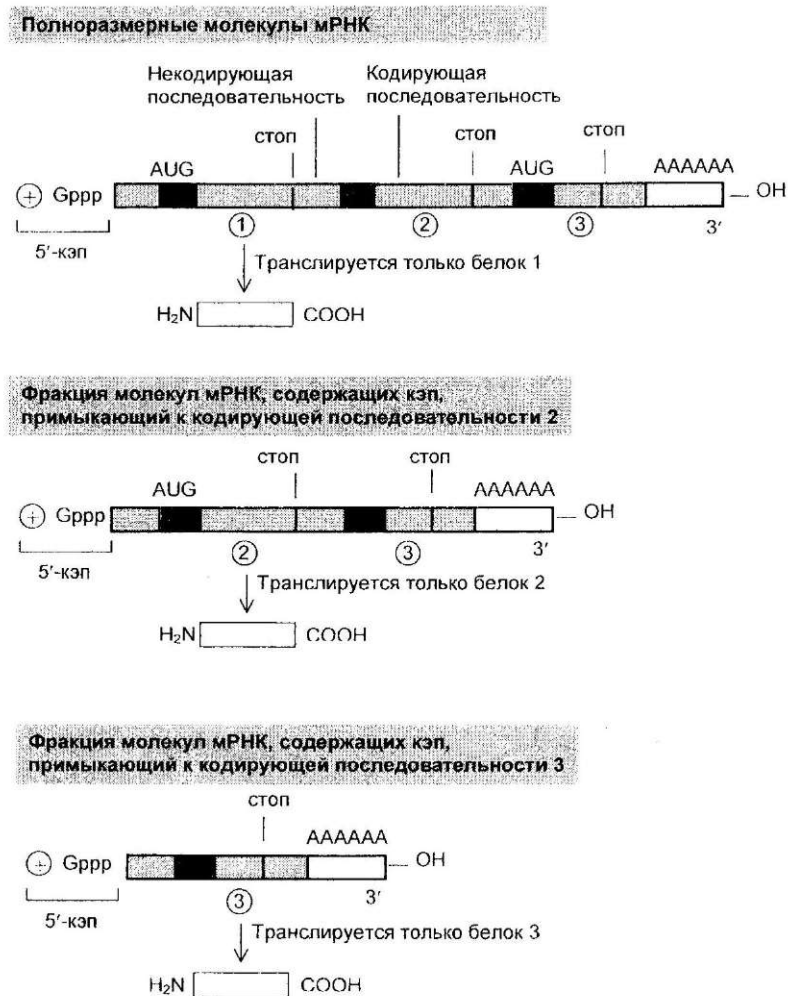


Рис.12. У некоторых вирусов один и тот же первичный транскриптан сплайсируется по-разному.

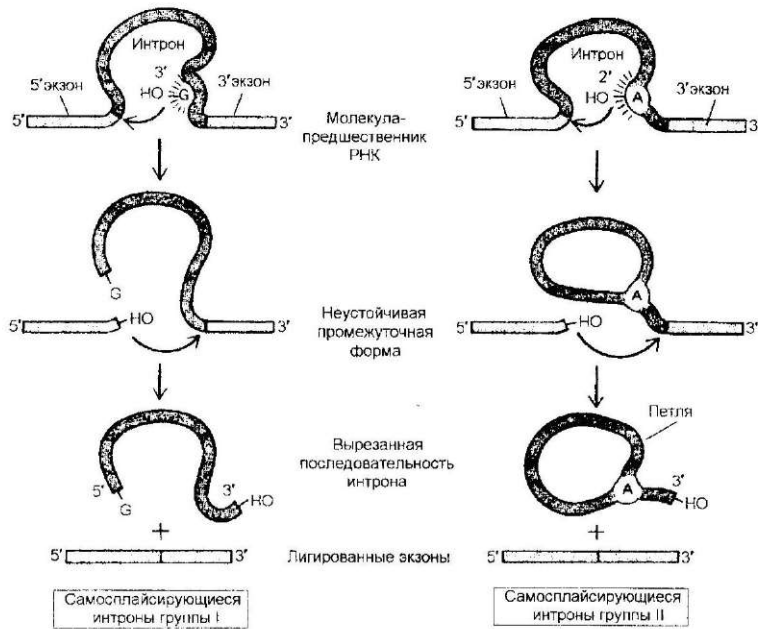


Рис. 13. Два известных класса самосплайсирующихся интронов. Сплайсинг РНК. Экспорт мРНК в цитоплазму происходит только после завершения сплайсинга.

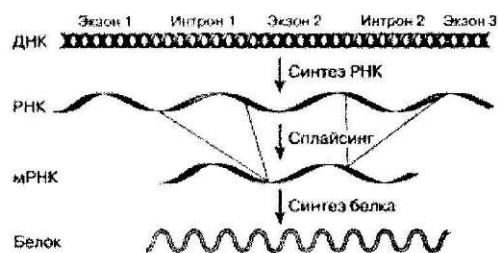


Рис. 14. Процесс передачи информации от ДНК до белка.

В процессинге участвует целый ряд ферментов. *Нуклеазы* вырезают интронные участки; *лигазы* сшивают экзонные участки. В итоге синтезированные молекулы мРНК или тРНК

оказываются меньших размеров, чем их структурные гены. Например, молекулы про-мРНК имеют молекулярную массу 10^7 дальтон, а после процессинга составляет $2 \cdot 10^6$ дальтон. Наличие интронов в генах эукариот является универсальным явлением. В больших генах интронов бывает до 50 (рис. 15). Предполагают, что интроны являются запасом информации, обуславливающим изменчивость.

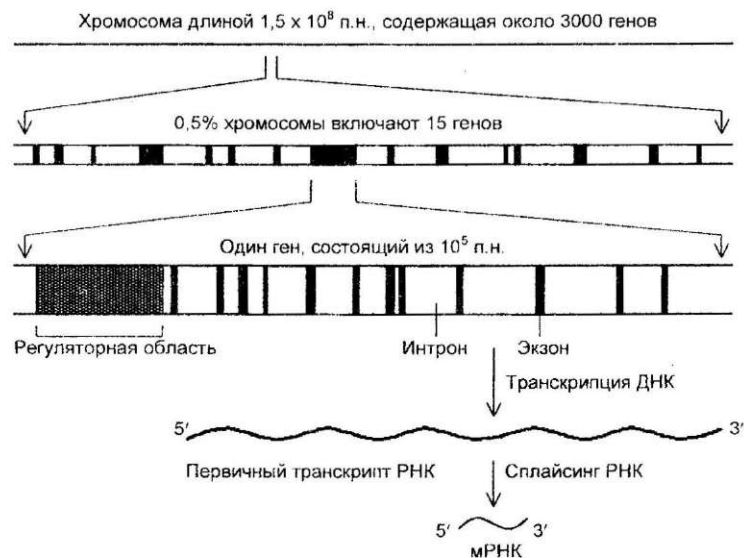


Рис. 15. Организация генов в типичной хромосоме позвоночных. Регуляторные последовательности расположены на 5'-конце гена. При образовании мРНК последовательности интронов из первичных транскриптов РНК удаляются.

Зрелые молекулы мРНК узнаются рецепторными белками (входящими в состав ядерных пар), которые способствуют продвижению мРНК в цитоплазму. Не все молекулы РНК, достигающие цитоплазмы, транслируются в белок.

Позитивный контроль трансляции может осуществляться за счет расположенной на мРНК специальной области «трансляционного энхансера», который способен выборочно привлекать рибосомы.

У таких РНК 5'-лидерная последовательность необычайно длинна и содержит серию триплетов А и G, препятствующих трансляции кодирующей последовательности.

Регуляция транскрипции у эукариот отличается от таковой у прокариот тремя важными особенностями.

Во-первых, у эукариот функционируют три разных типа РНК-полимераз: I, II, III. РНК-полимераза I считывает гены 18S, 28S и 5,8S рибосомных РНК, РНК-полимераза II считывает основную часть генов, кодирующих полипептиды и некоторые мРНК (малые ядерные РНК), РНК-полимераза III считывает гены 5S рибосомных РНК, транспортных РНК.

Во-вторых, РНК-полимераза эукариот не может самостоятельно инициировать транскрипцию. Для ее активирования необходимо большое число белков, называемых общими факторами транскрипции, которые должны объединиться в комплекс, прежде чем транскрипция начнется.

В-третьих, большинство регуляторных белков у эукариот могут влиять на скорость транскрипции, даже если эти белки связываются с участками ДНК, расположенными за тысячи пар нуклеотидов от промотора.

Выделяют пять уровней организации транскрипции: уровень взаимодействия белков с ДНК, уровень взаимодействия связанных с ДНК белков с другими белками, уровень организации хроматина, уровень организации ядра и уровень транспорта материала в ядро и из ядра.

1.4.6. Эпигенетическая регуляция активности генов.

Геномный импринтинг

На фоне расшифровки последовательности нуклеотидов в геномах разных организмов стало очевидным, что геном функционирует как сложная система с множеством обратных связей, а не как простое считывание информации с «цепочки бусинок-генов». Регуляторная иерархия динамична. Она может изменяться в процессе деления соматических и зародышевых клеток. Эпигенетические механизмы, догадки о которых на основе фактов возникли давно, приводят к наследственным стабильным изменениям экспрессии генов без изменения нуклеотидной последовательности в ДНК.

В настоящее время стало очевидным, что в транскрипцию генов эукариот вовлечен огромный комплекс молекул – полимеразы, транскрипционные факторы, белки регуляторного аппарата. Среди различных способов контроля транскрипции особый интерес вызывают надмолекулярные (эпигенетические) механизмы, дифференциальной экспрессии генов, связанные с модификацией генома без изменения первичной последовательности нуклеотидов в ДНК.

До недавнего времени предполагалось, что гены материнской и отцовской гомологичных хромосом в клетках млекопитающих экспрессируются одинаково и, таким образом, вклад родителей в геном человека является эквивалентным. Однако в последние годы внимание исследователей привлек интригующий феномен геномного импринтинга (ГИ). Под ГИ понимают эпигенетический процесс, дифференциально маркирующий некоторые локусы гомологичных хромосом и включающий экспрессию одного аллеля. Таким образом, в участках генома, подверженных импринтингу, обнаруживается не биаллельная, а моноаллельная экспрессия генов, причем если импринтирован материнский ген, то экспрессируется отцовский аллель, и наоборот. Наличие такого способа регуляции работы генов свидетельствует о неэквивалентном вкладе родителей в геном потомков и ставит под сомнение универсальность законов классической менделевской генетики. Естественно, что фенотипические признаки, контролируемые импринтированными локусами, могут изменяться не только в результате мутаций этих генов, но и в результате нарушения эпигенетической программы регуляции генной экспрессии.

В генетическом смысле термин «импринтинг» (англ, imprint – отпечаток) впервые был применен в 1960 г. Х. Кроуз из Колумбийского университета США для описания селективной элиминации отцовских хромосом у насекомых. Долгое время этого явления не замечали, и лишь к середине 80-х годов интерес к нему возник вновь, когда в экспериментах с трансплантацией ядер половых клеток у мышей было доказано, что андрогенетические или гиногенетические эмбрионы, т.е. зародыши, сформированные только из двух мужских или двух женских пронуклеусов, не могли нормально развиваться в ходе

эмбриогенеза. Гиногенетические плоды имели плохо развитую плаценту, но видимый эмбрион, тогда как у андрогенетических плодов хорошо развивались только экстраэмбриональные ткани. Эти данные указывали на то, что экспрессированные гены отца преимущественно обеспечивали развитие плаценты, в то время как материнские гены контролировали развитие эмбриона. Подобным же образом и у человека при полном пузырном заносе, содержащем только два гаплоидных набора отцовских хромосом, происходит сильное кистозное разрастание трофобласта (трофобластическая болезнь) без образования фетальных тканей. Триплоидные зародыши также обнаруживают эффекты импринтинга. Диандрические триплоиды (с двумя гаплоидными наборами отца и с одним материнским набором) характеризуются сильно развитым трофобластом и задержкой развития плода, тогда как дигинические триплоиды с обратным соотношением гаплоидных наборов имели плохо развитую плаценту. Эти данные свидетельствовали о существовании генов, которые экспрессируются либо только в отцовских, либо только в материнских гомологичных хромосомах.

Первый импринтируемый ген был открыт в 1991 г. при исследовании мышей, гомозиготных по нулевой мутации гена иммулиноподобного фактора роста типа 2 (Igf2), которые по величине были меньше мышей, имеющих гены Igf2 дикого типа. Однако, карликовые мыши появлялись также и у гетерозиготных носителей мутации этого гена, но только в том случае, если мутантный аллель был унаследован от отца. Этот факт свидетельствовал о материнском импринтинге гена Igf2, который экспрессировался только в отцовской хромосоме. Позже было показано, что аналогичный человеческий ген IGF2 также экспрессируется только в отцовской хромосоме в большинстве тканей человека, за исключением печени у взрослых лиц, где отмечается его биаллельная экспрессия. Таким образом, уже первые находки импринтированных генов свидетельствовали не только о существенном значении ГИ в контроле эмбрионального и постнатального роста и развития организма, но и о сложной эволюции механизмов такого контроля.

Благодаря эволюционной консервативности геномов млекопитающих исследование такого удобного модельного объекта, как мышь, вносит большой вклад в выявление импринтированных генов у человека. Эксперименты на мышах позволили создать и проследить развитие зародышей с двумя гомологичными хромосомами от одного родителя. Такое состояние называется униродительской или однородительской дисомией (ОРД). В зависимости от стадии мейоза, в которой происходит нерасхождение хромосом, возможны два типа ОРД – гетеродисомия и изодисомия (нерасхождение соответственно в I и во II мейотических делениях). Эффекты импринтинга по разным хромосомам набора у мышей варьировали от ранней эмбриональной летальности до поведенческих нарушений. Всего у данного объекта было выявлено 6 разных хромосом с разными типами фенотипических проявлений импринтинга, и половина из них детерминировала гибель эмбрионов в начале и в середине беременности. У человека ОРД по некоторым хромосомам набора также приводит к аномалиям фенотипа (табл. 2). Кроме того, поскольку в результате изодисомии происходит гомозиготизация генов, это событие может способствовать проявлению рецессивных моногенных дефектов. Следует отметить, что в последние годы был достигнут большой прогресс в идентификации импринтированных генов. У человека известно уже около 30 таких генов и транскриптов, и предполагается, что их число может достигать 200–500. Таким образом, к настоящему времени картировано, по-видимому, не более 10–15% генов, подверженных импринтингу. Импринтированные гены и транскрипты обнаружены на многих хромосомах человека – 1, 5, 6, 7, 11, 13, 15, 19 и 20. Однако одной из интригующих особенностей генома млекопитающих стало обнаружение кластерной организации большинства идентифицированных генов, подверженных импринтингу.

В основе ГИ лежат специфические структурно-молекулярные изменения отдельных участков хромосом, происходящие во время формирования мужских и женских половых клеток, которые приводят к стойким функциональным различиям экспрессии гомологичных генов у потомства.

Точные механизмы, лежащие в основе ГИ, неизвестны. Основную роль в этом процессе отводят метилированию цитозиновых оснований ДНК, которое включает транскрипцию генов.

Таблица 2

Однородительские дисомии человека, связанные с аномалиями фенотипа.

Хромосома	Родительское происхождение ОРД	Заболевание или синдром
6	Отцовское	Транзитный неонатальный сахарный диабет
7	Материнское	Синдром Рассела-Сильвера
	Материнское	Внутриутробная задержка развития
11	Отцовское	Синдром Видемана-Беквита
14	Материнское	Внутриутробная задержка развития, задержка физического и моторного развития, гипотония, преждевременное половое созревание
15	Материнское	Синдром Прадера-Вилли
	Отцовское	Синдром Ангельмана
16	Материнское	Внутриутробная задержка развития, связанная с ограниченным плацентарным мозаицизмом

Импринтинг почти всегда происходит во время гаметогенеза или перед слиянием пронуклеусов в зиготе, и должен иметь три признака:

- а) должен существовать в одной гамете и быть достаточно стойким в митозе, чтобы передаться каждой клетке эмбриона;
- б) в диплоидной клетке должен выявляться только в одной из гомологичных хромосом;
- в) должен обновляться в половых клетках после установления пола эмбриона.

Процесс научного познания импринтинга, его механизмы и влияние на нормальное и патологическое состояние регуляции экспрессии генов только начался и прогнозирует получение новых знаний и новых возможностей использования в практической деятельности человека.

Импринтинг – это наибольшая загадка настоящего времени. Известен только один из механизмов – метилирование цитозина в определенных местах ДНК (см. выше). Присоединение метиловых групп к цитозину выключает экспрессию гена, и тогда работает только его неметилованный аллель, локализующийся либо в материнском, либо в отцовском геноме.

1.4.7. Этапы синтеза белка

Процесс синтеза белков состоит из 3-х этапов: **инициация, элонгация, и терминация.**

Инициация. Активация аминокислот. Аминокислоты (АК) в цитозоле клетки вступают в реакцию с АТФ (активированная аминокислота). Формируется комплекс АК-АМФ, который катализируется ферментами **аминоацил-тРНК-синтетазами.** Активированная аминокислота присоединяется к своей специфической тРНК. Процесс узнавания аминокислот тРНК называется **рекогницией.**

Аминоацил-тРНК-комплекс поступает к месту синтеза белков, а свободный фермент может вновь активировать следующую молекулу аминокислоты (рис. 17).

Активация рибосом и начало синтеза полипептидной цепи. мРНК соединяется с малой рибосомальной субъединицей при помощи специального триплета. Это обеспечивается образованием водородных связей между комплиментарными парами оснований между соответствующими азотистыми основаниями иРНК и рРНК рибосом. Соединение рибосомы с мРНК обусловлено комплементарным взаимодействием нуклеотидов одной из рРНК с нуклеотидной последовательностью лидера мРНК. Эта последовательность располагается на расстоянии 4-7 оснований перед кодоном AUG и обнаруживается повсеместно в лидерных участках у прокариот (рис. 17).

При соединении 5'-конца мРНК с малой субчастицей рибосомы стартовый кодон обычно оказывается почти в середине экранированного рибосомой фрагмента мРНК в области, соответствующей ее П-участку.

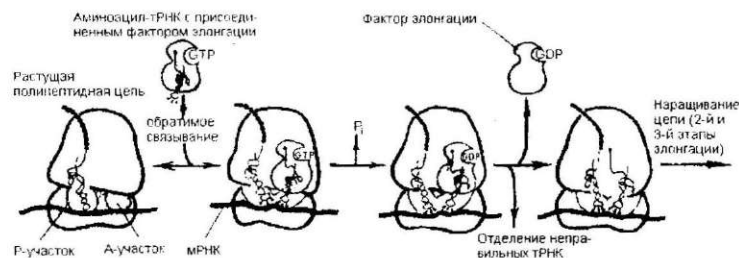


Рис. 16. Элонгация белкового синтеза.

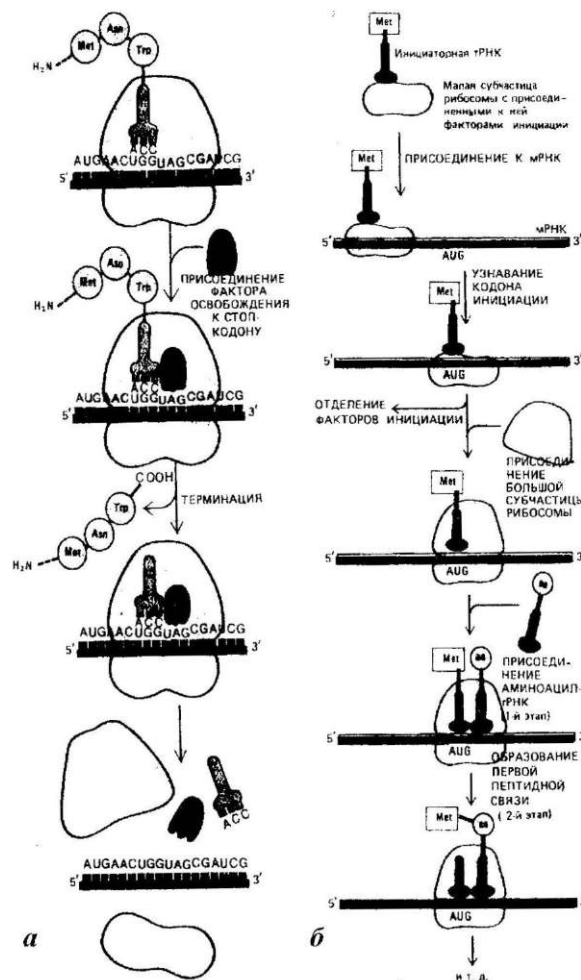


Рис. 17. Последняя фаза синтеза белка. Присоединение фактора освобождения к стоп-кодону прекращает трансляцию (а). Фаза инициации в синтезе белка (б).

КЭПированный конец мРНК распознается малой субчастицей рибосомы, затем лидирующая последовательность, содержащая до 100 нуклеотидов, взаимодействует с рРНК. При этом стартовый кодон AUG оказывается в недостроенном П-участке рибосомы. После присоединения к стартовому кодону

аминоацил-тРНК, несущей метионин, происходит воссоединение двух субчастиц рибосомы и формируются ее А- и П-участки.

Именно аминокислота метионин инициирует процесс синтеза белка. Ее несет тРНК, имеющая УАЦ антикодон, который связывается с АУГ кодоном и РНК на участке П рибосомы. Образующийся комплекс называется комплексом инициации. Затем к малой субъединице иРНК присоединяется большая субъединица, образуя активную рибосому (имеющую сформированные аминокислотный и пептидильный участки), рис. 18.



Рис. 18. Три главных участка связывания, в которых молекулы РНК присоединяются к рибосоме.

Элонгация. Удлинение полипептидной цепи. Процесс катализируется ферментом пептидилтрансферазой. В этом процессе связь между первой аминокислотой и ее тРНК разрывается и $-COOH$ группа первой аминокислоты образует пептидную связь со свободной $-NH_2$ группой второй аминокислоты. Первая тРНК, теперь свободна, отделяется от П-участка рибосомы и возвращается в общий фонд тРНК в цитоплазме. По мере продвижения мРНК относительно рибосомы все ее кодоны перемещаются на А-участок один за другим, и пептидная цепь растет. В процессе элонгации принимают участие специальные белковые **факторы элонгации**. Рибосома движется относительно мРНК только в одном направлении, перемещаясь на один триплет от 5'конца к 3'концу мРНК. Синтез белковой молекулы происходит в большой субъединице, где против одного триплета расположен аминокислотный центр (отсоединение АК от тРНК), а против другого – пептидильный участок (присоединение АК к

растущему пептиду), рис. 16. Скорость синтеза пептидной цепи у эукариот – 2 аминокислоты в секунду; у прокариот скорость выше – 15 аминокислот в секунду.

Терминация. В конце цепи мРНК находится один из «стоп»-кодона (УАА, УАГ, УГА). Фактор терминации (специальный белок) присоединяется к этому кодону и блокирует удлинение полипептидной цепи. При этом к последней аминокислоте синтезируемого белка присоединяется вода и ее карбоксильный конец отделяется от тРНК. Связь между последней тРНК и полипептидной цепью разрывается специальными ферментами – факторами высвобождения. Рибосома отсоединяется от цепи мРНК и распадается на 2 субъединицы. Синтезированный полипептид освобождается в цитоплазму. Каждая молекула мРНК транскрибируется несколько раз, а затем разрушается. Среднее время «жизни» мРНК составляет примерно 2 минуты.

Модификация синтезированного полипептида. Синтезированный из аминокислот полипептид – это пря-молинейная молекула, которая поступает в эндоплазматическую сеть или комплекс Гольджи, где завершается построение белковой молекулы.

В процессе «созревания» белковая молекула может терять некоторые концевые аминокислоты при помощи фермента экзопептидазы, а затем образовывать вторичную и третичную структуры. Процессы изменения первоначальной структуры полипептида и формирования новой называются посттрансляционной модификацией.

Альтернативные ситуации, имеющие место на уровне трансляции генетической информации.

Трансляция генетической информации у про- и эукариот имеет значительные отличия. В целом она подразделяется на три стадии – **инициацию, элонгацию и терминацию**. Практически на каждом этапе у про- и эукариот существуют свои альтернативные варианты.

Инициация – это начало считывания рибосомной генетической информации мРНК с определенной точки ее нуклеотидной последовательности. Эта точка – инициаторный кодон, располагающийся у прокариот не первым с 5'-конца мРНК, а, как правило, на некотором расстоянии от начала

полинуклеотидной цепи. В инициации участвуют инициаторные кодоны, инициаторная тРНК и белковые факторы инициации. У прокариот существуют несколько инициаторных кодонов, среди которых AUG является основным и встречается чаще, чем GUG и UUG. В редких случаях роль инициаторных кодонов выполняют кодоны AUU и AUA.

Инициаторные кодоны распознаются специальной метиониновой тРНК. Ей свойственно присоединять остаток формиатной кислоты после аминоацилирования метионином. Формиатная группа присоединяется к аминогруппе метионина в составе метионил – тРНК^{Met}. После этого образуется F-метионил – тРНК_ф^{Met}, способная узнавать только один из инициаторных кодонов, но не способная переносить остаток метионина внутрь белковой цепи, синтезирующейся на мРНК. Другие метиониновые кодоны узнаются обычной тРНК^{Met}, которая не формилируется. Формильная группа переносится на аминогруппу остатка метионина формилтрансферазой от формилтетрагидрофолата.

У прокариот существуют три белковых фактора инициации (IF-1, IF-2, IF-3), три белковых фактора элонгации (EF-Tu, EF-Ts, EF-G) и три белковых фактора терминации (RF-1, RF-2, RF-3).

У эукариот ситуация драматически отличается от прокариот: эукариоты имеют около 10 факторов инициации (eIF-1, eIF-2, eIF-3, eIF-4A, eIF-4B, eIF-4C, eIF-4D, eIF-4E, eIF-4F, eIF-5 и т.д.), два фактора элонгации (EF-1, EF-2) и только один фактор терминации (ERF). Главными факторами инициации считаются eIF-2, eIF-3 и eIF-5, в то же время другие факторы в разной степени только стимулируют трансляцию. Роль факторов eIF-2A и eIF-4D неизвестна.

В отличие от прокариот эукариоты имеют лишь иницирующий кодон AUG. В большинстве случаев этот кодон – первый от 5'-конца мРНК, однако, это не является абсолютным правилом для всех мРНК. Инициаторная тРНК эукариот, узнающая кодон AUG, не формилируется.

Еще одно важное отличие прокариотической системы трансляции от эукариотической состоит в том, что мРНК

эукариот имеют на 5'-конце так называемую *САР – структуру*, удаление которой резко снижает эффективность трансляции мРНК. САР – структура представляет собой остаток гуанина, метилированный в 7-м положении (m^7G), а также метилированный во второй и третий нуклеотид. Известны три альтернативные САР – структуры мРНК эукариот. С САР – структурой связывается один из инициаторных белков - eIF-4E. Это стимулирует ассоциацию рибосом с мРНК и инициацию трансляции.

На уровне трансляции, как известно, реализуется адапторная функция тРНК, суть которой состоит в том, что именно *антикодон тРНК*, а не аминокислота, которая аминоацилирует тРНК, узнает свой кодон. Это осуществляется благодаря комплементарности кодон – антикодонного взаимодействия с образованием стандартных пар нуклеотидов А-У, У-А, G-С, С-G. Между кодоном и антикодоном образуется комплекс с параметрами двойной антипараллельной спирали.

Как уже упоминалось, у прокариот существуют три белковых фактора терминации - RF-1, RF-2, RF-3. RF-1 узнает кодоны терминации UUA и UAG. RF-2 взаимодействует с кодонами UUA и. Третий фактор не участвует непосредственно в терминации.

Эукариоты имеют только один фактор терминации eRF. Он узнает все три кодона терминации (UUA, UAG, UGA), взаимодействует с GTP и вместе с рибосомой проявляет GTPазную активность. Альтернативный вариант терминации состоит в том, что существуют так называемые супрессорные тРНК, конкурирующие с факторами терминации за *нонсенс*-кодонами в А-сайте рибосомы. Если эта конкуренция идет в пользу супрессорной тРНК, то на полицистронной матрице у прокариот терминация не срабатывает, и первый синтезированный белок не отделяется от следующего. Таким образом, *нонсенс*-кодонами не являются абсолютно нонсенсами.

На рис. 19 представлена схема переноса белков в эндоплазматический ретикулум (ЭР). Как только на рибосоме синтезируется сигнальный пептид, он направляет рибосому к белку-рецептору на мембране ЭР.

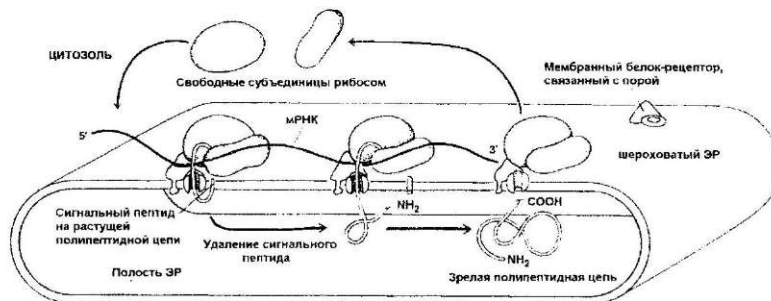


Рис. 19. Упрощенная схема переноса белков в эндоплазматический ретикулум (ЭР).

Результатом участия белков в метаболизме является развитие признака. Весь процесс биосинтеза белков и проявления их свойств можно представить схемой:

ДНК → про-мРНК → мРНК → полипептидная цепь → модификация → функциональная активность → признак.

Регуляция биосинтеза белка

Регуляция биосинтеза белка – принципиальный атрибут любой живой клетки.

Синтез белков в клетке регулируется на **трех уровнях**:
 1) путем изменения активности генов (уровень транскрипции);
 2) путем изменения активности мРНК в ее трансляции рибосомами (уровень трансляции); 3) путем деградации мРНК посредством ее тотального или избирательного расщепления рибонуклеидами.

Существует три основных способа, как регулировать трансляцию. *Первый способ* – позитивная регуляция на основе сродства мРНК к иницирующей рибосоме и факторам инициации (дискриминация мРНК).

Второй способ – негативная регуляция с помощью белков-репрессоров, которые связываясь с мРНК, блокируют инициацию (трансляционная репрессия).

Третий способ – тотальная регуляция трансляции всей совокупности мРНК клетки посредством модификации факторов инициации.

1. Дискриминация мРНК

Скорость и частота инициации трансляции рибосомами может сильно различаться для разных мРНК. У прокариотических организмов это определяется тем, что иницирующие участки разных мРНК имеют разное сродство к рибосомам и, таким образом, с разной эффективностью связывают рибосомные частицы. На основании разницы в эффективности инициации можно говорить о «сильных» и «слабых» мРНК. Похожая ситуация наблюдается и в эукариотических клетках, но там дискриминация мРНК обусловлена скорее разным сродством факторов инициации. Так как последние локализуются на иницирующих малых рибосомных субчастицах, то они и определяют разную эффективность посадки рибосом на разные мРНК и, таким образом, дискриминируют их на сильные и слабые.

Различная сила мРНК в значительной мере определяет соотношение продукции различных белков в клетке. Так, структурные белки мембран, рибосомные белки, факторы элонгации, белки оболочки вирусов и другие белки, требуемые в большом количестве, кодируются сильным мРНК, а многие специализированные ферменты и регуляторные белки – слабыми мРНК.

2. Трансляционная репрессия

Типичный механизм ее состоит в том, что специальный белок, называемый репрессором, специфически связывается с участком мРНК. Связываемый белок-репрессор мешает связываться иницирующей рибосомной частице и тем самым либо уменьшает скорость инициации, либо полностью блокирует ее. Часто в месте связывания белка-репрессора имеется не очень стабильная двуспиральная структура – шпилька, которая легко расплетается иницирующей рибосомой. Белок-репрессор стабилизирует шпильку, превращая ее в плохо преодолимый барьер для иницирующей рибосомы.

В научной литературе описано много случаев, когда репрессором является сам белок, кодируемый данной мРНК. Другими словами, мРНК репрессируется своим же продуктом.

В результате получается регуляция по типу обратной связи: производство избыточного количества белка на данной мРНК приводит к связыванию этого белка с инициаторным участком своей мРНК и таким образом к регрессии собственного синтеза.

3. Маскирование мРНК у эукариот.

Кроме типичной трансляционной репрессии эукариоты выработали интересный механизм маскирования мРНК, когда соответствующая мРНК становится недоступной не только для инициации трансляции, но и фактически выведена из всех других процессов ее возможных превращений или изменений – деградации нуклеазами, ферментативной модификации ее 3'-конца путем полиаденилирования. Маскирование, как и типичная трансляционная репрессия, тоже осуществляется белками и зависит от внешних сигналов (эффекторов). Маскирование и демаскирование мРНК являются особенно характерными для процессов гаметогенеза, раннего эмбрионального развития, клеточной дифференцировки гормонального включения или выключения функций. Например, в оогенезе происходит запасание некоторых материнских мРНК в маскированной форме, и часть этих мРНК демаскируется в ответ на оплодотворение яйцеклетки, обеспечивая белковый синтез на самых ранних стадиях эмбриогенеза: дробления, бластулы и ранней гаструлы.

1.4.9. Рибосомы. Роль рибосом в биосинтезе белка

Модель молекулярного механизма работы рибосом была предложена А.Спириным в 1968 г.

Рибосомы состоят из большой и малой субъединиц, содержащей различные типы рРНК и белки. Субъединицы образуются в ядрышке из рРНК и специальных белков и отдельно переходят через поры ядра в цитоплазму. Большие и малые субъединицы рибосом находятся в цитоплазме отдельно, пока не вовлечены в синтез белков, две субъединицы рибосом образуют комплекс с мРНК в момент начала синтеза белков и подвергаются диссоциации, если он заканчивается. Малая субъединица связывается с мРНК и активированными

---. пептидилтрансферазы большой субъединицы катализируют образование пептидных связей между аминокислотами. Терминирующие кодоны УАА, УАГ и УГА контролируют отделение от рибосомы синтетического полипептида и мРНК.

Рибосома имеет две бороздки, в одной располагается мРНК, а другая удерживает растущую полипептидную цепь. В момент синтеза белков в рибосоме находится участок мРНК, состоящий примерно из 30 нуклеотидов. При этом обеспечивается взаимодействие только двух тРНК несущих две аминокислоты.

1.4.10. Гистоновые и негистоновые белки (ГБ, НГБ) в регуляции функции генов

Комплекс обоих классов белков с ядерной ДНК клетки эукариот называется хроматином.

Во фракцию НГБ входят 450 индивидуальных белков с различным молекулярным весом (5-200 тыс.). К НГБ относятся ферменты, участвующие в метаболизме нуклеиновых кислот (ДНК-полимеразы, ДНК-типоизомеразы, метилазы ДНК и РНК, РНК-полимеразы).

Наиболее подробно изучены негистоновые белки так называемой группы (HMG – high mobility group или белки Джонса). Связываясь линкерными участками ДНК и обеспечивая изменение уровня компактизации фибрилл ДНП, которые становятся более доступными для взаимодействия с РНК-полимеразой.

Гистоны представляют собой относительно небольшие белки с очень высоким содержанием положительно заряженных аминокислот (лизина и аргинина). Суммарный положительный заряд позволяет им прочно связываться с ДНК.

Пять типов гистонов можно разделить на две основные группы: 1) нуклеосомные гистоны и 2) Н1 гистоны. Нуклеосомные гистоны – это небольшие белки (102-135 аминокислотных остатков), отвечающие за формирование нуклеосом. К ним относятся четыре гистона: H2A; H2B; H3 и

H4. Размер гистона H1 несколько больше и составляет примерно 220 аминокислотных остатков. Гистоновые белки H1 помогают соединять нуклеосомы.

Ацетилирование гистонов играет роль в регуляции транскрипционной активности.

Ацетилирование – это ковалентная модификация белков хроматина. Но в регуляцию транскрипции вовлекается также ковалентная модификация ДНК. Ацетилированные гистоны – признак транскрипционно активного хроматина. Гистоны целенаправленно модифицируются на тех промоторах, которые требуется активировать. Ацетилированные гистоны менее прочно связаны с ДНК, поэтому транскрипционным факторам легче преодолевать сопротивление упаковки хроматина. Идентифицированы ферменты, которые осуществляют процесс ацетилирования. В этот комплекс входит > 20 различных белков, в том числе и гистоноподобные ТАФ.

Регуляция транскрипции белками, которые контролируют клеточный цикл.

Циклины и циклинзависимые киназы (происходит фосфорилирование протеинкиназы) влияют на транскрипцию. Описаны Rb – семейство коактиваторов и корепрессоров. Так, супрессорный ген ретинобластомы Rb₁ и его родственники p107 и p130 кодируют семейство белков, включающих транскрипцию. Rb – ингибирует клеточный рост. Установлено, что фактор транскрипции E2F регулирует экспрессию многих генов, работающих на пролиферацию. Другой фактор транскрипции p53 также может как активировать, так и ингибировать транскрипцию. Он может специфически фосфорилироваться киназами, работающими на стадиях S и G₂/M клеточного цикла.

Основной (Basal) транскрипционный аппарат.

TFIIH – основной транскрипционный фактор – содержит киназу, способную фосфорилировать C – концевой домен РНК – полимеразы II.

Таким образом, мы уже имеем представление о том, как регуляторы клеточного цикла вовлекаются в регуляцию транскрипции.

1.5. Генетический код и его свойства

Генетический код (ГК) – последовательность расположения азотистых оснований в ДНК, определяющая расположение аминокислот в синтезируемом белке. Концепция ГК важна и из нее вытекает представление о существовании системы передачи информации. Наследственная информация о структуре клеточных белков закодирована в нуклеотидной последовательности клеточной ДНК. Генетический код, по словам Крика, устанавливает связь «между двумя великими полимерными языками – языком нуклеиновых кислот и языком белков».

В 1954 г. физик Г.Гамов предположил, что кодирование информации в ДНК может осуществляться сочетаниями нескольких нуклеотидов. Было установлено, что каждая аминокислота кодируется последовательностью трех разных азотистых оснований (триплетом или кодоном). Четыре азотистых основания в комбинациях по 3, то есть 4^3 могут образовать 64 разных кодона. В молекуле ДНК каждое основание входит в состав лишь одного кодона. Поэтому код ДНК *не перекрывающийся*. Так как возможных вариантов кодонов 64, аминокислот – 20. Одни и те же аминокислоты могут кодироваться различными триплетами (кодонами).

Поэтому генетический код называют *вырожденным или избыточным*. Есть несколько аминокислот, которые кодируют 3-4 различных кодона (например, аминокислота аланин кодируется триплетами ЦГА, ЦГГ, ЦГТ, ГЦГ). Также есть аминокислоты, кодирующиеся двумя триплетами и только две аминокислоты – одним. Однако каждый триплет кодирует только одну определенную аминокислоту, что говорит о его *специфичности*. Три варианта триплетов (АТТ, АЦТ, АТЦ) не кодируют аминокислоты, а являются своеобразными «точками» терминации процесса считывания информации. Установлены кодоны для всех 20 аминокислот. Последовательность триплетов в ДНК определяет порядок расположения аминокислот в молекуле белка, то есть имеет место коллинеарность. Это означает, что положение каждой

аминокислоты в полипептидной цепи зависит от положения триплета в ДНК. Многочисленными исследованиями установлена универсальность генетического кода. У всех живых организмов от вирусов и бактерий до растений и млекопитающих один и тот же триплет кодирует ту же аминокислоту. Это одно из наиболее убедительных доказательств общности происхождения живой природы.

Таблица 3

Генетический код

Первый нуклеотид	Второй нуклеотид				Третий нуклеотид
	У	Ц	А	Г	
У	УУУ фен	УЦУ сер	УАУ тир	УГУ цис	У
	УУЦ фен	УЦЦ сер	УАЦ тир	УГЦ цис	Ц
	УУА лей	УЦА сер	УАА нонсенс	УГА -	А
	УУГ лей	УЦГ сер	УАГ -	УГГ три	Г
Ц	ЦУУ лей	ЦЦУ про	ЦАУ гис	ЦГУ арг	У
	ЦУЦ лей	ЦЦЦ про	ЦАЦ гис	ЦГЦ арг	Ц
	ЦУА лей	ЦЦА про	ЦАА гли	ЦГГ арг	А
	ЦУГ лей	ЦЦГ про	ЦАГ гли	ЦГА арг	Г
А	АУУ илей	АЦУ тре	ААУ асп	АГУ сер	У
	АУЦ илей	АЦЦ тре	ААЦ асп	АГЦ сер	Ц
	АУА илей	АЦА тре	ААА лиз	АГА арг	А
	АУГ мет	АЦГ тре	ААГ лиз	АГГ сер	Г
Г	ГУУ вал	ГЦУ ала	ГАУ асп	ГГУ гли	У
	ГУЦ вал	ГЦЦ ала	ГАЦ асп	ГГЦ гли	Ц
	ГУА вал	ГЦА ала	ГАА глн	ГГА гли	А
	ГУГ вал	ГЦГ ала	ГАГ глн	ГГГ гли	Г

Шаг цепочки молекулы ДНК 0,34 нм.

Молекулярная масса нуклеотида 345.

Молекулярная масса аминокислоты 100.

Таким образом, генетический код ДНК имеет следующие фундаментальные характеристики:

Триплетность. Три соседствующих азотистых основания, называемые кодоном, кодируют одну аминокислоту.

Специфичность. Каждый отдельный триплет кодирует только одну определенную аминокислоту.

Неперекрываемость. Азотистое основание кодона у эукариот никогда не входит в состав другого кодона.

Отсутствие знаков препинания. Генетический код не имеет «пунктуационных отметок» между кодирующими триплетами в структурных генах.

Универсальность. Кодон в ДНК или иРНК определяет одну и ту же аминокислоту в белковых системах всех организмов от вируса до человека.

Избыточность. Одна аминокислота часто имеет более чем один кодовый триплет.

Коллинеарность. ДНК – линейная полинуклеотидная цепь, а белок – линейная полипептидная. Последовательность аминокислот в белке соответствует последовательности триплетов в его гене.

Равенство ген-полипептид. Клетка может иметь столько полипептидов, сколько имеет генов.

Процесс считывания информации происходит в одном направлении. Генетический код ДНК переводится в генетический код мРНК. Код мРНК комплементарен коду ДНК; мРНК имеет страт-кодон АУГ, а также стоп кодоны УАА, УАГ, УГА.

1.5.1. Современное представление о генетическом коде

Нет уверенности, что 3-я буква кодирующего триплетта равнозначна всем остальным. При кодировании ряда аминокислот (лей, про, Арт, Тир, Вал) третья буква не имеет значения. Это подвергает сомнению принцип «вырожденности кода».

В свете современных данных, по крайней мере по отношению к вирусам принцип неперекрываемости генетического кода не подтвердился. Оказалось, что один и тот же участок ДНК кодирует 2 или 3 различных белка по принципу перемещения рамки считывания.

Непрерывность кода также подверглась сомнению. Во многих генах обнаружены не кодирующие участки (интроны).

Сохранилось лишь свойство универсальности генетического кода.

Альтернатива универсальности генетического кода.

Универсальность генетического кода – это краеугольный

камень молекулярной биологии. Каноничность этого представления просуществовала до 1980 г. В настоящее время известно, что в геномах митохондрий существуют варианты генетических кодов, отличных от универсального. Общим для митохондриальных геномов эукариот, кроме растений, оказалось то, что терминирующий кодон UGA используется для кодирования триптофана. Кроме того, изолированный кодон AUA кодирует метионин в митохондриях млекопитающих, дрозофиллы и дрожжей. Лейциновые кодоны CUN кодируют треонин в митохондриях дрожжей, из двух аргининовых кодонов CGG кодируют триптофан в митохондриях кукурузы, а AGA – серин в митохондриях дрозофилы.

Принцип коллинеарности подвергся пересмотру, хотя бесспорно доказано, что последовательности триплетов оснований в мРНК точно соответствуют последовательности аминокислотных остатков. Последовательность триплетов оснований ДНК не соответствует последовательности триплетов иРНК.

Последовательность аминокислот в синтезированной пептидной цепи определяется последовательностью нуклеотидов (+)-цепи ДНК. Такое явление получило название *коллинеарности*. До недавнего времени это было каноническим принципом генетического кода. На основании этой главной закономерности в какой-то момент возникло утверждение: один ген – одна белковая цепь. Существовало представление о том, что принцип коллинеарности может дать информацию о последовательности нуклеотидов структурного гена в составе хромосомы.

Развитие современных методов определения полинуклеотидных последовательностей привело к радикальному изменению представлений о структурной организации генов. Выяснилось, что гены эукариот и их продукты не всегда коллинеарны. Самым впечатляющим было то, что участки ДНК, кодирующие такие белки, как глобин, иммуноглобин, овальбумины и др., разорваны некодирующими

фрагментами, вырезаемыми при созревании мРНК. Обнаружилось, что такая мозаичная структура – общая особенность большинства расшифрованных генов эукариот. Это касалось также генов, кодирующих тРНК и рибосомные РНК. Фрагменты ДНК, разделяющие кодирующие последовательности, стали называть интронами, а кодирующие – экзонами. Таким образом, каноническое представление коллинеарности дополнилось альтернативными вариантами. С открытием интрон-экзонной структуры генома эукариот возник вопрос о возможной функции интронов. Было доказано, что в некоторых случаях интроны кодируют ферменты сплайсинга.

Интроны в отличие от экзонов имеют особенный состав динуклеотидов. У экзонов чаще встречаются последовательности СС и GC, у интронов – ТТ, АТ, ТА, АА, преимущественно входящие в состав наиболее изогнутых участков ДНК, что инициирует формирование нуклеосом. Таким образом, интроны – это не пассивные структуры, в составе мозаичного строения генов эукариот. Их участие в формировании конечного транскрипта может реализоваться в альтернативной транскрипции и альтернативном сплайсинге. Понятно, что такие альтернативные варианты не оставляют места для коллинеарности.

Дополнительно обнаружено новое свойство универсальности генетического кода – подвижные гены. Исследования вирусов обнаружили наличие сегмента С, который способен поворачиваться на 180° в зависимости от функционального состояния. Исследования показали, что в зависимости от поворота этого сегмента происходит активация или инактивация генов вирулентности и способности вируса прикрепляться к оболочке бактериальной клетки.

1.5.2. Мобильные хромосомные элементы, или странствующие гены.

В 1933 г. Морган, выдающийся американский биолог, был удостоен Нобелевской премии за хромосомную теорию

наследственности, в которой он обосновал представление о генах – дискретных (корпускулярных) единицах наследственности и наследственной изменчивости. Морган провел анализ внутрихромосомной локализации генов и показал, что они располагаются в хромосоме линейно, и каждый ген занимает соответствующее место в определенной хромосоме. Именно это стало основой для составления карт расположения генов по длине хромосомы для животных, растений, бактерий, вирусов и человека. Эта работа интенсивно проводится и в наше время. Таким образом, было сформировано каноническое представление о том, что ген в хромосоме имеет строго определенное место. Однако в 40-х г.г. Барбара Мак-Клинток, работая с кукурузой, экспериментально показала, что принцип постоянности расположения генов в хромосомах не абсолютен. Она показала, что имеются участки хромосом, способные перемещаться из одного места генома в другое. За эту работу Мак-Клинток была удостоена в 1983 г. Нобелевской премии. Таким образом, две Нобелевские премии вручены за противоположные результаты. Но это только внешнее впечатление. Обе концепции существуют как альтернативные возможности структуры и функции генома. Мобильные генетические (МГЭ) элементы имеют разные названия: мобильные диспергированные гены, инсерционные последовательности, транспозоны, *gypsy-цыган*, *hobo-бродяга*, *stalker-гордо шествующий*, прыгающие гены. Транспозоны (генетические элементы) найдены у бактерий, дрозофилы, мышей, растений и людей.

В 1980 году выдвинули гипотезу об «эгоистичной» ДНК, согласно которой МГЭ являются «геномными паразитами», «бродягами», которые самостоятельно перемещаются в геноме. Основными точками приложения действия МГЭ совместно с генами - модификаторами являются различные этапы транскрипции: инициация, терминация, сплайсинг и стабильность мРНК.

Мобильные элементы играют важную роль в геномных перестройках про- и эукариот: вызывают интеграцию двух

ранее не связанных между собой генов или оперонов с образованием новых функциональных единиц, появление делеций, инверсий и дупликаций в геноме.

Методами гибридизации было показано, что некоторые активно работающие гены дрозофилы могут перемещаться в разные участки всех хромосом. Такие транспозиции возникают вследствие не только упомянутых выше геномных перестроек, но и мутаций. Транспозоны могут регулировать процессы считывания ДНК, усиливая или, наоборот, блокируя работу генов.

1.5.3. Стратегия генетического контроля или генная экспрессия

Стратегия генетического контроля, или генная экспрессия – это молекулярный механизм реализации наследственной информации. Клетки имеют механизм, контролирующий количество любого белка в определенное время.

1. В различных типах клеток многоклеточного организма содержится одинаковая ДНК.

2. В различных типах клеток синтезируются разные наборы белков:

а) Существует множество процессов, общих для всех клеток, и, следовательно, все клетки имеют много одинаковых белков (основные структурные белки цитоскелета и хромосом, цитоплазматического ретикулума АГ, рибосомные белки);

б) Некоторые белки обнаруживаются в больших количествах лишь в специализированных клетках (например, гемоглобин в эритроцитах).

Типичная клетка высших организмов синтезирует от 10 000 до 20 000 разных белков.

3. Экспрессия генов может регулироваться на каждом этапе пути от ДНК к РНК и к белку:

- Контроль на уровне транскрипции;
- Контроль на уровне процессинга;
- Контроль на уровне транспорта (отбор в ядре зрелых

- РНК, предназначенных для экспорта в цитоплазму);
- ❑ Отбор в цитоплазме мРНК для трансляции на рибосомах – контроль на уровне трансляции;
 - ❑ Контроль на уровне деградации мРНК; контроль на уровне активности белка;
 - ❑ Селективная активация, инактивация или компарментализация молекул белка после их синтеза (контроль на уровне активности белка).

4. Главные белки-регуляторы активируют сразу много генов. В клетке содержится много регуляторных белков, но не все регуляторные белки равны. Имеются главные белки регуляторы, обладающие координирующим действием на активность многих генов.

Контроль на уровне транскрипции зависит от регуляторных белков, связывающихся с определенными последовательностями ДНК.

1.5.4. Регуляция экспрессии генов у прокариот

В 1961 г. два французских биолога Ф.Жакоб и Ж.Моно предложили механизм регуляции генов, названной гипотезой оперона. Они обнаружили, что добавление лактозы к культуре *E. Coli* индуцирует образование сразу трех белков-ферментов: галактозидазы, пермеазы, и трансацетилазы, необходимых клетке для расщепления лактозы до глюкозы и галактозы. Гены, кодирующие эти ферменты, соседствуют друг с другом в хромосоме. Их назвали структурными генами (цистропами). Они одновременно транскрибируются РНК-полимеразой в одиночную длинную иРНК, которая имеет кодоны для всех трех ферментов. иРНК, транскрибируемая из нескольких генов, называется ***полицистронной***. Функция этих цистронов контролируется участком молекулы ДНК – оператором. ***Операторный локус*** – это определенный участок последовательности нуклеотидов, длиной 27 пар оснований. Этот сегмент ДНК располагается между промотором, к которому перед началом транскрипции присоединяется РНК-

полимераза, и началом первого структурного гена β -галактозидазы. Цистрон синтезирует иРНК, когда оператор включен и прекращает синтез, когда он выключен. Оператор включается или выключается белком, называемым репрессором. Его синтез контролируется регуляторным геном. Репрессор либо связывается с оператором, подавляя его активность, либо не связывается с ним позволяя проявлять активность структурным генам. Таким образом, репрессор является негативным регулятором. Сам белок-репрессор не является необходимым для функционирования оперона. Он необходим для управления функционированием структурных генов (рис. 20).

Репрессия (I). При отсутствии индуктора (лактоза), репрессор связывается с опероном и блокирует транскрипцию, в этом случае ферменты не образуются.

Индукция (II): лактоза индуцирует транскрипцию генов. Репрессор инактивируется индуктором. К промотору присоединяется РНК-полимераза и начинается транскрипция генов А, В, и С. в результате образуются необходимые в данных условиях ферменты. Синтез ферментов может не только приспособительно индуцироваться, но и подавляться. Например, в результате какой-то цепи реакций в клетке образуется конечный продукт Д в большем, чем это необходимо клетке количестве. Это может нарушить нормальный ход реакций обмена, поэтому в клетке возникает необходимость оставить данный процесс. Вещество Д вступает в реакцию с соответствующим белком-репрессором и переводит его в активное состояние. После этого происходит присоединение репрессора к гену-оператору, тем самым выключается вся система оперона и синтез ферментов прекращается. Таким образом, торможение синтеза производится конечным продуктом, образующимся в результате реакции. Это пример позитивной регуляции. Такой механизм действия называется регуляцией по принципу обратной связи. Например, согласно имеющейся генетической программе кишечная палочка может синтезировать несколько десятков ферментов, расщепляющих различные вещества, так как состав среды, окружающей бактерии, очень изменчив. В этих условиях постоянное

образование всего набора ферментов было бы неэкономичным для клетки, так как нецелесообразно продуцировать одновременно 60-80 ферментов, из которых

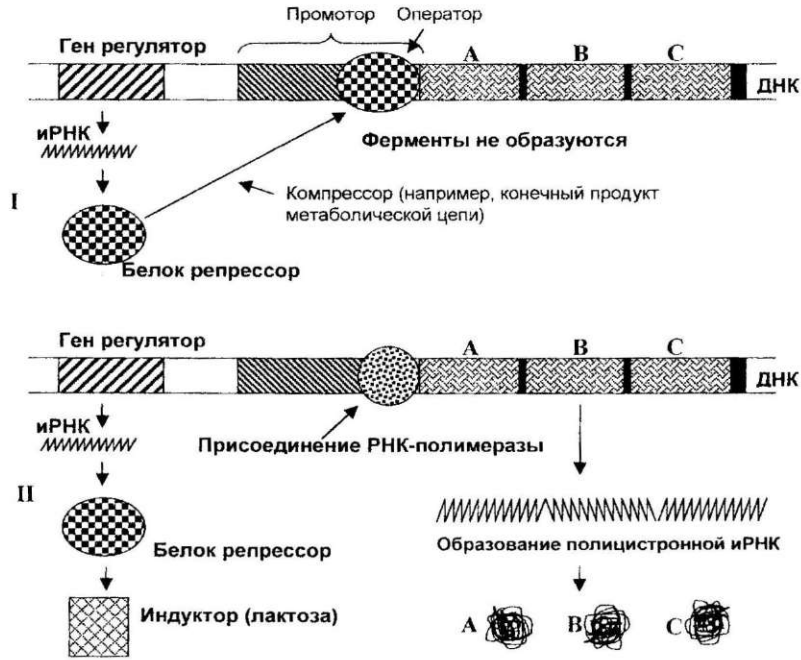


Рис. 20. Схема функционирования лактозного оперона *E.coli*.

в данных условиях среды могут понабиться лишь 6-8. В природе отбор идет по принципу наибольшей экономии, какой описан выше, поэтому клетки, функционирующие более экономично, лучше приспосабливаются и быстрее размножаются. Это привело к возникновению и совершенствованию системы регуляции метаболизма.

Структура оперона. Оперон – это последовательность специальных функциональных сегментов ДНК, а также структурных генов, которые кодируют синтез определенной группы белков одной метаболической цепи. Модель оперона предполагает наличие единой системы регуляции структурных генов в виде промотора, оперона, а также регуляторного гена.

Таким образом, регулируемая единица транскрипции состоит из следующих структурных частей:

- ❑ *Ген – регулятор*, контролирующий образование белка-регулятора
- ❑ *Промотор* – участок ДНК, к которому присоединяется РНК-полимераза и начинается транскрипция
- ❑ *Оператор* – участок промотора, связывающий репрессор
- ❑ *Структурные гены* – участки ДНК, кодирующие иРНК конкретных белков
- ❑ *Терминаторный участок ДНК* несет сигнал об остановке транскрипции

Особенностью прокариот является транскрибируемая мРНК со всех структурных генов оперона в виде полицистронного транскрипта.

1.5.5. Особенности экспрессии генов у эукариот

Регуляция экспрессии одинакова как у прокариот, так и у эукариот. Однако эукариоты – более сложные организмы, и экспрессия их генов сложнее. Можно отметить следующие особенности экспрессии у эукариот:

1. Геном высших эукариот значительно сложнее. Например, гаплоидный геном человека имеет приблизительно 30-35 тысяч генов расположенных в хромосомах. А у прокариот имеется только одна хромосома и несколько сотен генов. Некоторые гены эукариот многократно повторены, а определенные же участки ДНК вообще не играют генетической роли, например сателлитная ДНК. Значит, геном эукариот «избыточен». У них функционирует от 10^4 до 2×10^5 из 10^6 всех генов. Уникальные повторяющиеся последовательности генома эукариот у разных видов составляют 15-98%. У человека уникальные последовательности нуклеотидов составляют 56% кроме этого, в геномах эукариот содержатся последовательности, повторяющиеся несколько десятков, сотен и даже миллионов раз. Они рассредоточены среди уникальной ДНК. К повторяющимся последовательностям относятся элементы с непостоянной локализацией. Их называют *транспозонами*, или *мобильными*

последовательностям относятся элементы с непостоянной локализацией. Их называют *транспозонами*, или *мобильными элементами*. Значительная часть нуклеотидных последовательностей у эукариот не транскрибируется вообще – *молчащая ДНК*.

2. Избыточность генома эукариот объясняется экзон-интронной организацией. В отличие от прокариот, гены эукариот имеют последовательности азотистых оснований, которые не кодируют аминокислоты – *интроны*. Между ними расположены последовательности, которые кодируют аминокислоты – *экзоны*. Транскрибируемая из гена РНК, имеет как интроны, так и экзоны. Она называется про-иРНК. Ее интронные области удаляются нуклеазами, а несущие информацию участки – экзоны, соединяются вместе. Процесс обработки про-иРНК и превращение ее в иРНК известен как *процессинг*. Еще одна особенность генома у эукариот – наличие специальных «усиливающих» сегментов ДНК – энхансеров. Их функцией является участие регуляции активности структурных генов. В свою очередь и препромоторный элемент и энхансер регулируются соответствующими регуляторными белками.

3. В клетках эукариот ядерная оболочка пространственно разделяет процессы транскрипции и трансляции, хромосомы находятся в ядре, а рибосомы в цитоплазме. Регуляция активности генов у эукариот сложнее, т.к. в этом процессе участвуют сразу несколько генов – регуляторов, то есть регуляция транскрипции эукариот является комбинативной. Например, у эукариот на молекуле ДНК имеется специальная область около промотора. Эта область имеет около 100 пар специальных нуклеотидов (препромоторный элемент). К этому участку молекулы присоединяется особый белок – фактор транскрипции. Это обеспечивает успешное присоединение РНК-полимеразы II к промотору.

4. На экспрессию эукариотических генов оказывает влияние *амплификация генов*. Это многократное увеличение числа копий одинаковых генов, с целью интенсификации синтеза молекул нужных в определенный момент времени. Например, повторяющиеся последовательности ДНК включают сотни

копии генов рРНК и тРНК.

5. Особенность регуляции активности генов эукариот связана с образованием – комплекса ДНК с белками хроматина. В таком виде гены нуклеосом неспособны к транскрипции. Поэтому необходимым условием является частичная декомпактизация хроматина и ослабление связей с гистоновыми белками. Однако полная нуклеосомная организация хроматина в ходе транскрипции не утрачивается.

6. Контроль экспрессии генов у эукариот осуществляется также на стадии трансляции. Кроме того, регуляция экспрессии генов эукариот может осуществляться на стадии посттрансляционных изменений. Например, для образования активной формы белкового гормона инсулина, из молекулы проинсулина вырезаются две цепочки, которые затем сшиваются дисульфидными связями.

7. Геном эукариот подчиняется регуляторным воздействиям со стороны эндокринной системы организма. Многие гормоны являются индукторами транскрипции. В первую очередь это относится к стероидным гормонам, которые обратимо связываются с белками рецепторами, переносящими их в ядро. Такой комплекс связывается со специфическим участком хроматина, ответственным за регуляцию генов. Например, действие тестостерона активизирует гены, определяющие развитие организма по мужскому типу. На рис. 21 указаны 5 предположительных уровней экспрессии генов у эукариот.

Итак, очевидно, что экспрессия гена в признак у эукариот очень сложный процесс, который регулируется на многих уровнях, в том числе и другими генами. Таким образом, любой признак эукариотического организма является полигенным.

1.5.6. Современное представление о гене

Открытие альтернативного сплайсинга потребовало пересмотра понятия «ген». В клетках высших эукариот многие последовательности ДНК могут кодировать два и более различных белка благодаря альтернативному сплайсингу. В связи с этим изменена формулировка гена.

Ген – любая последовательность ДНК, которая транскрибируется как отдельная единица и кодирует набор близкородственных полипептидных цепей (изоформы белков).

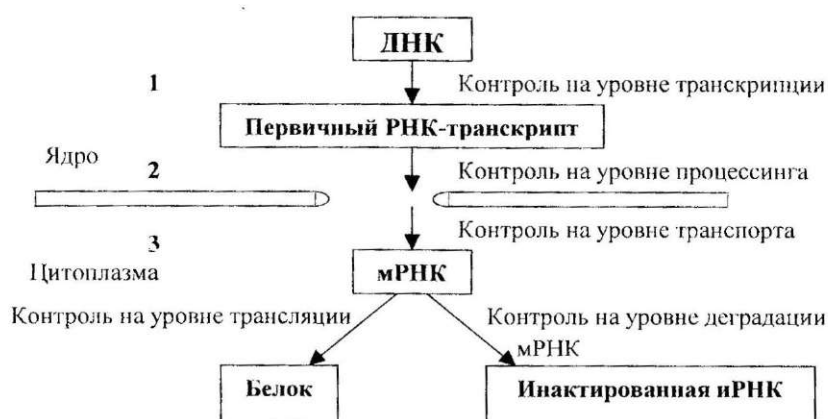


Рис. 21. Схема, иллюстрирующая пять предполагаемых уровней, на которых может осуществляться контроль экспрессии генов у эукариот.

Ген - основная элементарная структурно-функциональная единица наследственности, определяющая развитие определенного признака клетки или организма.

Слово «ген» было введено Иогансенем в 1909 г. для обозначения единицы наследственности, занимающей особое место (локус) в хромосоме. В 1948 г. Дж.Бидл и Э.Татум предложили гипотезу «один ген – один белок» и рассматривали ген как единицу наследственного материала, который содержит информацию для образования одного белка.

Известно, что большая часть генов клеток находится в репрессированном (неактивном) состоянии. Примерно 5-10% генов активны и могут быть транскрибированы. У эукариот гены, так же как и геномы (совокупность генов в гаплоидном наборе ДНК), устроены сложнее. Прежде всего в составе геномов значительно большее ДНК, намного сложнее структура регуляторной и кодирующих зон.

ДНК эукариот можно разделить на два типа последовательностей нуклеотидов: это *неповторяющиеся (уникальные) последовательности* и *повторяющиеся последовательности*. К первому типу относятся однокопийные гены, кодирующие белки. Повторяющиеся последовательности встречаются с частотой от 2 до 10^7 на одну клетку. У млекопитающих более половины геномной ДНК принадлежит к типу уникальных последовательностей.

В зависимости от структуры и выполняемых функций нуклеотидные последовательности могут быть нескольких типов.

По способам организации нуклеотидов в ДНК, ее можно разделить на следующие фрагменты: 1) структурные гены, 2) регуляторные гены, 3) сателлитная ДНК, 4) спейсерная ДНК, 5) кластеры генов, 6) повторяющиеся гены.

Кластеры генов – это группы различных структурных генов в определенном участке хромосомы, объединенных общими функциями. Например, кластеры пяти разных гистонов повторяются по 10-20 раз. Между такими кластерами находятся *спейсерные участки*, которые не транскрибируются. Их роль до конца не выяснена. *Сателлитная ДНК* имеет большое число повторяющихся групп нуклеотидов, которые не имеют смысла и не транскрибируются. *Одиночные гены* среди сателлитной ДНК обычно играют регуляторную или усиливающую роль действия на структурные гены, например, энхансеры. *Структурные гены* несут информацию о структуре определенных полипептидов. С этих участков ДНК транскрибируется иРНК, которая направляет синтез белков. *Повторяющиеся гены* – один и тот же ген многократно повторяется (много сотен раз), не отделяясь друг от друга, образуя *тандемы*. Например, гены рРНК.

Обнаружение структуры генов эукариот является одним из главных открытий конца 20 века. Структурный ген, кодирующий белок, сложно организован. Рассмотрим принцип организации гена на примере β - цепи гемоглобина (рис. 22).

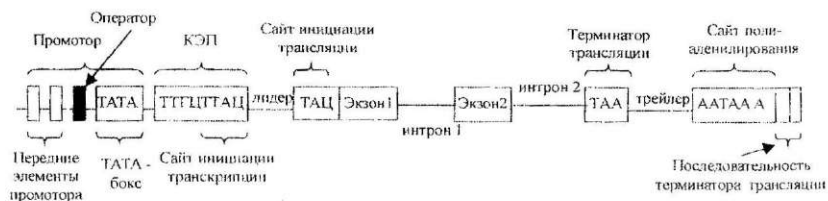


Рис. 22. Схема молекулярной структурно-функциональной организации гена β-цепи гемоглобина человека.

В начале гена (до его смысловой части) расположены участки регуляции работы гена. Сначала расположена область промотора, ответственная за присоединение РНК-полимеразы и последующей инициации транскрипции. Неспецифические участки регуляции называют ТАТА-БОКС, составленный из многократно повторяющихся тимина и аденина. Установлено, что РНК-полимераза точно присоединяется к этой последовательности, так что ее активный центр оказывается над первым считываемым нуклеотидом. Этот участок состоит из сайта-узнавания, сайта-связывания и сайта-инициации. Комбинация нуклеотидов в промоторе строго специфична и при нарушении рамки считывания образует стоп кодоны, что приводит к остановке транскрипции. В области промотора расположен оператор, который может присоединять факторы регуляции транскрипции. Далее следует КЭП-последовательность ТТГЦТТАЦ, на которой иницируется транскрипция и образует 5'-начальный участок РНК (сайт - инициации транскрипции). После этого следует кодон ТАЦ (сайт- инициации трансляции) в образуемой иРНК. Между сайтом транскрипции с сайтом трансляции лежит промежуточная область ДНК, составляющая из 50 пар оснований, и называется *лидерной последовательностью*. Далее идет смысловая часть структурного гена, состоящая из экзонов и интронов. Сначала следует экзон, содержащий 90 пар оснований, кодирующих с первой по 30-ю аминокислоты β-цепи гемоглобина. Потом, интрон из 130 пар оснований не кодирующих аминокислоты. Опять следует экзон из 222 пар

оснований, кодирующих аминокислоты с 31 по 104. Затем интрон, состоящий из 850 пар оснований. Снова экзон, содержащий 126 пар оснований, кодирующих аминокислоты 105-146. После этого кодон терминации трансляции ТАА. Затем трейлер и сайт полиаденилирования ААТААА, который необходим для присоединения к РНК-транскрипту «хвоста» поли-А, состоящего примерно из 200-300 адениловых остатков. Этот участок ДНК необходим для остановки транскрипции. Последовательность терминации трансляции начинается сразу за поли-А участком и состоит примерно из 1000 нуклеотидов. Эта последовательность, совместно поли-А останавливает процесс транскрипции. В пределах последовательности транскрибирующего 3'конца ДНК на расстоянии 600-900 нуклеотидов от поли-А сайта расположена область последовательностей энхансера. Этот участок обладает регуляторной активностью. Он необходим для временной и пространственной организации экспрессии гена β - цепи гемоглобина.

1.5.7. Функциональная характеристика гена. Виды генов

Гены бывают конститутивные, неконститутивные, структурные и регуляторные

Конститутивные гены – это гены, которые постоянно экспрессируются, так как белки, которые они кодируют, необходимы для постоянной клеточной деятельности. Обеспечивают синтез белков «домашнего хозяйства» - белков рибосом, цитохромов, ферментов гликолиза, переносчиков ионов и др. эти гены не требуют специальной регуляции.

Неконститутивные гены – это гены, обычно неактивные, но экспрессирующиеся только тогда, когда белок, который они кодируют, нужен клетке. Эти гены регулируются клеткой или организмом. Эти белки обеспечивают дифференцировку и специфичность структуры функций каждой клетки.

Структурные гены кодируют синтез белка. **Регуляторные** - направляют деятельность структурных генов.

❖ Гены являются *дискретной* составляющей сложного

наследственно материала – участком ДНК.

- ❖ Определенный ген кодирует *синтез одного белка*. Отдельный белок может обуславливать определенный признак. Этим обусловлены моногенные признаки.
- ❖ Клетка, орган или организм, обладают многими сложными признаками, которые слагаются из *взаимодействия многих генов* – это полигенные признаки.
- ❖ Некоторые гены обладают плейотропностью действия, определяя развитие сразу нескольких признаков. Например, синдром Марфана.
- ❖ Действие гена строго *специфично*, т.к. ген может кодировать только одну аминокислотную последовательность и регулирует синтез одного конкретного белка.

1.6. Хромосомный уровень организации генетического материала

Хромосома состоит из одной-единственной невероятно длинной молекулы ДНК, содержащей множество генов. ДНК эукариот тесно связана с большим количеством гистонов, которые служат для образования множества повторяющихся частиц, содержащих белки и ДНК и называемых *нуклеосомами*. Нуклеосомы обычно упакованы вместе в регулярную структуру – фибриллу, имеющую диаметр 30 нм.

Хромосомы в зависимости от периода и фазы клеточного цикла меняют свое строение. В интерфазе они образуют ядерные структуры - хроматин. При переходе клетки к митозу, особенно в метафазе. Хроматин приобретает вид хорошо различимых отдельных интенсивно окрашенных телец – хромосом.

Каждая интерфазная хромосома содержит одну молекулу ДНК, содержащую большое количество генов (рис. 23). Геном человека содержит $3,5 \cdot 10^9$ нуклеиновых пар, что достаточно для образования 1,5 млн. генов. Однако исследования показывают, что организм человека имеет примерно 100000 белков, а значит примерно столько же генов. Это значит, что в организме используется ~ 1% нуклеотидных последовательностей ДНК,

только 1% записанной информации. Значительная часть генома используется на процессы эмбрионального развития, дифференцировки, роста и в дальнейшем не экспрессируется. Другая значительная часть избыточной ДНК входит в состав интронов. И еще большая часть ДНК представлена многочисленными семействами не имеющих смысла повторяющихся последовательностей (сателлитная ДНК).

Хроматин (хромосома) представлен спирализованными нитями. При этом выделяется несколько уровней спирализации (компактизации) хроматина:

- ❖ Нуклеосомная организация обеспечивается четырьмя видами нуклеосомных гистонов: H2A, H2B, H3, H4. Они образуют белковые тела – коры, состоящие из 8 молекул (по две молекулы каждого вида гистонов). Молекула ДНК комплексируется с белковыми кора́ми, спирально накручиваясь на них (рис. 24). В контакте с каждым кором оказывается участок ДНК, состоящий из 146 пар нуклеотидов. Свободные от контакта с белковыми телами участки ДНК называют линкерными. Они включают от 15 до 100 п.н. в среднем 60 п.н. в зависимости от типа клетки. Отрезок молекулы ДНК длиной около 200 п.н. вместе с белковым кором составляет нуклеосому.
- ❖ Хроматиновая фибрилла. Дальнейшая компактизация нуклеосомной нити обеспечивается гистоном H1, который, соединяясь с линкерной ДНК и двумя соседними белковыми телами сближает их друг с другом. В результате образуется более компактная структура, построенная, возможно, по типу соленоида.
- ❖ Интерфазная хромонема. Данный уровень обусловлен укладкой хроматиновой фибриллы в петли. В их образовании, по-видимому, принимают участие негистоновые белки, которые способны узнавать специфические нуклеотидные последовательности внуклеосомной ДНК, отдаленные друг от друга на расстояние в несколько тысяч пар нуклеотидов. Участок ДНК, соответствующий одной петле, содержит от 20 000 до 80 000 п.н. Возможно, каждая петля является функциональной единицей генома.

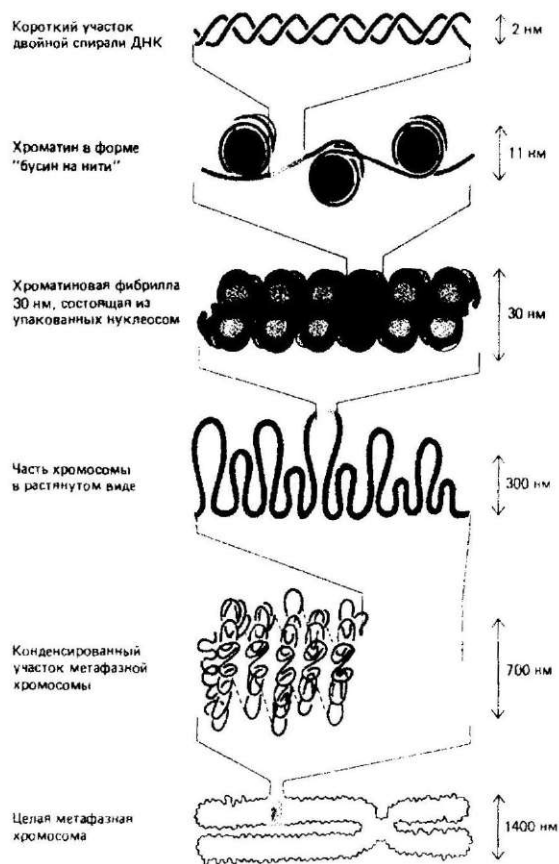


Рис. 23. Схема, иллюстрирующая различные уровни упаковки хроматина.

Неодинаковая степень компактизации разных участков интерфазных хромосом имеет большое функциональное значение. В зависимости от состояния хроматина выделяют *эухроматиновые* участки хромосом, отличающиеся меньшей плотностью упаковки в неделящихся клетках и потенциально транскрибируемые, и *гетерохроматиновые* участки, характеризующиеся компактной организацией и генетической инертностью (т.к. транскрипции не происходит).

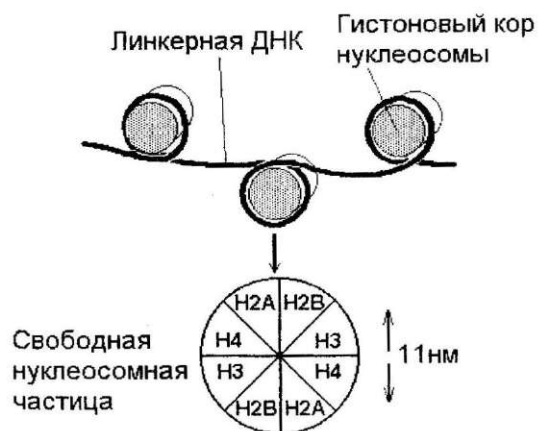


Рис. 24. Нуклеосомная организация хроматина: молекула ДНК накручена на белковые коры.

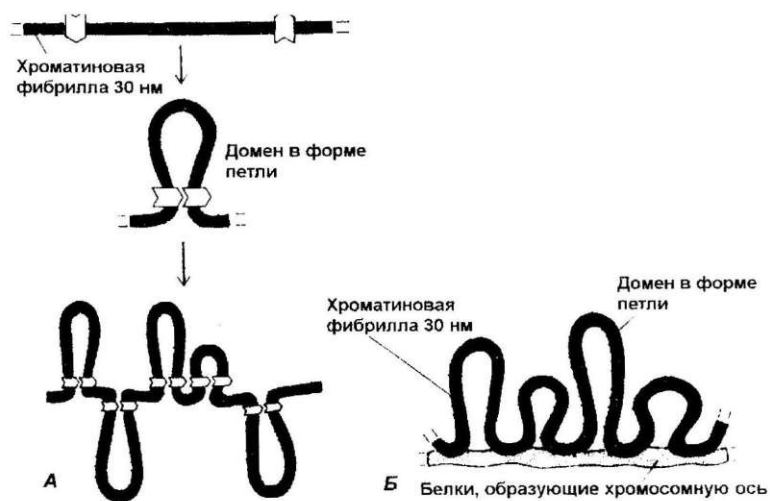


Рис. 25. Хроматиновая фибрилла диаметром 30 нм; возможная модель упаковки ДНК в хроматиновой фибрилле.

Метафазная хромосома. Вступление клетки из интерфазы в митоз сопровождается суперспирализацией хроматина. Этот процесс начинается в профазе, достигая своего максимального выражения в метафазе митоза и анафазе. Эта суперспирализация, уменьшающая линейные размеры ДНК с 5 см до 5 мкм, сопровождается фосфорилированием всех молекул гистона H1, присутствующих в клетке, по пяти сериновым остаткам. В связи с тем, что гистон H1 связывает между собой нуклеиновые частицы, его фосфорилирование может играть ключевую роль в конденсации хромосом в процессе митоза.

На рис.26 изображена типичная митотическая хромосома на стадии метафазы. Две дочерние молекулы ДНК упаковываются порознь и образуют сестринские хроматиды, которые удерживаются вместе с помощью центромеры, под электронным микроскопом, что каждая хроматида построена из хроматиновых петель, отходящих от центральной оси. Различные способы упаковки длинной спирали ДНК представлены на рис. 23. В митотической хромосоме хроматин транскрипционно неактивен: синтез РНК с началом конденсации хромосом прекращается. Экспериментально доказано, что поперечная исчерченность, характерная для митотических хромосом, отражает в какой-то степени порядок расположения генов в молекуле ДНК. Описанная митотическая суперспирализация облегчает расхождение хромосом к полюсам митотического веретена в анафазе митоза.

Каждая молекула ДНК, образующая хромосому, кроме кодирующих последовательностей должна содержать центромеру, два теломера и точки начала репликации (рис.26). Теломерные последовательности предотвращают укорочение хромосом, которое без них происходило бы при каждом цикле репликации ДНК. Центромеры служат для выстраивания молекул ДНК на митотическом веретене в ходе митоза. Точки начала репликации нужны для формирования репликационных вилок в S-фазе.

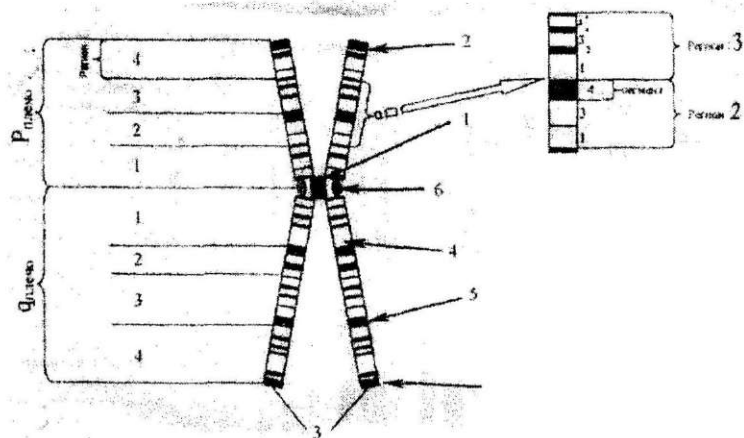


Рис.26. Схема организации метафазной хромосомы: 1 - центромерный участок хромосомы (первичная перетяжка), где дочерние молекулы ДНК имеют общий нереплицированный участок; 2 - теломерный участок ограничивает длину плечей, препятствует взаимодействию хромосом между собой; 3 - дочерние хроматиды; 4 - гетерохроматин, 5 - эухроматин; 6 - кинетохор; р - малое плечо; q - большое плечо. Плечи подразделяются на регионы, имеющие специфическую исчерченность, регионы подразделяются на отдельные сегменты разной плотности.

Значение и функции хромосом.

Хромосомы образуются из хроматина в начале митоза. В процессе деления клетки они претерпевают ряд структурных превращений и вновь образуют хроматин в ядрах дочерних клеток. Биологическое значение и смысл образования хромосом и их превращений - равномерное распределение наследственного материала в образующиеся клетки. Можно сказать, что хромосомы - это лишь «способ» распределения ДНК на равные порции и передачи их дочерним клеткам.

В интерфазной клетке хромосомы представлены в качестве хроматина и выполняют следующие функции; а) хранение наследственной информации в виде строгой последо-

вательности нуклеотидов ДНК; б) контроль метаболизма путем регуляции образования необходимых ферментов; в) обеспечение роста клеток, поддержание их структуры и функций путем управления синтезом структурных белков; г) контроль клеточной дифференцировки при развитии; д) обеспечение условий удвоения ДНК.

В делящихся клетках из хроматина образуются визуально различимые хромосомы, которые необходимы для следующих функций: а) компактизация (уплотнение) наследственного материала в тысячи раз. При этом генетический материал «консервируется» и теряет способность к экспрессии; б) образование структур, удобных для манипуляций при делении (метафазная хромосома, состоящая из 2-х хроматид); в) равномерное распределение компактного неактивного генетического материала между дочерними клеткам в виде отдельных хроматид; г) декомпактизация (разрыхление) наследственного материала и образование активного интерфазного хроматина.

Размеры и формы метафазных хромосом.

Размеры хромосом варьируют от вида к виду. Хромосомы различных организмов на стадии *метафазы* имеют длину от 0,5 до 33 мкм и толщину от 0,2 до 2 мкм. Обычно хромосомы растений имеют больший размер, чем хромосомы животных. Хромосомы различных пар одной и той же клетки различаются по размеру. Длина хромосом зависит от количества ДНК и белков, а также от степени скручивания хроматина. Размер хромосом человека составляет в среднем ~1,5 мкм в толщину и ~2-12 мкм в длину.

Формы хромосом определяются по относительному положению центromеры (первичной перетяжки). На основании этого классифицируют следующие 4 формы хромосом (рис. 27,б).

1. *Метацентрическая*. Хромосома имеет X-образную форму, при которой центromера находится в середине так, что плечи являются равными по длине.

2. *Субметацентрическая*. Хромосома имеет форму X с

центромерой, удаленной от средней точки так, что плечи являются неравными по длине.

3. *Акроцентрическая.* Центромера расположена очень близко к одному из концов хромосомы. Таким образом, она имеет плечи существенно отличающиеся по размерам. Маленькие плечи часто имеют спутники.

4. *Телоцентрическая.* Центромера расположена на конце хромосомы. Кариотип человека имеет все разновидности форм хромосом за исключением телоцентрических.

Химический состав хромосом.

Эукариотические хромосомы состоят из ДНК и белков. Могут содержать также РНК, ионы металлов и ферменты.

ДНК - длинная, линейная, двунитевая, закрученная в спираль молекула, Она содержит генетическую информацию. Ее количество во всех соматических клетках одного организма одинаково.

Белки бывают двух типов: основные гистоновые белки и кислые негистоновые белки. ДНК и гистоны связаны вместе в соотношении 1:1 и образуют нуклеосомы. Это обеспечивает спиральную компактную форму укладки молекулы ДНК. Гистоны предотвращают неконтролируемую транскрипцию и репликацию ДНК. Негистоновые белки - протеины с относительно небольшим молекулярным весом, способные регулировать активность генов.

Все виды РНК транскрибируются на ДНК. Большинство молекул РНК сразу поступает в цитоплазму. Некоторое количество остается какое-то время связанным с ДНК.

Ионы металлов. В хромосомах обнаруживаются ионы металлов, включая Mg^{++} , Ca^{++} и Fe^{++} . Они поддерживают структурную организацию хромосом.

Ферменты. ДНК-полимераза, РНК-полимераза, нуклеозидтрифосфатаза и другие при необходимости могут связываться с хромосомами.

Все хромосомы во время метафазы состоят из двух хроматид, состоящих из максимально спирализованного

хроматина (рис.25). Каждая хроматида - это связанная с гистонами единичная двунитевая суперспирализованная ДНК. Две дочерние молекулы ДНК, которые находятся в двух хроматидах, удерживаются вместе в области центромеры при помощи нереплицированного сегмента ДНК. Строение хромосомы на различных участках неоднородно. В хромосомах различают первичную *перетяжку*, делящую хромосому на *два плеча*. Первичная перетяжка (*центромера*) — наименее спирализованная часть хромосомы. Центромера представляет собой общий, нереплицированный участок ДНК. На ней располагаются специальные белки, образующие *кинетохоры* (гр. Kinesis — движение, phoros — несущий), к которым для деления генетического материала прикрепляются нити веретена. Это способствует разделению дочерних хроматид во время анафазы. Место расположения первичной перетяжки у каждой пары хромосом индивидуально и постоянно, что обуславливает, главным образом, ее форму. Концы плеч хромосом получили название *теломеров*. Они содержат тысячи повторяющихся последовательностей (ТТАГГГ). Это генетически неактивные специализированные участки, которые препятствуют соединению хромосом между собой или с их фрагментами. Лишенная теломеры хромосома оказывается «липкой» и легко соединяется с такими же участками других хромосом. Следовательно, теломеры сохраняют хромосому как дискретную единицу, обеспечивают ее индивидуальность.

Некоторые хромосомы имеют вторичные перетяжки, часто отделяющие участки хромосом, называемые *спутниками*. Эти участки хромосом содержат гены рРНК. Такие хромосомы в ядрах клеток человека могут сближаться друг с другом, вступать в ассоциации, что способствует формированию ядрышек. Эти участки в хромосомах называют *ядрышковыми организаторами*. У человека вторичные перетяжки имеются на концевых участках коротких плеч 13-15 и 21-22 хромосом, а также на длинном плече 1 хромосомы. В плечах хромосом видны более интенсивно окрашенные участки- хромомеры (**гетерохроматин**), чередующиеся со светлыми межхромомерными сегментами (**эухроматин**).

Характеристика аутосом.

Международная классификация хромосом человека была разработана в 1960 г. с учетом величины хромосом и расположения первичной перетяжки. Всем хромосомам были присвоены порядковые номера по мере уменьшения размера. Наиболее крупная пара гомологичных хромосом имеет № 1, следующая - № 2 и т. д. (табл.4). Самые маленькие из хромосом человека - 21 и 22. В зависимости от размеров и формы все аутосомы человека подразделяются на 7 групп (табл. 4), обозначаемых латинскими буквами А, В, С, Д, Е, F, G. Половые хромосомы, X и Y, выделяются отдельно. X хромосома по размерам соответствует группе С, а Y - группе G.

Таблица 4

Классификация хромосом человека

Группы	Номер	Размер, мкм	Характеристика
А	1,2,3	11-8,3	Самые крупные 1 и 3 метацентрические, 2 - субметацентрическая
В	4,5	7,7	Крупные субметацентрические
С	6 -12, X	7,2 - 5,7	Средние субметацентрические
Д	13-15	4,2	Средние акроцентрические
Е	16-18	3,6-3,2	Мелкие субметацентрические
Г	19-20	2,3-2,8	Самые мелкие метацентрические
G	21-22.Y	2,3	Самые мелкие акроцентрические

Группа А (1-3) представляют крупные метацентрические и субметацентрические хромосомы. Первая хромосома самая большая, метацентрическая. Центромера расположена

посередине. Вблизи центромеры часто обнаруживаются вторичные перетяжки, что иногда приводит к удлинению плеча, *центромерный индекс* (отношение длины короткого плеча к общей длине хромосомы) составляет 48,36. Вторая хромосома является самой крупной субметацентрической. Ее центромерный индекс 39,23, Третья хромосома метацентрическая с центромерным индексом 46,95. Она примерно на 20% короче первой хромосомы.

Группа В (4 и 5) представлена большими субметацентрическими хромосомами с одинаковым центромерным индексом 29,1, поэтому хромосомы этой группы трудно идентифицируются по размерам, но имеют специфическое окрашивание сегментов.

Группа С (6-12) представлена среднего размера метацентрическими хромосомами с центромерным индексом 50-40. В девятой хромосоме часто обнаруживается вторичная перетяжка на длинном плече около центромеры. Все хромосомы хорошо идентифицируются с помощью окрашивания. К этой группе условно относят X-хромосому. Это метацентрическая хромосома с высоким центромерным индексом - 40,12.

Группа D (13-15) представлена акроцентрическими средними по размерам хромосомами. Они сильно отличаются от других хромосом человека. Их центромерный индекс 17-20 - самый маленький из всех хромосом человека. Все три пары хромосом обычно имеют спутники. Короткие плечи могут несколько отличаться у хромосом разных индивидуумов. Иногда могут отсутствовать спутники а иногда быть очень большими. Редко наблюдаются двойные спутники.

Группа E (16-18) представлена относительно короткими субметацентрическими хромосомами. Хромосомы имеют центромерный индекс 41,33, что приближает их к метацентрическим хромосомам. Они примерно в 3 раза меньше длины первой хромосомы. Иногда в длинном плече выявляется перетяжка,

Группа F (19-20) Маленькие метацентрические, имеют центромерный индекс 46. На рутинно окрашенных препаратах выглядят одинаково, но отличаются при дифференциальном окрашивании.

Группа G (21-22) представлена маленькими субметацентрическими хромосомами с центромерным индексом 31. Имеют широкую вариабельность длины короткого плеча. Короткие плечи хромосом групп G и D содержат ядрышковые организаторы. К этой группе условно относят Y-хромосому. Она чуть больше, чем 21 и 22 хромосомы. Хроматиды длинных плечей Y-хромосомы лежат обычно вместе параллельно одна другой, а у хромосом группы G хроматиды образуют широкий промежуток между собой, Y-хромосомы отсутствуют спутник, длина короткого плеча сильно варьирует. Центромерный индекс тоже сильно варьирует и составляет примерно 25.

Идентифицировать хромосомы только по описанным признакам довольно трудно. Они позволяют лишь определить, к какой группе относится хромосома. Поэтому были разработаны методы дифференциальной окраски хромосом.

Дифференциальная окраска хромосом.

Для идентификации хромосом и изучения деталей их строения или повреждения используют различные методы окраски хромосом. Этими методами устанавливается четкая дифференцировка по длине и месту расположения окрашенных и неокрашенных полос (регионов и сегментов). Этот рисунок строго специфичен для каждой пары хромосом. Участки хромосом, воспринимающие красители, называются *гетерохроматиновыми*, неокрашенные - *эухроматиновыми*. Дифференциальная окраска позволяет выявить до 1000 различных сегментов хромосом. Такие методы имеют большое значение для медицинской генетики, так как позволяют точно установить характер нарушений в кариотипе пациента. Наиболее распространенный способ окраски - по Гимза. Выявление внутренней структурной неоднородности хромосом сыграло важную роль в дальнейшем развитии цитогенетики человека. Обозначение линейной структуры хромосом основывается на следующих признаках. Каждая хромосома подразделяется на определенные участки. Хромосомные *плечи* обозначаются латинскими буквами p (короткое плечо) и q

(длинное плечо) и подразделяются на *регионы*, границами которых являются регулярно наблюдаемые морфологические районы, которые в свою очередь подразделяются на *сегменты*. Сегменты - это участки хромосом, четко отличающиеся от соседних по интенсивности окраски. Регионы и сегменты нумеруются арабскими цифрами от центромеры к теломере, отдельно для каждого плеча.

Полиморфизм хромосом. Структура одних и тех же хромосом может несколько отличаться у разных индивидуумов одного вида. Полиморфизм особенно выражен в отношении размеров спутников акроцентрических хромосом, длины Y-хромосомы, вторичных перетяжек. Во многих хромосомах обнаруживаются «ломкие» участки, подверженные хромосомным и хроматидным разрывам.

Половые хромосомы человека.

X-хромосома крупная субметацентрическая. Это «общечеловеческая» хромосома, т.к. она необходима для развития как женского, так и мужского организма. Имеет большое генетическое значение. Содержит несколько сотен генов. Гены X-хромосомы определяют развитие более 100 различных признаков человека

X-хромосома содержит много генов, без которых невозможно развитие нового организма. Эти гены обеспечивают начальные этапы эмбриогенеза, дифференцировку и развитие эмбриона, регуляцию метаболизма и др. Наряду с большим количеством важных для развития и жизни генов она может содержать некоторые патологические аллели.

Y-хромосома - маленькая, акроцентрическая (рис.27, а). Короткое p и длинное q плечи, разделенные центромерным участком. В Y-хромосоме определены следующие участки, имеющие разные функции: (1) два теломерных участка на концах p и q плечей; (2) два участка гомологичных X-хромосоме (по одному в каждом плече); (3) центромерный участок, необходимый при редупликации; (4) уникальный участок, содержащий гены, характерные только для этой хромосомы.

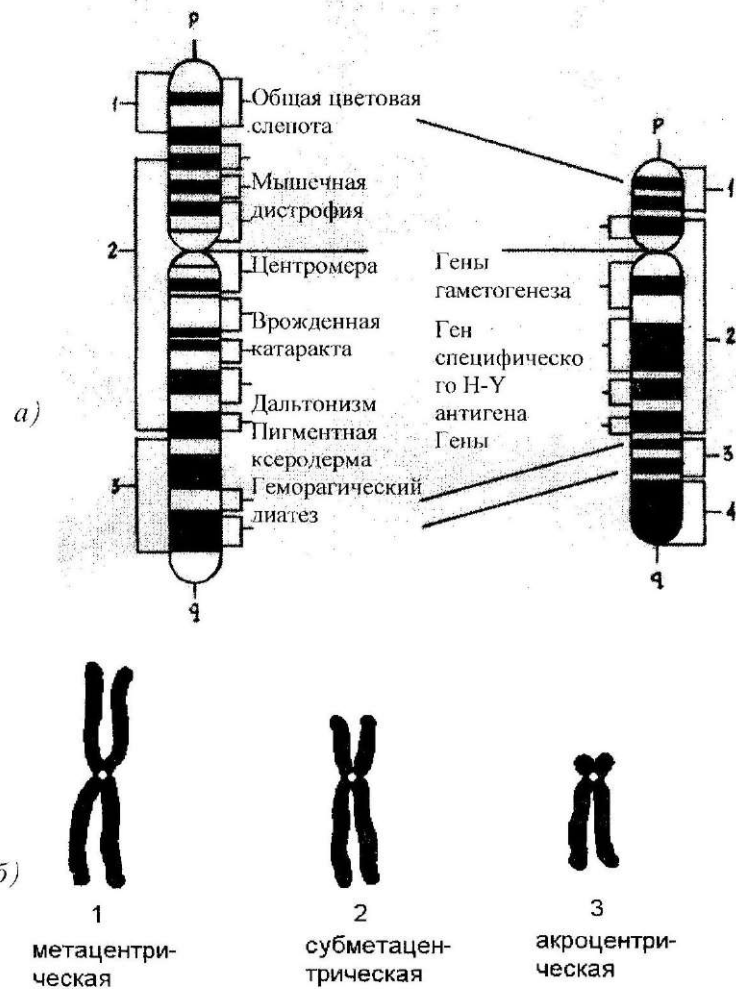


Рис.27. а) Схема строения и расположения некоторых генов в X и Y – хромосоме; p и q – теломерные участки, 1 и 3 – гомологичные участки хромосом; 2-уникальные участки; 4-гетерохроматиновый участок Y хромосомы; б) Формы хромосом

1.7. Геномный уровень организации наследственного материала

1.7.1. Геном. Кариотип. Геномика

Сейчас мы знаем, что ДНК представляет чрезвычайно длинный, неразветвленный линейный полимер, который может содержать много миллионов нуклеотидов. В ДНК 1 млн. «букв» (нуклеотидов) уместается на отрезке 0,034 см.

Кариотип – диплоидный набор хромосом, свойственный соматическим клеткам организмов данного вида, являющийся видоспецифическим признаком и характеризующийся определенным числом и строением хромосом.

Каждый вид хромосом в кариотипе, содержащий определенный комплекс генов, представлен двумя гомологами, унаследованными от родителей с их половыми клетками. Двойной набор генов, заключенный в кариотипе, – генотип – это уникальное сочетание парных аллелей генома.

Каждая молекула ДНК упакована в отдельную хромосому, а вся генетическая информация, хранящаяся в хромосомах организма называется геномом.

Геном человека представлен 6×10^9 парами нуклеотидов, распределенных в 46 хромосомах. В каждой отдельной хромосоме человека содержится от 50×10^6 до 250×10^6 нуклеотидных пар.

Термин «Геном» появился примерно 75 лет назад. Он произведен из слов GENE и chromosOME и обозначает полный набор генов и хромосом. Термин «геномика» появился в 1986 г. и относится к науке, занимающейся картированием и секвенированием геномов. Сейчас геномику разделяют на две составные части: структурную и функциональную. Стратегия функциональной геномики – расширение рамок биологических исследований от изучения отдельных генов или белков до изучения всех генов или белков одновременно.

Общая ДНК соматической клетки человека составляет $6,4 \times 10^9$ пар нуклеотидов. Большая часть ДНК – до 95% локализована в хромосомах ядра. ДНК митохондрий

составляет примерно 5%. Небольшое количество наследственного материала составляют кольцевые молекулы ДНК в ядре и цитоплазме.

Хромосомная ДНК ядра, подразделяется на две группы в зависимости от нуклеотидного состава участков: а) с уникальными последовательностями пар нуклеотидов; б) с повторяющимися последовательностями. Из общей массы ДНК в клетке человека примерно 50% ДНК с уникальными последовательностями и 50% - с повторяющимися. Участки с повторяющимися последовательностями не содержат генов и различаются по длине каждого повтора и числу повторов. Если повторы состоят из 2-8 пар нуклеотидов, то их называют микросателлитами. Другая группа повторов варьируют от 10 до 100 000 пар нуклеотидов, иногда и больше. Эти повторы называют минисателлитами. Различают умеренно повторяющиеся последовательности (до 1000 повторов в одном локусе) и высокоповторяющимися (больше 1000 повторов). Они могут быть локализованы в одном локусе или во многих локусах одной или разных хромосом. Одна и та же последовательность может повторяться в разных локусах неодинаковое число раз. Такие повторы называют тандемными. Мини- и микросателлитные тандемные нуклеотидные повторы разбросаны по всему геному и представляют собой уникальную для каждого человека комбинацию по числу повторов в разных локусах и по числу локусов. Среди уникальных последовательностей генома имеется много разнообразных генов. Однако установлено, что кодирующая часть ДНК составляет всего 3-5 %

При этом правильно рассматривать три разных уровня функциональности:

- биохимический уровень
- клеточный уровень
- уровень органов и целого организма

Из трех названных уровней функциональности только первый является относительно простым. Два других имеют дело со сложными системами.

Число установленных полных структур геномов стре-

нительно растет, среди них – последовательности геномов множества бактерий, дрожжей, нематоды, вскоре будут определены структуры генома дрозофилы и, наконец, в видимой перспективе – генома человека.

В прикладной области – развитие медицины нового поколения (генная терапия; фармакогеномика; лекарства нового поколения – эндогенные биорегуляторы; вакцины нового поколения; диагностика предрасположенности к болезням; появление надежных технологий экспресс-диагностики вновь появляющихся индукций), развитие новых подходов в сельском хозяйстве; использование новых технологий для развития производства пищевых продуктов; использование новых технологий для контроля и улучшения экологических ситуаций.

В фундаментальных исследованиях – идентификация всех генов; установления карты тканеспецифичности их экспрессии; идентификация регуляторных областей генов; построения глобальной регуляторной карты генома; классификация генов по биохимическим функциям их продуктов; создание коллекции генетического материала и многого другого.

Наступает время критического осмысления всей громадной информации, накопленной многими поколениями молекулярных биологов и генетиков. Ведь объем информации достиг того критического уровня, когда необходим пересмотр некоторых концепций о структуре гена, свойствах генетического кода.

Возникла необходимость в изложении студентам некоторых классических положений, а также альтернативных вариантов молекулярной биологии. Речь пойдет о запрещенных или неизвестных вариантах передачи биологической информации- в качестве иллюстрации рассмотрим *прионные болезни* человека.

1.7.2. Прионные болезни человека

Прионные болезни человека, возбудителем которых является конформационно-измененный прионный белок,

остаются актуальной проблемой не только неврологии, но и медицины в целом, что обусловлено прогрессирующим течением болезни с неизбежным летальным исходом, отсутствием терапевтических средств и необходимостью жесткого соблюдения предупредительных мер. В последние годы интерес к прионным болезням еще более возрос в связи с установлением идентичности линий прионов, выделенных от больных с новым вариантом болезни Крейтцфельда—Якоба и от коров с трансмиссивной спонгиозной энцефалопатией.

Прионные болезни — это группа нейродегенеративных заболеваний человека и животных. Клиническая феноменология большинства из них известна сравнительно давно, в то время как концепция их этиологии разработана около 20 лет назад, когда был введен термин «прион» и обнаружен прионный белок (PrP). В настоящее время известны **4 болезни человека**, вызываемые прионами, причем они манифестируют в виде инфекционных, спорадических и наследственных форм. **Куру**, регистрируемый в одном из племен Папуа—Новой Гвинеи, возникает в результате употребления в пищу мозга умерших соплеменников во время ритуального каннибализма. **Болезнь Крейтцфельда—Якоба (БКЯ)** возникает первично как спорадическое заболевание, однако ятрогенная БКЯ появляется в результате случайного заражения больных прионами. Семейная БКЯ, **синдром Герстманна—Штреусслера—Шейнкера (СГШШ)** и **фатальная семейная инсомния (ФСИ)** являются доминантно наследуемыми прионными заболеваниями, которые, как было показано, связаны с мутациями гена PrP. В последние годы интерес к прионным болезням в мире резко возрос в связи с эпидемией трансмиссивной спонгиозной энцефалопатии коров (так называемое «бешенство коров») в Великобритании, возбудителем которой является прион. В этот период, в основном в Великобритании, зарегистрировано более 100 спорадических наблюдений нового варианта БКЯ, дебют которой отмечался в молодом возрасте, что нетипично для этого заболевания, причем при патогистологическом исследовании мозга умерших больных были выявлены

изменения, сходные с таковыми при спонгиозной энцефалопатии коров. В последующем была установлена идентичность линий прионов, выделенных от больных с новым вариантом БКЯ и от коров с трансмиссивной спонгиозной энцефалопатией

Возбудителем прионных болезней является инфекционный PrP (PrP^{Sc}), образующийся в результате конформационных изменений третичной или четвертичной структуры нормального (неинфекционного) клеточного белка PrP^C который в свою очередь является жизненно необходимым и обнаруживается в организме всех млекопитающих, включая и человека. PrP^{Sc} отличается от нормального PrP физико-химическими и биологическими свойствами, в том числе посттрансляционным синтезом, высокой резистентностью к расщеплению протеазой К и первичным внутриклеточным накоплением в цитоплазматических пузырьках с последующим высвобождением во внеклеточное пространство и отложением в амилоидных бляшках. При этом накопление патологической изоформы PrP происходит не за счет нового синтеза молекул PrP^{Sc}, а в результате пространственных изменений PrP^{Sc} при соединении молекул PrP^{Sc} и PrP^C и образовании 2 молекул PrP^{Sc}, что обеспечивает экспоненциальный рост количества молекул PrP^{Sc}.

Процесс конверсии PrP^C в инфекционную форму аналогичен изменениям, происходящим при раке, за исключением того, что рак развивается на клеточном, а прионные болезни — на молекулярном уровне.

По классификации в настоящее время выделяются: *спорадические прионные заболевания* (БКЯ, атипичная БКЯ, спорадическая фатальная инсомния), развитие которых связано с возможной *соматической мутацией гена прионного белка PRNP, картированного на коротком плече 20-й хромосомы*, или со спонтанной конверсией PrP^C в PrP^{Sc}; *приобретенные* (инфекционные) заболевания (куру, ятрогенная БКЯ, новый вариант БКЯ); *наследственные болезни* (наследственная БКЯ, СГШЦ, ФСИ, различные атипичные деменции), развившиеся в результате мутации PRNP. При этом обнаружено более 20

мутаций PRNP, достоверно связанных с врожденными прионными заболеваниями. Кроме этого, генетический полиморфизм 129-го кодона, кодирующего метионин и/или валин, может модифицировать экспрессию мутации и приводить к различным клиническим и патолого-анатомическим проявлениям болезни. Аналогичное влияние предполагается и со стороны 171-го и 219-го кодонов PRNP.

Хотя при спорадической и инфекционной БКЯ не было обнаружено специфических мутаций PRNP, наследственная предрасположенность к этим формам прионных болезней также связывается с генетическим полиморфизмом 129-го кодона. Кроме этого, при спорадической БКЯ на начало заболевания и характер патоморфологических изменений может влиять генотип аполипопротеина Е. Наконец, еще одним фактором, влияющим на фенотип прионных болезней, является тип PrP^{res} (участка аминокислотных последовательностей PrP^{Sc}, устойчивого к действию протеаз), определяющийся молекулярной массой и соотношением гликоформ.

При морфологическом исследовании выделены характерные для прионных заболеваний макроскопические (снижение объема и массы головного мозга, а также атрофия коры) и гистологические признаки (спонгиозная дегенерация серого вещества головного мозга, атрофия и гибель нервных клеток, астроцитарный глиоз, а также амилоидные бляшки, содержащие PrP^{Sc}). При этом спектр морфологических изменений при различных прионных болезнях различается по их наличию, распространенности, выраженности и локализации в мозге.

Следует отметить, что в настоящее время специфическая морфологическая диагностика прионных болезней осуществляется иммуноцитохимическим методом путем окрашивания патологического протеина. Очевидно, что диагноз при этом достоверен только при аутопсии, поскольку возможности биопсии ограничены в связи с небольшим объемом биоптата и необходимостью его взятия из разных участков мозга.

Спорадические прионные болезни.

Болезнь Крейтцфельда—Якоба была впервые описана в начале XX века (H. Creutzfeldt — в 1920 г., A. Jacob — в 1921 г.), при этом более 90% случаев приходится на спорадические случаи, 10% — ятрогенные и наследственные формы. Общая годовая частота этого заболевания в разных регионах практически одинакова и составляет 0,3—1 случай на 1 000 000 населения, при этом мужчины заболевают несколько чаще, чем женщины (1,5:1). Клиническая тетрада, характерная для БКЯ, — подострая прогрессирующая деменция, миоклонии, типичные периодические комплексы на ЭЭГ и отсутствие изменений в цереброспинальной жидкости. Пик заболеваемости приходится на 60—65 лет, среднее время выживания составляет около 8 мес (90% пациентов умирают в течение первого года болезни). Однако описаны случаи с более быстрым течением заболевания, когда в течение нескольких недель развивается акинетический мутизм и смерть наступает через 2—3 мес от начала болезни. Продромальные симптомы, отмечаемые приблизительно у 1/3 больных за недели и месяцы до развернутой клинической картины, включают вегетативные нарушения (астения, нарушение сна и аппетита, снижение массы тела и потеря либидо, плохо определяемые болевые ощущения), нарушения внимания, памяти и мышления. Также могут отмечаться деперсонализация, эпизоды дезориентации, эмоциональной лабильности и галлюцинаций.

При классическом течении заболевания начальные когнитивные нарушения быстро переходят в прогрессирующую деменцию, являющуюся кардинальным признаком БКЯ. Миоклонии отмечаются в 3/4 случаев, иногда с самого начала заболевания. Кроме того, часто наблюдаются атаксия при ходьбе (у 70% больных), головокружение, нистагм, а также и другие мозжечковые нарушения (дискоординация в конечностях, тремор, дизартрия). Описываются также нарушения полей зрения, зрительного восприятия, зрительные галлюцинации и супрануклеарные глазодвигательные нарушения. При этом зрительные, мозжечковые нарушения, а также головная боль и дизестезии в конечностях могут быть

первыми симптомами заболевания. Эпилептические припадки возникают редко и имеют место в предтерминальной стадии. Пирамидные и экстрапирамидные нарушения выявляются более чем у 1/2 больных непосредственно перед смертью. Поражение нижнего мотонейрона имеет место менее чем в 1% случаев в начале заболевания, а затем развивается почти в 10% наблюдений.

Классическая триада гистологических изменений мозга при БКЯ складывается из спонгиозной дегенерации нейронов и их отростков, гибели нейронов и интенсивного реактивного астроцитоза, локализующихся в коре больших полушарий, базальных ганглиях, таламусе и мозжечке. 4-й морфологический феномен — формирование амилоидных бляшек — при классической спорадической БКЯ встречается редко.

В качестве альтернативы биопсии мозга для подтверждения диагноза БКЯ в последние годы было предложено исследование цереброспинальной жидкости с целью выявления атипичных белков — с молекулярной массой 26 000 и 29 000 Д, а также протеина 14-3-3. Типичные изменения на ЭЭГ наблюдаются в развернутой стадии заболевания в виде двух- или трехфазных острых волн с частотой 1—2 в секунду, которые обычно накладываются на общий сниженный уровень активности. Однако, помимо типичной, выделяются и атипичные варианты БКЯ, составляющие 10% наблюдений. В эту группу включены случаи с продолжительностью болезни более 2 лет, причем во всех этих наблюдениях отмечена гетерозиготность по 129-му кодону PRNP. Описаны атаксическая форма БКЯ с преобладанием мозжечковых нарушений над психическими, панэнцефалический тип болезни (случаи с дегенерацией белого вещества и губчатой вакуолизацией серого вещества мозга), амиотрофический вариант БКЯ, характеризующийся наличием выраженной мышечной атрофии уже на ранних этапах болезни, а также варианты с доминированием в клинической картине симптома корковой слепоты вследствие поражения затылочных долей.

При использовании в качестве маркеров генотипа 129-го

кодона PRNP и типа Pr^{res}. Parchi и соавт. выделили 4 группы вариантов спорадической БКЯ, включающие все описанные патологоанатомические варианты классической БКЯ и так называемые атипичные формы.

Приобретенные (инфекционные) прионные болезни.

Данная подгруппа, как уже отмечалось, включает **куру**, развитие которого связано с каннибализмом; ятрогенную форму БКЯ, возникающую при случайной инокуляции прионов; новый вариант **БКЯ**, наблюдающийся при употреблении в пищу мясных продуктов, полученных из зараженных коров.

Эпидемия **куру** развилась в 50-х годах XX столетия в племени форе, проживающем в горных районах Папуа — Новой Гвинеи, где существовал ритуальный каннибализм. Установлено, что при куру среди больных чаще регистрировалась гомозиготность по валину в 129 кодоне PRNP, что еще раз доказывает генетическую детерминированность прионных заболеваний.

Все случаи ятрогенных прионных болезней относятся к БКЯ, вызванной различными хирургическими и медицинскими манипуляциями: использованием недостаточно простерилизованных нейрохирургических инструментов; пересадкой твердой мозговой оболочки и роговицы; использованием соматотропного и гонадотропного гормонов, полученных из гипофизов умерших людей. Следует отметить, что при центральной (внутричерепной) инокуляции прионов заболевание клинически проявляется как классическая БКЯ, в то время как при периферической инокуляции, в основном после использования полученного из гипофиза гормона роста, типичен прогрессирующий атактический синдром. При этом инкубационный период в случаях внутричерепного заражения короче (19—46 мес при пересадке твердой мозговой оболочки), чем в случаях периферического заражения (обычно 15 лет и более). Гематогенный путь передачи прионных болезней также не исключается, хотя и не является доказанным.

До настоящего времени не выделены профессиональные

группы риска, однако имеются описания случаев возникновения БКЯ у двух лаборантов-гистологов, нейронатоморфолога и нейрохирурга.

В 1994—2001 гг. в основном в Великобритании, а также во Франции и Ирландии было зарегистрировано около 100 случаев нового варианта БКЯ, развившегося после эпизоотии спонгиозной энцефалопатии у коров и, вероятно, связанного с ней. Клинические отличия данного варианта от классической формы БКЯ — более молодой возраст начала заболевания (от 16 до 40 лет) и большая длительность течения болезни (в среднем 13 мес). Ни в одном случае не отмечено потенциально ятрогенных факторов; при анализе PRNP не выявлено известных мутаций, указывающих на наследственный характер заболевания. Однако молекулярно-генетические исследования показали, что все эти пациенты оказались гомозиготными по метионину в 129-м кодоне PRNP, а также носителями типа 2 PrP^{res}.

На ранних стадиях при новом варианте БКЯ отмечаются психические нарушения в виде тревоги, депрессии, изменения поведения, реже регистрируются боли или дизестезии в конечностях и на лице, спустя недели или месяцы присоединяются прогрессирующие мозжечковые нарушения. Для поздних стадий болезни характерны нарушения памяти и деменции, в меньшей степени — миоклонии и хорей, пирамидные симптомы, акинетический мутизм.

Характерным морфологическим признаком нового варианта БКЯ являются множественные амилоидные бляшки, содержащие PrP⁸⁰ и локализующиеся в коре полушарий большого мозга и мозжечка, часто окруженные ореолом спонгиозных изменений. Кроме этого, PrP^{Sc} может откладываться и в мелких бляшках, не связанных со спонгиозными изменениями, а также вокруг нейронов и сосудов. Другие гистологические изменения включают спонгиозные изменения, наиболее выраженные в базальных ганглиях с массивным отложением PrP^{Sc} резко выраженный астроглиоз и гибель нейронов в таламусе, массивное

накопление PrP^{Sc} в коре мозжечка и точечное отложение в ядрах моста.

Наследственные прионные болезни человека, для которых характерен аутосомно-доминантный тип наследования, включают семейные случаи БКЯ и ФСИ, а также все наблюдения СГШШ.

Наследственная БКЯ характеризуется наибольшим полиморфизмом среди генетически обусловленных прионных болезней. В настоящее время при БКЯ описано **7 точковых мутаций PRNP**, при которых клиническая и патоморфологическая картина имеет определенные отличия от классической (спорадической) формы болезни: *PrP Asp178Asn-129Met*; *PrP Val180Ile-129Met*; *PrP Thr183Ala-129Met*; *PrP Glu200Lys-129Met*; *PrP His208Arg-129Met*; *PrP Val210Ile-129Met*; *PrP Met232Arg-129Met*.

Наряду с точковыми мутациями при СГШШ описаны **2 вставочные мутации** в виде восьмичленных аминокислотных повторов в 51—91-м кодоне: **Синдром Герстманна—Штреусслера—Шейнкера**, описанный впервые J. Gerstniann в 1936 г., регистрируется с частотой 1 случай на 10 000 000 населения.

Клинические симптомы появляются на 3-м или 4-м десятилетии жизни, продолжительность заболевания составляет несколько лет (в среднем 5 лет). Начальными симптомами являются мозжечковые нарушения, позже может присоединиться деменция. В развернутой стадии также преобладают мозжечковые симптомы, но в некоторых семьях ведущими признаками могут быть экстрапирамидные нарушения, а также паралич зрения, глухота и слепота. Характерно отсутствие сухожильных рефлексов на ногах при наличии разгибательных патологических знаков. Миоклонии отмечаются редко. На ЭЭГ отсутствуют периодические синхронные колебания.

Наиболее характерным морфологическим признаком СГШШ является отложение мультицентричных амилоидных бляшек практически во всех отделах мозга, но в большей степени в мозжечке. Описаны также дегенерация зубчатого

ядра, сочетающаяся с гибелью нейронов и распространенным астроглиозом, дегенерация белого вещества, а также спонгиозные изменения, однако они очень вариабельны по степени выраженности и распространенности.

При молекулярно-генетическом исследовании отмечено, что для большинства генетических подтипов СГШШ характерна замена пролина на лейцин в 102-м кодоне PRNP, при этом в зависимости от сочетания с полиморфными 129-м и 219-м кодонами выделяются гомозиготы соответственно по метионину и валину, а также по лизину.

Так, клинически *генотип PrP Prol02Leu-129Met* характеризуется медленно прогрессирующим мозжечковым синдромом и пирамидной недостаточностью с длительностью заболевания от 1 года до 10 лет; в случаях быстрого течения клиническая картина может напоминать БКЯ. Основным неврологическим проявлением генотипа *PrP Prol02Leu-129Met, 219Lys* являются выраженные мозжечковые нарушения, длительность болезни при этом не превышает 4 лет. Генотип *PrP Prol02Leu-129 Val* клинически характеризуется эпилептиками, ригидностью, нарушением походки, дизартрией. При генотипе *PrP Prol02Leu-129Val* отмечаются спастический парапарез, нарастающий до тетрапареза, и негрубые мозжечковые нарушения, позднее присоединяется деменция, а до развития акинетического мутизма проходит не более 5 лет. *Генотип PrP Alal17Val-129Val* клинически проявляется деменцией в сочетании с паркинсонизмом, пирамидной недостаточностью, псевдобульбарным и мозжечковым синдромами. *Генотип PrP Tyr145Stop-129Met* отмечен у больной из Японии, заболевание у которой клинически и гистологически напоминало болезнь Альцгеймера и продолжалось 21 год. При *генотипе PrP Phe198Ser-129Val, 129Met/Val* клинические проявления подобны СГШШ с *генотипом Prol02Leu*, но с более медленным течением. Описан 1 больной с *генотипом PrP Gln212Pro-129Met*, заболевший в возрасте 60 лет. Клиническая картина включала медленно прогрессирующую атаксию, дизартрию при

отсутствии деменции; продолжительность заболевания составила 8 лет. Наконец, **генотип PrP Gln217Arg-129Val** характеризуется медленно прогрессирующей деменцией, мозжечковыми и экстрапирамидными симптомами при длительности болезни 5—6 лет.

Наряду с точковыми мутациями при СГШШ описаны 2 вставочные мутации в виде восьмичленных аминокислотных повторов в 51—91-м кодоне:

генотипы PrP Ins192bp-129Val и PrP Ins216bp-129Met, при которых возраст больных составил 21— 54 и 32— 55 лет, а длительность болезни — до 6 и до 4 лет). Остальные случаи БКЯ трактуются как вероятные-возможные.

Диагностика прионных болезней остается одним из сложных вопросов, поскольку поставленный клинически (а при спорадической БКЯ и электрофизиологически) диагноз должен быть подтвержден при гистологическом исследовании ткани мозга с последующим иммуноцитохимическим ее окрашиванием.

Однако в последнее время появились сообщения о выявлении иммуноцитохимическим методом PrP в биоптате ткани глоточной миндалины при новом варианте БКЯ, а также имеются сообщения о диагностике БКЯ с помощью моноклональных антител.

В последние годы за счет унификации диагностики прионных болезней человека разработаны критерии диагноза этих заболеваний.

Достоверный диагноз БКЯ устанавливается с помощью стандартных патоморфологических методов и/или в соответствующих лабораториях с помощью дополнительных методов (PrP-иммунохимические методы, западный блоттинг и/или- выявление скрепиассоциированных фибрил).

Куру может быть диагностирован только в племени форе в Папуа — Новой Гвинее.

Несмотря на прогресс, достигнутый в понимании этиологии и патогенеза прионных болезней, а также накопленный клинический опыт, лечение прионных болезней

на современном этапе включает лишь симптоматические средства. Обсуждаются некоторые терапевтические подходы, основанные на предотвращении или замедлении конформационного преобразования P_rP^C в P^Sc , а также на снижении уровня P^Sc без нанесения вреда организму.

Основным направлением борьбы с прионными болезнями на современном этапе является осуществление мероприятий по профилактике этих заболеваний. Так, наряду с ограничением использования лекарственных средств, приготовленных из тканей коров, прекращено производство гормонов гипофиза животного происхождения. В ряде стран введены ограничения на трансплантацию твердой мозговой оболочки. Разрабатываются запретительные меры на трансплантацию тканей, переливание крови и назначение препаратов крови от больных с деменцией.

Поскольку *передача прионных болезней от человека человеку* предполагает *прямую инокуляцию инфекционного материала*, при работе с больными в процессе инвазивных процедур, а также при контакте с биологическими жидкостями необходимо придерживаться правил, предусмотренных при работе с больными СПИДом. При вскрытии умерших больных следует соблюдать те же правила.

Инструменты, используемые у больных БКЯ при нейрохирургических манипуляциях, а также, по-видимому, при тонзиллярной биопсии, и внутримозговые электроды должны быть уничтожены. Если их использование неизбежно, инструменты должны быть подвержены обработке в 1 н. растворе NaOH или чистом неразведенном растворе гипохлорита в течение 1 ч, очищены, а затем автоклавированы в течение 1 ч при 134°C. При аутопсии необходимо использовать кольчужные перчатки, маску и очки.

Учитывая прогнозы, не исключающие возможности значительной эпидемии нового варианта БКЯ в ближайшие 10—15 лет, а также отсутствие эффективной терапии по мнению специалистов, в настоящее время необходимо разработать национальные программы и создать специализированные центры по надзору за прионными болезнями.

1.8. Молекулярные основы патологии апоптоза

Термин «апоптоз» (от греческого *apoptosis* – опадание). Применяется для обозначения запрограммированной гибели клетки. Первые высказывания о существовании процесса гибели клеток в многоклеточном организме появились еще в начале XIX века. Однако годом признания апоптоза как физиологического явления считается 1972 г., когда английские исследователи J.F.R. Kerr и соавторы представили убедительные морфологические доказательства.

Апоптотическая гибель клеток наблюдается при различных патологических состояниях. Путем запрограммированной клеточной гибели происходит удаление клеток, выживание которых нежелательно для организма, например мутантных клеток, зараженных вирусом. В последнем случае этот процесс имеет важное биологическое значение, поскольку фрагментация ДНК предупреждает перенос генетического материала в другие клетки. Отличительной морфологической чертой апоптоза является коллапс ядра. Хроматин, который в норме представлен открытыми и конденсированными областями (гетеро- и эухроматин), становится суперконденсированным в форме полумесяца по периферии ядра. В этот момент начинается фрагментация ДНК. На ранних стадиях апоптоза в отличие от некроза клетка, наоборот, сморщивается, теряя до 1/3 своего объема за несколько минут. Механизм этого явления до сих пор не изучен, но, несомненно, в этот процесс должны вовлекаться транспорт ионов и воды. Важной особенностью этого процесса является то, что не происходит повреждения мембран клетки. Усыхание хорошо выражено как в культуре клеток, так и в тканевых срезах, где апоптотическая клетка отделяется от соседних клеток. Далее апоптотическая клетка превращается в совокупность окруженных мембраной, различных по своему составу апоптотических телец, которые фагоцитируются макрофагами или соседними клетками. Запускают апоптоз каспазы, которые функционируют как медиатор сигнала смерти (механизм протеолиза, т.е. в активном центре находится цистеин). Во время апоптоза каспазы расщепляют поли (АДФ-

рибоза) полимеразу (ПАРП)-энзим, участвующий в репарации поврежденной ДНК.

Чрезвычайно интересны гипотезы об участии митохондриального генома в апоптозе. Образование пор в митохондриальной мембране играет главную роль в механизмах апоптоза. Недавно получены данные, что белки Bcl-2, Bcl-X₂ и Bax могут образовывать митохондриальные поры и таким образом прямо модулировать проницаемость митохондриальной мембраны для цитохрома С. поскольку последний является одним из факторов, способствующих активации каспазы 3 в цитоплазме, то митохондриальный этап может считаться одним из первых в каскаде событий, ведущих к апоптозу.

Апоптоспецифическая фрагментация ДНК.

Одно из апоптотических событий реализуется в ядре клетки и заключается во фрагментации ДНК. Дегградация ДНК является терминальной фазой апоптоза. В ходе дегградации ДНК сначала происходит образование крупных фрагментов, содержащих примерно 300 тыс. пар оснований (п.о.), несколько позже - 30-50 тыс. п.о. Далее наступает следующий этап фрагментации ДНК – ее межнуклеосомная дегградация с формированием фрагментов, содержащих 180 п.о. (протяженность нити ДНК в нуклеосоме) или кратных им по величине. Именно эти фрагменты выделяются в виде лесенки при электрофорезе ДНК лизатов апоптотических клеток, которые широко используются для идентификации апоптоза.

Фрагментация ДНК связана с протеолитическим расщеплением специфического белка топоизомеразы II. Этот белок выполняет структурную и ферментативную функции и участвует в формировании структур ДНК высшего порядка – суперспирализованных петель. Они содержат по 50 тыс. п.о. 6 петель, объединенных в единую дисковидную розетку; образуют еще более сложную структуру и имеют в своем составе соответственно по 300 тыс. п.о. Следует напомнить, что именно на фрагменты по 50 тыс. и 300 тыс. п.о. расщепляется ДНК в

начальной стадии деградации при апоптозе. Деградация топоизомеразы II каспазами является одной из причин фрагментации ДНК.

Также субстратом протеаз при апоптозе является гистон H1, который защищает ДНК от действия эндонуклеаз на межнуклеосомальном уровне. В результате этого расщепления происходит деградация ДНК на фрагменты порядка 180 п.о. и кратные им.

Осуществление различных этапов деградации ДНК связывают с проявлением активности различных эндонуклеаз. Мало сведений о характеристике эндонуклеаз, обуславливающих появление крупных фрагментов ДНК. Немного больше сведений о процессах межнуклеосомальной деградации ДНК, в результате которой образуются фрагменты ДНК размером 180 п.о. Считают, что этот тип деградации обеспечивается активацией Ca^{2+} , Mg^{2+} - зависимой эндонуклеазы.

Механизмы индукции апоптоза при повреждении ДНК.

До последнего времени считалось, что нерепарируемые повреждения ДНК приводят клетку к гибели в результате нарушений функций всех биохимических систем из-за невозможности полноценной транскрипции генов, содержащих дефекты в матрице ДНК. Исследования последних лет привели к формированию принципиально новых представлений о механизме гибели клеток, имеющих повреждения ДНК, как о процессе, осуществляемом в соответствии с определенной генетической программой. В индукции этой программы при наличии повреждений в ДНК клетки важная роль принадлежит белку p53. Этот белок с молекулярной массой 53 кДа локализован в ядре клетки и является одним из транскрипционных факторов, повышенная экспрессия которого приводит к репрессии ряда генов, регулирующих транскрипцию и причастных к задержке клеток в фазе клеточного цикла G₁. При повреждении ДНК под действием ионизирующего или УФ-излучения, ингибиторов

топоизомеразы II и некоторых других воздействиях происходит активация экспрессии гена p53. Блок клеточного цикла в фазах G₁ и G₂ до репликации ДНК и митоза соответственно делает возможной репарацию поврежденной ДНК и предотвращает тем самым появление мутантных клеток. Если же активность репарационных систем недостаточна и повреждения ДНК сохраняются, то в таких клетках индуцируется программируемая клеточная гибель, или апоптоз, что приводит к защите организма от присутствия клеток с поврежденной ДНК, т.е. мутантных и способных к злокачественной трансформации.

На уровне транскрипции p53 регулирует экспрессию генов, участвующих в блокаде клеточного цикла – p21 (ингибитор большинства циклинзависимых киназ), или взаимодействуют либо с комплексами, определяющими синтез и репарацию ДНК, либо с белками, модулирующими апоптоз, – Bcl-2, Bax. Последовательность рассмотренных событий представлена на рис. 28, а. Мутации гена p53 позволяют таким клеткам сохранять жизнеспособность в митозе, что чревато выживанием клеток, подвергшихся опухолевой трансформации. И действительно, при онкологической трансформации обнаружено значительное количество мутаций гена p53. Мутации гена p53 связаны с плохим прогнозом в лечении злокачественных новообразований. Такие опухолевые клетки оказываются резистентными к лучевой и химиотерапии. И, наоборот, опухоли с нормальным (диким типом) p53 легко поддаются лечению.

Таким образом, при действии генотоксических агентов p53 не только увеличивает время репарации ДНК, но также защищает организм от клеток с опасными мутациями.

Роль белков семейства Bcl-2 в регуляции апоптоза клетки.

Процесс регулируемой клеточной гибели условно может быть разделен на несколько различных фаз: фаза инициации апоптоза, проведение сигнала, активация каспаз, активация эндонуклеаз и специфическая деградация ДНК, в результате чего наступает гибель клетки (рис. 28, б). Если начальные фазы

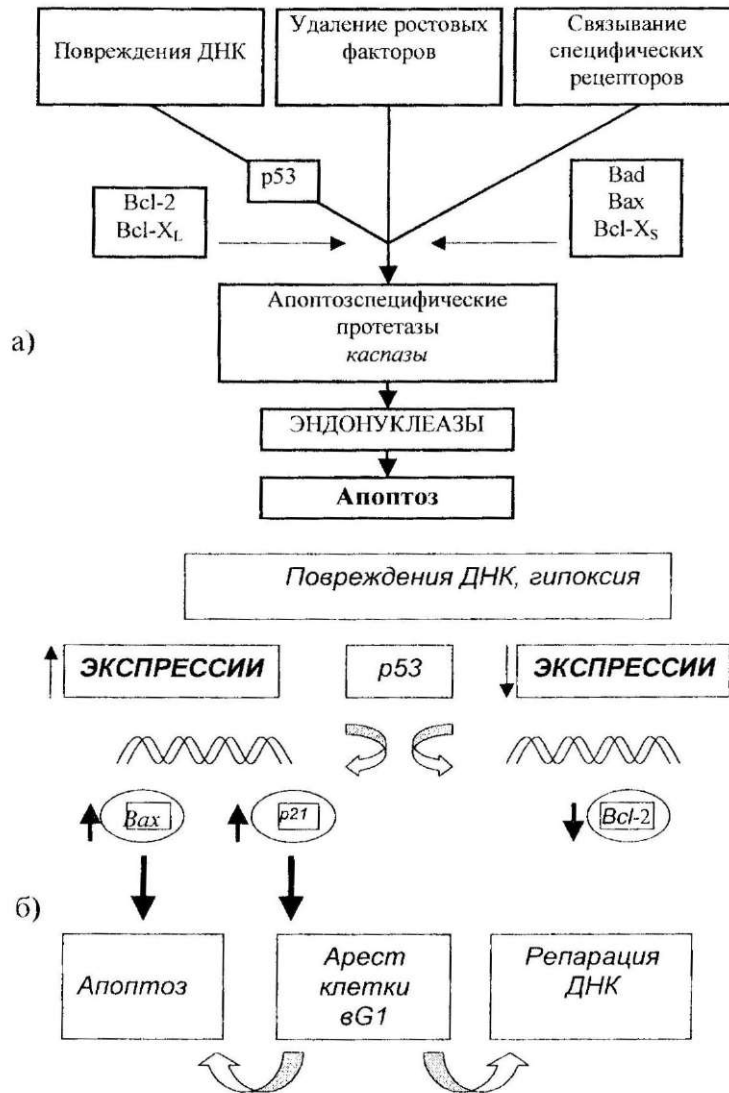


Рис. 28. а) - Последовательность биохимических событий при индукции апоптоза; б) - Роль белка p53 в регуляции апоптоза клетки.

различаются в зависимости от типа клеток и от апоптозиндуцирующего сигнала, то этап деградации ДНК универсален для большинства клеток. Эта фаза является переходом к необратимой, терминальной, стадии апоптоза, которую контролируют белки семейства Bcl-2, производные одноименных генов.

Многообещающими являются также подходы, связанные с регуляцией апоптозспецифических генов и реализующиеся, в частности, в генной терапии- одной из самых перспективных областей современной медицины – при лечении заболеваний, вызванных нарушением функционирования отдельных генов. Идентификация морфологических и биохимических маркеров апоптоза должна в перспективе способствовать более глубокому пониманию механизмов патогенеза заболеваний, улучшению дифференциальной диагностики и созданию принципиально новых направлений терапии.

1.9. Внеядерная (цитоплазматическая) наследственность

Митохондрия и ее геном.

Митохондрии – важнейшие клеточные органеллы, которые присутствуют во всех эукариотических организмах и являются энергетическими станциями клетки. В них осуществляются реакции клеточного дыхания, идущие с выделением энергии, которая запасается в виде аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ). Митохондрии, как и пластиды, - это относительно автономные органеллы. Они отграничены двойной мембраной и имеют собственную генетическую систему. Исследование генома митохондрий выявило совершенно уникальные его особенности. Первое шокирующее сообщение пришло в 1979 году, когда было обнаружено, что в митохондриях животных, грибов, а также в митохондриях человека кодон УГА, в стандартном коде являющийся стоп-кодоном, кодирует триптофан. Митохондрии растений, по-видимому, используют нормальный генетический код.

Другой необычной чертой митохондрий является

особенность узнавания кодонов транспортными РНК, что приводит к тому, что одна молекула узнает сразу четыре кодона. Указанное изменение митохондриального генетического кода уменьшает значимость третьего нуклеотида в кодоне и приводит к тому, что требуется меньше транспортных РНК. Всего 22 транспортных РНК достаточно для узнавания всех 64 кодонов, тогда как для обычных рибосом их должно быть не менее 32 (в некоторых организмах найдено до 61).

В митохондриальной генетической системе содержится запись некоторых (но далеко не всех) митохондриальных белков и большинства митохондриальных РНК (иногда за исключением нескольких маленьких РНК, в том числе части транспортных РНК, которые транспортируются в митохондрию из цитоплазмы). Митохондриальный геном кодирует 13 субъединиц комплексов дыхательной цепи. Ядерный геном кодирует остальные белки – переносчики электронов, митохондриальные транслоказы, компоненты транспорта белков в митохондрии, факторы, необходимые для транскрипции, трансляции и репликации митохондриальной ДНК. Поэтому можно сказать, что функционирование митохондрии представляет собой диалог между двумя геномами: митохондриальным и ядерным. Некоторые митохондриальные гены представлены копиями в ядерном (а у растений и в хлоропластном) геноме.

Особенность митохондриального генома многих организмов – это необычайно частое изменение структуры синтезированной РНК, так называемое редактирование. Иными словами, митохондриальный геном содержит немало ошибок, исправляемых в процессе созревания матричных РНК.

1.9.1. Митохондриальный геном человека

Геном митохондрий человека представлен одной кольцевой молекулой ДНК размером 16 569 пар нуклеотидов. Он кодирует 13 белков 22 (все) транспортные РНК, две рибосомные РНК. 60% генов, кодирующих белки, приходится

на семь субъединиц комплекса, окисляющего НАДН, остальные гены кодируют две субъединицы АТФ-синтетазы, три субъединицы цитохромоксидазы, одну субъединицу убихинол-цитохром-с-редуктазы (цитохром b). Все белки, кроме одного, две рибосомные и шесть транспортных РНК транслируются с матричной РНК, транскрибирующейся с более тяжелой цепи ДНК, 14 других транспортных РНК и один белок транслируются с матричной РНК, транскрибирующейся с более легкой цепи ДНК. Как остроумно отметил один из исследователей митохондрий, митохондриальный геном человека напоминает университет, в котором все уменьшено до минимальных размеров, но пока еще никто не уволен. Митохондрии содержат кольцевую двухцепочечную ДНК, которую называют 25-й хромосомой человека (мт ДНК). В каждой соматической клетке содержится сотни митохондрий. ДНК митохондрии составляет до 5 % от общего количества ДНК в организме. Митохондрии ДНК реплицируется (транскрибируется) полуавтономно от ядерной ДНК.

1.9.2. Митохондриальные болезни

Митохондриальные болезни - разнообразная группа заболеваний, обусловленных дефектами митохондриального генома

Многие митохондриальные дефекты приводят к нарушению работы сердечной мышцы. Поскольку миокард зависит от окислительного метаболизма митохондрий, неудивительно, что генетические нарушения митохондриальной функции приводят к кардиомиопатиям. Большинство митохондриальных кардиомиопатий представляют собой мультисистемные нарушения, где заболевания сердца – основной компонент. Нарушение функционирования нервной системы также может быть связано с митохондриальными дефектами.

Митохондриальные энцефало- и миопатии могут быть связаны по меньшей мере с 50 точковыми мутациями и другими разнообразными перестройками митохондриальной ДНК.

Подобные заболевания нередко имеют причиной недостатка цитохром-с-оксидазы (фермента, осуществляющего перенос электронов на кислород) и убихинона – универсального переносчика электронов. Известны заболевания, связанные с дефектами структурных митохондриальных белков, транслоказ, импорта белков в митохондрии, передачи сигналов между митохондриальным и ядерным геномом. Выявлены заболевания, обусловленные мутациями, затрагивающими транспортные и рибосомальные РНК митохондрий. Нарушения митохондриальной функции могут приводить к аритмиям. Одно из распространенных опасных заболеваний, проявляющихся в самом раннем возрасте, - ацидоз, связанный с накоплением молочной кислоты, при этом дефектные митохондрии могут только ограниченно утилизировать продукт гликолиза (пируват) в цикле Кребса. Митохондриальные дефекты могут проявляться на разных стадиях индивидуального развития.

Выявление самостоятельных синдромов митохондриальных болезней, создание генетической карты митохондриальных болезней, разработка дифференцированных подходов к терапии стали возможными в связи со значительными достижениями в исследованиях структуры и функций митохондрий с помощью новейших молекулярных технологий.

Учеными предложено несколько принципиально различных классификаций митохондриальных болезней. Одной из первых была фундаментальная классификация основанная на биохимических дефектах: а) дефекты транспорта митохондриальных субстратов; б) дефекты дыхательной цепи; в) дефекты утилизации субстратов; г) дефекты накопления и передачи энергии. Эта классификация являлась, безусловно, важнейшим этапом в систематизации митохондриальных болезней, однако открытие митохондриального генома и структурных перестроек мтДНК являлись предпосылкой для разработки новых классификаций, учитывающих достижения современной молекулярной генетики и биохимии. Наиболее приемлемой классификацией, удовлетворяющей состоянию

современной науки, является классификация, где выделены наследственные и приобретенные митохондриальные болезни, а среди наследственных - *митохондриальные болезни*, детерминируемые дефектами мт ДНК а также дефектами межгеномных взаимоотношений.

Для возникновения нарушений энергетического обмена и дисфункции конкретного органа или ткани необходимо критическое число мутантных мтДНК, т.е мутантный фенотип проявляется лишь тогда, когда количество мутантной ДНК достигает определенного минимума. Различная чувствительность, например мозга, мышц и печени по разному проявляется в случаях мутаций мт ДНК. Даже при наличии 90% мутантной мтДНК в клетках печени симптомы нарушения ее функций могут отсутствовать, в то время как аналогичное число мутантной мт ДНК в мышце и мозге может привести к выраженным метаболическим функциональным нарушениям т.к. мышцы и мозг имеют более значительные энергетические потребности.

В процессе оплодотворения генетическая информация ДНК ооцита и сперматозоида объединяется в равной степени, а практически вся мт ДНК будущей зиготы образуется из митохондрий ооцита. Поэтому закономерность наследования мтДНК и ее мутаций отличается от менделевской. Заболевания, вызванные мутациями мтДНК, наследуются по материнской линии. Больная мать, обычно передает заболевание всем своим детям. Передача заболевания следующим поколениям возможна только через дочерей.

1.9.3. Митохондрии и старение

Ассоциированное со старением изменение митохондриального генома наблюдается в различных видах. Оно включает точковые мутации нуклеотидов, а также делеции. Клеточный энергетический кризис ведет в конечном счете к клеточной смерти – апоптозу через фрагментацию митохондриальной ДНК, дегенерацию и атрофию тканей.

Внедрение митохондриальной ДНК в хромосомы, может быть причиной рака и старения. В настоящее время ни одна теория старения не может игнорировать роль митохондрий. Уже нет сомнений, что митохондрии представляют собой центр контроля апоптоза. Гибель клетки связана с выработкой специфического белка-убийцы, который локализован в межмембранном пространстве митохондрии и выходит из нее, когда она не справляется с удалением активных форм кислорода (супероксид-аниона, перекиси водорода). Последние индуцируют открывание пор во внешней мембране, что и приводит к выходу этого белка в цитозоль и включению цепи метаболических реакций, ведущих к синтезу протеаз и нуклеаз, переваривающих клетку. Исследуются вещества (в том числе и синтезирующиеся и внутри клетки), которые оказывают воздействие на митохондриальную мембрану и тем самым предотвращают или, напротив, ускоряют апоптоз. Некоторые из них являются онкобелками (белками, вовлеченными в развитие раковых опухолей). Их действие может быть связано с тем, что апоптоз является крайней мерой, позволяющей избавляться от сильно поврежденных геномов, накопление которых приводило бы к злокачественному перерождению тканей.

Гипотеза теломеразы. Проллиферативное старение.

Концы хромосом защищены своеобразными наконечниками — *теломерами* (см. стр. 84), концевыми участками ДНК, которые как полагают, отвечают за правильную ориентацию хромосом при делении и заякоривание их в мембране ядра клетки. При каждом делении кончик молекулы как бы обрывается, теломера ДНК все сокращается и, наконец, становится негодной для исполнения своих функций, и клетка теряет способность делиться. В результате клеточный состав органов и тканей постепенно изнашивается и не восстанавливается. Теломерные последовательности не являются кодирующими. Укорочение ДНК в ходе каждого раунда репликации лишь сокращает нетранскрибируемый текст теломеры, но не приводит к утрате

смысловых последовательностей - генов и регуляторов их экспрессии.

Исследователи открыли, что дети больные *прогерией* буквально за несколько лет «превращаются» в стариков, длина теломера настолько мала, что его не «хватает» надолго, и клетки очень быстро теряют способность делиться, что и ускоряет процесс старения.

В экспериментах ученые смогли изменить ход процесса старения у клеток путем введения в ДНК генов, отвечающих за образование фермента *теломеразы*, который играет важную роль в синтезе теломера. Теломераза - это ДНК-нуклеотидилэкзотрансфераза или теломерная терминальная трансфераза - фермент, восстанавливающий концы линейных молекул ДНК хромосом короткими повторяющимися последовательностями (у позвоночных TTAGGG). Помимо белковой части, теломераза содержит РНК, выполняющую роль матрицы для наращивания ДНК повторами. Длина теломеразной РНК колеблется от 150 нуклеотидов у простейших, до 1400 нуклеотидов у дрожжей. Сам факт наличия в РНК последовательности, по которой идет матричный синтез отрезка ДНК, позволяет отнести теломеразу к своеобразной обратной транскриптазе. Теломераза есть только в гаметах и у плода, взрослый же организм природа обделила этим ферментом.

Клеточный цикл является серией высоко упорядоченных процессов, которые приводят к удвоению клетки. При прохождении цикла клетка последовательно проходит несколько дискретных фаз означаемых G_1 , S, G_2 и M, Только прохождение фазы G_1 стимулируется митогенами организма и может быть заблокировано антипролиферативными факторами. По окончании G_1 клетки переключаются на автономную программу регуляции и проходят остальные фазы с практически одинаковой скоростью в каждом делении. Все физиологические задержки и остановки цикла — происходят в фазе G_1 . Критическим пунктом клеточного цикла является точка рестрикции в конце фазы G_1 . Именно здесь клетка «принимает

решение» переходить в фазу S или углубиться в состояние покоя. Клетки, израсходовавшие весь свой пролиферативный потенциал, останавливаются в G_1 , из-за утраты способности переходить точку рестрикции. Переход через точку рестрикции и вхождение в фазу S регулируют циклин-зависимые киназы (CDK). Мутации генов CDK нарушают образование киназ и замедляют обновление клеточного состава органов и тканей, что ускоряет старение.

В связи с укорочением теломер соматические клетки млекопитающих проходят также ограниченное количество делений и вступают в состояние необратимого покоя, называемого «пролиферативным старением». Это ведет к замедлению обновления клеток тканей, что обуславливает старение организма и его последующую неизбежную смерть.

Раздел 2 МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ИЗМЕНЧИВОСТИ

2.1. Источники изменчивости

Практически неограниченными источниками генетической изменчивости служат кроссинговер и независимое расхождение хромосом во время мейоза, а также слияние гамет во время оплодотворения. Вкратце эти процессы описаны ниже.

1. Кроссинговер — реципрокный обмен генами между хроматидами гомологичных хромосом, который может происходить в профазе I мейоза. В результате такого обмена создаются новые группы сцепления и новые комбинации аллелей.

2. Независимое расхождение хромосом — ориентация хроматид гомологичных хромосом (бивалентов) в плоскости веретена в метафазе I мейоза определяет направление, в котором каждый член пары будет перемещаться в анафазе I. Эта ориентация хроматид носит случайный характер. Во время метафазы II ориентация хроматид снова происходит случайным образом и определяет, к какому из двух противоположных полюсов направится каждая хромосома во время анафазы II. Случайная ориентация и последующее независимое расхождение

(сегрегация) хромосом делают возможным большое число различных комбинаций хромосом в гаметах. Это число можно подсчитать.

3. Случайное оплодотворение — третий источник изменчивости, возникающий при половом размножении в результате того, что слияние мужской и женской гамет происходит совершенно случайно (во всяком случае в теории). Любая мужская гамета потенциально имеет возможность слиться с любой женской гаметой.

Эти три источника генетической изменчивости и обеспечивают постоянную «перетасовку» генов, лежащую в основе непрерывной изменчивости. Среда оказывает воздействие на весь ряд получающихся таким образом фенотипов, и те из них, которые лучше всего адаптированы к данной среде, преуспевают. Это ведет к изменениям частот аллелей и генотипов в популяции. Однако эти источники изменчивости не порождают крупных изменений в генотипе, необходимых, согласно эволюционной теории, для возникновения новых видов. Такие изменения происходят в результате мутаций.

2.2. Мутации ДНК. Классификация мутаций

Мутацией называют изменение количества или структуры ДНК данного организма.

Классификация мутаций. В зависимости от причин возникновения мутации могут быть спонтанные или индуцированные. **Спонтанные** - это мутации, которые происходят в природе внезапно без видимых причин под действием каких-то факторов. **Индукцированные** - это мутации, происходящие при направленном воздействии определенных мутагенов.

В зависимости от места мутирования различают: генеративные и соматические мутации. **Генеративные** - это мутации, возникающие в генетическом аппарате генеративных клеток и передающиеся потомкам при половом размножении (например, изменения кариотипа гаметоцитов при нарушении мейоза). **Соматические** - это мутации, происходящие в генетическом аппарате соматических клеток и проявляющиеся

только у самой особи (например, рак кожи под действием ультрафиолетовых лучей). Потомкам не передаются.

В зависимости от последствий действия на фенотип различают следующие мутации: **Аморфные** - мутации приводят к исчезновению признаков. Например; альбинизм, безволосость, анофтальмия. **Гипоморфные** - уменьшение выраженности (экспрессивности) признака. Например, карликовость, микрофтальмия, микроцефалия. **Гиперморфные** - усиление выраженности (экспрессивности) признака. Например, гигантизм, полидактилия, гипертрихоз. **Неоморфные** - в процессе эволюции появляются новые признаки, которых ранее не было (гемоглобин, хорда, головной мозг и др.). **Антиморфные** - вместо одних признаков появляются другие. Например, в процессе эволюции млекопитающих вместо потовых появились молочные железы.

В зависимости от исхода действия на организм известны следующие мутации: **Летальные** - приводящие к гибели организма. Например, гетероплоидии по крупным хромосомам (1,2,3-й и др.), полиплоидии у животных. Смерть наступает на ранних этапах эмбрионального развития. **Сублетальные** - приводят к снижению жизнеспособности организма. Человек, как правило, не доживает до репродуктивного возраста. Например: синдром Дауна, Эдвардса. **Нейтральные** - не оказывают существенного влияния на процессы жизнедеятельности. Например, изменение цвета радужной оболочки, пигментации кожи. **Положительные** - приводят к повышению жизнеспособности организма. Возникают редко, но имеют большое значение для прогрессивной эволюции.

Генеративные мутации. Мутации, которые возникают в половых клетках, называются генеративными. Эти мутации непосредственно не сказываются на здоровье данного человека, но приводят к рождению потомства с наследственными болезнями. Причинами мутаций в генеративных клетках являются те же, вышеуказанные мутагенные факторы, а также различного рода нарушения мейоза и кроссинговера при гаметогенезе.

В зависимости от изменения генотипа половых клеток, а затем зиготы, мутации могут быть **генными, хромосомными и геномными.**

2.2.1. Геномные мутации

Если в результате какого-либо события происходит изменение числа хромосом в кариотипе, то говорят о геномных мутациях. *Геномные мутации* - это мутации обусловленные изменением числа хромосом: полиплоидии и гетероплоидии (анэуплоидии) (рис. 29).

Полиплоидия — увеличение числа хромосом в 2, 3, 4 и т.д. раза в результате добавления полных хромосомных наборов из-за нарушений деления. У полиплоидных организмов отмечается увеличение числа хромосом, кратное гаплоидному набору: 3n - триплоид, 4n - тетраплоид, 5n - пентаплоид, и т.д. У растений полиплоиды жизнеспособны и некоторые обладают повышенной урожайностью (более крупные листья, стебли, корнеплоды, плоды, цветки). Многие культурные растения полиплоидны. Полиплоидные формы известны и у некоторых примитивных животных. Например, у некоторых групп простейших, в частности инфузорий и радиолярии.

Полиплоидия у человека представляет собой летальную мутацию. Например, триплоидия у человека (69 хромосом) является довольно частой спонтанной мутацией набора хромосом в эмбриогенезе. Но большинство таких зародышей погибает на первом месяце развития. До 6-7 месяца развития доживает 1 %, что обычно заканчивается спонтанными абортами. Иногда такие дети (синдром триплоидии - 69, ХХУ) рождаются, но живут только 5-7 дней. Такие дети имеют многочисленные пороки развития: головного мозга, сердца, желудочно-кишечного тракта и др.

2.2.2. Генные мутации

Генные мутации - это изменения в пределах одного гена. Например, вставка или выпадение нуклеотида; замена одного нуклеотида на другой. Генные мутации являются причиной большинства болезней обмена веществ (фенилкетонурия, галактоземия, алкаптонурия, гистидинемия и др.). Генные мутации связаны с нарушением структуры одного гена. При этом изменения связаны обычно только с одним или несколькими

нуклеотидами. Поэтому такие мутации называют еще **точковыми**. Известны следующие точковые мутации: а) транспозиция, б) инсерция, или вставка, в) инверсия, г) дупликация, д) делеция.

- Замена одних азотистых оснований другими (транспозиция).
 - а) пурин → другой пурин = транзиция
 - пиримидин → другой пиримидин = транзиция
 - б) пурин → любой пиримидин = трансверсия
 - пиримидин → любой пурин = трансверсия
- Изменение количества нуклеотидных пар: выпадение (делеция) оснований; включение оснований (дупликация); в результате может возникнуть сдвиг рамки считывания. Пример сдвига рамки считывания:

A	U	G	A	U	G	A	U	G
мет								
A	G	A	U	G	A	U	G	A
арг			нонсенс					

Этот тип мутаций составляет значительную долю спонтанных мутаций. Большое число мутаций по типу вставок происходит вследствие включения в последовательность нуклеотидов мобильных генетических элементов. Часть генных мутаций по типу вставок и выпадений нуклеотидных пар происходит вследствие неравноценного обмена между молекулами ДНК при кроссинговере, то есть при нарушении рекомбинации между ними. В некоторых случаях замена одного основания на другое может привести к появлению одного из нонсенс-триплетов (УАА, УАГ, УГА), не кодирующего никакой аминокислоты. Последствием такой замены будет прерывание синтеза пептидной цепи. Возникают *миссенс* (искажающие смысл) кодоны и *сеймсенс* (не искажающие смысл) кодоны, последние обрывают чтение информации гена (УАГ, УАА и УГА).

- Изменение порядка последовательности нуклеотидов в составе гена (инверсии).
- Разрыв цепей.
- Образование сшивок.

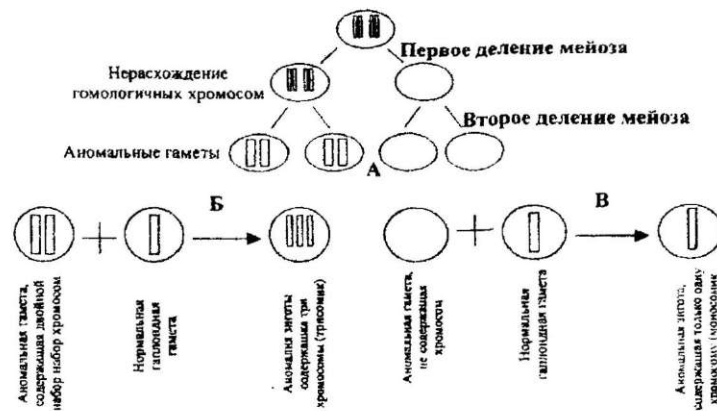


Рис. 29. Схема образования геномных мутаций. А - Образование аномальных гамет в результате нарушения первого деления мейоза. Эта мутация совершенно не опасна для производителей гамет, но представляет опасность для потомков. Б — схема появления трисомика при оплодотворении аномальных гамет. В — схема появления моносомика.

В результате мутаций изменяется рамка считывания генетического кода, что приводит к изменению аминокислотной последовательности синтезируемого белка или вообще к остановке процесса синтеза. Следствием является появление дефектного белка или отсутствие какого-либо фермента, что нарушает клеточный метаболизм, дифференцировку и развитие blastomeres и является причиной возникновения заболевания у потомства. Существуют мутации, которые нарушают репарацию поврежденных участков молекулы ДНК. Примерами таких мутаций является болезнь - *пигментная ксеродерма*. При этой патологии в клетках больных отсутствует фермент дезоксирибонуклеотидфотилиаза, необходимый для репарации ДНК, поврежденной ультрафиолетовыми лучами. Поэтому под воздействием солнечного света появляются веснушки, расширяются капилляры, наблюдается ороговение эпидермиса, повреждение глаз, развитие злокачественных образований кожи.

Аллели, возникшие в результате мутации, которые

определяют появление менее приспособленных особей, но сохраняются в популяции, называются *генетическим грузом*. Выделяют общий генетический груз, присутствующий в геноме человека и выявляемый генетический груз - это та часть неблагоприятных мутаций, которую удастся обнаружить. Частота мутаций и объем генетического груза может увеличиваться под действием ряда факторов современной цивилизации. К этим факторам можно отнести промышленные отходы, радиоактивное заражение среды, выбросы автотранспорта, электромагнитное излучение, ионизирующее излучение, лекарственные препараты, токсические вещества, накапливающиеся в пищевых продуктах при их неправильном хранении и обработке и др. В целях снижения наследственной патологии необходимо внедрять технологии, которые не оказывают мутагенного влияния на окружающую среду. В связи с возрастающим загрязнением окружающей среды потенциальными мутагенами, особое внимание должно уделяться профилактике и пренатальной диагностике.

2.2.3. Хромосомные мутации, или хромосомные aberrации

Хромосомные перестройки (aberrации) - это мутации, обусловленные изменением структуры хромосом. Они могут быть внутривхромосомными и межхромосомными. Внутривхромосомные перестройки связаны с нарушением структуры отдельной хромосомы. Межхромосомные перестройки происходят между негомолотичными хромосомами.

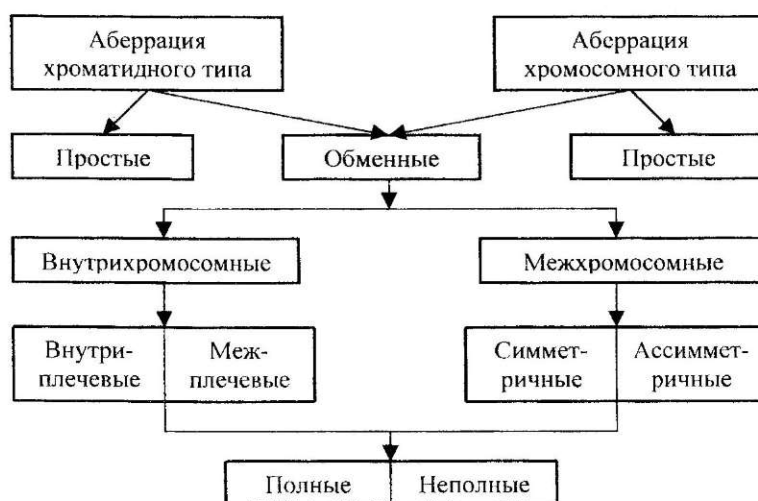
Все хромосомные aberrации, возникающие в соматических клетках человека и регистрируемые на стадии метафазы, разделяют на две основные группы: aberrации хромосомного и хроматидного типа. Среди aberrаций обоих типов различают простые и обменные aberrации (табл. 5). Обменные aberrации разнообразны и по локализации классифицируются на внутривхромосомные и межхромосомные. Внутривхромосомные и межхромосомные могут быть полными и неполными, симметричными и асимметричными.

Аберрации хромосомного типа.

Парные фрагменты – это ацентрические образования, представляющие собой спаренные участки двух хроматид. Внутрихромосомные обмены могут быть как внутривлевыми, так и межвлевыми. Спаренные участки хроматид в форме кольца, не содержащие ацентрические кольца. Кольцевые хромосомы представляют собой замкнутые структуры с обязательным наличием в каждой из них центромеры (рис. 31, 34). Перичентрические инверсии относятся к межвлевым обменам и представляют собой результат инверсии (поворота на 180°) сегмента, содержащего центромеру, с последующим его включением в ту же хромосому и воссоединением разорванных концов (рис. 34). Парацентрические инверсии представляют собой результат инверсии интерстициального участка внутри плеча поврежденной хромосомы (рис.30).

Таблица 5

Общая классификация хромосомных аберраций



Межхромосомные обмены

Межхромосомные обмены встречаются довольно часто.

По характеру перекombинации хромосом среди межхромосомных обменов различают симметричные и асимметричные обмены. *Реципрокные транслокации* – это вид межхромосомных обменов, представляют собой aberrации, возникающие в результате взаимного обмена между двумя хромосомами дистальными ацентрическими участками (рис. 33).

Одним из часто встречающихся видов являются *дицентрические хромосомы*, которые представляют собой aberrации, возникающие в результате обмена между собой двух центрических фрагментов (рис. 32, 33).

Аберрации хроматидного типа.

Конфигурация aberrаций хроматидного типа крайне разнообразна. Они разделяются на простые и обменные.

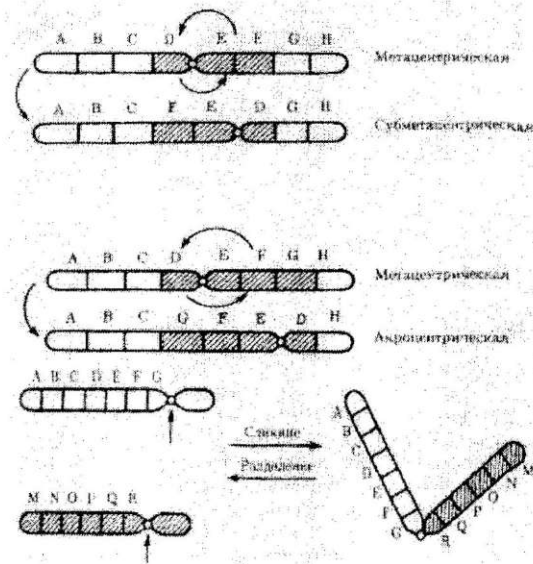


Рис. 30. Изменение формы хромосом в результате перичентрических инверсий. Хромосомные перестройки, связанные с центрическим слиянием или разделением хромосом.

Различают одиночные фрагменты, внутривхромосомные, внутривхроматидные обмены, межхроматидные обмены, внутривхромосомные межплечевые обмены, межхромосомные обмены, хроматино-хроматидные обмены.

ХА в наследственной патологии характеризуются тем, что они более редки, а их генетические проявления менее выражены или не имеют специфических черт по сравнению с аномальными, вызываемыми мутациями количества хромосом. Мутации структуры хромосом обнаружены во всех парах аутосом.

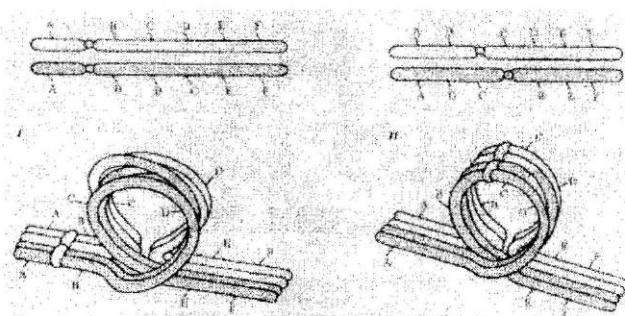


Рис. 31. Конъюгация хромосом при инверсиях;
 I – парацентрическая инверсия в одном из гомологов.
 II – перичентрическая инверсия в одном из гомологов

Делеция.

Например, делеция по 5-й хромосоме – синдром крика кошки; синдром «дупликация-делеция в 3-й хромосоме» выражается в спонтанных абортах. С клинико-цитогенетической точки зрения делеция в одной из гомологичных хромосом означает нехватку участка или частичную моносомию по этому участку, а дупликация – удвоение или частичную трисомию (рис.32).

В случае концевых делеций в обоих плечах хромосомы возникает кольцевая хромосома. У индивида, унаследовавшего кольцевую хромосому от одного из родителей, будет частичная моносомия по двум концевым участкам хромосомы.

Иногда разрыв хромосомы происходит через центромеру. Каждое плечо, разъединенное после репликации, имеет две сестринские хроматиды, соединенные оставшейся частью центромеры. Сестринские хроматиды одного и того же плеча становятся плечами одной хромосомы. Такие хромосомы называются изо-хромосомами.

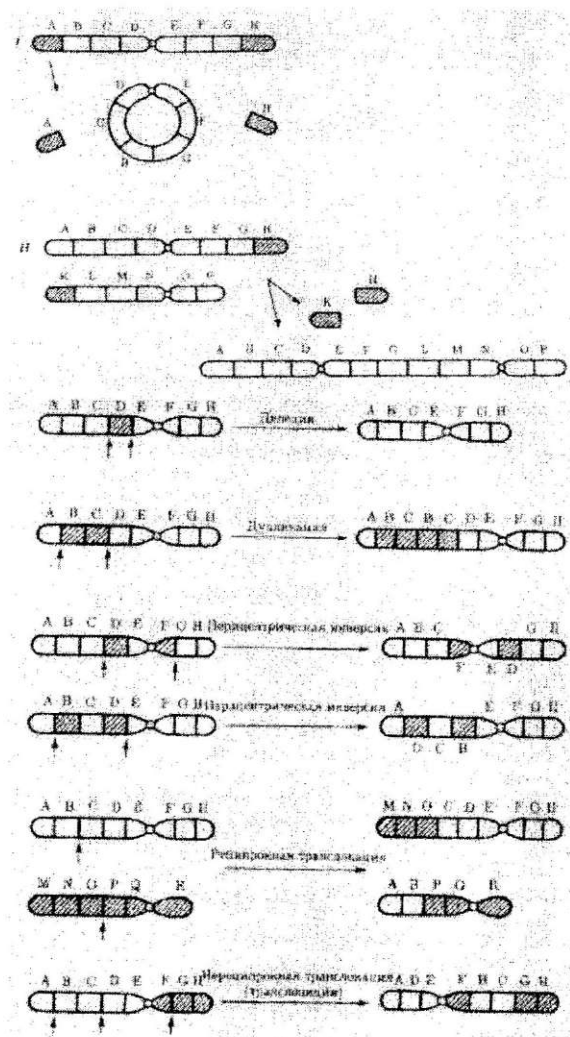


Рис. 32. Виды хромосомных перестроек. Образование кольцевых (I) и полицентрических (II) хромосом

У них одинаковые по набору генов плечи. Наличие их у индивида вызывает хромосомную патологию, так как это одновременно и частичная моносомия (по отсутствующему плечу), и частичная трисомия (по присутствующему плечу).

Транслокация – это обмен частями гомологичной и негомологичной хромосом. Если транслокация является реципрокной (взаимной) без потери участков, вовлеченных в нее хромосом, то она называется *сбалансированной* (рис. 33). Она, как и инверсия, не вызывает патологических эффектов у носителя. Однако в результате кроссинговера и редукции числа хромосом при образовании гамет, у носителей сбалансированных транслокаций и инверсий могут образоваться *несбалансированные* гаметы. Транслокация между двумя акроцентрическими хромосомами с потерей их коротких плеч приводит к образованию одной метацентрической хромосомы вместо двух акроцентрических. Такие транслокации называются *робертсоновскими*. Формально их носители имеют моносомию по коротким плечам двух акроцентрических хромосом. Однако такие носители здоровы, потому что потеря коротких плеч двух акроцентрических хромосом компенсируется работой таких же генов в остальных акроцентрических хромосомах. У носителей робертсоновских транслокаций может образовываться 6 типов гамет, однако нуллисомные гаметы должны приводить к моносомии по аутосомам в зиготе, а такие зиготы не развиваются.

Инверсии заключаются в поворотах на 180° отдельных сегментов хромосомы, высвободившихся в результате двух разрывов. Если инвертированный сегмент не содержит центромеру, инверсию называют *парацентрической*, в противном случае – *перичцентрической*. (рис. 31).

Несмотря на неблагоприятные, как правило, последствия хромосомных мутаций, иногда они оказываются совместимыми с жизнью клетки и организма. Изменения хромосомной организации, чаще всего оказывающие неблагоприятные воздействия на организм, проявляются в виде хромосомных болезней.

Структурные перестройки хромосом половых клеток изменяют генетический баланс и генетические программы развития и функционирования эмбриона. Изменяется характер взаимодействия генов и их функционирования. Это отрицательно сказывается на структуре и функции клеток,

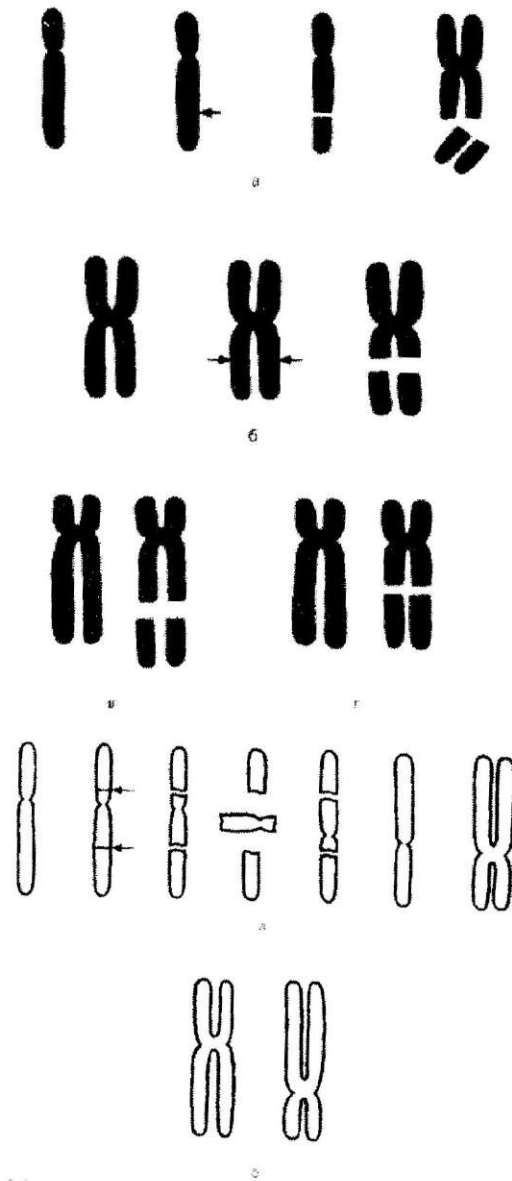


Рис. 33 Происхождение парных (а) и изохроматидных (б) фрагментов. Происхождение перичесентрической инверсии (а); сопоставление «инвертированной» хромосомы с гомологом (б).

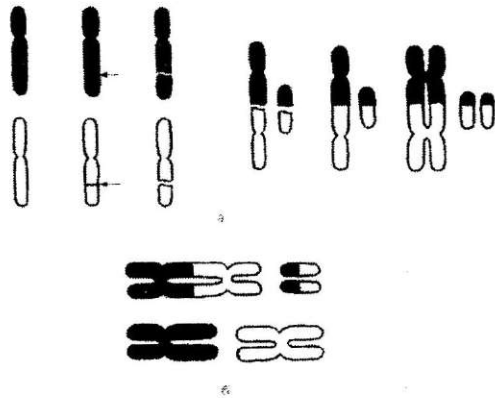


Рис. 34. Происхождение дицентрической хромосомы (а); сопоставление по длине хромосом, вовлеченных в дицентрическую структуру (б).

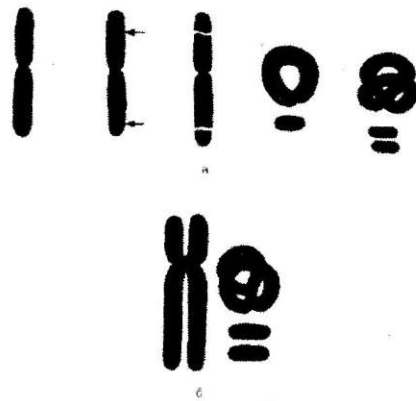


Рис. 35. Происхождение кольцевой хромосомы (а); сопоставление гомологичных хромосом (б).

органов и приводит к серьезными последствиями. Зачастую мутации оказываются несовместимыми с развитием нового организма или обуславливают появление патологий. Однако некоторые перестройки хромосом могут быть полезными для эволюции. Например, у человека 23 пары хромосом, а у современной человекообразной обезьяны 24 пары. Предполагается, что существенным этапом эволюции человека

является робертсоновская транслокация — слияние 12 и 13 хромосомы обезьян и образование второй хромосомы человека, которая почти полностью соответствует по генетическому составу своим предшественникам. В результате этого произошло изменение числа пар хромосом и комбинаций генов, что вероятно, явилось одной из причин появления человека. Остальные хромосомы человека практически сходны с хромосомами шимпанзе, хотя есть некоторые отличия, например, перичентрические инверсии 4, 5, 12, 17 хромосом.

Хромосомные aberrации обнаруживаются цитогенетическим методом под световым микроскопом. У человека известна транслокационная форма болезни Дауна, когда часть 21 хромосомы во время мейоза присоединяется к 15-й и вместе с ней через гаметы попадает в зиготу, где появляются три 21 хромосомы. Крупные хромосомные aberrации в зиготах приводят к тяжелым аномалиям, несовместимым с жизнью или гибели зародышей на начальных стадиях эмбриогенеза.

2.2.4. Рекомбинация наследственного материала в генотипе. Кроссинговер хромосомная теория наследственности

Процессами, приводящими к перекомбинации генов и целых хромосом в половых клетках, являются кроссинговер и расхождение бивалентов в анафазе I мейоза.

Кроссинговер. Этот процесс происходит в профазе I мейоза в то время, когда гомологичные хромосомы тесно сближены в результате конъюгации и образуют биваленты. В ходе кроссинговера осуществляется обмен соответствующими участками между взаимно переплетающимися хроматидами гомологичных хромосом.

Нарушение кроссинговера, приводящее к обмену неравноценными участками ДНК между хроматидами, может привести к утрате или удвоению определенной нуклеотидной последовательности в них. Если это затрагивает структуру отдельного гена, то возможно возникновение генной мутации с изменением количества нуклеотидов в нем. Если при неравноценным обмене затронут участок хроматиды, содержащей несколько генов, изменяется доза этих генов в геноме.

Нарушение расхождения бивалентов в анафазе I мейоза является причиной изменения количества хромосом в гаплоидном наборе гамет. Нарушение структуры генома, заключающиеся в изменении количества отдельных хромосом, называют анеуплоидией.

Структурные изменения генома могут выразиться в ином распределении генов по группам сцепления. Когда отдельные хромосомы соединяются по типу робертсоновской транслокации или, наоборот, из одной хромосомы образуются две самостоятельные, это ведет к изменению числа группы сцепления в геноме (рис. 33). При реципрокных транслокациях между негомологичными хромосомами или при инверсиях изменяется место отдельных генов (эффект положения).

Кроссинговер (рекомбинация генов).

На основании многочисленных опытов Морган сформулировал теорию сцепленного наследования признаков в следующих положениях: а) гены, расположенные в одной хромосоме являются сцепленными и вместе передаются следующим поколениям; б) гены располагаются в хромосомах в линейном порядке; в) каждый ген имеет определенное место в хромосоме; г) в гомологичных хромосомах в тех же локусах располагаются аллели; д) между гомологичными хромосомами может происходить обмен аллельными генами - кроссинговер; е) расстояние между сцепленными генами в хромосоме определяет «силу» сцепления. Близко расположенные гены более «сильно» сцеплены, чем удаленные гены. Поэтому удаленные гены чаще подвергаются кроссинговеру, чем расположенные рядом; д) в отсутствие кроссинговера родительская комбинация сцепленных генов в процессе наследования остается неизменной.

Сцепление генов редко бывает полным. Обычно они могут рекомбинировать во время мейоза с помощью специального молекулярного механизма называемого *кроссинговером*. Этот процесс происходит во время пахины профазы первого мейотического деления гаметогенеза. В разных гаметоцитах кроссинговер происходит в различных участках хромосом, в результате образуется огромное разнообразие комбинаций

родительских аллелей в гаметах. *Кроссинговер* - это процесс обмена соответствующими участками ДНК между несестринскими хроматидами гомологичных хромосом. При этом происходит обмен аллельными генами, что образует их новые комбинации в гомологичных хромосомах. Этот процесс обеспечивает рекомбинацию отцовских и материнских аллелей в группах сцепления. Расхождение гомологичных хромосом в разные клетки приводит к образованию разных по аллельному составу гамет. Случайное расположение хромосом в плоскости клетки и последующее их расхождение в анафазе I обеспечивает рекомбинацию родительских групп сцепления в гаплоидном наборе гамет. Каждая гамета является уникальной в отношении аллельного состава. Разным аллельным составом гамет объясняется то, что потомки никогда полностью не похожи друг на друга или родителей. Хромосомы, образовавшиеся в результате взаимообмена сегментами, известны как *рекомбинантные* хромосомы, а хромосомы, оставшиеся интактными, называются *нерекомбинантными*.

Цитологический механизм кроссинговера. Процесс кроссинговера условно можно разделить на несколько этапов. *Синапсис:* Сближение хромосом во время лептомеры и зигонемы профазы мейоза приводит к тесному контакту гомологичных хромосом между собой по всей длине - этот процесс называется также *конъюгация*. Этот этап приводит к образованию *бивалентов* хромосом, в которых аллельные гены гомологичных хромосом расположены друг против друга. Группа из четырех хроматид двух контактирующих гомологичных хромосом называется *тетрадой*. *Обмен участками.* Во время пахимеры мейоза несестринские хроматиды тетрады частично обвиваются друг вокруг друга. В этом состоянии происходит процесс *кроссинговера* в местах тесного контакта. При этом гомологичные хромосомы обмениваются идентичными участками ДНК, т.е. аллельными генами (рис.36).

Расхождение гомологичных хромосом. Две хроматиды разрываются в области перекреста (*хиазмы*) с помощью ферментов *эндонуклеаз* и вновь соединяются в своей хромосоме в новой комбинации при участии ферментов *лигаз*.

Кроссинговер - очень точный процесс, т.к. гомологичные хромосомы обмениваются абсолютно эквивалентными участками, локусами тех же аллелей. После завершения кроссинговера контактировавшие хроматиды, а затем и хромосомы постепенно расходятся. Процесс завершается во время метафазы полным разделением гомологичных хромосом.

ПРОФАЗА I: ДИАКИНЕЗ

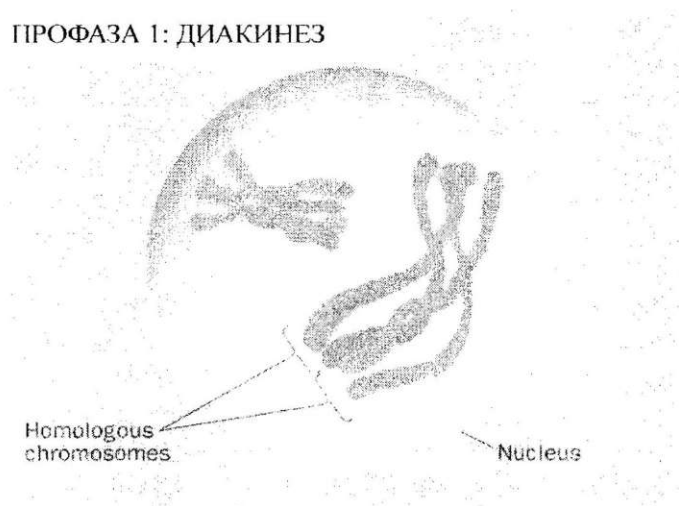


Рис.36 Кроссинговер между гомологичными хромосомами. Отчетливо видны хиазмы.

Молекулярный механизм кроссинговера. В этом процессе участвуют две молекулы ДНК несестринских хроматид (рис36). Суть молекулярного процесса сводится: а) к разрыву двух длинных линейных молекул ДНК в одном или нескольких частях; б) соединению разорванных цепей молекул ДНК соседних хроматид в другом порядке; в) обмену нуклеотидными последовательностями; г) последующему разрыву и восстановлению целостности цепей молекул ДНК. Завершается процесс расхождением хромосом. В результате - цепи контактировавших молекул ДНК имеют измененный состав нуклеотидов.

Кроссинговер как механизм рекомбинации эффективен только в том случае, когда соответствующие гены

гомологичных хромосом представлены разными аллелями. Одинаковые группы сцепления не дают новых сочетаний.

Типы кроссинговера. В зависимости от количества появившихся хиазм, могут быть рассмотрены следующие типы кроссинговера: *Одиночный кроссинговер.* В этом случае образуется только одна хиазма, что ведет к обмену только одним участком ДНК гомологичных хромосом. Это наиболее распространенный тип кроссинговера. *Двойной Кроссинговер.* В этом случае образуются две хиазмы. Они могут появляться как между одними и теми же несестринскими хроматидами, так и между разными несестринскими хроматидами. Этот тип кроссинговера приводит к обмену двумя участками ДНК гомологичных хромосом.

Множественный Кроссинговер. В этом случае образуется более двух хиазм (перекрестов) между несестринскими хроматидами гомологичных хромосом. Далее они могут быть классифицированы как тройные (3 хиазмы), четвертные (4 хиазмы) и т.д.

Определение частоты кроссинговера. Установлено, что вероятность кроссинговера между определенными сцепленными генами зависит от расстояния между ними в хромосоме. Т.Морган установил, что чем дальше расположены в хромосоме, тем более вероятен кроссинговер между их аллелями другой гомологичной хромосомы. Для близких расположенных генов кроссинговер менее вероятен. *Частота кроссинговера* выражается в процентах рекомбинантных генотипов, полученных после анализирующего скрещивания. Эта частота строго пропорциональна расстоянию между сцепленными генами и измеряется в *морганидах*. Одна морганида соответствует одному проценту рекомбинантных гамет или генотипов, полученных при анализирующем скрещивании.

Значение кроссинговера. Кроссинговер — широко распространенное явление. Он происходит практически у всех организмов, размножающихся половым путем. Этот процесс является *молекулярной основой комбинативной изменчивости*. В результате рекомбинации генов могут появляться новые полезные признаки и их сочетания. Поэтому кроссинговер

имеет большое значение для выживания и размножения. Этот процесс также увеличивает генетическое разнообразие потомства, что очень важно для приспособления и эволюции. Определение частоты кроссинговера лежит в основе картирования генов хромосом, т.е. определения места расположения различных генов в хромосоме.

2.2.5. Генетические карты хромосом

Каждая клетка содержит очень много генов (~ 35 000 у человека), но имеет ограниченное количество хромосом (46 у человека). Следовательно, в каждой хромосоме находится множество генов (~ 100-2000 у человека). Так как нуклеотидная последовательность (генетический код) имеет линейную организацию, значит гены в ДНК (в хромосоме) расположены в линейном порядке. Исходя из выше перечисленного и учитывая частоту рекомбинаций при кроссинговере, можно определить месторасположение генов и расстояние между ними. Этот процесс называется *картированием генов*. При гибридологическом анализе он включает следующие этапы; а) сначала устанавливают, какие гены (признаки) являются сцепленными, то есть наследуются совместно через одну хромосому; б) определяют частоту рекомбинантных генотипов (% кроссинговера) при анализирующем скрещивании. Это соответствует расстоянию между двумя сцепленными генами; в) строят модель хромосомы и определяют место (локус) этих генов.

Единицей картирования является **морганида**. Одна единица соответствует 1 % кроссинговера. Например, если 2 сцепленных гена демонстрируют 10 % частоту кроссинговера, то расстояние между ними составляет 10 морганид (10 единиц картирования). Зная локализацию двух генов и расстояние между ними, а так же расстояние третьего по отношению к первому, можно рассчитать локализацию третьего гена и его расстояние от второго. Например, если гены А, В и С сцеплены и расстояние между А и В составляет 10 морганид. Чтобы узнать место гена С в хромосоме, необходимо выяснить, какой процент кроссинговера он дает с обоими из двух уже известных генов.

Например, если с А он дает 3 % рекомбинантных генов, то можно предположить, что ген С находится либо между А и В (рис.37, 1вар.) либо в противоположной стороне, т.е. А расположен между С и В (рис.37, вар.2).

Тогда если В и С дают 7% кроссинговера, то на хромосоме их следует расположить в таком порядке, как на первой схеме. Если же между В и С кроссинговер составляет 13%, то расположение генов в хромосоме должно быть таким, как на второй схеме.

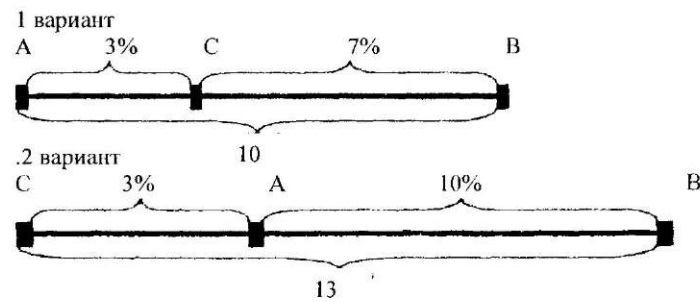


Рис.37 Схема картирования хромосом. Два варианта расположения гена С в хромосоме в зависимости от расстояния между генами - А, В, С.

Методы картирования хромосом человека. Хромосомы человека невозможно картировать традиционными методами анализирующего скрещивания принятыми для других организмов. Для этой цели применяют другие методы. Например, метод *гибридизации соматических клеток* грызунов и человека в культуре ткани. Если изолировать из тела и смещать клетки мыши и человека в культуре, то в результате их слияния можно получить гибридные клетки, содержащие хромосомы одного и другого вида. Клетки мыши имеют 40 хромосом, а клетки человека - 46. Суммарное число хромосом гибридных клеток должно быть 86, но обычно этого не происходит и чаще всего гибридные клетки содержат обычно от 40 до 50 хромосом. Потеря тех или иных хромосом случайна, поэтому разные гибридные клетки имеют разные наборы

хромосом. В гибридных клетках хромосомы функционируют, регулируя синтез соответствующих белков. Под микроскопом каждую из хромосом мыши или человека можно отличить. Можно установить также, какие именно хромосомы человека присутствуют в данном конкретном наборе. Далее изучив белковый состав гибридных клеток, можно установить с какими хромосомами связан их синтез. Так как, гибридные клетки обычно теряют ту или иную хромосому человека целиком, то это даёт возможность определения групп сцепления генов.

В настоящее время для картирования генов хромосом человека используются также другие методы. *Генеалогический метод* - анализ расщепления и сцепления признаков в семьях по родословной. *Биохимические методы* - сравнение аминокислотных последовательностей белков и нуклеотидной последовательности ДНК отдельных хромосом. *Цитологические методы* - сопоставление изменения морфологии хромосомного участка с характерным фенотипом, анализ «ломких» участков хромосом. Благодаря картированию удалось узнать локализацию многих генов в хромосомах человека. Наибольшее число генов - более трехсот удалось изучить в наиболее крупной из аутосом - первой. В X-хромосоме их известно более двухсот. Аллели определяющие группы крови по системе АВО находятся в девятой хромосоме, определяющие группы крови по системе MN - во второй, а аллели системы резус-фактора (Rh) - в первой хромосоме. Определение локализации генов в хромосомах человека имеет большое значение для науки и медицины. Идентифицировано около шести тысяч генов человека, что составляет примерно 16% от общего количества. Однако процесс идентификации идет довольно быстро. В настоящее время уже установлена нуклеотидная последовательность всех хромосом человека.

2.2.6. Хромосомная теория наследственности

Г. Мендель считал, что признаки передаются из поколения в поколение как отдельные дискретные, стабильные единицы наследственности, расположенные в половых клетках. Он

назвал их «*факторами*», а теперь они называются *генами*. Он не знал места расположения этих факторов в клетках, поскольку не было известно существование хромосом. Неизвестна была также роль ядра в процессе размножения. Еще не были открыты процессы митоза и мейоза. Ядро, а потом и хромосомы были открыты только в конце 19 века. В 1902 году Т. Бовери и Д. Сэттон заметили тесную взаимосвязь между менделевским наследованием признаков и поведением хромосом при образовании гамет и оплодотворении. В частности, они отметили:

а) хромосомы встречаются как гомологичные пары. *Мендель считал, что наследственные факторы существуют в парах;*

б) гомологичные хромосомы разделяются при мейозе, так что гаметы получают только одну хромосому из пары. *Мендель считал, что при образовании гамет в каждую попадает только один фактор из пары (закон расщепления);*

в) хромосомы различных гомологичных пар группируются случайным образом при мейозе и распределяются в гаметы независимо от каждой другой пары. *Мендель считал, что факторы каждой пары являются независимыми от каждой другой пары при их распределении в гаметы (закон независимого наследования);*

г) гомологичные хромосомы от двух родителей встречаются вместе в зиготе, в результате слияния мужской и женской гамет, при этом восстанавливается диплоидное число у потомков. *Мендель полагал, что отцовские и материнские факторы смешиваются при оплодотворении;*

д) хромосомы сохраняют свою структуру, индивидуальность и генетический состав на протяжении жизненного цикла индивидуума. *Мендель полагал, что признаки не теряются, даже если они не проявляются.*

Установление соответствия поведения хромосом и факторов Менделя явилось предпосылкой формулирования хромосомной теории наследования признаков. Стало очевидно, что основой для Менделевских законов наследования является наличие генов в хромосомах и их

поведение при мейозе и оплодотворении. Рассматривая вышеуказанное поведение хромосом, А. Вейсман и Д. Сэттон предположили, что именно в них расположены гены, являющиеся единицами наследственности. Так как каждая хромосома имеет гомологичную себе, значит, существует два альтернативных гена (аллельных), по одному в каждой гомологичной хромосоме. Поскольку гомологичные хромосомы разделяются при мейозе (В. Ру) и заново объединяются при оплодотворении (О. Гертвич), очевидно, что аллельные гены ведут себя так же. Таким образом, именно хромосомы несут от родителей к потомкам гены, которые и определяют развитие признаков. Это привело к формулированию *основных положений хромосомной теории наследственности* Т. Бовери и Д. Сэттоном в 1902 году:

а) менделевские факторы или гены расположены в хромосомах, б) в каждой гомологичной хромосоме находится по одному аллельному гену; в) гомологичные хромосомы и вместе с ними аллельные гены разделяются и независимо сортируются в разные гаметы при мейозе; д) гомологичные хромосомы, а с ними и аллельные гены заново объединяются в зиготе во время оплодотворения.

Современные положения хромосомной теории наследования признаков. Теория наследования признаков через хромосомы была окончательно доказана и существенно расширена Т. Морганом (1910 г.) его экспериментами по сцепленному наследованию. В 1933 году Т. Моргану была присуждена Нобелевская премия за экспериментальное доказательство хромосомной теории наследственности. Таким образом, было точно установлено:

- Гены расположены в хромосомах.
- Каждый ген занимает в хромосоме определенное место (локус).
- Каждая гомологичная хромосома содержит по одному аллелю из пары.
- Гены в хромосомах расположены линейно.
- Каждая хромосома представляет собой группу сцепленных генов.

- Число групп сцепления равно гаплоидному числу хромосом.
- Между гомологичными хромосомами может происходить обмен аллельными генами (кроссинговер).
- Комбинация сцепленных генов в соматических клетках остается постоянной на протяжении всей жизни организма.
- Комбинация аллелей сцепленных генов в генеративных клетках может изменяться в процессе мейоза, если имеет место кроссинговер.
- Сила сцепления генов обратно пропорциональна расстоянию между ними.
- Гомологичные хромосомы, а вместе с ними аллельные гены разделяются и независимо сортируются в разные гаметы при мейозе.
- Гомологичные хромосомы, а с ними и аллельные гены объединяются в зиготе во время оплодотворения.
- Открытие хромосомной теории послужило основой бурного развития генетики, биологии развития и раскрытия молекулярных основ жизни.

2.2.7. Конверсия гена

Этапом общего процесса кроссинговера является конверсия гена.

Конверсия гена является биологическим процессом, играющим важную роль и в эволюции живых организмов, и в их онтогенезе.

Помимо того, что конверсия гена участвует в общей (гомологичной) рекомбинации, она является одним из проявлений другого фундаментального генетического процесса – репарации ДНК.

В основе конверсии лежит общий механизм -- исправление (коррекция) неспаренных (некомплементарных) оснований.

Первоначально, со времени ее открытия К. Линдгеном в 1949 г., термин «конверсия гена» применяли только к конкретному явлению-нарушению стандартного менделевского расщепления 2А:2а у грибов аскомицетов.

В настоящее время общепризнаны две модели рекомбинации, приводящие к конверсии. Один из видов конверсии (модель Холлидея) приведена на рис.38.

Из рисунка видно, если в тетраде произошел кроссинговер в участке гена В, то соотношение аллелей генов А и С, внешних по отношению к участку кроссинговера, не изменяется и остается равным 2А:2а и 2С:2с (рис.38), то есть рекомбинация по ним реципрокна.

Напротив, рекомбинация маркеров, попавших непосредственно в участок кроссинговера, т.е. в гетеродуплекс, обычно нереципрокна из-за коррекции неспаренных оснований, внесенных разными аллелями (В и в).

Еще одна важная характеристика конверсии заключается в том, что конверсия может сопровождаться, а может не сопровождаться кроссинговером по внешним маркерам (рис. 38, в, г). Конверсия является этапом общего процесса кроссинговера. Функционирование аппаратов конверсии и кроссинговера связано с особыми уплотнениями в местах контактов ДНК синептонемального комплекса, называемыми рекомбинантными узелками. Они бывают 2-х типов: ранние и поздние. Первые связаны с конверсией, вторые (их в несколько раз меньше) – с кроссинговером.

Конверсия происходит в зиготене или даже лептотене. Роль конверсии заключается в проверке гомологии между хромосомами после их временного синапсиса. В эволюционном плане конверсия имеет прямое отношение и поддержанию стабильности генетического материала.

2.2.8. Причины мутаций

- *Ошибки репликации.* Возникают в случае некомплементарного присоединения азотистых оснований в процессе репликации. Если ошибки не были исправлены ДНК-полимеразой, они передаются следующим поколениям в процессе следующей репликации.
- *Ошибки рекомбинации.* Нарушение точности рекомбинаций участков ДНК при кроссинговере ведет к обмену несоответствующими участками хромосом.

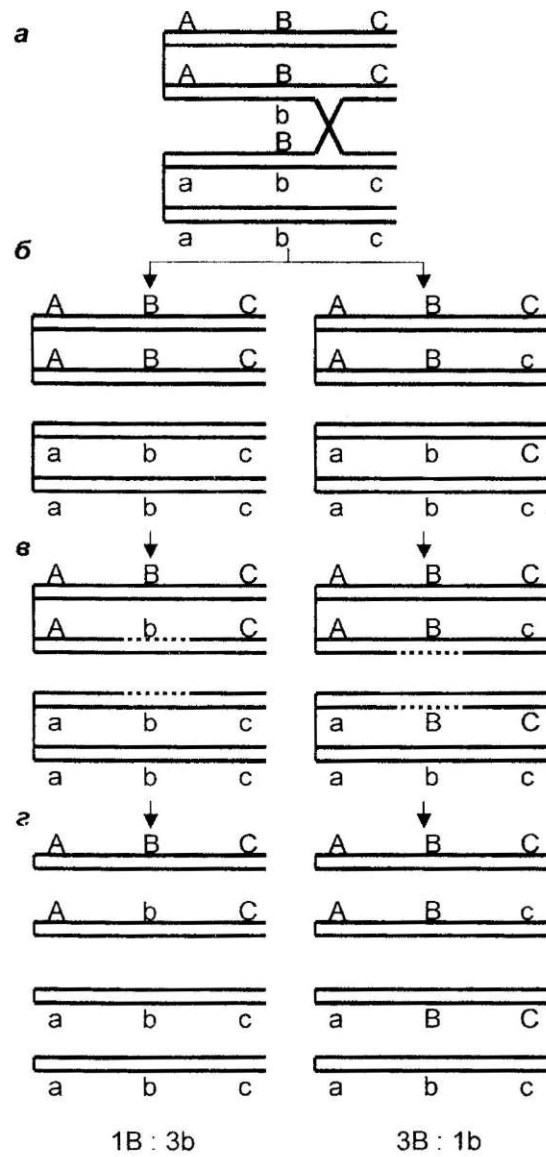


Рис. 38. Упрощенная схема конверсии гена по модели Холлидея. Линии соответствуют цепям ДНК, две параллельные линии - хроматиде.

- *Химические мутагены.* Химические вещества могут изменять структуру ДНК. Например, аналоги азотистых оснований, включаясь в ДНК, могут останавливать репликацию или нарушать комплементарность цепей; формальдегид (НСОН) может «сшивать» между собой ДНК, РНК, белки; гидроксиламин (NH₂ОН) – специфически реагирует с цитозином, а его деративы вместо гуанина связывают аденин; азотистая кислота (HNO₂) окисляет и повреждает азотистые основания ДНК.
- *Физические мутагены.* В частности воздействие радиации или ультрафиолетовое излучение (200-400нм) вызывает образование димеров тимина, что нарушает структуру ДНК. В результате останавливается транскрипция, нарушается репликация. Ионизирующая радиация рентгеновские лучи, гамма лучи нарушают структуру пуриновых оснований и фосфодиэфирные связи ДНК.
- *Биологические мутагены.* Например, вирусы, обладающие способностью встраивать свой ген в ДНК клетки хозяина. Тем самым изменяют исходную структуру генетического материала.
- *Спонтанные изменения* (без видимых причин). Например, спонтанное дезаминирование цитозина и образование при этом урацила приводит к нарушению комплементарности и замены пары оснований на другую.

2.3. Репарация ДНК. Классификация репараций

Репарация (лат. reparatio – восстановление) – способность клеток к исправлению повреждений в молекулах ДНК.

Классификация репараций ДНК по времени осуществления в клеточном цикле. Различают дорепликативную и пострепликативную репарацию.

Дорепликативная репарация – процесс восстановления поврежденной нити ДНК до ее удвоения.

Репликативная репарация. Это совокупность процессов восстановления ДНК в ходе репликации. При этом поврежденный участок удаляется в ходе репликации в зоне роста

цепи. В обеспечении высокой точности репликации большая роль принадлежит механизму самокоррекции, осуществляемому ДНК-полимеразой или тесно связанной с ней ферментом эндонуклеазой. Этот процесс связан с определением ошибочно включенного в цепь нуклеотида, отщепление его и замена на соответствующий. В результате этого частота ошибок снижается в 10 раз (с 10^{-5} до 10^{-6}), рис. 39.

Пострепликативная репарация. Ее механизм точно не изучен. При постреликативной репарации происходит вырезание поврежденного участка и сшивание концов, что изменяет, таким образом ген. При этом клетка может сохранять жизнеспособность и передавать дефектную ДНК дочерним клеткам. Предполагают возможность различных вариантов синтеза ДНК на поврежденной матрице.

По механизмам репарации подразделяются на следующие: *неэксцизионная репарация, эксцизионная репарация, и рекомбинативная репарация.*

Неэксцизионная репарация. Фоторепарация. В результате ультрафиолетового облучения целостность молекул ДНК нарушается, так как в них возникают димеры, т.е. сцепленные между собой соседние пиримидиновые основания. Димеры могут формироваться между двумя тиминами, тимином и цитозином, двумя цитозинами, тимином и урацилом, двумя урацилами. Однако облученные клетки на свету выживают гораздо лучше, чем в темноте. После тщательного анализа причин этого явления установлено, что в поврежденных клетках на свету происходит репарация ДНК (фоторепарация). Она осуществляется специальным ферментом **ДНК-фотолигазой** активирующей квантами видимого света. Фермент соединяется с поврежденной ДНК, разъединяет возникшие в димерах связи и восстанавливает целостность нити ДНК. Фотореактивирующий фермент ДНК-фотолигаза не является видоспецифичным, т.е. действует на разные виды ДНК. В качестве кофермента в нем имеется цианокобаламин (вит B_{12}), поглощающий кванты видимого света и передающей энергию молекуле фермента. На ранних стадиях эволюции живых организмов, когда отсутствовал озоновый экран, задержи-

вающий большую часть потока губительных для организмов солнечных ультрафиолетовых лучей, фоторепарация играла особенно важную роль.



Рис. 39. Путь репарации ДНК. Утраченное основание может быть либо пурином, либо пиримидином

Экцизионная репарация или темновая. Механизм темновой репарации более сложен.

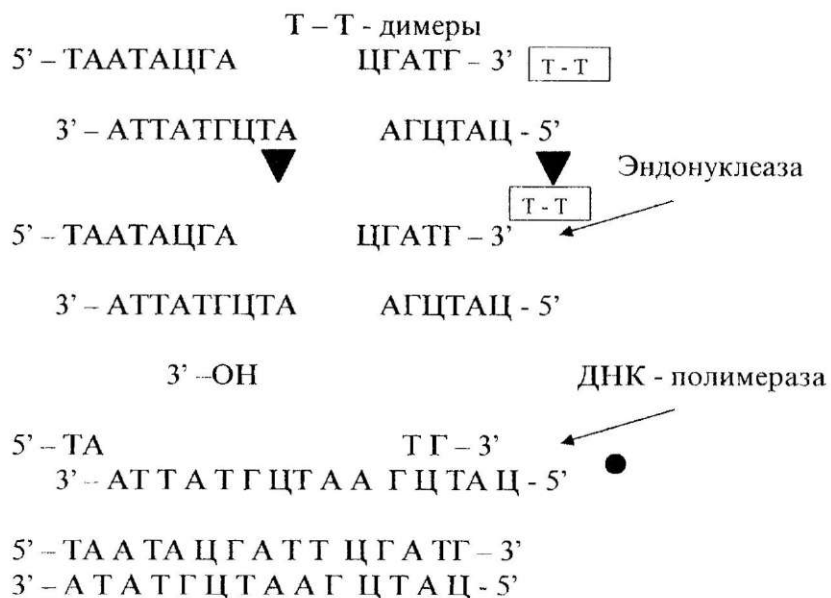


Рис. 40. Схема эксцизионной репарации ДНК по удалению Т-Т димера.

При эксцизионной репарации устраняются повреждения, появившиеся под влиянием ионизирующей радиации, химических веществ и других факторов. Это основной тип репарации, который обнаружен как у прокариот, так и в клетках эукариот.

Механизм эксцизионной (вырезающей) репарации ДНК отличается тем, что не только разрезают димеры (как при световой), но и вырезаются большие участки молекулы ДНК (до нескольких сотен нуклеотидов). Видимо, могут удаляться целые гены, после чего происходит репаративный комплементарный матричный синтез с помощью фермента ДНК-полимеразы, рис. 40.

На основании одной из предложенных моделей установлено пять последовательных этапов эксцизионной репарации: 1) «узнавание» повреждений ДНК эндонуклеазой;

2) действие эндонуклеазы по разрезанию одной цепи молекулы ДНК вблизи повреждения; 3) «вырезание» поврежденного участка и расширение брешки экзонуклеазой; 4) матричный синтез новой цепи ДНК-полимеразой (репаративная репликация); 5) соединение новообразованного участка с нитью ДНК под воздействием фермента ДНК-лигазы.

Рекомбинативная репарация. Если возникшая мутация, например, димеры тимина не устранены до рекомбинации, то они приводят к изменению структуры дочерних ДНК. Однако такие нарушения могут устраняться непосредственно в процессе кроссинговера. Но при этом не происходит устранение димера, он удаляется уже после репликации в процессе рекомбинации молекулы ДНК. Рекомбинативная репарация также состоит из этапов: 1) исходная материнская ДНК имеющая дефект – Т-Т-димер; 2) так как материнская ДНК имеет повреждение одной из цепей (Т-Т-димер), в процессе репликации образуются две дочерние молекулы, одна из которых нормальная, а вторая имеет разрыв, т.к. против Т-Т-димера азотистые основания не присоединяются; 3) в процессе рекомбинативной репарации восстанавливается первая поврежденная цепь ДНК (ликвидируется разрыв) за счет включения в эту часть молекулы неповрежденного участка ДНК из гомологичной хромосомы при кроссинговере; 4) после обмена участками, цепи ДНК рассоединяются. Структура второй цепи восстанавливается путем эксцизионной репарации.

В ходе дорепликативной и пострепликативной репарации восстанавливается большая часть поврежденной структуры ДНК. Однако, если в наследственном материале клетки возникает много повреждений и часть из них не ликвидируется, включается система индуцируемых ферментов репарации (SOS-система).

SOS-ответ клетки.

SOS-ответ представляет собой индуцируемую реализацию клеток на резкую остановку синтеза ДНК, вызванную повреждением ДНК, голоданием клетки или другими факторами.

Механизм SOS-индуцированного мутагенеза заключается в том, чтобы заставить ДНК-полимеразу пройти повреждение

даже ценой ошибки. Однако, как только повреждение пройдено, «мутагенная репарация», восстанавливающая синтез ДНК и спасающая клетку от гибели должна быть прекращена. Данный процесс состоит из 2-х этапов: 1) Pol III вставляет случайное основание напротив поврежденного; 2) комплекс белков помогает полимеразе продолжить синтез ДНК после вставки. С этой целью в районе повреждения на ДНК формируется мультиферментный комплекс, так называемая «мутасома», содержащая белки Umu D', Umu C, Rec A и голофермент Pol III.

2.3.1. Репарация ДНК и канцерогенез

Одним из достижений молекулярной медицины последнего десятилетия явилось доказательство генетической мультифакторной природы рака. По современным представлениям от трех до шести дополнительных генетических повреждений необходимы для завершения процесса начавшейся неоплазии.

Рак – неизбежный спутник долгоживущего организма – вероятность накопления соматической клеткой критического числа мутаций прямо пропорциональна времени жизни.

Большой интерес представляют гены стабилизации ДНК и канцерогенеза.

В настоящее время выделяют 3 группы генов, роль которых в инициации, развитии и поддержании опухолевого статуса клеток представляется очевидной. **Протоонкогены** стимулируют клеточную пролиферацию, а гены-супрессоры, наоборот, ее подавляют. Этот баланс нарушается при превращении протоонкогена в онкоген, или при инактивации гена-супрессора, что и в том, и в другом случае может приводить к неконтролируемому росту клеток.

Гены, активирующие клеточную пролиферацию. Мутации в протоонкогенах – ключевой фактор канцерогенеза. Классический пример – онкоген **ras**, точечные мутации, в котором впервые были обнаружены из карциномы мочевого пузыря.

Гены-супрессоры. Вторая группа генов, которые играют принципиальную роль в канцерогенезе – это гены-супрессоры

опухолевого роста. Список генов-супрессоров, к которым относятся хорошо известные гены p53 и ретинобластомы Rb105, за последние годы существенно пополнился. С большой долей вероятности можно говорить о том, что инактивация генов-супрессоров может быть связана с развитием опухолевого процесса, так как они играют ключевую роль в процессах регуляции клеточного деления.

Ген p53, получивший даже название «**охранника клеточного генома**» является полифункциональным геномом, участвующим во многих процессах, важных для нормального функционирования клеток. Основная функция p53, непосредственно связанная с канцерогенезом и реализуемая при появлении различных нарушений в ДНК, состоит в активации нескольких генов, часть из которых еще не идентифицирована. Результатом этой активности является программируемая гибель клеток (апоптоз) с последующей элиминацией клеток с поврежденным геномом. Во многих опухолевых клетках эта функция гена p53 нарушена и, как следствие, программа регулируемой гибели клеток переключается на программу фактически неограниченного долгожительства, характерного для опухолевых клеток (рис. 28).

Продукт второго из наиболее хорошо изученных генов-супрессоров, гена ретинобластомы (Rb105), присутствует в клетках в гипофосфорилированном состоянии в комплексе с транскрипционным фактором E2F, который в составе этого комплекса неактивен. На разных этапах клеточного цикла Rb105 фосфорилируется, и процесс фосфорилирования-дефосфорилирования этого белка играет ключевую роль в регуляции клеточной пролиферации. В опухолевых клетках фактор E2F может вытесняться из комплекса с белком Rb105 и, тем самым, активировать работу различных клеточных генов. Кроме того, высвобождение E2F нарушает процесс фосфорилирования-дефосфорилирования самого белка Rb105.

Гены стабилизации ДНК – гены, вовлеченные в процесс канцерогенеза, поддерживающие целостность клеточного генома и исправляющие ошибки, возникающие при репликации

ДНК. Главенствующую роль в опухолевом росте играет накопление мутаций в ДНК. Мутации в ДНК могут возникать в результате воздействия химических канцерогенов, индуцирующих модификации в ДНК, различных видов облучения.

Известно, что любая клетка, достигшая возраста физиологического старения (30-50 генераций), перестает размножаться и погибает. При каждом делении клетки происходит укорочение хромосомы на определенное число повторов (TTAGGG), пока размер теломеры не достигнет определенной критической длины порядка 2-3 т.п.н., при которой клетка перестает делиться и погибает. Напомним, что теломеразные последовательности, расположенные на концах ДНК всех хромосом представляют повторяющиеся обогащенные гуанином шестичленные нуклеотидные последовательности типа TTAGGG, общий размер их составляет 12-15 т.п.н. В норме фермент теломераза восстанавливает длину теломеры при каждой генерации.

Теломераза характеризуется рядом уникальных свойств. Во-первых, этот фермент, хотя и обладает ДНК-полимеразной активностью, но существенно отличается от других известных РНК и ДНК-зависимых полимераз. Во-вторых, он представляет собой комплекс из 2-х белковых субъединиц, связанных с РНК-затравкой сравнительно небольшого размера (~ 500 н.), т.е. может функционировать как обратная транскриптаза.

В настоящее время можно с высокой долей вероятности говорить о теломеразе как об уникальном диагностическом маркере, и, что особенно важно, как о маркере ранних стадий злокачественного опухолевого процесса.

Таким образом, гены теломеразного комплекса принадлежат к группе генов, которые определяют общебиологический феномен – сохранение критического размера теломеразной области хромосом.

Гены репарации ДНК отвечают за исправление ошибок при синтезе ДНК, причем ошибок, образующихся в результате неспаренных оснований. Эта система восстановления

неспаренных оснований (mismatch repair system, MRS). Компоненты этой системы узнают нормальные нуклеотиды, которые образуют либо неправильные пары, либо вообще не спарены. В течение следующих трех лет у человека было идентифицировано пять компонентов MRS (картированы на хромосоме 3p, 2q на 7). Неспаренные основания в ДНК могут возникать в результате: 1) прямого повреждения оснований ДНК продуктами клеточного метаболизма; 2) ошибочной подстановки некомплементарного основания ДНК-полимеразой в ходе репликации; 3) рекомбинационной интеграции однонитевого участка ДНК в неабсолютно идентичную ДНК партнера по рекомбинации.

Наследственные нарушения клеточных репаративных систем у человека приводят к тяжелым врожденным аномалиям и/или предрасположению к развитию раковых заболеваний.

Если в клетке, несмотря на осуществляемую репарацию, количество повреждения структуры ДНК остается высоким, в ней блокируются процессы репликации ДНК, нарушается, в конечном счете, синтез белков, ферментов, что ведет к возникновению генных болезней.

Одним из наиболее важных практических приложений в достижении молекулярной генетики является разработка методов ДНК-диагностики, что без преувеличения революционизировало всю систему медико-генетического консультирования. Все методы медико-генетического консультирования могут быть разделены на прямые и косвенные.

2.4. Генная инженерия

Генная инженерия – область молекулярной биологии и генетики, ставящей своей задачей конструирование генетических структур по заранее намеченному плану, создание организмов в новой генетической программой. Возникновение генной инженерии стало возможным благодаря синтезу идей и методов молекулярной биологии, генетики, биохимии и

микробиологии. Основные принципы генной инженерии были разработаны в 60-70-х годах XX века. Они включают три основных этапа: а) получение генетического материала (искусственный синтез или выделение природных генов); б) включение этих генов в автономно реплицирующуюся генетическую структуру (векторную молекулу ДНК), то есть создание рекомбинантной молекулы ДНК; в) введение векторной молекулы (с включением в нее геном) в клетку-реципиент, где она встраивается в хромосомный аппарат.

Экспериментальный перенос генов в другой геном называется *трансгенезом*. Он основан на технологии рекомбинантной ДНК.

В основе генной инженерии лежат различные методы манипуляций с молекулами ДНК.

Получение генетического материала.

В современной генетике применяются два способа синтеза генов вне организма – химический и ферментативный. Для химического синтеза необходимо иметь полностью расшифрованную последовательность нуклеотидов ДНК. Впервые искусственный ген синтезировал индийский ученый Г. Корана (1970). Это был ген аланиновой тРНК дрожжей, состоящей из 77 нуклеотидов. В первых опытах он не проявлял функциональной активности, так как не имел регуляторных участков. В 1976 г. удалось синтезировать ген тирозиновой тРНК бактерии кишечной палочки, состоящей не только из структурного участка (126 нуклеотидных пар), но и регуляторных частей – промотора и терминатора. Этот искусственно созданный ген был введен в бактериальную клетку и функционировал как природный.

Другим примером химического синтеза гена является синтез гена, кодирующего фермент, расщепляющий лактозу. Синтезированный в пробирке ген был встроен в плазмиду и введен в бактерию; кишечная палочка приобрела способность усваивать лактозу. Химическим путем можно синтезировать небольшие по размеру гены прскарриот. Синтез эукариот,

состоящих из тысячи и более нуклеотидов, путем химического синтеза пока не удается.

Ферментативный синтез генов осуществляется с помощью процесса обратной транскрипции. Открытие этого процесса было сделано на онкогенных РНК-содержащих вирусах. Однако в дальнейшем оказалось, что передача генетической информации с иРНК на ДНК может происходить в условиях эксперимента и с другими РНК. Именно это лежит в основе ферментативного синтеза гена; упрощенно это можно представить следующим образом: в пробирке на матрице иРНК с помощью фермента обратной транскриптазы (ревертазы) синтезируется комплиментарная ей нить ДНК, затем образуется двухнитчатая молекула ДНК. после этого иРНК разрушается ферментом рибонуклеазной, полученную ДНК называют ДНК-копией (кДНК) рис.41.

Решение всех проблем стало реальным, когда были открыты ферменты рестриктазы. Эти ферменты, которые можно выделить в очищенном виде из бактериальных клеток, разрезают двойную спираль ДНК по специфическим последовательностям из 4-8 нуклеотидов, разделяя ее на фрагменты строго определенного размера.

Получение библиотеки ДНК с помощью вирусных или плазмидных векторов.

Клонирование того или иного гена начинается с создания библиотеки ДНК в вирусном или плазмидном векторе.

Плазмидные векторы, используемые при клонировании генов, представляют собой небольшие кольцевые молекулы двухцепочечной ДНК, происходящие от более крупных плазмид, обычно присутствующих в клетках бактерий, дрожжей и млекопитающих (рис. 42). Клонирование начинают с того, что очищенные кольцевые молекулы плазмидной ДНК обрабатывают одной из рестриктаз и получают таким путем линейные молекулы ДНК, затем клеточную ДНК, из которой требуется создать библиотеку, разрезают при помощи рестриктазы и полученные рестрикционные фрагменты, включая и те, в которых присутствует клонированный ген,

добавляют к разрезанным плазмидам, а затем подвергают отжигу, для того, чтобы могли образоваться рекомбинантные кольцевые молекулы ДНК.

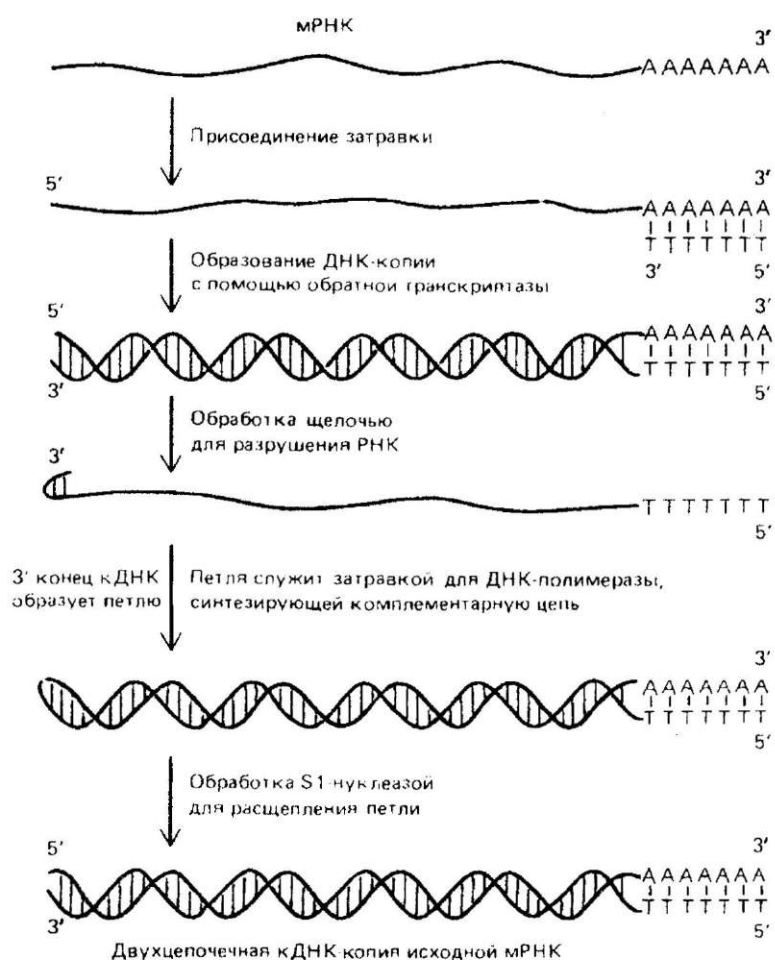


Рис. 41. Синтез кДНК. Обратная транскриптаза синтезирует ДНК-копию молекулы мРНК, образуя гибридную спираль ДНК/РНК.

Следующий шаг к получению библиотеки ДНК состоит в том, что рекомбинантные кольцевые молекулы ДНК вводят в клетки, сделав их для этой цели временно проницаемыми для ДНК.



Рис. 42. Образование рекомбинантной молекулы ДНК, состоящей из плазмиды и встроенной в нее хромосомной ДНК.

Альтернативный метод начинает процесс клонирования с отбора тех последовательностей ДНК, которые транскрибируются в мРНК и, значит, предположительно соответствуют генам. Осуществляется это путем извлечения из клеток мРНК и затем получения комплементарной ДНК-копии (кДНК); эта реакция катализируется обратной транскриптазой. Одноцепочечные молекулы ДНК, синтезированные обратной транскриптазой, превращаются в двухцепочечные молекулы ДНК под действием ДНК-полимеразы, а эти двухцепочечные молекулы включаются в плазмиды и образуют клоны. Каждый полученный таким путем клон называется клоном кДНК, а вся совокупность клонов, происходящих от одного препарата мРНК, составляет библиотеку кДНК.

Клоны геномной ДНК и клоны кДНК существенным образом различаются (рис.43). Клонирование генов на основе библиотек кДНК имеет ряд преимуществ. Первое связано с тем, что многие белки вырабатываются специализированными клетками в очень больших количествах, а значит, в избытке синтезируется и мРНК, кодирующая подобный белок. Другое преимущество клонов кДНК заключается в том, что в них кодирующая нуклеотидная последовательность гена ничем не прерывается (нет интронов).

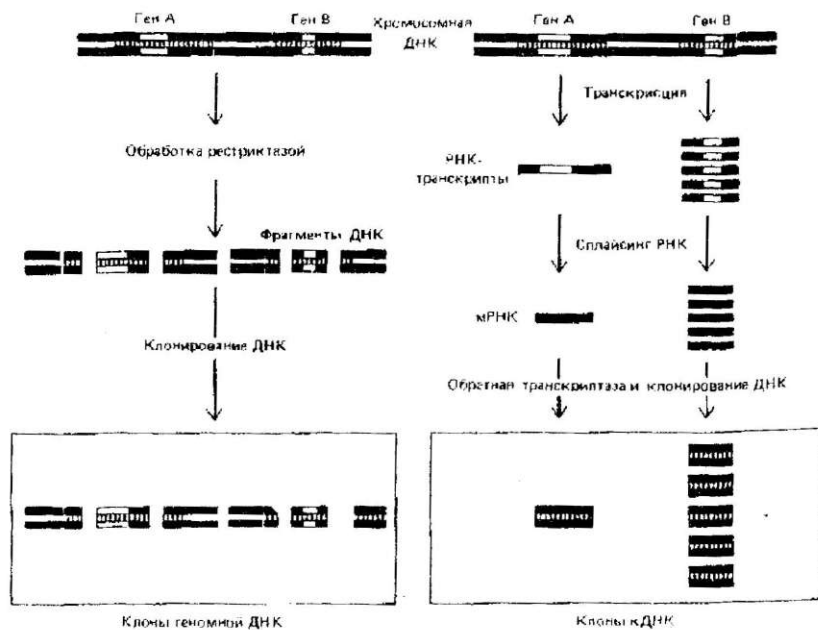


Рис. 43. Схема, иллюстрирующая различия между клонами геномной ДНК и клонами кДНК.

Включение полученного гена в вектор

Вектор – это как молекулярное «такси», способное переносить чужую ДНК внутрь бактериальной клетки, причем чтобы она там могла реплицироваться. Существует два основных типа векторов: бактериальные плазмиды и бактериофаги.

После выделения или синтеза гена следующим этапом является сшивание полученного гена с векторной (направляющей) молекулой ДНК при помощи рестриктаз. Последние распознают чужеродную ДНК, разрезая ее на отдельные участки. Каждая рестриктаза может действовать только на определенную последовательность нуклеотидов – участок опознавания. Комбинируя различные рестриктазы и лигазы, можно разрезать нить ДНК в разных местах и получать рекомбинантные молекулы.

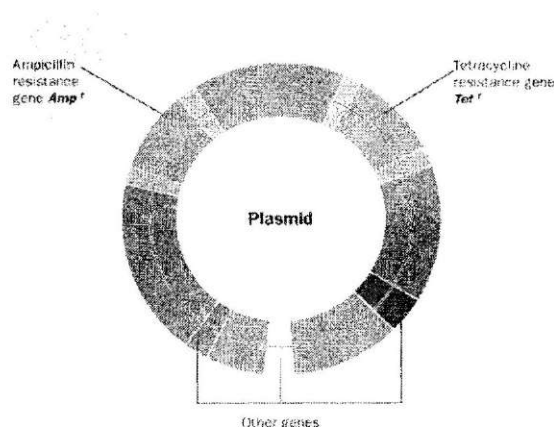


Рис 44. Плазмидный вектор, содержащий ген устойчивости к антибиотику ампицилину.

Встраивание в геном реципиента.

Векторные молекулы, включающие в себя фрагменты чужеродной ДНК, должны обладать свойством, обеспечивающим третий этап генетической инженерии: проникновение в клетку-реципиент и встраивание ее в геном (рис.44). Реципиентные клетки, т.е. клетки, выбранные для клонирования гена, могут быть как про-, так и эукариотическими. Чаще всего для этой цели используют бактерии, поскольку их легко получать в большом количестве. Перенос бактерии может осуществляться из одной бактерии в другую с помощью плазмид. Если в плазмиду встроены другие гены, они передаются в клетку хозяина путем трансдукции и встраиваются в их геном. Где способны к быстрой репликации с помощью ферментативной системы клетки-хозяина. Этот процесс быстрого получения большого количества одинаковых копий называется клонированием. Клон – это большая популяция идентичных молекул, бактерий, клеток, организмов, полученных от одного предка.

- ❖ **Клонирование генов** – это процедура, включающая выделение и амплификацию (дублирование большого количества) отдельных генов в реципиентных клетках

про- и эукариотических. Эти клетки, содержащие нужный нам ген, можно использовать для получения либо а) большого количества белка, кодируемого данным геном, либо б) большого количества самого гена в высокоочищенном виде. Клонирование участков ДНК человека многоэтапный процесс, включающий: 1 – получение определенного гена, 2 – подготовка вектора, 3 – встраивание гена человека в вектор, 4 – введение рекомбинантной ДНК в бактерию, где вместе с плазмидой реплицируется (воспроизводится) ген человека.

Кроме плазмид в качестве вектора используются фаги (фаг лямбда), вирусы, (обезьяний вирус SV₄₀). В случае использования фагов и вирусов перенос генетического материала осуществляется посредством трансдукции. Особым случае трансдукции является перенос чужеродных генов в эукариотические клетки с помощью неонкогенных вирусов и фагов. Впервые предположение, что трансдукция возможна у эукариот, было высказано С.М.Гершензоном в 1966 г. при исследовании на тутовом шелкопряде. Введение бактериям рекомбинантных молекул ДНК дает возможность значительно повысить эффективность производства аминокислот, ферментов, антибиотиков и других продуктов микробиологической промышленности.

2.4.1. Трансгенные организмы

В последние годы американские и европейские фирмы вкладывают громадные средства в исследования по созданию трансгенных животных и растений. Это – домашний скот и культурные растения, несущие чужеродные гены. Например, можно вырастить свинью, которая будет производить то, что нам надо – человеческий интерферон, женское молоко и т.п. для этого лишь надо ввести в организм животного определенный ген или гены, скажем, гены, определяющие синтез наиболее важных белков женского молока. Технология

приблизительно такова. Животное, например свинья, стимулируется половым гормоном, чтобы оно произвело больше яйцеклеток, из фаллопиевых труб извлекают яйцеклетки и затем в них вводится чужеродный ген. Здесь, правда возникают некоторые трудности. Дело в том, что ДНК сама в клетку не проникает, поэтому ее вводят в каждую клетку путем инъекции. Другой способ – обработка яйцеклеток ДНК в комплексе с поликатионами; в таком виде ДНК (гены) могут проникнуть в клетку через поверхностную мембрану. Яйцеклетки с чужеродным геном подсаживаются в суррогатную маму – в фаллопиевы трубы другой свиньи. Там они имплантируются в матку, и в соответствующее время рождаются поросята. Теперь надо установить, кто из них получил чужеродный ген (вероятность «приживания» чужого гена в разных опытах пока низкая). Диагностика простая: по капельке крови или по кончику хвоста определяют, имеется ли этот ген в клетках данного поросенка или его там нет. Из поросят, у которых обнаружен чужой ген, выращивается свинья, которая будет производить «женское молоко», точнее, свиное молоко, но с более необходимыми белками женского молока.

Пионерские работы по адресному расщеплению и изменению гена выполнил в начале 70-х годов Д.Г.Кнорре. Они также базируются на принципе комплиментарности. Если мы имеем ген и знаем его структуру – последовательность четырех сортов оснований, то мы можем синтезировать фрагмент ДНК или РНК, полностью комплиментарный смысловой (кодирующей белок) нити гена, то есть «антисмысловую» ДНК или РНК. Поскольку синтезированный фрагмент ДНК или РНК достаточно протяженный, достигается его абсолютная специфичность: фрагмент прилипнет именно к тому гену или к тому участку гена, какой мы выбрали – на нем как бы написан адрес доставки. Так, уже само по себе может происходить блокирование смысловой нити гена или производимой им РНК. А если этот синтезированный фрагмент несет на себе пришитую химическую группу, разрушающую цепь ДНК (гена) в месте контакта или модифицирующую ее, - ген будет инактивирован.

Поэтому такой подход называют «адресованной» инактивацией или адресованной модификацией гена.

Что касается проблемы *генной диагностики*. Обычно молекулярная диагностика проводится по белкам, как правило, с помощью других белков – антител. Недостатки такой диагностики – обнаружение болезни на поздней стадии, когда уже появились чужеродные белки, а также невысокая чувствительность метода. Но теперь можно диагностировать и по генам (ДНК), и по синтезированным на них РНК еще до того, как в организме начали синтезироваться и накапливаться чужеродные белки. Эта генная диагностика, основанная на принципе комплементарности, использует главным образом два современных технических подхода: гибридизацию искомого гена с комплементарными ДНК- или РНК-зондами и амплификацию гибридизирующихся ДНК- или РНК-зондов с помощью специальных ферментных систем репликации.

Предположим, нам необходимо узнать, сидит ли в организме пациента какой-то онкоген (ген, вызывающий рак) либо вирус, не выявляемые ни биологическими, ни биохимическими тестами, потому что до поры до времени они не работают. Мы синтезируем фрагмент ДНК или РНК (зонд), комплементарный к искомому онкогену или вирусному гену, и если он связывается с исследуемой ДНК, выделенной из клетки пациента по комплементарному принципу, то есть гибридизируется, это означает, что в организме обнаружен интересующий нас вредный ген. Иногда приходится вести обнаружение единичных молекул чужеродных генов на фоне всего генетического материала клетки. В этом случае на помощь приходят все ферментативные способы амплификации ДНК или РНК. Например, если гибридизируется хотя бы одна молекула, гибрид можно задержать на определенном фильтре. Потом гибрид обрабатывают ферментом, который его амплифицирует и дает, скажем, 10^{12} идентичных молекул. По этой колонии молекул можно точно определить: здесь была молекула искомого ДНК, то есть найден интересующий нас ген. Эта ультрачувствительная диагностика сейчас входит в практику. По-видимому, за такой диагностикой будущее, поскольку она ранняя и сравнительно дешевая.

2.4.2. Основные направления генной инженерии

Прежде всего, наука и техника располагают громадным арсеналом методов, позволяющих выделять в чистом виде любые индивидуальные гены любых живых организмов, включая человека. С выделенными генами возможны манипуляции, называемые «генной кройкой-шитьем». Это значит, что ген можно разрезать в любом намеченном месте, а фрагменты – сшить, можно их рекомбинировать в нужной последовательности, сшивать разные гены и один и получать слитые гены и т.д.

Существуют методы синтеза новых генов, как химические, так и с помощью специальных ферментов. Можно «изобрести» совсем новый белок и, исходя из плана его структуры, синтезировать для него ген. В любой существующий ген можно ввести локальные изменения – точечные мутации, пропуски, вставки и таким образом менять его смысл. Широко вошла в практику полимеразная цепная реакция, в процессе которой происходит экспоненциальное размножение генов. Имея всего одну молекулу, за обозримое время можно сделать препаративное количество данного вещества, то есть данного гена. И, наконец, можно клонировать разнообразные варианты генов, в том числе и полученные с ошибками, и синтезировать разные варианты одного и того же гена. И все эти генетические изменения и новшества можно вносить в живой организм.

Ныне бурно развивается генноинженерное производство белков, антител, иммуностимуляторов, в первую очередь с помощью трансгенных микроорганизмов, то есть обычных микроорганизмов, в которые введены соответствующие человеческие гены. Всем известный факт – человеческий интерферон продуцируется бактериями. Необходимый сыроваренной промышленности тимозин сейчас продуцируется дрожжами. Прежде его получали только из сычуга теленка, но это слишком дорого и не столь доступно для современного массового производства. Теперь ген телячьего тимозина вводится в дрожжи, дрожжи культивируются и из них выделяется телячий тимозин.

Однако в генной инженерии использование бактерий

представляет ряд неудобств и постепенно начинает уступать место другим технологиям. Бактерии надо выращивать, потом выделять, разрушать, фракционировать, отделять требуемый белок от массы других белков бактерии, тщательно его чистить. Проще ввести, например, ген человеческого интерферона козе, поставив его под контроль регуляторов белков козьего молока, то есть интерферон будет производиться в молоке. Козье молоко створаживается, творог идет в сыр, а из сыворотки легко выделяется человеческий интерферон. Трансгенные животные и высшие растения все больше используются для производства пищевых белков высокого качества и сывороток, причем человеческих.

Широко субсидируемые проекты – создание трансгенных растений, устойчивых к гербицидам, паразитам и грибковым заболеваниям. Создан горох, устойчивый к жуку-долгоносику. В горох был введен ген из бактерии *Bacillus thuringiensis* – организма, продуцирующего специальный белок, который убивает насекомое. Присутствие этого бактериального гена в горохе делает его непоедаемым жуком-долгоносиком.

Бельгийцы пытаются выйти на европейский рынок с капустой, устойчивой к различным гербицидам. Поле с такой капустой можно поливать любыми гербицидами: все сорняки погибают, а капуста растет. Дания выступила против распространения на европейском рынке этой капусты, поскольку устойчивая ко всем ядам против сорняков, она сама может стать злостнейшим сорняком. А значит, потребуются новые средства для борьбы с этой капустой.

1992-й можно считать годом рождения генной терапии. В том году в США была сделана уникальная операция женщине из Канады, которая в 16 лет перенесла инфаркт, в 26 лет – операцию на сердце, но продолжала болеть. У нее оказался дефектный ген, который ответственен за выработку в печени белка-рецептора, адсорбирующего липопротеиды низкой плотности. Последние ответственны за сужение сосудов. Женщина должна была умереть. Ей сделали следующую операцию: отрезали часть печени, разгомогенизировали ее, в полученные клетки *ex vivo* (вне организма) с помощью трансфекции ввели ген (ДНК), кодирующий нормальный белок-

рецептор. Затем эти трансформированные клетки инфузирова­ли в печень пациентки. Часть их прижилась, стала адсорбировать липопротеиды низкой плотности из крови, и женщина выздоровела. Это один из ярких примеров возможностей генной терапии.

Разрабатываются методы механической доставки генов *in vivo*. Такой подход, в частности, планируется для лечения сужения кровеносных сосудов. Если артериальный сосуд сильно сужается, то обычно делают операцию и ставят шунт. Предлагается заменить хирургическую операцию на генноинженерную. Существует белок – сосудистый эндотелиальный фактор роста, способствующий росту сосудов. Баллончик, пропитанный генами этого фактора, вводят в кровеносный сосуд к месту его сужения, гены диффундируют в окружающие клетки, и начинается рост обводных сосудов. Насколько я знаю, этот метод, однако, еще не реализован на людях.

Не имея возможности более детально останавливаться на генной терапии, перечислю основные проблемы, разработкой которых сейчас занято научное сообщество передовых стран мира.

Доставка генов к клеткам-мишеням организма. Сюда относится обработка временно извлеченных из организма клеток *ex vivo* и механическая доставка *in vivo*. Кроме того, активно разрабатываются способы стабилизации нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) для их инъекции в кровяное русло или перорального применения.

Доставка нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) внутрь клеток. Микроинъекции генов в индивидуальные клетки. Введение генов в клетки с помощью непатогенных вирусов (трансфекция) и придание проницаемости для проникновения генов через клеточную мембрану с помощью поликатионов. Мембранный барьер клеток может быть преодолен с помощью липидных микроконтейнеров (липосом) для доставки гена в клетку, а также путем использования специальным образом химически модифицированных ДНК и РНК.

Блокировка или разрушение вредного гена либо

блокировка продуцируемой им РНК с помощью антисмысловых ДНК и РНК. Это направление работ обещает стать одной из главных стратегических линий в борьбе в раковыми и вирусными заболеваниями

Введение нового активного гена или регулятора активности гена. Лечение наследственных болезней целиком зависит от прогресса этого направления. Сюда же относится разработка подходов к введению в организм генов, кодирующих иммуногенные белки, то есть белки, на которые вырабатываются антитела против инфекционных агентов – вирусов, бактерий, грибов.

Введение генов или комплексов генов, блокирующих клеточное деление или вызывающих клеточную смерть (апоптоз) как средство кардинальной раковой терапии.

По прогнозам американцев, уровень мировых доходов рынка генотерапии к 2005 г. достигнет более 2,6 млрд. долл. Предполагается, что около 50% рыночных доходов будет получено от генной терапии рака, около 30% - от лечения генетических заболеваний и около 10% - от лечения вирусных инфекций, в том числе СПИДа.

2.4.3. Генная терапия человека

Генная терапия (ГТ) представляет собой подход к лечению, основанный на введении в организм больного генетических конструкций. Лечебный эффект достигается либо в результате экспрессии введенного гена, либо за счет частичного или полного подавления функции «больного» или сверхэкспрессирующегося гена. ГТ получает все большее распространение, и ее по праву считают медициной 21-го столетия.

ГТ может быть условно разделена на позитивную и негативную. Позитивная ГТ – основная часть ГТ, базирующаяся на введении в клетки гена, кодирующего белковый продукт, необходимый для достижения лечебного эффекта. Негативная ГТ предполагает подавление функции «больного» или же избыточного экспрессирующегося гена.

Можно также выделить корректирующую ГТ (исправление структуры «больного» гена).

Среди способов направленного введения генетических конструкций наиболее распространены:

а) Прямая инъекция генетического материала – введение плазмидной ДНК в растворе непосредственно в ткань. Область использования данного метода ограничена кожей, тимусом и поперечно-полосатыми мышцами, некоторыми солидными опухолями, причем длительная экспрессия трансгена обнаружена только в мышечной ткани. Эффективность этого процесса доставки рекомбинантной ДНК очень низка (менее 1%), но достаточна, например, для генетической иммунизации.

б) Баллистическая трансфекция, основанная на обстреле органа и ткани микрочастицами тяжелых металлов (золото, вольфрам), покрытыми плазмидной ДНК, проходящими через клеточные слои и переносящими генетическую конструкцию непосредственно в ядра клеток. Глубина проникновения микрочастиц, как правило, не велика – доли миллиметра, поэтому метод обычно используют для трансфекции клеток кожи или подлежащего хряща. Однако при использовании специально разработанных условий обстрела микрочастицы проникают в ткань на глубину до 4 мм и могут применяться для введения гена в волокна поперечно-полосатых мышц.

в) Введение генетического материала в кровеносные сосуды, питающие трансфицируемый орган. Этот подход, в первую очередь, разработан в отношении печени.

г) Введение генетического материала в почку путем инъекций в кровеносные сосуды, в почечную паренхиму и мочевыводящие пути.

д) Аэрозольное введение в дыхательные пути. Этот способ пытаются применять для ГТ легочной формы муковисцидоза.

Потенциальные возможности ГТ для лечения опухолей.

Большая часть геннотерапевтических протоколов относится к лечению опухолей.

Усиление иммуногенности опухоли при помощи цитокинов и других иммуномодуляторов.

Генетическая модификация клеток иммунной системы для усиления их противоопухолевой активности.

Введение в опухоль генов чувствительности к химиотерапевтическим препаратам («генов самоубийства»).

Блокирование экспрессии онкогенов (например, при помощи бессмысленных конструкций или внутриклеточных антител).

Введение в раковые клетки гена-супрессора опухолевого роста, например, гена белка p53 дикого типа.

Защита нормальных тканей от системного токсического действия химиотерапевтических препаратов (например, введение в стволовые клетки костного мозга гена множественной лекарственной устойчивости).

Повышение устойчивости к облучению нормальных тканей, находящихся рядом с опухолью, за счет сверхэкспрессии в них антиоксидантов (например, глутатионсинтетазы или трансферазы).

2.4.4. Биотехнология

Новый импульс биотехнология получила в середине 70-х годов благодаря появлению такой отрасли, как генетическая инженерия. Началом промышленной генной инженерии принято считать 1980 год, когда в США был выдан первый патент на генно-инженерный штамм микроорганизма, способного разлагать нефть. К настоящему времени в области генной инженерии зарегистрировано около 600 патентов, что отражает интенсивность ее развития. Внедрение в производство разработок генной инженерии потребовало переоснащения биотехнологических производств и повышения профессионального уровня обслуживающего персонала. Первая генно-инженерная продукция была получена в Японии. Первый коммерческий продукт – человеческий инсулин, продуцируемый бактерией, был разрешен для клинического использования в 1982 году. Примерно к тому же времени относится энергичное развитие клеточной инженерии. Микробный продуцент был пополнен новым источником

получения полезных веществ – культурой изолированных клеток и тканей растений и животных. На этой основе были созданы новые приемы биотехнологии, а также разработаны принципиально новые методы селекции эукариот. Особенно больших успехов удалось достичь в области микроклонального размножения растений, а также получения и использования трансгенных растений и животных.

Прикладная микробиология. Условно микробные производства можно разделить на три типа:

основанные на использовании живой или инактивированной биомассы микроорганизмов; сюда относится производство пекарских, винных и кормовых дрожжей, вакцин, белково-витаминных концентратов (БВК), средств защиты растений, заквасок для получения кисломолочных продуктов и силосования кормов, почвоудобренных препаратов;

производящие продукты микробного биосинтеза, к числу которых относятся антибиотики, гормоны, ферменты, аминокислоты, витамины;

производства, основанные на получении продуктов брожения, гниения, например утилизация целлюлозы и различных отходов с целью получения углеводов, биогаза, биоэтанола. Сюда же относятся получение спиртов, органических кислот, растворителей, а также биотехнология утилизации неприродных соединений.

К числу важных практических достижений генной инженерии необходимо отнести выделение, клонирование и получение диагностических препаратов. Сегодня уже более 200 новых диагностикумов введены в медицинскую практику, разработаны способы диагностики такого опасного заболевания, как СПИД. Широко применяются методы генной диагностики, то есть выявления дефектных генов, включая пренатальную диагностику.

Известно, что проблемы охраны здоровья человека в значительной степени зависят от обеспечения необходимыми медикаментами. Биотехнология предлагает новые подходы к разработке и производству лекарственных, профилактических

и диагностических медицинских препаратов, а также позволяет производить в достаточных количествах широкий спектр лекарственных средств, которые ранее были малодоступны. Биотехнологические медицинские препараты по объему продаж в настоящее время составляют более 5% общего мирового рынка, а к 2005 году достигнут более 15%. Среди примерно 50 новых видов лекарств, вакцин и диагностикумов, появляющихся на рынке ежегодно, 10 – 15 получены с помощью биотехнологических методов, в стадии клинического изучения находится более 350 новых биопрепаратов, причем большинство из них предназначены для лечения болезней, которые считаются неизлечимыми. По производству биотехнологических медицинских препаратов на первом месте стоит Северная Америка – 63%, в странах Западной Европы производится 25%, в Японии – 7%.

К самому большому классу лекарств, получаемых путем микробного синтеза, относятся антибиотики. По разнообразию и показаниям к применению они занимают первое место среди продукции мировой фармацевтической промышленности. Сегодня известно более 6000 видов антибиотиков, более 100 из которых находят применение в медицинской практике, в том числе при лечении таких тяжелых заболеваний, как туберкулез, менингит, плеврит, пневмония. Отдельные антибиотики применяют при лечении онкозаболеваний. Объем мирового рынка антибиотиков увеличивается в последнее время на 10 – 12% в год и составляет более 23 млрд. долларов.

Второй класс лекарственных веществ, производимых биотехнологическим путем, - гормоны. К традиционным микробиологическим продуктам относятся стероидные гормоны – кортизон, преднизолон, которые широко применяются при лечении различных аллергических заболеваний, в том числе такого тяжелого, как бронхиальная астма, а также ревматоидного артрита и других недугов. Спектр гормональных препаратов, производимых путем микробного синтеза, значительно пополнился за счет пептидных гормонов, представляющих генно-инженерные продукты. Следует отметить такие противовирусные, антиопухолевые и

иммуномодулирующие агенты, как интерфероны и интерлейкины.

Среди лекарственных средств особое место занимают ферменты. Так, известно применение протеолитических ферментов при лечении заболеваний пищеварительных органов. Эти же ферменты используют при лечении ожоговых поражений и различных ран для удаления некротических тканей. При лечении патологий обмена веществ применяют также липазы. Протеиназы с фибринолитическим действием используют для растворения тромбов. С помощью таких препаратов, как стрептокиназа и урокиназа, лечат тромбоз коронарных сосудов сердца, легких, конечностей.

Крупным достижением современной биотехнологии стала возможность получения рекомбинативного гормона роста (соматрем, генотропин, биосома), что позволило отказаться от препаратов гормона роста, получаемых из гипофизов умерших людей.

Генно-инженерным методом синтезированы гипоталамический высвобождающий, или рилизинг-фактор секреции гормона роста – соматолиберин, гексарелин, а также гуморальный посредник действия гормона роста соматомедин С. создан препарат – рекомбинантный антагонист гормона роста – соматрем, используемый при лечении ряда болезней (панкреатит, язвенная болезнь желудка и др.).

Ген гормона роста удалось ввести в миоциты, которые начинали продуцировать этот гормон.

Важный вклад микробной биотехнологии в медицину состоит в получении профилактических препаратов, причем этот вид продукции не имеет дублера в химической промышленности. В развитых странах, где профилактическая служба находится на должном уровне, смертность от инфекционных заболеваний составляет всего 4 – 8 против 30 – 50% в развивающихся странах. Вакцина против оспы позволила полностью искоренить эту болезнь. В 1955 году в США и Канаде полиомиелитом заболели 200 человек на 1 млн. населения. В настоящее время распространенность этого заболевания снизилась в 4000 раз (1 человек на 20 млн. населения). Также

быстро снизилась заболеваемость корью, краснухой, дифтерией после введения соответствующих вакцин в практику.

Благодаря иммунобиологическим препаратам (ИБП) ликвидирована натуральная оспа, резко снижена заболеваемость полиомиелитом, корью, коклюшем, столбняком, дифтерией и др. болезнями. Однако мир микробов, патогенных для человека, расширяется, появляются новые, так называемые эмерджентные болезни: ВИЧ, вирусные гепатиты, Т-клеточный лейкоз, прионные болезни.

В настоящее время разработано и используется в практике более 1000 ИБП.

ИБП можно разделить на 5 больших групп: 1) вакцины и другие микробные профилактические и лечебные препараты; 2) препараты на основе антител (иммуноглобулины); 3) иммуномодуляторы; 4) адьюванты; 5) диагностические препараты.

Созданы синтетические вакцины – гриппозная, чумная. В перспективе – получение синтетических вакцин против детских инфекций, ВИЧ-вакцины, вакцины против малярии, сифилиса и др.

На основе вирус-вакцин уже получены векторные вакцины против гепатита В, клещевого энцефалита, ВИЧ-инфекций, появилась перспектива создания холерной, брюшнотифозной и др. вакцин.

Хорошо известно профилактическое действие интерферонов (генноинженерный препарат реаферон), интерлейкинов.

Большие перспективы в получении новых вакцин открывает генная инженерия. При этом необходимый защитный антиген можно получить с помощью непатогенного микроорганизма и, таким образом, избежать опасностей, связанных с токсичностью обычных вакцин.

По прогнозам, к 2050 году население Земли возрастет до 10 млрд. человек и для обеспечения его потребности в продукции сельского хозяйства нужно будет увеличить объемы производства на 75%. Анализ проблемы обеспечения человека продовольствием специалистами разных стран показал, что в

основном она заключается в недостатке белка животного происхождения, который по аминокислотному составу более богат, чем растительный белок. Промышленная микробиология поставляет животноводству по крайней мере три вида важных веществ: кормовой белок или белково-витаминные концентраты (БВК), незаменимые аминокислоты и кормовые антибиотики.

Важнейшим видом биотехнологической продукции являются незаменимые аминокислоты, производство которых для медицины и сельского хозяйства интенсивно развивается во всем мире. Среди них, такие как лизин и метионин, обязательно должны содержаться в готовом виде в пище человека и кормах животных. Метионин производят с помощью химической технологии, а лизин – в основном биотехнологически. Внесение в корма лизина высвобождает фураж и увеличивает объем мясной продукции: на 1 т лизина высвобождается 40-50 т фуражного зерна и получается дополнительно более 10 т мяса.

В дополнение к сказанному необходимо отметить, что так называемая биологическая система животноводства и растениеводства приобретает все большую популярность. В настоящее время в разных странах производят более 100 видов биопрепаратов, применяемых в растениеводстве, в том числе энтомопатогенные препараты: энтобактерин, инсектин, токсобактерин, боверин, вирин, а также гербициды, фунгициды, бактериальные удобрения: нитрагин, азотобактерин фосфоробактерин. Использование биологических средств защиты растений, стимуляторов роста животных и растений, микробных удобрений позволяет снизить дозы применяемых химических средств защиты и минеральных удобрений, что приводит к повышению качества продукции и созданию экологически чистых технологий.

Методы генной инженерии позволяют добиться улучшения свойств сельскохозяйственных растений путем создания так называемых трансгенных растений, то есть таких, которые несут чужеродные гены. Внедрение генов в растения осуществляется с помощью Ti-плазмид, выделенных из агробактерий, которые

при естественном развитии в природе переносят в зараженное растение часть собственных генов, а их продукты вызывают трансформацию, перерождение растительных тканей и образование наростов, так называемых корончатых галлов. Именно эти гены были модифицированы и с помощью агробактерий перенесены в растения. В настоящее время получено более 50 видов трансгенных растений, которые приобрели устойчивость к насекомым-вредителям, фитопатогенным бактериям, микромицетам и вирусам, к повреждениям при хранении, а также растений, синтезирующих гормоны, привлекающие полезных насекомых.

Еще одно направление повышения урожайности растений связано с использованием бактерий, фиксирующих атмосферный азот. Известно, что с помощью азотфиксирующих бактерий ежегодно около $17,5 \cdot 10^7$ т молекулярного азота атмосферы превращается в органические соединения. Фиксацию азота обеспечивают ферменты – продукты *nif*-генов. В настоящее время практически решена проблема увеличения дозы *nif*-генов у клубеньковых бактерий рода *Rhizobium*. Большинство генов, контролирующих способность этих бактерий к симбиозу с бобовыми растениями, локализуется на плаزمиде. Это расширяет возможности использования методов генной инженерии злаковых растений азотфиксаторов.

По оценкам экспертов, в ближайшие годы биотехнология обеспечит прирост сельскохозяйственной продукции на 15-20%. Биосистемы получения энергии в таких странах, как США, Канада, и составят основу энергетики в Бразилии, Китае, Индии, на Филиппинах.

Природоохранные технологии уже сегодня позволяют эффективно очищать сточные воды химических производств и проводить биоремедиацию земель и акваторий, залитых нефтью. Здравоохранение получит эффективные противоопухолевые препараты, вакцины нового поколения, а также методы диагностики генетических заболеваний. Важно отметить, что биотехнологическая промышленность относится к самым наукоемким отраслям мира.

2.5. Экологическая генетика

Экологическая генетика человека изучает влияние факторов среды обитания на наследственность и изменчивость. Факторы окружающей среды оказывают два типа эффектов: а) изменение проявления определенных аллелей; б) изменение генетического материала у индивида и в популяциях.

Эффекты первого типа у человека проявляются на индивидуальном уровне в виде патологий, а на популяционном уровне - в виде худшей приспособляемости. Патологические проявления аллелей при действии факторов среды называются *экогенетическими болезнями*.

Эффекты второго типа индуцированы мутациями и отбором. Оба эти процесса ведут к повышению темпов наследственной изменчивости человека на индивидуальном и популяционном уровнях.

Постепенное изменение генотипов ведет к изменению организмов, а естественный отбор в популяциях в свою очередь формирует генофонд. С этой точки зрения, эволюция какого-либо биологического вида, в том числе и человека, - эволюция его генотипа. Таким образом, основы экологической генетики человека связаны с общебиологическими закономерностями эволюции,

На протяжении миллионов лет эволюции среда обитания человека постоянно менялась (климат, пища, жилище). К таким изменениям организм человека постепенно приспособлялся благодаря широкой норме реакции признаков, а также изменениям генотипов и фенотипов. Все это обеспечило формирование биологической природы человека и его приспособленность к окружающей среде. В результате под влиянием естественного отбора сформировался широкий генотипический и фенотипический полиморфизм. Его объем в современных популяциях человека громадный. Многочисленные варианты в ферментных системах, транспортных белках, антигенах и рецепторах клетки обуславливают индивидуальные особенности метаболизма, реакция организма на биологические агенты или физические факторы, что и составляет предмет экогенетики человека.

Проблемы экогенетики стали актуальными в связи с тем, что среда обитания человека наполнилась новыми факторами (промышленные отходы, лекарства, пестициды, пищевые добавки и др.). Ранее человек не контактировал с такими веществами. Вследствие этого какой-либо новый фактор может оказать непредсказуемое действие на экспрессию генов или даже изменить их структуру.

2.6. Фармакогенетика

Важным разделом генетики человека является фармакогенетика, изучающая вовлеченность генов в индивидуальный ответ на лекарства. Геномные исследования значительно стимулировали разработку проблемы генетических подходов к индивидуализации лекарственной терапии. Имеется много причин, почему те или иные лекарства либо воздействуют, либо не воздействуют на пациента. Тем не менее индивидуальное генетическое предрасположение остается главной (пока еще мало оцененной) причиной несоответствующего ответа на прием лекарства.

Цель клинического фармакогенетического исследования сводится к выявлению пациентов, более или менее позитивно отвечающих на лечение, а также, наоборот, склонных к развитию побочных реакций на лекарство. Индивидуальная проверка на лекарство должна учитывать эффективность и безопасность. В табл. 6 представлены примеры патологических клинических реакций на лекарства у лиц с мутациями в соответствующих генах.

Генетические факторы определяют от 25 до 50% неблагоприятных ответов на лекарства. Одни гены (кодирующие белки) вовлечены во всасывание, распределение, метаболизм (биотрансформация) и выведение лекарств, другие кодируют лекарственные мишени.

Недалеко то время, когда мониторинг индивидуальной чувствительности к лекарствам будет проводиться молекулярно-генетическими методами, и это станет стандартной процедурой перед лечением.

Таблица 6

Примеры клинически значимых генетических полиморфизмов, влияющих на метаболизм и действие лекарств.

Гены	Лекарство -- благоприятный эффект или болезнь	Клиническая реакция у лиц с мутациями
Энзимы, метаболизирующие лекарства		
Цитохром P450 (CYP2C9)	Варфарин - антикоагуляция	Повышенный антикоагуляционный эффект
Цитохром P450 (CYP2D6)	Кодеин - анальгезия	Кодеин не метаболизируется в морфин. Отсутствует анальгетическое воздействие.
Тиопурин метилтрансфераза	Тиопурины – лейкемия, аутоиммунные нарушения	Токсическая передозировка при азатиопуриновой терапии
Мишени лекарств		
β_2 -Адренергический рецептор	Албутерол – бронхиальная астма	Усиление симптомов астмы при регулярном применении албутерола
5-Липоксигеназа (ALOX-5)	Зилетон – бронхиальная астма	Отсутствие реакции на ингибитор 5-липоксигеназы

Первым, кто отметил, что наследственные дефекты метаболизма могут объяснять индивидуальные различия в эффективности лекарств и побочных реакций от их применения, был Мотульский. Эти предположения нашли подтверждение при изучении генетических причин возникновения апноэ от применения для анестезии суксаметония (сукцинхолина) и гемолитической анемии в ответ на некоторые антималярийные препараты. В первом случае было показано, что причиной апноэ являются низкие уровни сывороточной холинэстеразы, ассоциированные с выделенными аллелями гена холинэстеразы, во втором, – что анемия развивается у мужчин -- носителей некоторых мутантных аллелей гена глюкозофосфат-дегидрогеназы.

Основное направление фармакогенетических исследований -- анализ ассоциаций между генетическим полиморфизмом и такими фенотипическими признаками, как эффективность лекарственного препарата, побочные эффекты и др., т. е. имеют популяционно-генетическую основу. Поиски ассоциаций между полиморфизмом в отдельных генах и отсутствием эффекта от

лекарственной терапии, а также побочными эффектами лекарственных веществ с самого начала подобных исследований имели под собой более очевидные основания, чем сходные исследования при мультифакториальных заболеваниях (МФЗ). Это объясняется лучшей изученностью метаболизма лекарств. Общая схема метаболизма лекарственных препаратов включает, как известно, два этапа, представляющие собой последовательность ферментативных превращений. На первом этапе происходит окисление лекарства с помощью цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ. На втором этапе происходит сульфатирование, ацетилирование или глюкуронирование образовавшихся продуктов, в которых участвует ряд ферментов, включая глутатион-S-трансферазы, N-ацетилтрансферазы и UDP-глюкуронозилтрансферазы. Конечно, это упрощенная схема, так как лекарственные препараты, попадая в организм, взаимодействуют не только с ферментами, которые их метаболизируют, но и с другими белками, в частности с рецепторами, сигнальными белками и т.д., генетическая изменчивость которых также может иметь отношение к эффективности действия лекарств.

Одна из первых ассоциаций между генетическим полиморфизмом и эффективностью действия лекарства была найдена для N-ацетилтрансферазы и изониазида. Позднее было показано, что некоторые аллельные варианты гена N-ацетилтрансферазы, по-видимому, предрасполагают к развитию периферической нейропатии у больных, принимающих этот противотуберкулезный препарат. Значение полиморфизмов в генах системы цитохрома Р-450 впервые отчетливо выявилось в отношении крайней чувствительности к такому гипертензивному препарату, как *debrisoquine*, и антиаритмическому средству *spartein*. Такая связь не кажется удивительной, так как цитохром Р-450-зависимые оксигеназы играют ключевую роль в первой фазе метаболизма большей части лекарств. В настоящее время известно более 50 ферментов системы цитохрома Р-450, причем два из них – CYP3A4 и CYP2D6 наиболее часто задействованы в этом процессе. Для

ряда генов этой системы выявлены полиморфизмы, в том числе для CYP1A1, CYP1B1, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 и CYP2E1. Связь некоторых из этих полиморфизмов с особенностями метаболизма лекарственных препаратов стала очевидной в последнее время. Так, нулевой аллель гена CYP2D6 является ответственным за накопление в организме значительного числа лекарственных препаратов, в том числе β -блокаторов, антидепрессантов, нейролептиков и некоторых других лекарственных средств, и обусловленную этим накоплением токсичность, а также отсутствие лечебного эффекта от указанных препаратов. Эти негативные эффекты нулевого аллеля гена CYP2D6 должны проявляться на популяционном уровне, так как частота гомозигот по нулевому аллелю в европейских популяциях составляет около 6%. К противоположному эффекту – сверхбыстрому превращению тех же лекарственных препаратов – предрасполагает другой аллель гена CYP2D6, который, как недавно было показано, представляет собой тандемные копии (вплоть до 13 копий) гена CYP2D6. Естественно, что лицам с такими аллелями гена CYP2D6 для достижения терапевтического эффекта требуются существенно большие дозы препаратов, метаболизируемых с участием CYP2D6. Известны некоторые примеры необычного, иногда патологического ответа на прием лекарственных препаратов, связанного с полиморфизмом ряда генов: повышенная кровоточивость при приеме варфарина, ассоциированная с полиморфизмом в CYP2C9, выраженная токсичность 5-фторурацила, обусловленная полиморфизмом в гене дигидропиримидиндегидрогеназы, токсичность 6-меркаптопурина, ассоциирующая с полиморфизмом в гене тиопуринометилтрансферазы. В число полиморфных аллелей гена тиопуринометилтрансферазы входят также неактивные аллели, продукты которых не обеспечивают метаболизм ряда лекарств, в частности, антилейкемических. В результате терапия лейкозов может быть совершенно неэффективной и требуется генотипирование больных на наличие этих аллелей прежде, чем приступать к лечению. Полиморфизм белков, на которые

направлено действие препарата, также может быть причиной токсичности лекарств. Показано, что причиной дискинезии при приеме нейролептиков может быть полиморфизм гена D3 рецептора допамина. При бронхиальной астме мишенями антиастматических препаратов являются 5-липоксигеназа и β_2 -адренергический рецептор. Показано, что полиморфизм этих двух белков имеет прямое отношение к эффективности антиастматических препаратов. Большой и все более пополняющийся список генетических полиморфизмов, имеющих отношение к эффективности лекарств и их побочным эффектам, можно найти в Интернете на сайте: www.sciencemag.org/feature/data/.

Как любой полиморфизм, полиморфизм по генам ферментов, участвующих в метаболизме лекарственных препаратов, а также других белков – мишеней лекарств, имеет отчетливое этническое своеобразие, впрочем довольно плохо исследованное. Уже упоминались, что, например, у европейцев гомозиготы по нулевому аллелю гена CYP2D6 встречаются с частотой около 6%, в то время как у американских негров частота такого генотипа составляет только 2%, а у монголоидов – менее 1%.

Существенные межэтнические различия известны также для частот аллелей в генах CYP2E1, алкогольдегидрогеназы и альдегиддегидрогеназы, ферментов, участвующих в метаболизме этанола.

До сих пор фармакогенетика имела дело преимущественно с полиморфизмом отдельных генов, ассоциированных с особенностями метаболизма тех или иных лекарств. Однако, поскольку процессы метаболизма организованы в цепи, совершенно очевидно, что целесообразно исследовать влияние полиморфизма во всех, или по крайней мере во многих генах, продукты которых, являются звеньями этих цепей. В связи с этим предполагается, что, на следующем этапе развития фармакогенетики будет проводиться полномасштабный геномный скрининг для выявления всех генетических ассоциаций с различными отклонениями в действии

лекарственных препаратов. В планировании и проведении такого рода исследований с неизбежностью придется использовать оптимальную популяционно-генетическую стратегию.

В настоящее время, что более 200 генов имеют отношение к детоксикации ксенобиотиков. Недалеко то время, когда мониторинг индивидуальной чувствительности к лекарствам будет проводиться молекулярно-генетическими методами, и это станет стандартной процедурой перед лечением.

* * *

Одним из главных стратегических результатов исследования генома человека для медицины явилось создание фундамента нового направления – *молекулярной медицины*. Это направление позволяет более точно определять молекулярные механизмы, лежащие в основе здоровья и болезней человека. Развитие патологических процессов прослеживается на молекулярном уровне от первичного продукта гена до исхода заболевания.

Обнаружение новых генов в последние 15 лет шло через «привязывание» их к известной хромосоме и группе генов. Это так называемые позиционное клонирование.

В настоящее время в связи с новыми методическими разработками (ДНК-биочипы, компьютерные программы и др.) на первое место выходят исследования по комплексному мониторингу предрасположенности к болезням. Следовательно, главное внимание будет уделяться уже не моногенным, а мультифакторным болезням. И это оправдано, во-первых, потому что моногенные болезни хорошо изучены. Во-вторых, с точки зрения здравоохранения мультифакториальные болезни представляют собой важнейшую проблему, поскольку их вклад в заболеваемость, смертность, продолжительность жизни является определяющим. Последнее десятилетие явило миру абсолютно

новую область науки - молекулярную медицину. Эта область стала возможной благодаря стремительному развитию таких направлений биологической науки, как молекулярная биология и молекулярная генетика и проникновению практически во все сферы биологических исследований методов и технологий генетической инженерии. Значительным достижением в этой области стала расшифровка первичной структуры генома человека, и этот результат совместных усилий мирового научного сообщества дает возможность развивать такие разделы молекулярной медицины как функциональная геномика и геномная дактилоскопия, молекулярная диагностика, фармакогенетика и генная терапия. Научными задачами молекулярной медицины является идентификация структурных и регуляторных генов человека, изучение их экспрессии и регуляции, выяснение генной природы и молекулярных механизмов наследственных болезней, роли генетических факторов в этиологии и патогенезе разнообразных патологических состояний, в том числе и инфекционной этиологии.

Раздел 3 **НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ И ВРОЖДЕННЫЕ** **ПОРОКИ РАЗВИТИЯ**

3.1. Груз генетических ошибок

Одной из весьма частых причин множественных врожденных пороков развития являются мутации (лат. *mutatio* – изменение), то есть внезапно возникающие изменения в генетическом аппарате клетки.

Примерно один процент всех новорожденных появляется на свет с аномалиями, вызванными хромосомными или генными мутациями. О том, сколько беременностей прерывается из-за этих аномалий до срока, точных данных нет. Чрезвычайно

трудно учесть спонтанное прерывание беременности в первые две-три недели после оплодотворения. Известно, что из каждых десяти зачатий лишь три-четыре заканчиваются рождением ребенка. Столь высокий уровень гибели зародышей в значительной степени определяют хромосомные нарушения. Подавляющее большинство детей, родившихся с аномалиями наследственного аппарата, имеют и многочисленные пороки строения – уродства. В целом ущерб здоровью человека от генетических нарушений вряд ли намного меньше, чем от сердечно-сосудистых и опухолевых заболеваний. Врожденная и наследственная патология занимает одно из ведущих мест в структуре причин заболеваемости, инвалидности и смертности детей. По разным данным, врожденные пороки развития составляют около 20% среди причин детской смертности. Среди детей первого года жизни от врожденных пороков в Украине погибает около 1000 новорожденных ежегодно. Частота врожденных пороков среди новорожденных составляет 20-26 на 1000 и катастрофично возрастает в последние годы. По данным ВОЗ частота врожденных пороков развития в отдельных странах составляет от 2,7 до 16,3%. Развитие зародыша проходит при непрерывном взаимодействии наследственных факторов и факторов внешней среды.

Среди причин врожденных пороков развития выделяют 3 группы: наследственные, мультифакториальные и тератогенные.

Общий груз наследственной патологии достаточно весом: до 50% спонтанных аборт обусловлены генетическими факторами, до 5% новорожденных отягощены наследственной патологией; причиной госпитализации не менее чем 25% лиц среднего и пожилого возраста является наследственная предрасположенность.

Известно, что вся наследственная патология определяется грузом мутаций, вновь возникающих и унаследованных из предыдущих поколений.

Медицинские последствия мутационного груза – это повышенная необходимость медицинской помощи и сниженная

продолжительность жизни больных.

Наследственная патология является одним из результатов эволюции в процессе формирования человека как биологического вида, уровень которой поддерживается постоянно протекающим мутационным процессом и отбором.

Генетика входит в XXI век в положении науки востребованной теоретической, клинической и профилактической медициной. Для полного использования генетических технологий в медицине, как сказал лауреат Нобелевской премии Пол Берг, «нам потребуются врачи настолько осведомленные в молекулярной анатомии и физиологии хромосом и генов, насколько кардиохирург знает работу сердца и структуру сосудистого дерева».

3.2. Наследственная патология, обусловленная мутациями хромосом

В 1956 г. впервые удалось определить истинное диплоидное число хромосом человека (46), а уже в 1959 было установлено, что при самой частой форме слабоумия – болезни Дауна во всех клетках тела обнаруживается маленькая лишняя хромосома 21, и, следовательно, это заболевание вызвано нерасхождением парных хромосом 21 в гамете.

Начиная с 1959 г. бурно развивается учение о хромосомных болезнях человека. Для всех или почти всех хромосомных болезней характерно то, что они начинают проявляться еще во внутриутробном периоде развития. Установлено, что гибель зародышей происходит уже на стадии зиготы и бластулы (первые недели развития). Хромосомные мутации ответственны за 40% спонтанных аборт и 6% мертворожденных младенцев. Смертность от хромосомных болезней в перинатальный период составляет приблизительно 1: 1000. Наследственными эти болезни называют потому, что они обусловлены патологией генетического аппарата, а также потому, что нарушения количества или структуры хромосом возникают при

формировании половых клеток родителей или в процессе оплодотворения.

У человека выявлено 3 категории генетических нарушений: одиночный мутантный ген, изменения хромосом, мультифакториальный тип наследования. Отсюда типы наследственной патологии: 1) генные болезни (более 3500 нозологических форм); 2) хромосомные болезни (более 100 синдромов); 3) болезни с наследственным предрасположением; 4) соматические генетические болезни (рак, вторичные иммунодефициты); 5) несовместимость матери и плода по антигенам.

Различают хромосомные болезни, детерминируемые мутациями количества хромосом и хромосомные болезни, детерминируемые мутациями структуры хромосом.

Наиболее тяжелые и ярко выраженные пороки развития человека отмечаются при геномных мутациях, которые заключаются в добавлении или утрате одной или нескольких хромосом, а также в увеличении количества наборов хромосом.

Увеличение количества наборов хромосом в одной клетке называется полиплоидией. Когда в клетках человека насчитывается по 69 хромосом, говорят о триплоидах (23 хромосомы – гаплоидный набор), 92 – о тетраплоидии (23 x 4).

Триплоидия – одна из наиболее частых спонтанных аномалий набора хромосом в эмбриогенезе человека. Примерно пятая часть нарушений хромосом у зародышей приходится на триплоидию. Однако у человека большинство триплоидных зародышей погибает в начале второго месяца внутриутробного развития, лишь около одного процента доживают до шестого-седьмого месяца эмбриогенеза.

Появление этого типа аномалии возможно двумя путями. Во-первых, при оплодотворении в яйцеклетку могут проникнуть два сперматозоида; во-вторых, проникновение одного сперматозоида в яйцеклетку, которая имеет диплоидный набор хромосом (т.е. 46); при формировании такой яйцеклетки не произошло уменьшения их числа, а в итоге – 69 хромосом в зиготе. Триплоидия приводит не только к утрате

жизнеспособности: человеческий триплоид, достигший плодного периода (к началу третьего месяца эмбриогенеза), имеет и многочисленные пороки развития – перерождение ворсинок хориона, сращение пальцев рук и ног, нарушения нервной и мочеполовой систем. С подобным сочетанием аномалий, но имеющих другую природу, в некоторых случаях возможно существование ребенка хотя бы в течение нескольких недель после рождения. А вот триплоидия не совместима с жизнью ребенка. Тетраплоидия, то есть два диплоидных (или четыре гаплоидных) набора хромосом в одной клетке встречается редко. Из всех зародышей с хромосомными нарушениями тетраплоидия обнаруживается лишь у 5-6%. Такая аномалия может возникнуть различными способами: либо при оплодотворении диплоидной яйцеклетки диплоидным сперматозоидом, либо при оплодотворении нормальной гаплоидной яйцеклетки тремя гаплоидными сперматозоидами, либо тетраплоидный зародыш возникнет, если нормальная зигота разделится на 2 нормальные клетки, но вскоре эти клетки снова сольются в одну.

Развитие тетраплоидов человека сопровождается пороками формирования многих органов, и лишь крайне редко такие зародыши вступают в плодный период, обычно они погибают в течение первых двух месяцев эмбриогенеза. Однако в специальной литературе описаны пять живорожденных детей с тетраплоидией. Все дети имели разнообразные пороки строения тела, и срок их жизни не превышал несколько дней.

Итак, кратные изменения количества хромосом с жизнью несовместимы.

Возможны варианты анеуплоидии: если имеется одна добавочная хромосома – трисомия; если в паре гомологичных хромосом одна отсутствует – это моносомия. Отсутствие пары гомологичных хромосом у человека не описано, но называется это нуллисомия.

Трисомия является наиболее часто встречающейся хромосомной аномалией у человека, и возникать она может в любой из 23 пар хромосом.

К трисомиям по аутосомам ($2n + 1$) можно отнести болезнь Дауна (трисомия по 21-й паре); синдром Патау (трисомия по 13-й паре); синдром Эдвардса (трисомия по 18-й паре). Различают полисомии по половым хромосомам и X-моносомии. К таким болезням относятся синдромы Клайнфельтера и трипло X, синдром ХУУ.

Моносомия же по любой паре с 1-й по 22-ю пару соматических хромосом обязательно приводит к гибели зародыша еще во внутриутробном периоде: у человека при нехватке генетического материала возникают более тяжелые и более ранние нарушения эмбриогенеза, чем при его избытке. У родившихся и живущих детей возможна нехватка одной хромосомы только из 23-й пары, то есть определяющей пол. Причем оставшейся в единственном числе может быть только X-хромосома. Единичная Y-хромосома не была описана у человека.

Причины и механизмы возникновения хромосомных болезней. Причиной хромосомной патологии являются все виды хромосомных мутаций и некоторые геномные мутации. В животном и растительном мире геномные мутации многообразны, но у человека обнаружено только 3 типа: тетраплоидии, триплоидии и анеуплоидии. При этом из всех вариантов анеуплоидий у людей встречаются только трисомии по некоторым аутосомам, полисомии по половым хромосомам (три-, тетра- и пентасомии), а из моносомий встречаются только моносомия X.

У человека обнаружены все типы хромосомных мутаций; делеции, вставки, дупликации, инверсии, транслокации. Делеция даже в одной из гомологичных хромосом означает нехватку участка, а дупликация - избыток.

Как же возникают такие отклонения у человека? Наиболее часто это происходит при формировании родительских половых клеток (гаметогенез). Когда первичные половые клетки претерпевают мейоз, в результате которого набор хромосом в образующихся гаметах станет гаплоидным (23^{n} хромосомы), существует возможность сбоя, в результате которого

количество хромосом в одной клетке будет 22, то есть недостача, а во второй – 24, то есть избыток генетического материала. Когда в результате оплодотворения в яйцеклетке окажется еще один гаплоидный набор хромосом, то вместо обычных 46 в первом случае будет 45 (моносомия по какой-то паре), а во втором – 47 хромосом (трисомия), (рис.45).

Возможен и другой путь приобретения зародышем подобных хромосомных аномалий. При нормальном развитии нормальной зиготы, получающиеся при ее делении клетки имеют обычный диплоидный набор хромосом. Однако поведение хромосом может нарушаться и при делении соматических клеток, при митозе. И тогда к полюсам делящейся клетки хромосомы расходятся неправильно или вообще теряются. Естественно, что в разных клетках будет разное количество наследственного материала. В отличие от первого, так сказать, гаметического способа возникновения хромосомных аномалий, в данном случае часть клеток зародыша будет нормальна, а часть (потомки клетки с нарушенным митозом) – нести какие-то нарушения. Организмы, в которых наряду с нормальными имеются клетки с генетическими нарушениями, называют мозаиками. Мозаицизм более часто наблюдается по половым хромосомам. Такие мозаики обладают генотипами X/ XX; X/XY ; XX/XY; XXY/XX.

3.3. Гаметогенез. Сперматогенез. Овогенез

Сперматогенез- это сложный процесс образования зрелых половых клеток(сперматозоидов) у особей мужского пола. Этот процесс протекает в семенниках.

У многих животных сперматогенез происходит лишь в определенное время года. В промежутках между ними в канальцах семенников содержатся лишь сперматогонии. Но у человека и многих домашних животных сперматогенез никогда не останавливается.

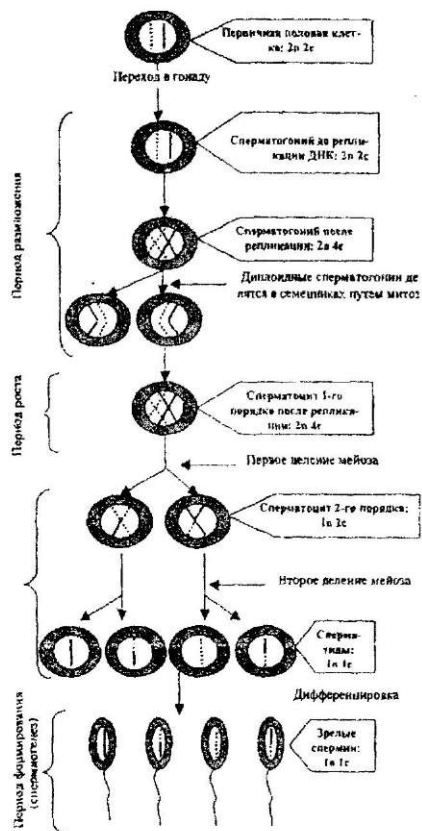


Рис.45 Схема сперматогенеза, n -плоидность набора хромосом, c - количество молекул ДНК. По достижении половой зрелости организма, сперматогонии начинают быстро размножаться. Часть из них сохраняет способность к непрерывным неограниченным делениям (сперматогонии типа стволовых клеток), а другая часть (созревающие сперматогонии) первого порядка, после ограниченного числа последовательных митозов приступает к мейозу, превращаясь в сперматогонии первого порядка. После завершения второго деления мейоза сперматогонии первого порядка превращаются в гаплоидные сперматиды, дифференцирующиеся в зрелые спермии

Сперматогенез у человека. Это процесс образования гаплоидных микроскопических мужских гамет (сперматозоидов) из диплоидных репродуктивных клеток (сперматогониев), присутствующих в семенниках. Сперматогенез у мужчин происходит постоянно после полового созревания на протяжении многих лет. Сперматогенез подразделяется на 2 этапа: образование сперматиды, спермиогенез (рис.45).

Образование сперматиды делится на 3 периода;

1. Период размножения;

Это быстрое митотическое деление зародышевых клеток,

присутствующих в зародышевом эпителии семявыносящих трубочек - семенников. Этот процесс обеспечивает образование *сперматогониев*. Генетическая формула этих клеток соответствует $2n2c$ до S периода интерфазы и $2n4c$ после него, n - гаплоидный набор хромосом, c - количество ДНК.

2. *Период роста*. Характеризуется сперматогенезом, при котором диплоидные сперматогонии увеличивается в размере (приблизительно в два раза) и дифференцируется в диплоидный генетическая формула которого после репликации ДНК - $2n4c$.

3. Фаза созревания характеризуется мейозом. Первичный-сперматоцит претерпевает мейоз I (редукционное деление) и образует две одинаковые гаплоидные клетки, называемые *сперматоцитами второго порядка*: $1n2c$. Затем немедленно происходит мейоз II (эквационное уравнивательное деление), и из каждого вторичного сперматоцита образуется по две равноценных гаплоидных сперматиды $1nc$. При обоих делениях мейоза в сперматоцитах цитокinesis не доводится до конца.

Овогенез у человека. Это процесс образования гаплоидных женских гамет (зрелых яйцеклеток) из диплоидных репродуктивных клеток (овогониев) яичников женского организма (рис.46).

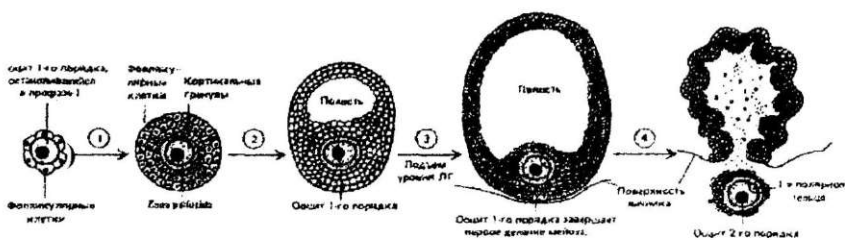


Рис. 46. Схема развития овоцита и фолликула от начала созревания и до овуляции.

1) Еще до рождения девочки овоциты останавливаются в профазе I деления мейоза. Большая их часть окружена одним слоем фолликулярных клеток, 2) Некоторые из развивающихся фолликулов накапливают жидкость, превращаясь в антральные фолликулы. 3) С наступлением половой зрелости раз в месяц волна лютеинизирующего гормона побуждает примерно 20

антральных фолликулов к ускоренному росту, однако созревает лишь один из этих фолликулов, овоцит первого порядка, находящийся в этом фолликуле, завершает первое деление мейоза, образуя полярное тельце и превращаясь в овоцит второго порядка. 4) Овоцит второго порядка, который был остановлен на стадии метафазы II мейоза, вместе с полярным тельцем и частью окружающих полярных клеток освобождается в тот момент, когда фолликул разрывается на поверхности яичника (овуляция).

Овоцит второго порядка завершает второе деление мейоза только в том случае, если он будет оплодотворен. После овуляции опустевший фолликул превращается в эндокринное образование (желтое тело), которое секретирует прогестерон, тем самым готовя матку к приему оплодотворенного овоцита. Если оплодотворение не наступает, желтое тело редуцируется, а внутренняя слизистая оболочка матки отслаивается и выводится из организма во время менструации.

У человека овогенез начинается на 3-м месяце эмбрионального развития. В это время яичники содержат около 7 млн. зародышевых клеток, однако многие подвергаются атрезии (дегенерации) до рождения. К моменту рождения в яичниках девочки насчитывается около 2 млн. первичных фолликулов, в которых первичные овоциты находятся на стадии профазы первого деления мейоза. Атрезия продолжается, и к моменту полового созревания яичники содержат примерно 30 000 первичных фолликулов. Овогенез завершается только после полового созревания. Созревание овоцитов стимулируется ФСГ (фолликулостимулирующим гормоном) и ЛГ (лютеинизирующим гормоном) гипофиза.

Эндокринная функция яичников также начинает проявляться по достижению половой зрелости. У женщин ежемесячно созревает одна яйцеклетка, а за весь период половой зрелости — примерно 450. Имеет существенное значение тот факт, что первичные овоциты формируются еще до рождения и затем сохраняются всю жизнь, и лишь постепенно некоторые из них периодически созревают и образуют яйцеклетки. Это значит, что различные неблагоприятные факторы, которым

подвергается в течение жизни женский организм, могут сказаться на развитии яйцеклеток. Ядовитые вещества (в том числе никотин и алкоголь), попадающие в организм, могут проникнуть в овоциты и вызывать нарушения развития потомства.

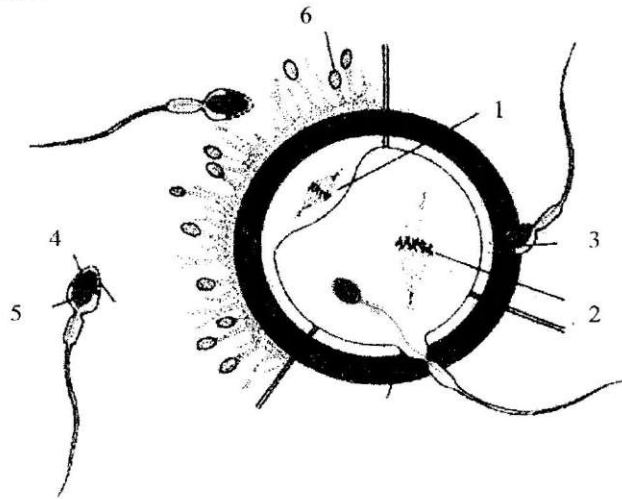


Рис.47.Схема оплодотворения. Связывание сперматозоида с зона pellucida(3); проникновение ядра спермия в яйцеклетку; 4- акросома, 5-ядро сперматозоида; 1- деление полярного тельца; 2- вторичный овоцит во втором мейотическом делении; 6- фолликулярные клетки лучистого венца.

Овогенез состоит из 3 периодов (рис.48): а) Период размножения. Осуществляется в период внутриутробного развития. Первичные половые клетки зародышевого эпителия яичника (большие по размеру и имеющие большие ядра по сравнению со сперматогониями) подвергаются быстрому митотическому делению для образования групп диплоидных материнских яйцеклеток – *овогоний*. Генетическая формула их соответствует $2n2c$ до S периода и $2n4c$ после него, n — это гаплоидный набор хромосом, c - количество ДНК.

б) Период роста - гораздо длиннее, чем для сперматогенеза. В это время один овогоний растет и превращается в диплоидный *овоцит первого порядка*, а окружающие его другие

овогонии образуют вокруг питательный фолликулярный эпителии. Эта структура названа *первичным фолликулом*.

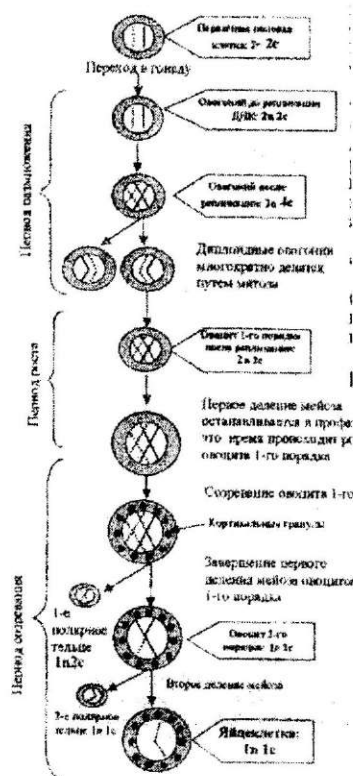


Рис.48 Схема овогенеза. n-плоидность набора хромосом; c-количество молекул ДНК.

- Во время периода роста происходят следующие процессы:
- ❖ увеличение в размере овогония (20000 раз у лягушки и приблизительно в 200 раз у человека) в результате накопления желтка (вителогенез);
 - ❖ ядро значительно увеличивается в размере;
 - ❖ вокруг овоцита образуется тонкая желточная (вителиновая) оболочка;
 - ❖ увеличивается количество митохондрий, компонентов ЭПС и комплекса Гольджи;

- ❖ происходит репликация ДНК при неизменном числе хромосом, Генетическая формула овоцита I порядка соответствует $2n4c$.

в) *Период созревания* характеризуется мейозом. В этот период диплоидный и полностью выросший первичный овоцит претерпевает мейоз I (редукционное деление) для образования двух неравных *гаплоидных* клеток. Меньшая клетка называется *первичным полярным тельцем* и имеет малое количество цитоплазмы. Большая клетка называется *овоцитом второго порядка*. Обе они - гаплоиды, и каждая имеет по 23 хромосомы. Генетическая формула вторичных овоцитов соответствует $1n2c$. Вторичный овоцит претерпевает мейоз II (уравнительное деление), при этом опять образуются две неравные гаплоидные клетки. Меньшая называется *вторичным полярным тельцем* и имеет очень мало цитоплазмы, в то время как большая дифференцируется в *яйцеклетку*. Одновременно первое полярное тельце может также делиться на два. Генетическая формула яйцеклетки и полярных телец – $1n 1c$.

Таким образом, из первичных половых клеток, мигрирующих в яичник на ранней стадии эмбриогенеза, развиваются овогонии. После ряда митотических делений овогонии растут и приступают к первому делению мейоза. На этой стадии их называют уже овоцитами первого порядка. У млекопитающих овоциты первого порядка формируются очень рано (у человека это происходит между 3-м и 8-ми месяцами эмбрионального развития) и остаются на стадии профазы I до тех пор, пока самка не достигнет половой зрелости. После этого под влиянием гормонов периодически созревает небольшое число овоцитов, которые завершают первое деление мейоза и превращаются в овоциты второго порядка. На этой стадии происходит овуляция. У большинства млекопитающих овуляция происходит на стадии вторичного овоцита после завершения 1-го деления мейоза. У человека овуляция происходит, когда яйцеклетка находится на стадии метафазы второго деления мейоза. Мейоз II может завершиться только после оплодотворения.

Несмотря на сходство некоторых периодов сперматогенеза

и овогенеза, между этими процессами имеются существенные отличия (таблица 7).

Таблица 7

Основные отличия сперматогенеза от овогенеза у человека.

№	Характеристика	Сперматогенез	Овогенез
1	Период образования гамет	Постоянно после полового созревания	В эмбриогенезе
2	Период созревания и формирования гамет	74 дня	13-50 лет
3	Деление гаметоцитов	Равномерное, из одного сперматоцита образуется 4 спермия	Неравномерное, из одного овоцита образуется 1 яйцеклетка и 3 полярных тельца
4	Количество созревающих и сформированных гамет	- 120 млн каждый день	1 клетка в 28 дней
5	Длительность мейоза	Несколько дней	До 40-50 лет
6	Остановка гаметогенеза	Процесс существенно замедляется в старости	Останавливается после 45-50 лет
7	Размеры и формы гамет	Маленькие, удлинённые, подвижные	Большие, шарообразные, неподвижные.

3.3.1. Оплодотворение

У млекопитающих и человека сперматозоиды в женских половых путях передвигаются благодаря собственной подвиж-

ности, яйцеклетки передвигаются в результате сокращений матки, маточных труб и колебаний их ворсинок. Встреча гамет обычно происходит в верхних отделах маточных труб.

Осеменению способствует то, что яйцеклетки выделяют в окружающую среду химические вещества — *гамоны* привлекающие сперматозоиды. Для некоторых видов животных существуют специфические вещества для привлечения сперматозоидов только своего вида. Это является разновидностью *хемотаксиса*. Для некоторых организмов установлена природа привлекающих факторов; они являются пептидами разного аминокислотного состава невысокой молекулярной массы. Они выделяются только зрелой яйцеклеткой, после завершения определенного этапа мейоза. Таким образом, овоцит способен контролировать не только видовую специфичность спермиев, но и момент оплодотворения.

Сперматозоиды млекопитающих могут проникнуть в яйцеклетку только в том случае, если находились в женском половом тракте не менее 1 ч. Процесс активации сперматозоидов называется *капацитацией*. Существуют экспериментальные данные о том, что этот процесс заключается в изменении липидов клеточной мембраны спермиев, в них значительно снижается содержание холестерина. Это дестабилизирует мембрану акросомы и обеспечивает акросомальную реакцию. От поверхности яйцеклетки отслаивается желточная оболочка. Между ней и мембраной яйца образуется свободное, наполненное жидкостью пространство. После отслоения оболочки оплодотворения другие сперматозоиды уже не могут проникнуть в яйцеклетку.

В яйцеклетку проникает, как правило, один сперматозоид - это явление *моноспермии*. Однако у насекомых, рыб, птиц и некоторых других животных в цитоплазму яйцеклетки может попасть несколько гамет. Это явление получило название *полиспермии*. Роль полиспермии не совсем ясна, но установлено, что все равно генетический материал лишь одного из сперматозоидов (мужской пронуклеус) сливается с женским пронуклеусом. Следовательно, в передаче наследственной информации принимает участие только этот сперматозоид. Ядра других гамет подвергаются разрушению. Так как

связывание сперматозоида и яйцеклетки видоспецифично, это значит, что только сперматозоиды особей своего вида могут связаться, а затем оплодотворить яйцеклетку. В основе этого лежит молекулярный механизм узнавания и связывания, который осуществляется при помощи видоспецифичных макромолекул-рецепторов. У млекопитающих сперматозоиды проникают в яйцеклетки, находящиеся еще в периоде созревания, на стадии метафазы второго мейотического деления (рис. 47). Созревание яйца заканчивается только после проникновения в него сперматозоида. Завершается второе деление мейоза и образуется вторичный полюцит.

Основным событием процесса оплодотворения является слияние отцовского и материнского генетических материалов. Ядро сперматозоида в цитоплазме яйца «набухает» и достигает величины ядра яйцеклетки. Оболочка ядра спермия распадается на мелкие везикулы, что создает условия для действия факторов цитоплазмы яйца на хроматин мужского нуклеуса. Белки, сохранявшие компактное, неактивное состояние хроматина спермия, удаляются, что приводит к деконденсации хроматина. Образуются более крупные пронуклеусы, вокруг которых вновь образуются оболочки. Мужской пронуклеус движется навстречу женскому пронуклеусу, который также движется в его сторону. Процесс сближения продолжается несколько часов. В это время в каждом пронуклеусе происходит репликация хромосом.

После встречи наборов материнских и отцовских хромосом они «перемешиваются». Этот процесс называется *кариогамия*, или *амфимиксис*. В результате кариогамии восстанавливается диплоидный набор хромосом, содержащих по 2 хроматиды, образуется зигота, которая приступает к дроблению.

Оплодотворение у человека - это процесс слияния отцовской и материнской гамет, являющийся началом развития нового организма. В результате слияния восстанавливается диплоидный набор хромосом и образуется зигота (одноклеточный зародыш).

Осеменение у человека внутреннее. Встреча яйцеклетки и сперматозоида происходит в фаллопиевых трубах женщины.

Спермий сразу не может оплодотворить яйцеклетку. Для этого он должен быть активирован в половых путях женщины. Этот процесс называется капацитацией. Процесс оплодотворения включает в себя следующие этапы:

Подход сперматозоида к яйцеклетке. Во время полового акта мужчина высвобождает около 3,5 мл семенной жидкости. Этот процесс называется эякуляцией. В норме семенная жидкость содержит 200-400 млн. спермиев. Это гарантирует достижение определенным количеством спермиев яйцеклетки, т.к. многие погибают в кислотной среде генитального тракта женщины. Спермии движутся в направлении фаллопиевых труб через матку и «проплывают» 1-4 мм за минуту.

Яйцеклетка выходит из яичника в середине менструального цикла, и этот процесс называется овуляцией. Яйцеклетка движется к матке по трубе благодаря ее перистальтике и реснитчатым механизмам. Направленное движение сперматозоида к яйцеклетке обеспечивается хемотаксисом. Яйцеклеткой выделяются пептиды, привлекающие сперматозоидов. Многочисленные спермии достигают яйцеклетки и связываются с ней специальными видоспецифическими рецепторами. Яйцеклетка при этом может вращаться в результате движения хвостов сперматозоидов. В это время протекает акросомная реакция. Способность яйцеклетки человека к оплодотворению в женском генитальном тракте составляет 12-24 часа.

Проникновение спермия обеспечивается химическим механизмом, при котором акросома спермия высвобождает фермент гиалуронидазу (а также другие ферменты), который растворяет в определенном месте оболочку яйца. После этого плазматические мембраны яйцеклетки и спермиев сливаются, и образуется канал для проникновения ядра сперматозоида. Сигналом для акросомальной реакции является прикрепление гамет друг к другу рецепторами. Время, необходимое спермию для входа в яйцеклетку, составляет - около 30 мин.

Активация яйцеклетки. Проникновение сперматозоида в яйцеклетку инициирует серию очень быстрых процессов. Мембраны кортикальных гранул сливаются с мембраной яйцеклетки и высвобождают свое содержимое наружу.

Желточная мембрана начинает подниматься от поверхности мембраны яйцеклетки. Так возникает перивиттелинное пространство в пределах желточной оболочки. Рецепторы к сперматозоидам разрушаются, и яйцеклетка утрачивает способность связывать спермии. Это предотвращает полиспермию. В яйцеклетку проникает только ядро и центриоли. После этого по периферии овоплазмы происходит ее уплотнение, и образуется «оболочка оплодотворения»; также препятствующая проникновению других спермиев. Яйцеклетка активизируется, усиливается обмен веществ, завершается мейоз.

Объединение хромосом. Вход ядра сперматозоида в яйцеклетку стимулирует вторичный овоцит завершить второе мейотическое деление, в результате чего образуется зрелая яйцеклетка и второе полярное тельце. Из ядер сперматозоида и яйцеклетки образуются мужской и женский пронуклеусы на стадии профазы (рис.49). ДНК пронуклеуса яйцеклетки и сперматозоида удваивается, и затем образуются хромосомы, Центриоли расходятся к разным полюсам и образуют веретено деления. При контакте пронуклеусов их оболочки разрушаются. Происходит конденсация хроматина с образованием видимых хромосом. Два набора хромосом (материнский и отцовский) смешиваются (*amphimixis*) в центральной части клетки. Оплодотворенное яйцо теперь называется зиготой. Затем начинается быстрое митотическое деление.

Кариология начального эмбриогенеза человека.

Завершение первого мейотического деления. За несколько часов до овуляции ядро овоцита теряет оболочку и превращается в плотную хроматиновую массу, которая быстро движется к периферии клетки. Через 3-4 часа хромосомы образуют метафазную пластинку, затем расходятся, и отделяется I полярное тельце. В некоторых случаях полярное тельце может оплодотворяться, однако дробление почти сразу останавливается.

Начало второго мейотического деления. Овоцит, минуя интерфазу и профазу, переходит на стадию прометафазы второго деления. Несколько часов овоцит находится на стадии метафазы второго деления. В это время происходит овуляция, однако овоцит продолжает оставаться на этой стадии до

оплодотворения. Неоплодотворенные яйцеклетки погибают, не завершив мейоз.

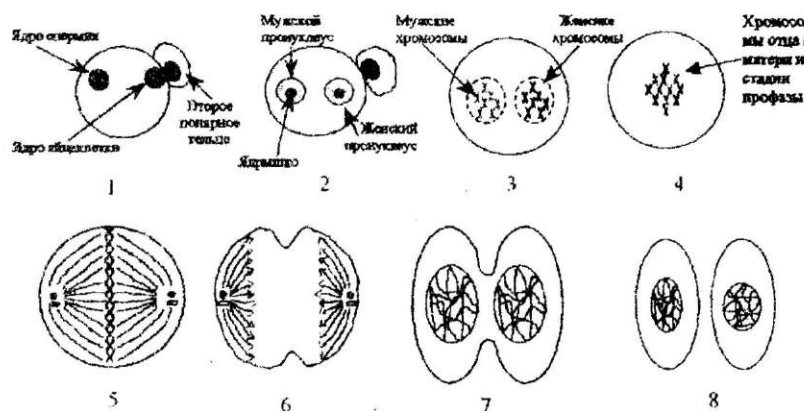


Рис. 49 Схема основных событий, происходящих с генетическим материалом отца и матери на начальных стадиях эмбриогенеза. 1 - завершение мейоза-II после проникновения ядра спермия; 2 - Образование пронуклеусов и репликация ДНК; 3 - Формирование хромосом в пронуклеусах; 4 - Кариогамия (амфимиксис), объединение хромосом отца и матери; 5 - метафаза первого деления зиготы; 6 - Анафаза; 7 - Телофаза; 8 - Цитокinesis. Образуются две клетки, имеющие смешанный генетический материал матери и отца.

Проникновение спермия. Уже через 5-10 минут после проникновения спермия мейотические хромосомы овоцита проходят стадию анафазы и через час - телофазы. Далее, в течение 20 минут, хромосомы находятся в состоянии покоя. После этого веретено деления распадается и отделяется вторичное полярное тельце (рис. 48). В головке сперматозоида спустя 10-15 минут после его попадания в овоцит становятся заметными морфологические изменения: увеличиваются размеры, утрачиваются контуры, появляются мелкие ядрышковые гранулы. Это происходит на стадии анафазы и телофазы деления ядра овоцита.

Образование пронуклеусов. Образование женского пронуклеуса начинается после отделения второго полярного

тельца. Содержание мужского и женского ядра разрыхляется и покрывается оболочкой. Активный рост пронуклеусов наблюдается через 10-20 часов после оплодотворения. Развитие мужского пронуклеуса происходит быстрее. У человека пронуклеусы имеют одинаковую величину, но значительно больше, чем ядра соматических клеток. В пронуклеусах количество ДНК удваивается незадолго до первого деления зиготы. Репликация ДНК начинается спустя 7-9 часов после оплодотворения и длится в течение 4 часов.

Кариогамия. После репликации ДНК пронуклеусы сближаются в центре овоцита. За 30 минут до кариогамии пронуклеусы утрачивают ядрышки и несколько уменьшаются в размерах. Хроматин уплотняется, начинают формироваться хромосомы. При соприкосновении пронуклеусов их мембранные оболочки разрушаются. Кариогамия — объединение геномов отца и матери - происходит, когда хромосомы обоих пронуклеусов находятся на стадии профазы первого митоза зиготы. В результате первого митоза зиготы каждая хромосома разделяется на хроматиды, которые расходятся к разным полюсам овоплазмы. Далее следует цитокинез и образуется два бластомера зародыша. В течение первых делении зиготы хромосомы остаются малоспирализованными.

3.4. Мейоз

Мейоз (гр. Meiosis - уменьшение) - особый тип деления генетического материала гаметоцитов во время гаметогенеза. В результате образуются гаметы (зрелые половые клетки), хромосомный набор которых составляет половину от числа хромосом исходных клеток.

Мейоз и оплодотворение играют главные, но противоположные роли в жизненном цикле организмов, размножающихся половым путем. Мейоз делит число хромосом пополам, в то время как благодаря оплодотворению восстанавливается диплоидное число хромосом. Мейоз обеспечивает два основных эффекта: он уменьшает набор хромосом в гаметах в два раза и способствует генетическому разнообразию потомства благодаря кроссинговеру.

Мейоз I.

Мейозу I предшествует *интерфаза*, во время которой каждая молекула ДНК реплицируется, Поэтому каждая хромосома делящейся клетки состоит из двух сестринских хроматид, связанных центромерой. Пара центриолей (в клетках животных) также удваивается.

Первое мейотическое деление условно разбивают на несколько этапов. Также как и митоз, мейоз I подразделяют на профазу, прометафазу, метафазу, анафазу, _телофазу (рис.50).

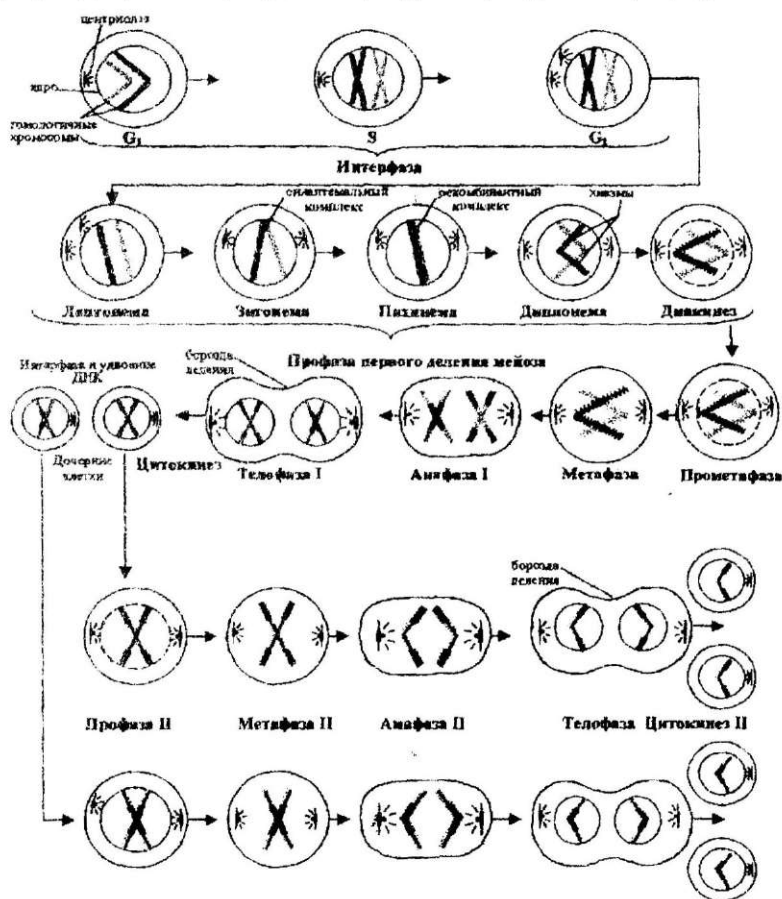


Рис.50 Схема основных процессов превращения и распределения генетического материала во время мейоза.

Профаза I. Профаза наиболее длительный этап. Он включает в себя **5 стадий**:

Леттомема. Хроматиновая сеть упорядочивается в хорошо заметные хромосомные нити с белковой осью. Каждая такая хромосома прикреплена теломерными участками к ядерной мембране. Хотя каждая ДНК хромосомы уже удвоилась и состоит из 2-х сестринских хроматид, они еще очень сильно сближены. За счет этого все хромосомы кажутся отдельными одиночными нитями.

Зигонема. Гомологичные хромосомы тесно соединяются друг с другом по всей своей длине. Этот процесс называется *конъюгацией* или *синапсисом*. Обычно этот процесс начинается со сближения концов гомологичных хромосом на ядерной мембране. Далее этот процесс соединения распространяется вдоль хромосом с обоих концов к центромерам до полного объединения. Иногда процесс имеет направление от центромер. Структуры, образованные в результате синапсиса, называются *бивалентами*, но т.к. каждая гомологичная хромосома состоит из двух сестринских хроматид, их также называют *тетрадами*. В момент синапсиса гомологичных хромосом каждый ген приходит в «соприкосновение» с гомологичным ему аллелем. При конъюгации белковые нити хромосом сближаются и образуют *синаптемальный комплекс*.

Пахионема. Стадия пахиномы самая продолжительная и может продолжаться несколько дней. При этом в синаптемальном комплексе появляются *рекомбинационные узелки*. Считается, что в этих областях контакта хромосом происходит обмен гомологичными участками (кроссинговер), что приводит к *перекрестам* между несестринскими хроматидами. В обмене участвует по одной хроматиде из двух от каждой из спаренных хромосом.

Диплонема. Этот период начинается с разделения конъюгировавших хромосом. Постепенно синаптемальный комплекс распадается, и гомологичные хромосомы отделяются друг от друга. Однако, они еще связаны *хиазмами* (перекрестками) в тех местах, где произошел кроссинговер. В развивающихся яйцеклетках диплонема может растянуться на месяцы или годы (человек). Именно в этот период хромосомы

частично деконденсируются и синтезируют РНК. Такие хромосомы, с расплетенными участками называют хромосомами «типа ламповых щеток».

Диакинез. Биваленты сильно укорачиваются, и хиазмы перемещаются к дистальным концам хромосом, дальше от центромеров. В этот момент плотные хромосомы отделяются от ядерной мембраны. В этой стадии уже видно, что каждый бивалент содержит четыре отдельных хроматиды. Пара сестринских хроматид соединена центромерой, а несестринские - хиазмами. Во время диакинеза начинает разрушаться ядерная оболочка. Начинается формирование веретена деления, которое прикрепляется к кинетохорам хромосом.

Прометафаза I — это короткий промежуток цикла, связанный с быстрым разрушением ядерной оболочки. Оболочка фрагментируется и образует мембранные везикулы, равномерно распределенные в цитоплазме. Ядро как компартмент исчезает. Хромосомы оказываются погруженными в цитоплазматический матрикс. Они становятся доступными микротрубочкам веретена деления, которые прикрепляются к кинетохорам хромосом и упорядочивают их движение.

Метафаза I. После длительной профазы следует метафаза, она более короткая и соответствует процессам митоза. Биваленты с помощью веретена деления выстраиваются в экваториальной плоскости клетки. Причем, центромеры хромосом располагаются точно по экваториальной линии на равном расстоянии от полюсов деления. Ориентация каждого бивалента происходит независимо от других.

Анафаза I. Гомологичные хромосомы начинают двигаться в сторону разных полюсов клетки под действием сил веретена деления. В результате этого хромосомы полностью отделяются друг от друга. Таким образом, в анафазе к полюсам расходятся не хроматиды, а целые гомологичные хромосомы. В отличие от митоза, центромеры не делятся и хроматиды не разъединяются. Этим первое мейотическое деление принципиально отличается от митоза.

В процессе этой фазы связывавшие хромосомы хиазмы разрываются. В результате этого на каждой из несестринских

хроматид остаются гены, приобретенные в результате кроссинговера между эквивалентными участками гомологичных хромосом. Кроссинговер и случайное расхождение гомологичных хромосом во время анафазы приводят к изменению генетического материала. Этот процесс называют *рекомбинацией генов*. Он приводит к образованию генетически неидентичных гамет, содержащих разный аллельный состав.

Телофаза I. Каждая из пары разделившихся гомологичных хромосом достигает определенного полюса клетки. Хромосомные наборы разделяются и полностью расходятся в различные части клетки. Это обуславливает уменьшение хромосомного набора в дочерних клетках в два раза. Вокруг каждого нового набора хромосом из мембранных везикул постепенно формируется ядерная оболочка. Хромосомы частично раскручиваются и несколько удлиняются, а затем появляется ядрышко.

Цитокинез I. После завершения телофазы происходит деление материнской клетки пополам (цитокнез). Таким образом, после первого мейотического деления каждая дочерняя клетка содержит один из наборов гомологичных хромосом.

Интеркинез— это период между первым и вторым делениями мейоза. Этот промежуток цикла обычно очень короткий или может полностью отсутствовать. Репликации генетического материала во время короткой интерфазы не происходит. Каждая хромосома исходно состоит из двух сестринских хроматид. Итак, после первого мейотического деления в каждой дочерней клетке содержится гаплоидное число хромосом, но каждая из них содержит две молекулы ДНК (состоит из 2-х хромосом).

Мейоз II.

Механизм второго деления мейоза схож с механизмом митоза, т.е. его сутью является разделение хромосом на отдельные хроматиды. Этот этап также условно подразделяют на 5 фаз.

Профаза II. На этом этапе хромосомы вновь становятся хорошо заметными в результате спирализации и уплотнения хроматина. *Прометафаза II.* Постепенно пропадают ядрышко

и ядерная оболочка. Вновь происходит формирование веретена деления. Эти периоды очень короткие, а у некоторых организмов они вообще отсутствуют. *Метафаза II*. Под действием сил веретена деления хромосомы выстраиваются в экваториальной плоскости клетки. *Анафаза II*. Каждая центромера хромосомы разделяется, и сестринские хроматиды начинают двигаться к противоположным полюсам. *Телофаза II*. На этом этапе хроматиды достигают соответствующих полюсов клетки. Вокруг них формируется ядерная оболочка. Хромосомы деспирализуются и вытягиваются, приобретая вид хроматина интерфазного ядра, появляется ядрышко. После этого следует деление цитоплазмы. *Цитокинез II*. По периметру экваториальной зоны цитоплазматической мембраны клетки образуется *борозда деления*, которая постепенно углубляется. В этом процессе принимают участие специальные белковые фибриллы, способные к сокращению. При соединении борозды деления в центре материнской клетки происходит отделение дочерних клеток. В результате мейоза образуются четыре клетки, каждая из которых имеет полный одиночный набор непарных хромосом и отличается от других своим генетическим составом.

Итак, при мейозе I гомологичные хромосомы сначала соединяются в пары для кроссинговера, затем в конце первого мейотического деления расходятся по одной в дочерние клетки. Во время второго мейотического деления гомологичные хромосомы расщепляются на отдельные хроматиды, которые расходятся в новое поколение дочерних клеток. Следовательно, в результате двух последовательных мейотических делений, из одной клетки с диплоидным набором хромосом образуются четыре клетки с гаплоидным набором. В зрелых гаметах число хромосом и количество ДНК вдвое меньше, чем в соматических клетках.

При образовании и мужских, и женских половых клеток происходят принципиально одни и те же процессы, хотя в деталях они несколько различаются. Существенным отличием мейоза при овогенезе является наличие специальной стадии — *диктиотены*, отсутствующей при сперматогенезе. Она наступает вслед за диплономией. На этой стадии мейоз в

овоцитах прерывается на многие годы и переход к диакинезу наступает лишь при созревании яйцеклетки.

Сходства и различия между митозом и мейозом.

Сходство процессов заключается в том, что биологическим смыслом каждого является деление генетического материала между дочерними клетками. Процессы митоза и мейоза лежат в основе деления клеток. Молекулярно-генетической основой каждого процесса является предварительное удвоение молекул ДНК — репликация. Сходными являются детали строения хромосом и цитологические механизмы деления генетического материала. Однако, процесс митоза и мейоза имеет много отличительных характеристик (табл.8).

Значение мейоза

1. Мейоз является одним из основных этапов формирования гамет.

2. Механизм мейоза уменьшает количество хромосом в гаметах до гаплоидного набора. При оплодотворении диплоидность хромосом восстанавливается в зиготе. Следовательно, мейоз поддерживает постоянное число хромосом одного вида из поколения в поколение. Если бы не происходило редукции числа хромосом при гаметогенезе, то из поколения в поколение возрастало бы их число, и был бы утрачен один из существенных признаков каждого вида — постоянство числа хромосом.

3. При мейозе образуется большое количество новых различных комбинаций негомологичных хромосом. Ведь в диплоидном наборе они двойного происхождения: в каждой гомологичной паре одна из хромосом от отца, другая — от матери. После мейоза хромосомы отцовского и материнского происхождения образуют в сперматозоидах и яйцеклетках большое количество новых сочетаний. А именно 2^n , где n — число пар хромосом. Следовательно, у организма, имеющего три пары хромосом, этих сочетаний окажется 2^3 , т. е. 8; у дрозофилы, имеющей 4 пары хромосом, их будет 2^4 , т. е. 16, а у человека — 2^{23} , что составляет 8388608.

Таблица 8

Различия между митозом и мейозом

Митоз	Мейоз
1. Митоз происходит в соматических клетках, а также в гаметогониях в период их размножения.	1. Мейоз происходит только в специальных клетках - гаметогониях на фазе созревания половых клеток.
2. Процесс включает только одно деление хромосом на отдельные хроматиды.	2. Процесс включает два последовательных деления. Во время М I расходятся гомологичные хромосомы. Во время М II каждая из гомологичных хромосом делится на отдельные хроматиды.
3. Репликация происходит перед каждым делением клетки.	3. Репликация происходит только перед первым делением мейоза.
4. Профаза короткая и не имеет отдельных стадий.	4. Профаза I очень длинная и подразделяется на лептотему, зиготему, пахинему, диплотему и диакinesis.
5. В профазе хромосомы сильно конденсированы и выглядят как двойные структуры	5. Во время начала профазы I хромосомы выглядят как единичные нити.
6. Не происходит образования хиазм, перекресте и кроссинговера.	6. Образуются хиазмы и происходит кроссинговер
7. Обе хроматиды каждой хромосомы имеют одинаковый аллельный состав.	7. После кроссинговера хроматиды имеют различный аллельный состав.
8. В результате деления центромер происходит разделение хромосом на две сестринские хроматиды.	8. Во время М I, происходит разделение набора хромосом на отдельные гомологичные хромосомы. Их пенгмеры не «делятся».
9. За кариокинезом следует цитокинез	9. После первого деления обычно не происходит цитокинеза. Он имеет место после завершения М II.
10. В результате деления образуется две клетки с идентичным диплоидным набором хромосом в генов.	10. В результате деления образуется четыре клетки (гаметы) с гаплоидным набором хромосом в различных вариантах аллельных генов.

4. В процессе *кроссинговера* происходит рекомбинация генетического материала. Практически все хромосомы, попадающие в гаметы, имеют видоизмененные участки. Этим достигается еще большая степень перекомбинации наследственного

материала. В этом одна из причин изменчивости организмов, дающей материал для отбора.

5. Дети никогда не выглядят и не ведут себя точно так, как их родители или братья и сестры, исключая только идентичных близнецов. Одна из причин этого удивительного *разнообразия* заключается в их хромосомах, не идентичных родительским или друг другу. Это связано с тем, что во время мейоза происходит «перетасовка» хромосом и рекомбинация генов. В результате этого каждое следующее поколение обладает некоторыми новыми признаками или их новыми комбинациями .

3.5. Принципы классификации хромосомной патологии

В основе классификации хромосомной патологии лежат три принципа.

Первый принцип – это характеристика хромосомной или геномной мутации с учетом конкретной хромосомы. Этот принцип называется этиологическим.

Второй принцип – это определение типа клеток, в которых возникла мутация (в гаметах или зиготе). Гаметические мутации ведут к поздним формам хромосомных болезней. У таких индивидов все клетки несут унаследованную с гаметой хромосомную аномалию. Если хромосомная аномалия возникает в зиготе или на ранних стадиях дробления (такие мутации называют зиготическими в отличие от гаметических), то развивается организм с клетками разной хромосомной конституции (два типа и более). Такие формы хромосомных болезней называют мозаичными. Для возникновения мозаичных форм, по клинической картине совпадающих с полными формами, необходимо иметь не менее 10% клеток с аномальным набором.

Третий принцип – это выявление поколения, в котором возникла мутация: возникла ли она заново в гаметах здоровых родителей (спорадические случаи) или родители уже имели такую аномалию (наследуемые, или семейные, формы). О наследуемых хромосомных болезнях говорят в тех случаях, когда мутация имеется в клетках родителя, в том числе и в гонадах. Это могут быть и случаи трисомии. Большая же часть

наследуемых случаев хромосомных болезней связана с наличием у здоровых родителей Робертсоновских транслокаций, сбалансированных реципрокных транслокаций между двумя (реже более) хромосомами и инверсий. Клинически значимые хромосомные аномалии в этих случаях возникли в связи со сложными перестройками хромосом в процессе мейоза (конъюгация, кроссинговер).

Таким образом, для точной диагностики хромосомной болезни необходимо определить: 1) тип мутации; 2) вовлеченную в процесс хромосому; 3) форму – полная или мозаичная; 4) вид болезни – спорадический случай или наследуемая форма.

Хромосомные аномалии вызывают нарушение общего генетического баланса, поэтому патологические эффекты хромосомных и геномных мутаций проявляются на всех стадиях онтогенеза, и, возможно, даже на уровне гамет, влияя на формирование последующих. Главные эффекты хромосомных аномалий появляются в двух связанных вариантах: летальности и врожденных пороках развития. Предполагают, что 30-40% оплодотворенных яйцеклеток погибает на стадии зиготы-бластоциты, то есть до имплантации. В этих случаях речь идет о резких нарушениях ранних морфогенетических процессов, так как нарушение геномного баланса приводит к дискоординации включения и выключения генов в соответствующей стадии развития или соответствующем месте бластоцисты.

Фенотипическое проявление хромосомных аномалий зависит от следующих факторов: 1) индивидуальности вовлеченной в аномалию хромосомы или ее участка (специфический набор генов); 2) типа аномалии (трисомия, моносомия, полная, частичная); 3) размера недостающего (при делеции) или избыточного (при частичной трисомии) материала; 4) степени мозаичности организма по абберрантным клеткам; 5) генотипа организма; 6) условий среды (внутриутробная или постнатальная).

Значение хромосомных aberrаций.

Врачам акушер-гинекологам необходимо обратить внимание не только на период беременности, но и на период

предшествующий – период образования гамет со всеми факторами, способными нарушить нормальный процесс распределения хромосом при образовании половых клеток. Особое значение приобретают и первые дни развития оплодотворенного яйца. С повышением возраста матери возрастает не только частота болезни Дауна у младенца, но и частота заболеваний, связанных с нерасхождением половых хромосом при редукционном делении и после оплодотворения. Несмотря на совершенно очевидную роль хромосомных аномалий в эмбриопатиях, гинекологи долгое время не придавали достаточного значения хромосомным абберациям. В настоящее время интенсивно развиваются методы дородовой диагностики ХА, а их использование в практическом здравоохранении позволяет предупредить рождение детей с тяжелой патологией. Предпринимаются попытки полностью отказаться от биохимического скринингового обследования беременных и заменить его более углубленным и расширенным ультразвуковым исследованием. Наши врачи акушер-гинекологи должны быть вооружены знаниями методических подходов пренатальной диагностики (ПД) хромосомопатий, а также принципиально новых направлений диагностики наследственных заболеваний.

3.6. Хромосомные болезни, связанные с нарушением аутосом

3.6.1. Лишняя 21-я хромосома. Синдром Дауна (СД)

Самая известная и самая распространенная форма хромосомной патологии у человека – синдром Дауна (СД). Один из характерных признаков этого заболевания – специфический монголоидный разрез глаз, поэтому английский врач Л. Даун, впервые выделивший и описавший эту патологию в 1866 году, дал ей название монголизм, или монголоидный идиотизм.

Известно, что частота рождения детей с синдромом Дауна тесно связана с возрастом родителей: чем они старше, тем риск выше, причем особенно это касается матерей. У женщины в возрасте 40 лет индивидуальный риск выявления у плода

синдрома Дауна (СД) на 16-й неделе беременности равняется 1: 110, тогда как у 25-летней беременной – 1:1350 (табл. 9).

В связи с этим оправданным является формирование группы риска беременных женщин старше 35 лет, проведение им инвазивных исследований и определение кариотипа плода.

Таблица 9

Риск синдрома Дауна зависимо от возраста матери
(N.J.Wald, 1999)

Возраст матери	Риск синдрома Дауна
До 25	1:1500
	1:1350
	1:1300
	1:1200
	1:1100
	1:1000
	1:910
	1:800
	1:680
	1:570
	1:470
	1:380
	1:310
	1:240
	1:190
	1:150
	1:110
	1:85
	1:65
	1:50
	1:35
	1:30
	1:20
	1:15
	1:11
	1:8
	1:6

Известно, что большая часть трисомий хромосомы 21 обусловлена нерасхождением в I мейотическом делении оогенеза. Методы ДНК-диагностики позволяют определить материнское или отцовское происхождение лишней хромосомы. Доказано, что в 86-95% случаев имеет место материнское нерасхождение хромосом, в 5-10% – отцовское.

Диагностика болезни Дауна у новорожденного в большинстве случаев не вызывает затруднений. Эти больные настолько похожи друг на друга, что говорят не о диагностике, а об «узнавании» этой хромосомной аномалии. Чаше при этом синдроме имеются брахицефальный череп со сглаженным затылком и уплощенным лицом, косой разрез глаз (наружный угол выше внутреннего), гипертелоризм, расширенное и уплощенное переносье, маленькие недоразвитые ушные раковины, расположенные низко, верхняя челюсть недоразвита (рис.51).

Увеличенный «складчатый» язык нередко выступает изо рта. Высокое нёбо, неправильный рост зубов, диастема, поперечная исчерченность на губах. У большинства больных – короткая шея, широкие кости с короткими пальцами и укороченными искривленными V пальцами (клиндактилия), расширенные промежутки между I и II пальцами стоп. Встречаются и другие аномалии: синдактилии, деформации грудины, укорочение трубчатых костей, гипоплазия таза. Специфическим признаком болезни Дауна является низкий хриплый голос. Рост больных ниже среднего, осанка нарушена: плечи опущены, голова и туловище при ходьбе наклонены вперед. Кожа обычно сухая, на лице нередко шелушащаяся, щеки с характерным румянцем. Довольно часто можно обнаруживать недоразвитие наружных половых органов, пупочные и паховые грыжи, расхождение прямых мышц живота. Встречаются врожденные пороки сердца, желудочно-кишечного тракта.

Для болезни Дауна характерны такие дерматоглифические особенности, как поперечная борозда на одной или на обеих ладонях, одна сгибательная борозда на V пальце, дистальное расположение осевого трирадиуса, частота ульнарных петель выше, а завитков на пальцах – ниже, чем в популяции (табл. 3).

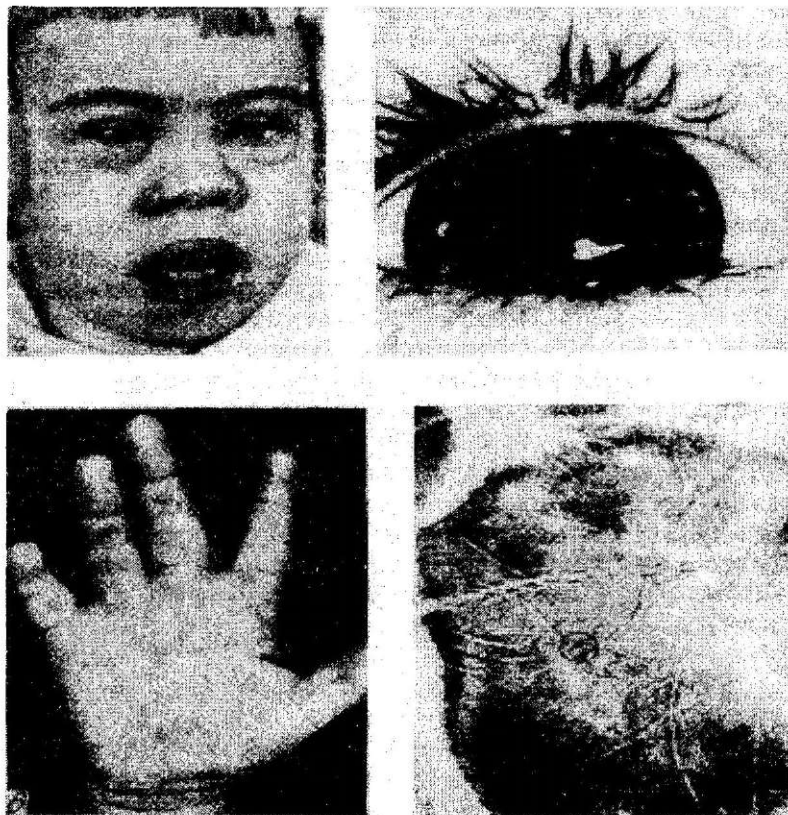


Рис. 51. Синдром Дауна

- а – типичное строение лица (открытый рот);
б – пятна на радужной оболочке;
в – короткие, толстые пальцы, согнутый мизинец;
г – линии ладони: поперечная складка в центре и сдвинутый дистально трирадиус (из Knudson, 1965).

Среди неврологических симптомов отмечаются мышечная гипотония, нарушение функции вестибулярного аппарата, недостаточная моторика.

Умственная отсталость при полной трисомии 21 обнаруживается практически у всех больных, причем в основном это олигофрения в степени имбицильности (65-90%).

У остальных больных диагностируется дебильность и идиотия в одинаковом соотношении.

Недоразвитие интеллекта тотальное. Мышление больных тугоподвижно, эмоции поверхностны, малодифференцированы. Дети, как правило, ласковы, добродушны, привязчивы, хорошо усваивают несложные житейские понятия и навыки.

Таблица 10

Дерматоглифические особенности у лиц с хромосомными нарушениями

Хромосомные заболевания	Дерматоглифические особенности
1. Трисомия 13. Синдром Патау	Наличие рисунка в области тенара. Резкое дистальное смещение осевого трирадиуса. Наличие поперечной 4-х пальцевой борозды.
2. Трисомия 18. Синдром Эдвардса.	Преобладание дуговых узоров на пальцах. Часто наличие варианта 4-х пальцевой поперечной борозды. Дистальное смещение осевого трирадиуса 81°.
3. Трисомия 21. Болезнь Дауна.	Преобладание на пальцах ульнарных петель. Наличие поперечной 4-х пальцевой борозды. Дистальное смещение осевого трирадиуса 81°.
4. Синдром «кошачьего мурлыканья».	Преобладание на пальцах завитков и дуг. Дистальное смещение трирадиуса 61°. Отсутствие или редукция пальцевого трирадиуса С. Наличие варианта поперечной 4-х пальцевой борозды.
5. Синдром Шерешевского-Тернера – 45, XO	Преобладание на пальцах завитков и петель. Дистальное смещение осевого трирадиуса 66°. Увеличение гребешкового счета. Отсутствие или редукция пальцевого трирадиуса С. Ульнарное смещение пальцевого трирадиуса В.
6. Синдром Клайнфельтера – 47, XXУ	Преобладание на пальцах дуг. Снижение гребешкового счета. Проксимальное смещение осевого трирадиуса. Увеличение гребешкового счета между пальцевыми трирадиусами а и в.

При болезни Дауна интеллектуальный дефект усугубляется с возрастом больных. Среднее IQ у детей 10 лет и старше составляет всего 24.

При мозаичном варианте болезни Дауна значительно чаще встречается легкая умственная отсталость, описан и нормальный интеллект.

Наиболее частой цитогенетической формой болезни Дауна является простая (регулярная) трисомия – 90–93% случаев, 3–4% больных имеют транслокационный вариант и 3–4% – мозаичный вариант болезни. В последнее время обнаружение

частичной трисомии 21 у ряда больных с фенотипом болезни Дауна показало, что все особенности клинического симптомокомплекса связаны с трисомией определенного небольшого сегмента длинного плеча хромосомы 21–21q22. При частичной трисомии 21, не включающей этого участка, больные имеют умственную отсталость с неспецифической клиникой.

Иногда 21-я хромосома целиком присоединяется к 15-й хромосоме, и тогда хромосом в клетке будет лишь 45 (сбалансированная транслокация).

Следует обратить внимание еще на одно обстоятельство: у пожилых матерей дети с синдромом Дауна имеют, как правило, истинную трисомию – 47 хромосом, у молодых матерей – транслокационную форму (табл. 11).

Почему же добавочный участок 21-й хромосомы приводит к таким тяжелым последствиям. Удалось установить местоположение многих генов в 21 хромосоме: обнаружен ген, кодирующий ферменты для синтеза пуринов. Так очень многие симптомы заболевания можно объяснить трисомией по этому гену. В сыворотке крови у больных при СД выявляется повышенное содержание пуринов. Известно, что такая концентрация пуринов уже сама по себе приводит к умственной отсталости, неврологическим расстройствам, дефектам иммунной системы. В том же участке, кроме пуринового, находится ген супероксиддисмутазы – фермента, обезвреживающего некоторые опасные продукты кислородного обмена. По существующим предположениям изменение концентрации этого фермента является причиной относительно высокой скорости старения.

Лечение. Больным назначают психостимуляторы, нейрометаболические препараты, общеукрепляющую терапию. Применяется сидикарб по 10–15 мг/сут., аминалон по 250–500 мг/сут., энцефабол по 100–150 мг/сут., пантогам по 250–500 мг/сут., пирацетам по 400–800 мг/сут. Длительность лечения каждым препаратом 2–3 мес. Показана витаминотерапия (В₁, В₆, В₁₂), лечение гормональными препаратами – тиреоидин по 0,05–0,2 мг/сут., крефизон по S–1 ампуле в день, на курс 30 инъекций.

3.6.2. Нарушения в других парах хромосом

В 1960 г. Дж.Эдвардс с сотрудниками описали новый синдром, связанный с увеличением количества хромосом. Синдром Эдвардса – заболевание еще более тяжелое, чем монголизм. Каковы же его внешние проявления?

Обычно у детей узкий лоб и широкий выступающий затылок, а в ряде случаев – гидроцефалия, неправильной формы ушные раковины; постоянный признак – значительное недоразвитие нижней челюсти (рис.52).

Имеется ряд нарушений грудной клетки, уродливо развиты многие внутренние органы, на ладони специфические складки, резко отличающиеся от складок здоровых людей.

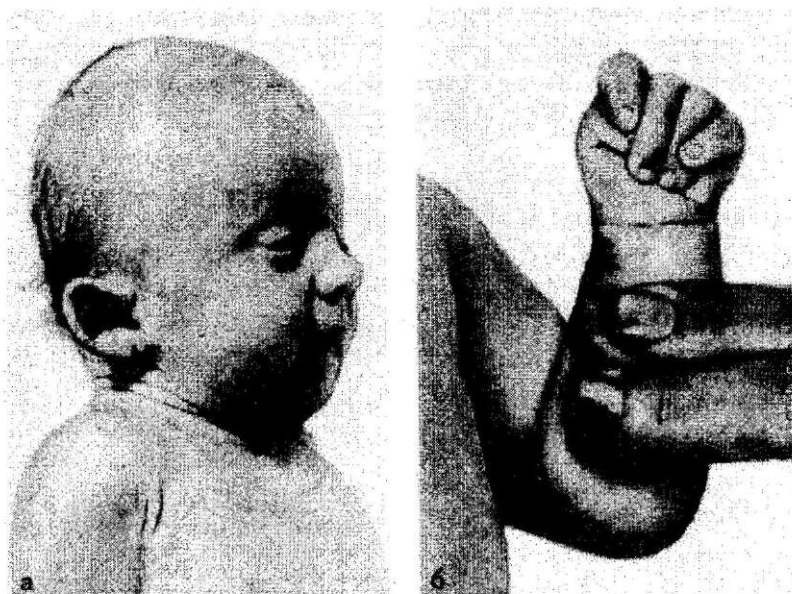


Рис.52. Синдром трисомии хромосомы 18.
а – черепно-лицевые аномалии; б – кисть того же больного (характерное расположение пальцев).

Причиной смерти детей с синдромом Эдвардса почти всегда становится сердечная недостаточность или инфекцион-

ные заболевания. При мозаичных формах болезни продолжительность жизни несколько увеличивается, но у таких детей выявляется тяжелая идиотия. На вероятность появления синдрома Эдвардса влияет возраст матери примерно так же, как и при СД; и это вполне объяснимо, поскольку причины синдромов в обоих случаях одинаковые – нерасхождение хромосом в мейозе. Средний возраст матерей – 32,5 года, отцов – 35 лет.

Дерматоглифическая картина имеет несколько отличительных признаков: большая частота дуг на подушечках пальцев рук (примерно в 10 раз выше), нередко отсутствует дистальная сгибательная складка на пальцах, у трети больных обнаруживается поперечная ладонная борозда, гребневый счет увеличен, осевой трирадиус обычно расположен дистально (табл.10).

При цитогенетическом обследовании в 80% случаев находят трисомию 18, у 10% больных – мозаицизм. Описаны случаи транслокационного варианта, двойной анеуплоидии типа 48, XXУ18⁺.

Но что с трудом поддается истолкованию, так это зависимость частоты рождения больных от времени года, когда произошло зачатие: в большинстве случаев больные с этим синдромом рождаются с января по июнь. Голландский ученый Джонблат выдвинул гипотезу, согласно которой в женском организме на момент зачатия может наблюдаться гормональная недостаточность, из-за чего происходит внутрифолликулярное перезревание ооцитов. Если такой перезревший ооцит будет оплодотворен, то весьма вероятно, что в образовавшейся зиготе можно обнаружить хромосомные нарушения. Важно еще и то, что гормональная недостаточность, как правило, возникает в периоды смены сезонов года.

3.6.3. Синдром Патау

В 1960 году был описан еще один синдром множественных врожденных пороков, связанных с трисомией одной из соматических хромосом, а именно – 13-й. Частота синдрома среди новорожденных составляет 1: 7000. Оба пола поражаются с равной частотой.

Первичный диагноз может быть поставлен сразу после рождения: сочетание аномалий сердца, почек, микроцефалия, низко расположены и неправильной формы уши (рис. 53).

Одним из частых признаков синдрома является «заячья губа» и «волчья пасть». Аномалии со стороны костно-мышечной системы отмечаются в виде полидактилии.



Рис. 53. Синдром трисомии хромосомы 13.
а – аномалии лица; б – двусторонняя полисиндактилия стоп.

Дерматоглифические изменения заключаются в поперечной ладонной складке, дистальном расположении осевого трирадиуса, повышенной частоте радиальных петель и дуг на 1 пальце руки, частота узоров на тенаре повышена (табл. 10). Продолжительность жизни таких детей небольшая – три-четыре месяца.

Синдром Патау встречается в двух цитогенетических вариантах. В одних случаях речь идет о простой трисомии, в других – о робертсоновской транслокации D/13. Соотношение между этими вариантами 1:8, т.е. транслокации встречаются реже.

Помимо этого в клинической практике могут встречаться случаи, не совсем типичные для «классического» варианта. Это объясняется существованием менее распространенных генетических форм синдрома (мозаицизм, реципрокные транслокации, инверсии, изохромосомы и др.).

Таблица 11

Хромосомные болезни, связанные с нарушением аутосом

Название болезни	Пол	Частота среди эмбрионов, имеющих развитие (округленно в %)	Частота среди новорожденных (округленно в %)	Число хромосом	Аномальная группа хромосом	Главная патологическая особенность	Экспресс-метод диагностики
Болезнь Дауна	М, Ж	0,16	0,16	47	Трисомия 21	Олигофрения, конституциональные дефекты	-
Транслокационная болезнь Дауна	М, Ж		Несколько процентов среди детей с болезнью Дауна	46 (с транслоцированной частью хромосомы 21)	21 + другая хромосома	Наследование болезни Дауна и частые аборт в семье больного	-
Мозаичная болезнь Дауна	М, Ж		Несколько процентов среди детей с болезнью Дауна	47/46	Мозаичность, трисомия 21, дисомия 21	Частичная симптоматология болезни Дауна	-
Триплоидия	М, Ж	0,08	0,001	69	Триплоидность	Эмбриолетальность. Выживание при мозаичности	-
Синдром трисомии по хромосомам 1-20, 22	М, Ж	2,8	0	47	Трисомия по одной из хромосом 1-20, 22	Эмбриолетальность	-
Синдром моносомии по хромосомам 1-22		3,3	0	45	Моносомия по одной из хромосом 1-22	Ранняя эмбриолетальность	-
Синдром трисомии (17 или 18) (трисомия E)	М, Ж	0,2	0,02	47	Трисомия по одной из хромосом 17 или 18	Эмбриолетальность; в редких случаях рождение множественные уродства	Аномалии папиллярных линий и линий ладони
Синдром трисомии 13 (14 или 15) (трисомия D)	М, Ж	0,15	0,007	47	Трисомия по одной из хромосом 13, 14 или 15	То же	Поперечная ладонная складка, дистальный осевой тридактилус

Дети с синдромом Патау имеют настолько характерную внешность, что предположительный диагноз может быть поставлен еще до проведения цитогенетического исследования. При более детальном клиническом обследовании, помимо так называемых стигм эмбриогенеза или малых аномалий развития, обнаруживаются грубые уродства глаз (офтальмия, микрофтальмия и др.), черепа, внутренних органов.

В зависимости от состояния срединных лицевых структур выделяются два варианта синдрома Патау: тип I с хейлогнато-

палатосхизмом и пороками развития головного мозга (прозэнцефалическая группа) и тип II – без расщелины лицевых структур. Таким образом, для синдрома Патау свойствен клинический полиморфизм. Относительно особенностей центральной нервной системы (ЦНС) при этом синдроме известно немного: агенезия мозолистого тела, гидроцефалия, расплавление базальных ганглиев, гипоплазия мозжечка, менингомиелоцеле.

3.6.4. Синдром «Кошачьего Крика», синдром 5p-

Частота данной патологии среди новорожденных составляет 1:50000. Соотношение полов: М : Ж соответственно 1 : 1,6, то есть преобладают девочки. Описан в 1963 г. Леженом.

Делеция короткого плеча 5-й хромосомы. Основными фенотипическими признаками синдрома являются низкая масса тела при рождении, микроцефалия, круглое «лунообразное» лицо, антимонголоидный разрез глаз, эпикант, гипертелоризм, косоглазие, катаракта, атрофия зрительных нервов, плоская спинка носа, высокое нёбо, у части больных с расщелиной.

Патогномоничным симптомом является своеобразный крик при рождении, напоминающий крик кошки. Последний связан с изменениями гортани (уменьшение надгортанника, сужение гортани, отечность слизистой оболочки). Отмечается глубокая умственная отсталость (имбецильность и идиотия), глубокое недоразвитие речи, выраженная задержка физического и моторного развития, парезы конечностей.

Длительность жизни больных зависит от того, насколько тяжело поражены их внутренние органы: известны случаи, когда такие больные доживали до 10, 20 и даже 30 лет. Умирают больные с этим синдромом по тем же причинам, что и при других хромосомных болезнях, от сердечной недостаточности или инфекций.

Делеция участка 18-й хромосомы приводит к тяжелой умственной отсталости, аномалиям внутренних и внешних органов. Известны делеции 4-й, 21-й, 22-й и некоторых других хромосом, влияющие на появление различных дефектов развития. Нехватка наследственного материала приводит к более тяжелым последствиям, чем его избыток.

3.6.5. Болезни геномного импринтинга. Синдром Прадера-Вилли (СПВ), Синдром Ангельмана (СА)

СПВ является одним из распространенных синдромов множественных аномалий развития, основными диагностическими признаками которого служат ожирение, мышечная гипотония, низкий рост, гипогонадизм, умственная отсталость различной степени выраженности и множественные признаки дизэмбриогенеза (рис. 54). Основными диагностическими признаками СА являются микробрахицефалия с уплощенным затылком, большая нижняя челюсть, макростомия, гипопигментация, задержка умственного и моторного развития (рис. 55). Характерны неврологические проявления: атаксия, гипотония, судорожная готовность, гиперрефлексия и гиперкинезия, приступы неконтролируемого смеха; хлопанье в ладоши.

Частота синдромов составляет 1 на 10 000 живых новорожденных. СПВ и СА в 60–75% случаев сопровождаются разнообразными хромосомными перестройками в районе хромосомы 15 (q11.2–q13), связанными с дисбалансом хромосомного материала, что позволяет считать эти заболевания самыми частыми микроделеционными синдромами. Делеция при СПВ возникает в отцовской хромосоме, и при СА – в материнской (рис. 55). Значительный вклад в генез СПВ и СА вносит *импринтинг*, представленный на молекулярном уровне однородительской дисомией и аномалиями метилирования отцовских или материнских генов, расположенных в критическом районе. Наличие только одной копии или двух гомологичных копий этого района, но унаследованных от одного из родителей, не обеспечивает нормального развития и приводит к заболеванию

Генетический импринтинг - молекулярно-генетический процесс, дифференциально «выключающий» экспрессию генов хромосом одного из родителей. Таким образом, обнаруживается моноаллельная (а не биаллельная) экспрессия генов, т.е. экспрессируется только отцовский или только материнский аллель. Это обуславливает отклонение от менделевских законов, согласно которым вклад каждого из

родителей в наследственность потомков равнозначен. Таким образом, фенотипические проявления конкретного гена могут

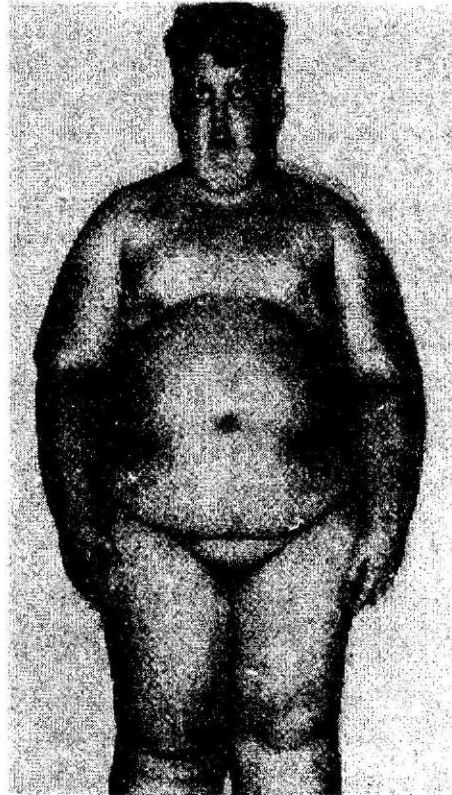


Рис.54. Больной с синдромом Прадера-Вилли, вызванный микроделецией отцовской хромосомы 15.

меняться не только вследствие его мутации, но и в результате избирательного выключения экспрессии. Наиболее вероятным механизмом импринтинга является *специфическое метилирование цитозиновых оснований ДНК*, которое выключает транскрипцию гена. У человека известно около 30 генов, подверженных импринтингу и имеющих тканеспецифичную моноаллельную экспрессию. Некоторые из них имеют прямое отношение к наследственной патологии (опухоли, синдромы

Прадера-Вилли, Ангельмана и др.). Генетический импринтинг может проявляться не только на уровне гена или кластера генов. Он может затрагивать целую хромосому (аллельное исключение X хромосом у женщин) и даже геномы.

Обследование методами высокоразрешающей цитогенетики показало, что почти 70% пациентов с СПВ имели структурные перестройки критического района хромосомы 15 (q11.2–q13), представленные микроделециями, транслокациями, пара- и перичентрическими дупликациями. В настоящее время диагностический алгоритм указанных выше синдромов состоит из кариотипического анализа, анализа метилирования критического района с использованием ПЦР и микросателлитного анализа, позволяющего определять микроделеции и однородительскую дисомию.



Рис. 55. Больная с синдромом Ангельмана. Дефект унаследован с материнской хромосомой 15.

3.6.6. Другие микроцитогенетические синдромы

Вышеприведенные синдромы, обусловленные незначительными делециями или дупликациями строго определен-

ных участков хромосом, называют микроделеционными и микродупликационными синдромами.

Пока еще не установлено, что лежит в основе развития микроцитогенетических синдромов – отсутствие структурного гена или более протяженного участка, включающего конкретный ген. Природа клинических проявлений этих синдромов различна. Патологический процесс у некоторых из них разворачивается через активацию онкогенов. Клиника других синдромов обусловлена не только делециями, но и явлениями хромосомного импринтинга однородительских дисомий.

Клинические проявления микроцитогенетических синдромов варьируют в связи с разной протяженностью делеции или дупликации, а также в связи с родительской принадлежностью микроперестройки – унаследована она от отца или от матери (как в случае синдрома Прадера-Вилли).

На рис. 56 изображена транслокация района 10-й хромосомы на короткое плечо 3 хромосомы. Присутствие $der(3)t(3;10)(p25;q24.3)$ более чем в двух третях клеток приводит к мозаицизму по частичной моносомии 3p (дистальная часть района 3p25) и частичной трисомии 10q (район 10q24.3→qter). Приведенный случай является примером частичной трисомии 10q и частичной моносомии 3p, возникшими *de novo*. Мозаицизм по присутствию аномальной хромосомы, высокий процент клеток клона с хромосомой 3p+, значительные отклонения в развитии ребенка указывают на то, что реорганизация хромосом имеет место на ранних этапах эмбрионального развития. Механизм формирования данной хромосомной перестройки неясен. В качестве одного из возможных предположений, объясняющий появление аномального клона, можно предложить транслокацию хромосомного материала 3-й и 10-й хромосом с последующим нарушением расхождения хромосом в митозе, приведшим к потере $der(10)$ и унипарентной родительской дисомии нормальной хромосомы 10.

Трисомия части длинного плеча 10-й хромосомы уже была описана у нескольких десятков пациентов. В описанных случаях она являлась следствием сбалансированной транслокации у

одного из родителей. Описаны случаи возникновения частичной трисомии 10q de novo. Отмечается высокая частота возникновения обменов хромосомы 10 именно в районе 10q24. Описаны случаи транслокации хромосомы 10 с хромосомами 2, 4, 6, 7, 9, 11, 13, 14, 15, 17 и 22. Следует отметить, что в районе 12q24 локализовано большое число генов, ответственных за различные нарушения онтогенеза, нейрологические аномалии, метаболизм гормонов, повышенную чувствительность к ряду заболеваний, вызываемых факторами внешней среды, и опухолегенез.

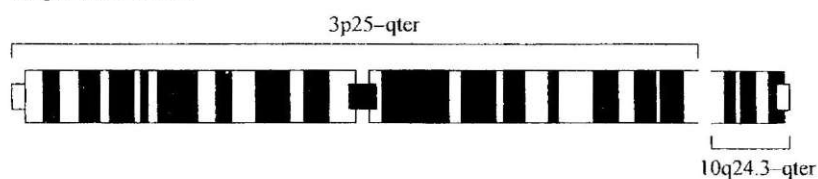


Рис. 56 Идиограмма хромосомы 3p+

У пациентов имеется ряд совпадающих с синдромом дистальной 10q трисомии стигм, в частности, микроцефалия, эпилепсия, узкое лицо, клювовидный нос с узкими ходами, рот «карпа», диспластичные уши, редкие неправильно растущие зубы, высокое небо, деформированные нижние конечности и сандалевидная щель.

3.7. Хромосомные болезни, связанные с нарушением половых хромосом

Количественные и структурные нарушения в половых хромосомах, а следовательно, и аномалии, связанные с ними, встречаются и у новорожденных, и у взрослых людей даже чаще, чем нарушения во всех соматических хромосомах вместе взятых. Связано это с различными причинами, но в первую очередь - с тем, что часто дефекты половых хромосом не приводят к значительному снижению жизнеспособности, как это наблюдается с соматическими: даже отсутствие одной из половых хромосом в определенных случаях совместимо с

жизнью. В табл. 12 приведены хромосомные болезни, связанные с нарушением половых хромосом.

3.7.1. Синдром полисомии X

Описан Г.Клайнфельтером в 1942 г. Эта хромосомная патология бывает довольно часто: 1:500 новорожденных мужского пола. Среди мужчин, страдающих бесплодием, более 10% имеют дополнительную X-хромосому. Средний возраст родителей при рождении ребенка с синдромом Клайнфельтера повышен: 35,5.

Изменения в кариотипе 46,XY могут касаться отдельно X- или Y-хромосомы. Известны различные генетические варианты:

Полисомия X-хромосомы. Сюда относятся кариотипы 47, XXY; 48, XXXY и 49, XXXXY (табл. 12).

При кариотипе 47, XXY наличие болезни можно и не заподозрить вплоть до наступления возраста полового созревания. И только по мере развития организма начинает проявляться недостаточная гормональная активность мужских половых желез. Узкие плечи и широкий таз, отложение жира происходит по женскому типу, иногда начинают формироваться молочные железы (рис. 57), наружные половые органы несколько уменьшены в размерах, но, главное, в семенной жидкости отсутствуют сперматозоиды. Умственное развитие при кариотипе 47, XXY нередко практически нормальное. Наличие трех X-хромосом (48, XXXY) обычно уже сочетается со значительной умственной отсталостью.

Известно, что в раннем возрасте диагностика синдрома Клайнфельтера затруднена из-за отсутствия четких клинических симптомов. У 15% больных с синдромом Клайнфельтера наблюдают олигофрению, обычно в степени дебильности, что не может считаться постоянным диагностическим критерием. Чаще, чем в популяции, у детей с кариотипом 47, XXY встречаются речевые нарушения. Для пациентов с синдромом Клайнфельтера характерны деформации ушных раковин, алопеция, катаракта, прогнатизм, поперечная ладонная складка, радиоульнарный синостоз, сколиоз, неврологические нарушения, пороки сердца, но эти

признаки не имеют диагностического значения. Основные клинические признаки синдрома проявляются в пубертатном возрасте, одним из них является гинекомастия, связанная с повышенной продукцией эстрогенов интерстициальными клетками Лейдига и обнаруживаемая у j больных. Наружные половые органы обычно сформированы по мужскому типу и нередко имеют нормальные размеры. Микроорхизм является одним из важных клинических критериев синдрома.

Таблица 12

Хромосомные болезни, связанные с нарушением половых хромосом

Название болезни	Пол	Число хромосом	Аномальная группа хромосом	Главная патологическая особенность	Экспресс-метод диагностики
Синдром Клайнфельтера	М.	47	XXY	Евнухоидизм, вялость, пониженный интеллект	Половой хроматин у мужчины
Сверх-Клайнфельтер	М.	48, 49	XXXУ XXXXУ	Идиотия, евнухоидизм.	Наличие двух (при XXXУ) и трех (при XXXУ) половых хроматин у мужчины
Трисомия X	Ж.	47	XXX	Издавка слабоумие или бесплодие	Два половых хроматина во многих клетках
Тетрасомия X	Ж.	48	XXXX	Идиотия	Наличие трех половых хроматинов в некоторых клетках у женщины
Синдром Шерешевского-Тернера	Ж.	45	XO	Большой частью гибель на стадии плода; карликовость, бесплодие	Отсутствие полового хроматина у женщины, малый рост
Атопический синдром Шерешевского-Тернера	Ж.	45, 46 и др.	Мозаичность XO/XX и др.	Бесплодие	-
Синдром Штейна-Левенталя	Ж.	46; 45/46/47 и др.	Мозаичность XO/XX/XXX и др.	Бесплодие	-
Истинный гермафродитизм	М., Ж	45/46; 46/47	Мозаичность XO/XY; XX/XXY и др.	Бесплодие	-

Известно также, что добавочные хромосомы X в мужском кариотипе (полисомия X) ведут к грубой задержке психического развития и широкому спектру врожденных пороков и микроаномалий. Так, кариотип 49,XXXXY, например, приводит к комплексу резко выраженных нарушений:

пренатальной гипотрофии, задержке роста, лицевым аномалиям (гипертелоризм, эпикант, косоглазие, близорукость, уплощение спинки носа, деформация ушных раковин, прогнатизм), клинодактилии мизинцев, плоскостопию, недоразвитию и видоизменению половых органов.

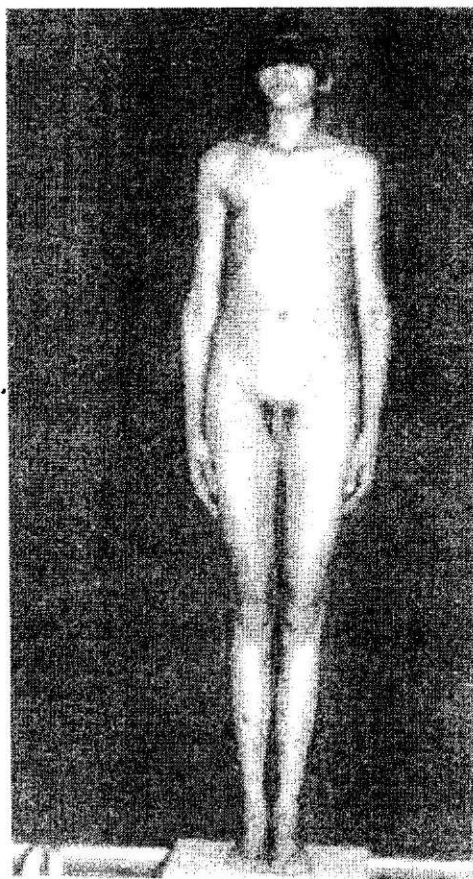


Рис. 57. Синдром Клайнфельтера. Высокий рост, непропорционально длинные конечности при синдроме XXY .

Практически у всех больных выявляются гипогонадизм и крипторхизм. Отчетливо выражена дисгенезия гонад: отсутствие половых и гипоплазия интерстициальных клеток. Больные с кариотипом $49, \text{XXXXY}$ страдают глубокой олигофренией,

их IQ в среднем достигает лишь 40, тогда как соответствующий показатель в случаях классического типа синдрома Клайнфельтера с кариотипом 47, XXУ может превышать 80–90. К настоящему времени описано более 100 случаев данной патологии, причем в большинстве из них установлено материнское происхождение всех четырех хромосом X.

Мозаичные формы заболевания характерны для синдромов с аномалиями половых хромосом, в том числе и для синдрома Клайнфельтера. Эти формы определяются присутствием в организме человека клона клеток, отличного от нормального набора хромосом (наличие в организме двух и более клеточных линий с разным числом и/или структурой хромосом). Мозаицизм встречается в виде численных аномалий (анеуплоидий) и структурных перестроек гоносом и аутосом, часто в сочетании с нормальным клоном клеток. В генетической практике встречаются кариотипы, представленные двумя или более аномальными клеточными линиями. Характеризуя клиническое проявление мозаичных форм аномалий гоносом, можно сказать, что при них наблюдается менее выраженная картина синдромов.

В цитогенетической практике встречаются случаи с несколькими клеточными линиями – от 2 до 5.

Лечение синдрома Клайнфельтера, главным образом гормональное, предпочтительнее начинать с 10-12 лет, терапия препаратами мужских половых гормонов улучшает физическое состояние. Обычно назначают 1% или 5% растворы тестостерона пропионата по 0,5–1 мл внутримышечно 2–3 раза в неделю или сустанон – 250 по 0,5–1 мл раз в месяц, а также 5–10 мг метилтестостерона сублингвально 2–3 раза в день. Однако при этом необходимо помнить, что гормональное лечение повышает сексуальное влечение. Выраженную гинекомастию лечат хирургическим путем. При неглубоком интеллектуальном снижении применяют психостимуляторы и нейрометаболические препараты. Для стимуляции роста волос на лице используют растирки и мази, содержащие андрогены.

Риск повторного рождения ребенка с синдромом Клайнфельтера не превышает 1%, если кариотип родителей нормальный.

При трех лишних X-хромосомах симптомокомплекс отличается от классического синдрома Клайнфельтера, что некоторые клиницисты выделяют его в отдельный синдром – тетрасомию X.

3.7.2. Синдром Ретта

Синдром носит имя австрийского педиатра A.Rett, впервые давшего его описание в 1966 г. По мнению большинства исследователей, заболевание встречается преимущественно у девочек с относительно высокой частотой (1:10 000-15 000). Среди умственно отсталых девочек в России частота синдрома Ретта составляет 2,5%.

Принято считать, что тип наследования при синдроме Ретта X-сцепленный доминантный с летальностью у гемизиготных мальчиков. Большинство описываемых случаев заболевания – спорадические.

Клиническая картина синдрома включает умственную отсталость, замедление роста головы с развитием «приобретенной» микроцефалии, нарушение контакта с окружающими, утрату целенаправленных движений рук (апраксия) с заменой их на специфические стереотипные движения, напоминающие «мытьё рук», хлопки, сжимание, стискивание ладоней. Для патологии характерны также апраксия и атаксия при ходьбе, дыхательная дизритмия с чередованием апноэ и учащенного дыхания, бруксизм и в $\frac{2}{3}$ случаев – судороги. Заболевание характеризуется стадийностью течения, манифестируя в возрасте от 4 мес. до 2,5 лет. На первой стадии замедляется психомоторное развитие детей, вторая представляет собой период регресса приобретенных навыков, на третьей стадии происходит стабилизация состояния и на четвертой – прогрессируют двигательные нарушения.

При цитогенетическом исследовании у детей с синдромом Ретта обнаружены специфические нарушения процесса репликации инактивируемой хромосомы X, не встречающиеся в контроле. С учетом выявленных изменений разработан диагностический тест, основанный на феномене поздней репликации одной из хромосом X, определяемой по особому

типу сегментации этих хромосом. Однако такой метод приемлем для диагностики синдрома Ретта лишь у девочек – при наличии двух хромосом X.

При молекулярно-генетических исследованиях установлено, что у 65–75% девочек выявляются мутации в гене метил-СpG-связывающего протеина 2 (MeCP2), расположенного в участке *q28* длинного плеча хромосомы X. У здоровых лиц белок MeCP2 осуществляет контроль за работой генов, поддерживая их в неактивном состоянии. Предполагается, что повреждения этого белка влекут к активации в норме «молчащих» генов. В результате нарушается деятельность в первую очередь клеток центральной нервной системы и развивается синдром Ретта. Однако у $\frac{1}{3}$ детей с данной патологией ген MeCP2 не поврежден. Следовательно, заболевание, по-видимому, генетически гетерогенно. И возможно существование других генов, мутации которых ведут к развитию клинического симптомокомплекса синдрома Ретта.

Морфологические исследования биоптатов скелетных мышц у детей с синдромом Ретта выявили структурные изменения митохондрий. Обнаружены также метаболические аномалии, указывающие на митохондриальную дисфункцию.

Методы лечения синдрома Ретта сводятся к симптоматическим средствам.

Наличие синдрома Ретта у мальчиков обсуждается с момента описания патологии. К настоящему времени в мире известно уже 12 случаев заболевания у лиц мужского пола. Предполагается, что мутация, ведущая к синдрому Ретта, летальна для гемизиготных мальчиков, и они могут выжить только в случае существования дополнительной хромосомы X в клетках, как это бывает при синдроме Клайнфельтера.

Патологических изменений внутренних органов у больных не отмечалось. В неврологическом статусе обращает на себя внимание альтернирующее сходящееся косоглазие, гипотония мышц, апраксия движений рук, постоянные стереотипии, бруксизм, приступы гипервентиляции, отсутствие речи, аутичное поведение. Психологическое обследование обнаруживает грубое нарушение психического развития (коэффициент психического развития 23 ед.).

Наиболее сложным является проведение дифференциального диагноза с инфантильным аутизмом, основным признаком которого, как и для синдрома Ретта, является нарушение контакта с окружающими. Однако при инфантильном аутизме отмечают более позднюю манифестацию, не выявляют и характерных для синдрома Ретта стереотипий, потери ранее приобретенных навыков, двигательных и дыхательных расстройств. Предметная деятельность при инфантильном аутизме носит сложный характер, тогда как при синдроме Ретта ее диапазон значительно сужен.

Единичные случаи синдрома Ретта у мальчиков связаны с мозаицизмом по синдрому Клайнфельтера.

3.7.3. Хромосомы фрагильной X-синдром (синдром Мартина-Белла). Ломкость X-хромосомы в сегменте q 28.

Для больных с этим синдромом характерны умеренная или глубокая умственная отсталость; большие оттопыренные ушные раковины, выступающий лоб и массивный подбородок; макроорхизм. Встречаются ожирение, гинекомастия. С пубертатного периода выражен макроорхизм (рис.58).

Распространенность синдрома ломкой X-хромосомы составляет примерно 1:1200 у мальчиков и 1:2000 у девочек. Методами молекулярной генетики выявлен основной эпигенетический дефект при синдроме ломкой (фрагильной) X-хромосомы – увеличение числа нуклеотидных повторов CGG (цитозин-гуанин-гуанин) в локусе гена фрагильной X-хромосомы (FRAХ), выявление которых предложено использовать в качестве скрининг-теста на ломкую X-хромосому.

С мутациями генов X-хромосомы связано около 20 синдромов умственной отсталости.

Мозаицизм – индивиды обладают двумя или более клеточными линиями с разными генотипами, но происходящими из единой зиготы. Мозаицизм обычно появляется в результате митотического нерасхождения либо анафазного отставания.

Химеризм – присутствие у одного индивида клеток, происходящих из различных зигот. Различают три типа аномалий:

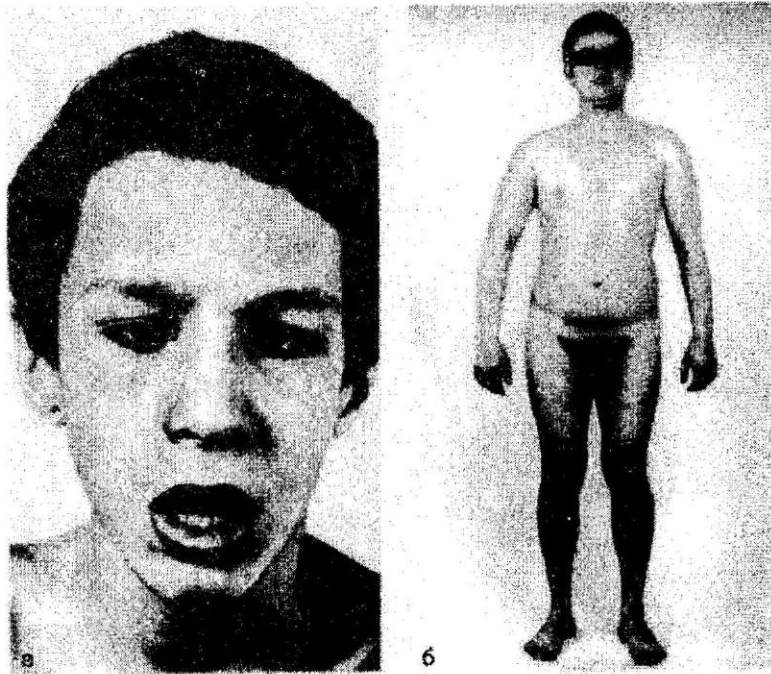


Рис. 58. Синдром хрупкой Х-хромосомы.
а – прямоугольное лицо, длинный нос, гиперплазия нижней челюсти; б – макроорхизм.

- ❖ химеризм клеток крови в результате обмена их между близнецами через плацентарные анастомозы;
- ❖ трансплацентарный химеризм вследствие взаимного обмена плодовыми и материнскими клетками крови;
- ❖ полный химеризм, связанный, по-видимому, со слиянием зигот и ответственный за развитие истинного гермафродитизма 46,XX/46,XY.

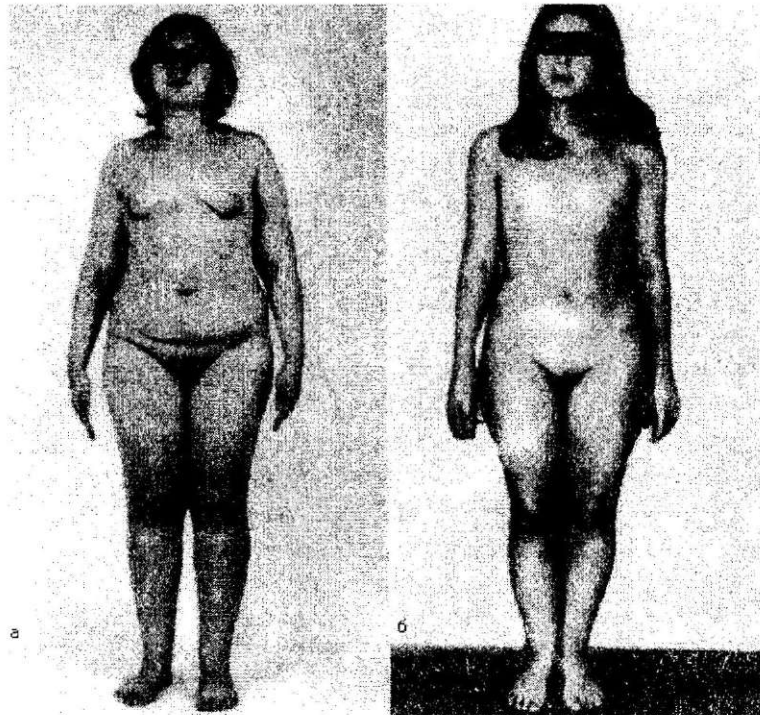


Рис. 59. Синдром тестикулярной феминизации – а; Дисгенезия гонад, XX-тип. Недоразвитие вторичных половых признаков. - б.

Гермафродитизм истинный. Кариотип обычно 46,XX, реже – 46,XY, 46,XX/46,XY или 46,XX/47,XXY. Гонады могут содержать одновременно тестикулярную и овариальную ткань (овотестис), рис. 59, 60. Этиология: 1) мозаицизм 46,XX/46,XY или 46,XX/47,XXY; 2) транслокация участка Y-хромосомы на X-хромосому или аутосоме; 3) гснная мутация.

При истинном гермафродитизме у человека имеются одновременно мужские и женские половые железы (рис. 60). Вторичные половые признаки при этой болезни обычно имеют смешанный характер, поскольку уровень выделения половых гормонов чаще соответствует среднему для мужчин и женщин (рис. 59). Как же у таких больных пол определен генетически, какие у них половые хромосомы? Однозначного ответа нет. Изредка у них встречаются различные формы мозаицизма:

XO/XY, XX/XXY. Почему же 46 хромосом, среди которых две X-хромосомы, имеются не только у женщин, но еще у некоторых бесплодных мужчин у большинства «истинных» гермафродитов?



Рис. 60. Дисгенезия гонад, XY-тип. Умеренная гинекомастия и недоразвитие вторичных половых признаков.

3.7.4. Синдром Шершевского-Тернера

Синдром Шершевского-Тернера (45, X0) – единственная форма моносомии у живорожденных детей – регистрируется в различных популяциях независимо от расового происхождения и географического распространения с частотой 1 на 2500 – 1 на 5000 новорожденных.

В 1925 году Н.А. Шершевским была описана больная – 20-летняя женщина, которая имела довольно необычные

сочетания эндокринных нарушений с врожденными аномалиями. Больная была маленького роста, у нее отсутствовали вторичные половые признаки, внешне она выглядела как 9-10 летняя девочка (такое явление называется половым инфантилизмом), а характерной чертой служила широкая кожная складка на шее (рис. 61). Гинекологическое исследование выявило недоразвитие яичников, яйцеводов и матки.

Оказывается, закладывается и развивается гонада абсолютно правильно, до начала четвертого месяца эмбриогенеза. Отличить нормальный яичник от яичника X0-эмбриона невозможно. Но с этого времени в половой железе начинают дегенеративные явления, и ткань яичника заменяется соединительной тканью. Причины моносомии следует искать, скорее всего, в самом зародыше: вторая половая хромосома теряется, видимо, при первых митотических делениях клеток зародыша. Возможно и другое допущение: теряется она во время оплодотворения, при образовании зиготы.

Генетические обследования многих больных выявляют и полную моносомию (45,X0), и мозаичные формы – 46,XX/45,X0 у больных с данным синдромом. Встречаются и другие варианты хромосомных аномалий у пациентов с синдромом Шершевского-Тернера: 46,Xi(Xq), 46,del(Xp), 46,del(Xq) и 46,Xi(Xp). Есть данные, что эти варианты хромосомной аномалии несовместимы с жизнью и все случаи на самом деле представляют собой 46,Xdel(Xq).

Наружные половые органы недоразвиты, отсутствуют или слабо развиты молочные железы, ареолы почти не пигментированы, втянутые соски широко расставлены, оволосение на лобке не выражено, почти всегда отсутствуют менструации.

Типично недоразвитие внутренних половых органов; влагалище длинное и узкое, матка гипопластична, шейка матки укорочена или раздвоена, на месте яичников – фиброзные тяжи с участками яичниковой ткани, содержащей примордиальные фолликулы. Вследствие недоразвития яичников отмечается эстрогенная недостаточность. Лобковое и подмышечное оволосение развивается поздно.

Пороки сердца диагностируют почти у четверти больных; чаще это коарктация аорты, стеноз легочной артерии, незаращение межжелудочковой перегородки, артериального протока. Реже можно обнаружить патологию почек.



Рис. 61. Синдром моносомии X-хромосомы.

а – выраженный шейный птеригизм, широкая грудная клетка, соски молочных желез гипопластичны и расположены снаружи от срединной ключичной линии;

б – кожные складки на шее.

При дерматоглифическом обследовании находят дистальное расположение осевого трирадиуса, поперечную ладонную складку, увеличение частоты узоров в области гипотенара, высокий гребневой счет (табл. 10).

Интеллектуальное развитие больных синдромом Шерешевского-Тернера в большинстве случаев нормальное или близкое к норме, но умственная отсталость встречается все же значительно чаще, чем в популяции, достигая в отдельных случаях олигофрении в степени имбецильности. Больным свойственны некоторые черты недоразвития эмоционально-

волевой сферы, они капризны, упрямы и в то же время повышено внушаемы, часто эйфоричны.

Дисгенетическая гонада, особенно в условиях гипергонадотропии, подвержена повышенному риску опухолевого роста. Риск оказывается особенно высоким при наличии клона, содержащего Y-хромосому, т.к., по-видимому, присутствие H-Y- антигена в эмбриогенезе сообщает рудиментарной гонадальной ткани чувствительность к гонадотропинам.

Диагноз синдрома Шершевского-Тернера подтверждается кариологическим исследованием. При этой аномалии в ядрах клеток слизистой оболочки рта обычно не обнаруживается полового хроматина, хотя у 20 % больных встречается хроматин положительный вариант синдрома. Это объясняется мозаицизмом.

Лечение направлено на увеличение длины тела и развитие вторичных половых признаков. Для этого назначают анаболические стероиды (нерабол, ретаболил и др.) в возрасте до 16 лет, а после 16 лет проводится длительная курсовая терапия эстрогенами: в течение 3 нед. Назначают этинилэстрадиол по 0,05–0,1 мг 2 раза в день, затем на неделю делают перерыв, во время второй половины курса – лечение этинилэстрадиолом. Гормональное лечение улучшает и психическое состояние больных. В 15 – 17 лет при достижении близкого к паспортному костного возраста показан переход на циклическую гормональную терапию.

В связи с повышенным риском опухолевого перерождения рудиментных гонад больные должны находиться на диспансерном учете с ежегодным УЗИ матки и половых желез. Лицам с наличием Y-содержащего клона показана лапаротомия с превентивным удалением гонадальных тяжей.

Прогноз для жизни благоприятный. Потомства больные не имеют, хотя опубликованы единичные наблюдения женщин с кариологически подтвержденным синдромом Шершевского-Тернера, родивших здоровых детей. Следует отметить, что синдром Тернера, по-видимому, служит основной причиной ранних выкидышей; 20% таких эмбрионов имеют генотип XO.

3.7.5. Трисомия X

Впервые описан Р.А. Jacobs с соавт. (1959). Больные с трисомией X рождаются, как правило, у более пожилых родителей. Среди новорожденных девочек данная аномалия встречается с частотой 1:1000 – 1:1200. Женщин, имеющих кариотип 47XXX, значительно больше среди пациенток психиатрических больниц, более 1% девочек, страдающих слабоумием, имеют эту хромосомную патологию.

Фенотипические проявления трисомии X разнообразны. Наиболее часто встречаются телосложение по мужскому типу, изменение формы и расположения ушных раковин, укорочение и искривление V пальцев, изменение формы черепа, гипертелоризм, эпикант, уплощенное переносье, высокое небо, неправильный рост зубов. Довольно часты различные аномалии внутренних органов, нарушение деятельности желез внутренней секреции.

При дерматоглифическом обследовании чаще, чем в норме, находят поперечную ладонную борозду, увеличение частоты дуг и снижение общего гребневого счета (табл.10).

Интеллектуальное снижение от пограничной умственной отсталости до различных степеней олигофрении отмечается у 2/3 больных. Половина детей с умственной отсталостью имеют более выраженные речевые нарушения. Большинство девочек отличаются старательностью, послушанием.

При тетрасомии X гораздо чаще встречается глубокая умственная отсталость. Среди женщин с полисомией X увеличена частота психических заболеваний.

Лишь у некоторых женщин с трипло-X отмечаются нарушения репродуктивной функции (вторичная аменорея, дисменорея, ранняя менопауза и др.). Аномалии развития наружных половых органов (признаки дисэмбриогенеза обнаруживаются лишь при тщательном обследовании, выражены они незначительно.

Исследование кариотипа выявляет увеличенное, по сравнению с нормой, число X-хромосом. Встречаются многочисленные мозаичные формы этих аномалий – 47,XXX; 48,XXXX; 47,XXX/46,XX; 47,XXX/48,XXXX и др. варианты (табл. 12).

Некоторые женщины с тремя X-хромосомами совершенно здоровы во всех отношениях: они выходят замуж и рожают нормальных детей. Трисомия X, как и все другие виды трисомий, связана с возрастом матери, причины ее возникновения зависят от нерасхождения хромосом в мейозе.

Лечение полисомии по половым хромосомам у женщин сводится к симптоматической терапии обнаруженных расстройств и гормональной терапии при половом инфантилизме.

Прогноз для жизни при трисомии X благоприятный, при полисомии X зависит от выраженности врожденных уродств.

Причины возникновения большего, чем в норме, числа половых хромосом те же, что и при возникновении трисомии в соматических хромосомах: это, как правило, нарушение мейоза.

Описаны больные с синдромом Клайнфельтера, но кариотипом 46,XX. В единичных случаях выявляется все-таки мозаицизм, хотя доля клеток с кариотипом 47,XXY составляет не более 1-1,5%. Как свидетельствует табл. 5, большинство женщин, имеющих нарушения в количестве половых хромосом, бесплодны.

Многие авторы относят все разновидности анеуплоидий хромосомы X к синдрому Клайнфельтера (кариотип 47,XXY), популяционная частота которого – 0,5–2 на 1000 новорожденных мальчиков, включая полные и мозаичные формы. Этот синдром встречается у 1–2,5% пациентов с легкой степенью умственной отсталости.

3.7.6. Полисомия по Y-хромосоме

Впервые описали А.А. Sandberg и соавт. (1961). Частота аномалии у новорожденных мальчиков составляет 1:840 и возрастает до 10% в популяции высокорослых мужчин (выше 200 см).

Клиника. Фенотипические проявления анеуплоидии полиморфны, но имеются клинические симптомы, позволяющие заподозрить эту хромосомную патологию. Большинство авторов отмечают ускорение роста в этом возрасте. Длина тела взрослых мужчин также увеличена и составляет в среднем 186 см.

Пациенты часто имеют евнухоидное телосложение: высокую талию, длинные ноги, относительно широкий таз, отложение жира по женскому типу. Нередки различные аномалии: микроцефальный череп, грубые черты лица, выступающие надбровные дуги и переносье, увеличенная нижняя челюсть. Часто обнаруживается высокое небо, неправильный рост крупных зубов с дефектами зубной эмали, большие ушные раковины с приросшей мочкой. Выявляются экскавации грудины, вальгусная девиация коленных и локтевых суставов, молоткообразные пальцы, вальгусное положение I пальца стопы, радиоульнарной синостоз. Нередко у больных описывают нарушение половой сферы (гипогонадизм, оволосение по женскому типу, бесплодие, крипторхизм), но в большинстве случаев половая функция не страдает, и они имеют здоровых детей.

Неврологические изменения в виде легкого интенционного тремора, мышечной слабости и плохой «тонкой» моторики. У 30-40% больных обнаруживают признаки интеллектуальной недостаточности. Чаще это пограничная умственная отсталость, осложненная эмоционально-волевыми нарушениями.

Психическое состояние у детей с кариотипом 47,XYУ и умственной отсталостью определяется психопатоподобными расстройствами: дисфорические проявления, расторможение и извращение влечений, аффективная неустойчивость, взрывчатость и др.

При кариологическом исследовании обнаруживают две (реже больше) Y-хромосомы как самостоятельные, так и в различных сочетаниях с другими аномалиями половых хромосом.

В качестве экспресс-метода диагностики дополнительной Y-хромосомы исследуют буккальный соскоб с помощью люминесцентной микроскопии. Обнаружение двойного Y-хроматина говорит о лишней Y-хромосоме.

Прогноз в отношении жизни благоприятный. Имеются данные об увеличении частоты хромосомных аномалий у потомства.

Таким образом для точной диагностики хромосомной болезни необходимо определить: тип мутации; вовлеченную в процесс хромосому; форму (полная или мозаичная); вид болезни (случай или наследуемая форма.)

Патологические эффекты. Хромосомные нарушения вызывают изменение общего генетического баланса. Это приводит к нарушению взаимодействия и координации в работе генов, регуляции метаболизма клеток и функций, которые сложились в процессе эволюции каждого вида. Поэтому патологические эффекты хромосомных и геномных мутаций проявляются на всех стадиях онтогенеза. Основные эффекты хромосомных аномалий проявляются в двух связанных между собой вариантах: летальности и врожденных пороках развития. Патологические следствия хромосомных аномалий начинают проявляться уже со стадии зиготы, что обычно приводит к летальному исходу - внутриутробной гибели. Считается, что 50 - 80% оплодотворенных яйцеклеток погибают на стадии зиготы - бластоцисты, т.е. еще до имплантации. Это связано с существенным нарушением ранних морфогенетических процессов - гастрюляции и формирования зародышевых листков. Случаи ранней остановки развития можно объяснить нарушением геномного баланса, что приводит к дискоординации включения и выключения генов на соответствующих стадиях развития. На первых стадиях развития эмбриона участвует примерно 1000 генов, локализованных во всех хромосомах, поэтому хромосомные аномалии нарушают взаимодействие генов и нарушают конкретные процессы развития, например, межклеточные взаимодействия или дифференцировку клеток. Чем раньше прерывается беременность, тем вероятнее, что это обусловлено аномалиями развития эмбриона, вызванными хромосомным дисбалансом. Наиболее серьезный дисбаланс хромосомного набора встречается у ранних абортусов. Это полиплоидии (25%), полные трисомии по аутосомам (50%). Среди погибших плодов частота хромосомных аномалий составляет около 6%. В этих случаях летальные эффекты сочетаются с врожденными пороками развития.

Хромосомные аномалии, возникающие в соматических

клетках после рождения, могут вызывать различные последствия: обусловить гибель клетки, изменить функцию или остаться нейтральными. Хромосомные аномалии в незначительном количестве возникают в соматических клетках постоянно, обычно такие клетки уничтожаются иммунной системой. Однако, в некоторых случаях (активация онкогенов) хромосомные аномалии являются причиной злокачественного роста. Например, транслокация между хромосомами 9 и 22 вызывает миелоблейкоз. Облучение и химические мутагены индуцируют хромосомные aberrации. В процессе старения так же происходит накопление клеток с хромосомными aberrациями.

Пока не разработана общая схема развития комплексных патологических процессов, обусловленных хромосомными аномалиями. Не выявлено ключевое звено в развитии хромосомных болезней. Предполагают, что такое звено - «несбалансированность генотипа» или «нарушение общего генного баланса». Однако, такое определение не указывает на конкретный механизм.

Общим для всех форм хромосомных болезней является *множественность поражения*. Это врожденные пороки развития внутренних органов и частей тела, черепно-лицевые дизморфии, замедленное внутриутробное и постнатальное развитие, нарушения психического развития и функций нервной системы эндокринной и иммунной систем и др. При каждой форме хромосомных болезней наблюдается 30-80 различных отклонений от нормы.

3.8. Генные болезни

К настоящему времени накоплен огромный материал по биохимической характеристике многих болезней обмена. Выявлено около 3500 наследственных нарушений метаболизма, но только для 105 из них установлен точный уровень «метаболического блока» и характер дефекта.

При моногенных болезнях фенотипическое проявление действия мутантного гена характеризуется альтернативными признаками (есть, нет).

Каждый одиночный мутантный ген будет проявляться по одному из четырех типов менделевского наследования (аутосомно-доминантному, аутосомно-рецессивному; X-сцепленному рецессивному, X-сцепленному доминантному).

В основе молекулярных (генных) болезней лежат генные мутации.

Генные мутации – изменение химической структуры генов, нарушение последовательности нуклеотидов в ДНК. Известно несколько типов изменений азотистых оснований в молекулах ДНК: 1) замена оснований; 2) выпадение (делеция) оснований; 3) включение оснований; 4) инверсия оснований.

Генные болезни многообразны по клиническим проявлениям (вовлеченность разных органов и систем), по срокам клинической манифестации, по характеру течения и исходам. Главная их генетическая характеристика состоит в том, что они передаются от поколения к поколению по Законам Менделя.

В большинстве случаев врожденные нарушения обмена веществ с клиническими последствиями проявляются (или могут быть выявлены) в период новорожденности. Такие новорожденные сразу после рождения обычно выглядят здоровыми, однако признаки патологии, такие как летаргия, затруднения при кормлении, судороги, рвота и др. могут проявиться у них уже через несколько часов. Некоторые нарушения метаболизма могут остаться нераспознанными в период новорожденности, и диагноз может быть поставлен только через несколько месяцев и даже лет. Ранние клинические проявления обычно неспецифичны и могут быть отнесены к перинатальной патологии. Врожденное нарушение обмена веществ должно рассматриваться как возможное состояние у любого ребенка с одним из указанных клинических проявлений: *необъяснимое отставание умственного, двигательного развития, судороги; необычный запах, в частности, во время острого заболевания; интермиттирующие эпизоды необъяснимой рвоты, ацидоза, нарушений психики, кома; почечные колики, гепатомегалия.*

Классификация врожденных нарушений обмена веществ

Нарушение метаболизма аминокислот:

фенилаланина /фенилкетонурия/;
тирозина /тирозинемия, алкаптонурия/;
метионина /гомоцистинурия/;
цистина /цистинурия/;
триптофана /болезнь Хартнупа, триптофанемия и др./;
лейцина /болезнь кленового сиропа/;
гистидина /гистидинурия, гистидинемия/ и других аминокислот.

Нарушение метаболизма углеводов:

галактозы /галактоземия/;
фруктозы /фруктоземия/;
гликогена /гликогенозы/;
дисахаридазные энтеропатии /синдром мальабсорбции углеводов/.

Наследственные болезни обмена соединительной ткани:

мукополисахаридозы;
болезнь Марфана

Наследственные болезни обмена липидов:

гиперлипопротеидемии;
сфинголипидозы /болезнь Ниманна-Пика/;
ганглиозидозы /болезнь Тея-Сакса/.

Наследственные болезни порфиринового обмена /порфирии/.

Энзимопатии желчно-пигментного обмена /болезнь Жильбера/.

Энзимопатии панкрео-инсулярного гормонсинтеза:

муковисцидоз;
врожденное отсутствие энзимов поджелудочной железы;
болезнь Вильсона-Коновалова;
целиакия.

Энзимопатии биосинтеза гормонов.

3.8.1. Наследственные болезни обмена аминокислот.

✓ Фенилкетонурия (ФКУ).

ФКУ относится к тем наследственным нарушениям обмена, которые широко известны и довольно детально изучены. Фенилпировиноградная олигофрения была описана в 1934 г. Феллингом. Фенилаланин (ФА) относится к незаменимым

аминокислотам. Поступающий с продуктами питания и не используемый для синтеза белка, в норме он распадается по тирозиновому пути. Дефицит фермента фенилаланин-гидроксилазы или его кофактора тетрагидроптиоптерина приводит к накоплению фенилаланина в жидких средах организма. Это ингибирование приводит ко вторичным блокам. Уровень фенилаланина в плазме нарастает до 20 мг % уже к концу первой недели жизни. Далее уровень повышается и стабилизируется на 40 мг %. Выделение его с мочой усилено, это относится и к продуктам его трансаминирования: фенилпировиноградной кислоте, фенилуксусной кислоте (ей обязана своим запахом моча), фенилмолочной кислоте, фенилглутамину. Отмечается увеличение ФА в спинномозговой жидкости. Существуют несколько клинически и биохимически отличительных форм гиперфенилаланинемии (классическая, атипичная и обусловленная дефектом дегидроптеридинредуктазы).

Классическая фенилкетонурия обусловлена полным или почти полным отсутствием фенилаланин-гидроксилазы. Избыток фенилаланина трансаминируется до фенилпировиноградной кислоты или до фенилэтиламина. Эти и другие метаболиты наряду с избытком фенилаланина, нарушают процессы метаболизма и вызывают повреждение клеток головного мозга.

Клиника. Ребенок при рождении выглядит здоровым. Отставание в психическом развитии может происходить постепенно и стать очевидным только через несколько месяцев. Ранним симптомом заболевания может стать рвота, иногда настолько сильная, что ее ошибочно расценивают как проявление пилоростеноза. Возможны повышенная раздражительность, экзема и судороги. В более старшем возрасте нелеченные дети становятся гиперактивными, осуществляют бесцельные движения, ритмические покачивания, у них определяется атетоз. При объективном обследовании обращает на себя внимание то, что ребенок выглядит белокурым, у него светлая кожа и голубые глаза. У некоторых больных появляется себоррейная или экзематозная кожная сыпь. От них исходит необычный запах фенилуксусной кислоты, который характеризуют как заплесневелый, мышьяный

или волчий. У большинства детей определяется гипертонус и повышение глубоких сухожильных рефлексов, клонус стопы, тремор. Около 1/3 детей страдают судорогами. Поведение их изменено: они кажутся или добродушными и приветливыми, или нервными и вспыльчивыми. Часто у нелеченных детей определяют микроцефалию, выступающую верхнюю челюсть с широко расставленными зубами, гипоплазию эмали, отставание в росте. В нелеченных случаях развивается олигофрения различной степени вплоть до идиотии.

Генетическое исследование. В настоящее время существуют скринирующие программы для выявления больных ФКУ детей. Для диагностики ФКУ используют качественные биохимические тесты, полуколичественные микробиологические тесты (тонкослойной хроматографии, автоматического анализа, жидкостной хроматографии и спектрометрии).

Для проведения качественных проб объектом исследования является моча ребенка (тест Феллинга, или «пеленочная проба»): на мокрую пеленку новорожденного наносятся несколько капель 10% FeCl_3 , и по появлению зеленого пятна диагностируется ФКУ. У детей первого года жизни этот тест может быть отрицательным. Так бывает, если уровень фенилпировиноградной кислоты меньше 0,2 мг/мл, что может быть обусловлено сильным разведением мочи или низким содержанием белка в пище в течение определенного времени. Зеленую окраску дают и другие метаболиты, некоторые лекарственные препараты /хлорпромазин/. Поэтому используют полуколичественный тест Гатри. Для его проведения требуется несколько капель капиллярной крови, которую помещают на фильтрованную бумагу и отправляют в лабораторию, где помещают в чашку Петри, которая содержит на питательной среде штамм *e.Coli*, расщепляющий ФА. По росту колоний определяют, является ли проба положительной. Рекомендуется брать кровь через трое суток после того, как ребенок получил белковую пищу для уменьшения возможности получения ложноотрицательного результата. В настоящее время в крупных генетических центрах есть возможность применять метод автоматического анализа, который является более точным.

Критериями диагностики классической ФКУ служат:

- уровень ФА в плазме более 200мг/л;
- нормальный уровень в плазме тирозина;
- повышение уровня в моче метаболитов фенилаланина;
- сниженная толерантность к полученному внутрь фенилаланину /нагрузочный тест, применяемый для дифференцировки ФКУ/.

Лечение. Цель его состоит в уменьшении ФА и его метаболитов в жидкостях тела. Она может быть достигнута низким содержанием фенилаланина в пище. Это единственный эффективный метод лечения ФКУ и должен применяться с первых месяцев жизни. В настоящее время выпускается большое количество гидролизатов белка, частично или полностью лишенных ФА. Они созданы на основе казеина, лактальбумина, сыворотки крупного рогатого скота. Одни гидролизаты полностью лишены ФА («Берлофен» (ФРГ), «Альбумоид» ХР (Австрия), «Гипофенат» (Россия)); в других он содержится в незначительных количествах («Лофеналак» (США), «Минофен» (Англия), «Нофелан», «Нофемикс», «Казенолан» (Польша)). Важным вопросом в диетотерапии является определение потребности в белке, так как из рациона исключают продукты с высоким содержанием белка. Детям 1-го года жизни необходимо давать натуральный белок из расчета 4г/кг в сутки (20-22% от возрастной нормы). Остальное количество составляют гидролизаты белка. Дети грудного возраста получают белок в небольшом количестве грудного молока или молочных смесей, дети старше 1 года – с овощами и фруктами. Содержание жира в диете детей составляет 30-38%, а углеводов 60-70% от энергетической ценности рациона. Во многих странах ведутся исследования по созданию специальных продуктов, содержащих мало белка (безбелковый хлеб, кондитерские изделия, крупы, муссы и др.).

Для оценки эффективности диетотерапии необходимо регулярно определять концентрацию ФА в сыворотке крови, оценивать умственное и физическое развитие детей.

Результаты лечения зависят от возраста, в котором начато лечение. Клиническое наблюдение показывает, что правильный диетический режим не позже 10-го месяца жизни предохраняет ребенка от тяжелых поражений мозга, и если начать его до 3-й

недели жизни, умственное развитие обычно остается нормальным. Продолжительность лечения – до 6-8 летнего возраста. Диету расширяют постепенно, этот период составляет около 2 месяцев, с постепенным исключением гидролизата из рациона. Далее рацион отличается от такового у здоровых детей тем, что в нем ограничено содержание мяса, исключен творог, яйца, рис. Беременные, страдающие ФКУ, должны придерживаться диеты до зачатия и во время вскармливания плода, уровень ФА в крови должен быть ниже 100 мг/л в течение всего периода беременности.

3.8.2. Альбинизм.

Разные формы альбинизма могут наследоваться по аутосомно-рецессивному типу а так же по аутосомно-доминантному и сцепленному с X-хромосомой. Эти формы болезни являются *генокопиями*. Мутантный аллель альбинизма находится в длинных плечах 6 и 11 хромосом. Причина заболевания - отсутствие фермента тирозиназы, который превращает аминокислоту тирозин через ряд промежуточных продуктов в меланин. Различают альбинизм общий и глазной. Общий альбинизм сопровождается нарушением зрения, отмечаются дефекты внутренних органов. У этих больных отсутствует пигментация кожи, волос, радужной оболочки глаз. При глазном альбинизме пигментация кожи, волос, радужной оболочки не изменена, но отмечается снижение остроты зрения и расстройство цветного зрения.

Общая частота альбинизма в популяциях человека в разных регионах колеблется от 1:5000 до 1:25000.

3.8.3. Серповидно-клеточная анемия.

Мутантные аллели заболевания локализованы в 11 и 16 хромосомах. Наследуется это заболевание по аутосомно-рецессивному типу. Гомозиготы погибают в раннем детском возрасте из-за значительных дефектов внутренних органов. У гетерозигот имеются нарушения газообмена, а в условиях дефицита кислорода (высоко в горах, при пребывании в самолете или на подводной лодке) может внезапно возникнуть

гемолитический или тромболитический криз, который может закончиться смертью больного. Ниже показаны некоторые возможные эффекты при серповидно-клеточной анемии.



Генное заболевание серповидно-клеточная анемия обусловлена мутацией гена, определяющего синтез нормального гемоглобина. У этих людей вместо нормального А-гемоглобина возникает аномальный S-гемоглобин. В аномальном S-гемоглобине происходит замена глютаминовой кислоты на валин, что изменяет свойства гемоглобина, повышает вязкость крови. Аномальный гемоглобин при низком содержании O_2 в клетке переходит в состояние геля, эритроциты принимают форму серпа или полумесяца. Эритроциты склеиваются между собой, вызывая микротромбозы, которые могут стать причиной инфарктов и инсультов.

Гетерозигот можно определить путем микроскопического выявления S-эритроцитов, имеющих форму серпа в условиях гипоксии. Точный диагноз ставится на основе ДНК-анализа. С целью профилактики желательнее проводить пренатальную диагностику.

Серповидно-клеточная анемия встречается, главным образом, среди населения стран тропической Африки и побережья Средиземного моря, где распространена малярия. Это связано с тем, что гетерозиготные носители мутантного аллеля более устойчивы, чем гомозиготы по нормальному аллелю, к возбудителю тропической малярии.

3.8.4. Наследственные болезни обмена липидов. Ганглиозидозы

Ганглиозиды – это класс сложных гликолипидов, содержащихся преимущественно в ганглиозных клетках нервной ткани.

Амавротическая идиотия – ранняя детская (инфантильная) форма – **Болезнь Тея-Сакса** относится к группе внутриклеточных липидозов. Это заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования. Патологический ген локализован в длинном плече 15 хромосомы – 15q23. При данном заболевании отмечается увеличение в мозге гликолипида-ганглиозида, а также увеличение ганглиозидов в печени, селезенке, что свидетельствует о генерализованном нарушении обмена ганглиозидов. Гистологически обнаруживается картина генерализованного распада ганглиозных клеток нервной системы. Ранняя детская (инфантильная) форма – болезнь Тея-Сакса начинается в возрасте 4-6 месяцев. Часто это заболевание носит семейный характер. У этих больных рано проявляется снижение зрения. Ребенок не может фиксировать взгляд, не следит за игрушками. Довольно рано на глазном дне обнаруживается симптом «вишневой косточки» – вишнево-красное пятнышко макулярной области, окруженное серовато-белым ободком. В последующем развивается атрофия зрительных нервов и полная слепота. Исчезают ориентировочные и защитные реакции. При болезни Тея-Сакса наблюдается симптом повышенной реакции на звуковые раздражения – дети резко вздрагивают от обычного звука, могут отмечаться судороги, носящие тонический характер. В конечной стадии болезни развивается кахексия и состояние децеребрационной ригидности. Смерть наступает в среднем через 1-2 года после начала заболевания. При ранней детской форме болезни Тея-Сакса дети, нормально развивавшиеся до этого, относительно быстро становятся вялыми, утрачивают интерес к окружающему, перестают узнавать близких. Происходит постепенное исчезновение приобретенных двигательных навыков и речи. В течение нескольких месяцев, реже до 2-х лет, развивается глубокое слабоумие типа идиотии.

Лечение. Специфическое лечение амавротической идиотии не разработано.

Профилактика. Возможно установление гетерозиготного носительства мутантного гена у родителей больных. В случае беременности женщины, гетерозиготной по гену амавротической идиотии Тея-Сакса, целесообразно исследование гексоаминидазы-А в амниотической жидкости, полученной на 18-20й неделе беременности. При значительном снижении гексоаминидазы-А показано искусственное прерывание беременности.

Болезнь Ниманна-Пика. Из-за отсутствия (или снижения активности) сфингомиелинидаз в паренхиме селезенки накапливается сфингомиелин (соединение церамида с холином и фосфорной кислотой) в клетках головного мозга и внутренних органов (печень).

Выделяют: инфантильную, подострую и хроническую формы.

При инфантильной форме у больных наряду с поражением головного мозга, наблюдается коричневая пигментация кожи. Также наблюдается мышечная ригидность, отставание в психическом развитии, на глазном дне обнаруживается вишнево-красное пятно. На рентгенограммах костей – остеопороз и остеомаляция. Дети погибают в первые 2-3 года жизни.

Подострая форма. При этой форме фермент сфингомиелинидаза не полностью отсутствует, а понижена ее концентрация. Мышечная ригидность сменяется гипотонией.

Хроническая (висцеральная) характеризуется накоплением сфингомиелина преимущественно во внутренних органах, что приводит к нарушению их функции. Болезнь наследуется аутосомно-рецессивно.

Болезнь Гоше. В клетках головного мозга и внутренних органов накапливается глюкоцереброзидоз (соединение церамида с глюкозой). Выделяют острую, подострую и хроническую формы.

У больных с острой формой отмечают мышечную ригидность, психическую отсталость, нарушение зрения. Также отмечают остеопороз костей, деформацию по типу «бутылок».

Уменьшение костного мозга приводит к гипохромной анемии, тромбопении, что сопровождается носовыми кровотечениями. Больные дети погибают в первые годы жизни от истощения. При подострой форме все симптомы протекают более мягко. При хронической – поражаются внутренние органы без вовлечения в процесс головного мозга.

Описаны как аутосомно-рецессивные, так и аутосомно-доминантные типы наследования.

3.8.5. Наследственные гиперлипопротеидемии

Гипертоническая болезнь. Наряду с наследственным предрасположением сильное влияние на ее развитие оказывают хронический стресс, диета с повышенным содержанием поваренной соли и холестерина, низкое качество жизни.

Едва ли можно связать развитие семейной гипертонической болезни с мутацией единственного гена, так как это заболевание имеет мультифакториальную природу. Известно по крайней мере 20 генов, определяющих уровень артериального давления. Наиболее значимые гены-кандидаты: ангиотензиногена и рецепторов ангиотензиногена, рецептора ангиотензина I, ангиотензинконвертирующего фермента, β_2 -адренорецепторов, эндотелина I, аддуцина, NO-синтазы.

В зарубежной литературе последних лет много внимания уделялось роли наследственных полиморфных вариаций гена ренина, которые могут предопределять развитие гипертонической болезни. С ними связано повышение тканевого уровня прессорного пептида – ангиотензина II, повышающего артериальное давление. В более высокой степени уровень этого прессорного пептида зависит от активности ангиотензинконвертирующего фермента, или ангиотензинпревращающего фермента.

Известны три полиморфных варианта гена ангиотензинпревращающего фермента – фенотипы *II* (инсерции нуклеотидов), *ID* (инсерции – делеции) и *DD* (делеции – делеции). Эти полиморфные вариации у людей в значительной степени определяют тяжесть гипертонической болезни и особенно чувствительность к гипотензивным препаратам – ингибиторам

ангиотензинпревращающего фермента – каптоприлу, эналаприлу (энапу) и др. Наиболее неблагоприятным в прогностическом отношении считается DD-генотип.

Более 50% больных гипертонической болезнью отличаются повышенной чувствительностью к поваренной соли в пищевом рационе. Наиболее вероятно существование связи между гиперчувствительностью к хлориду натрия и мутацией гена аддуцина – белка эндотелия, участвующего в процессах ионного транспорта натрия и калия.

Одним из наследуемых условий формирования раннего атеросклероза сосудов, риска ишемической болезни сердца считается семейная гиперхолестеринемия. Она характеризуется аутосомно-доминантным типом наследования.

Заболевание обусловлено мутациями гена рецепторов липопротеинов низкой плотности (LDL-рецепторы), причем известно около 300 типов мутаций. Дислипидемия проявляется в гетерозиготном состоянии, ее частота 1:200–500 детей, включая новорожденных.

Очень редко наблюдается гомозиготность (вернее – двойная гетерозиготность, или наследование ребенком двух разных мутантных генов семейной гиперхолестеринемии): гены заболевания наследуются от матери и отца, причем чаще всего – это разные мутации.

При гомозиготности, или двойной гетерозиготности уровень холестерина в плазме крови больных очень высок – 600–1000 мг/100 мл, и все клинические проявления болезни, включая множественные ксантомы, инфаркт миокарда, проявляются уже в первом десятилетии жизни. Но гомозиготная гиперхолестеремия в отличие от гетерозиготной, встречается крайне редко.

Высокой степенью распространенности (1:500) характеризуется семейная комбинированная гиперлипидемия. При данной дислипидемии в плазме крови повышено содержание холестерина, триглицеридов и аполипопротеина-В (гипер-апо-В). По-видимому, это гетерогенная аномалия липидного обмена, так как при детальном обследовании больных и их ближайших родственников могут выявляться различные фенотипы липопротеинемий (IIa, IIb, IV). Полагают, что мутация гена аполипопротеина-В препятствует связыванию

липопротеинов с *LDL*-рецепторами клеток.

Артериальная гипертензия, гиперхолестеролемиа и комбинированная гиперлипидемиа служат важнейшими факторами риска ранних форм ишемической болезни сердца и раннего атеросклероза, которые выявляются в детском возрасте задолго до возникновения клинической симптоматики серьезного сердечно-сосудистого заболевания. Данное обстоятельство послужило основанием для предложения ввести массовый скрининг школьников на гиперхолестеринемию.

Американская академия педиатрии рекомендует проводить селективный скрининг детям из семей высокого риска по сердечно-сосудистым заболеваниям. При содержании холестерина в плазме крови более 170 мг/100 мл рекомендуется определять липопротеины низкой плотности и холестерин в этих липопротеидах (*LDL*-холестерин).

Семейная гиперхолестеринемиа – особенно гомозиготная форма – реальный кандидат для генной терапии. Так как рецепторы для липопротеинов низкой плотности отсутствуют на клетках печени, то пока для введения генов прибегают к частичной гепатэктомии. С помощью ретровирусного вектора в клетки печени вводится ген рецептора липопротеинов низкой плотности, после чего гепатоциты инъецируются в вену. В результате содержание холестерина в крови снижается на 35–50%. Конечно, пока данная технология исключительно сложна, чтобы получить практическое применение.

В зарубежной печати дискутируется вопрос о сокращении доли жиров в диете в качестве превентивной меры, предупреждающей развитие раннего атеросклероза, ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда и гипертонической болезни у взрослых.

Применяются ингибиторы синтеза холестерина – так называемые статины (симвастатин, ловастатин), а также клофибрат и другие гиполипидемические средства.

3.8.6. Болезни нарушения обмена стероидов

✓ *Адреногенитальный синдром.* Заболевание проявляется гиперпродукцией гормонов надпочечников. У мужского пола

проявляется преждевременным половым созреванием, а у женского – ложным гермафродитизмом. Реже, при этом синдроме выделяется избыточное количество эстрогенов. У женщин это вызывает маскулинизацию, у мужчин – феминизацию. В надпочечниках не образуется гидрокортизон, вследствие этого выделяется избыточное количество АКТГ. В зависимости от биохимического дефекта в цепи ферментативных превращений выделяют несколько вариантов данного синдрома.

Недостаточное выделение гормонов надпочечников проявляется болезнью Аддисона. Клинически заболевание проявляется общей слабостью больных, потерей веса, понижением артериального давления, нарушением функции желудочно-кишечного тракта и гиперпигментацией кожных покровов. Наследуется аутосомно-рецессивно.

3.8.7. Нарушение обмена пуринов и пиримидинов

Синдром Леша-Найхана. Относится к группе врожденных аномалий обмена нуклеиновых кислот. Заболевание наследуется по рецессивному типу, сцепленно с X-хромосомой. Патологический ген локализован в длинном плече X-хромосомы-X q 26. При изучении эритроцитов больных выявлено отсутствие фермента гипоксатин-гуанинфосфорибозил-трансферазы (ГГФРТ), участвующего в обмене гипоксатина и гуанина, т.е. это нарушение пуринового обмена. Болеют мальчики. У них повышено содержание мочевой кислоты, подагрические артриты, гематурия и нарушение функции почек.

У больных отмечается умственная отсталость, впоследствии появляются насильственные атетоидные движения и агрессивность поведения, которая проявляется в самоповреждении пальцев и губ.

При микроскопическом исследовании мозга погибших обнаруживается демиелинизация в полушариях головного мозга и мозжечке.

Для определения гетерозиготного носительства производят электрофоретическое разделение содержимого волосняной луковицы или гомогената культуры клеток амниотической жидкости, меченой C^{14} -гипоксантином.

Использование этой методики дает возможность своевременно решить вопрос о целесообразности деторождения.

При хромосомном анализе – выявлена делеция длинного плеча 18 хромосомы (18q).

3.8.8. Наследственные болезни обмена углеводов.

Галактоземия – первое описание этого наследственного заболевания принадлежит венскому педиатру Реуссу (1808). Оно представляет собой врожденное нарушение галактозного обмена и передается по аутосомно-рецессивному пути. Частота заболевания от 1:16000 до 1:17500 населения.

Патогенез его связан с блоком в процессе распада галактозы до глюкозы, осуществляющегося под действием галактокиназы и галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы. Принято считать, что патологические повреждения обусловлены накоплением в клетках галактозо-1-фосфата и нарушением клеточного метаболизма.

Клиническая картина галактоземии зависит от степени энзимного дефекта и от количества поступающей с пищей галактозы. В типичных случаях заболевание проявляется в первые дни и недели. Новорожденный неохотно принимает молоко, у него отсутствует аппетит, возникает рвота, вздутие живота, диспепсия, персистирующая желтуха, гипогликемия. Желтуха вначале напоминает физиологическую, но на 5-6 день усиливается. В тяжелых случаях заболевания резко прогрессирует и приводит к коме и смерти. В большинстве случаев течение заболевания более продолжительное: ребенок не прибавляет в массе и росте, увеличиваются печень и селезенка, появляется асцит. Иногда присоединяются симптомы геморрагического диатеза. Имеет место появление катаракты на 3-й неделе жизни, которая прогрессирует и приводит к полной слепоте. Характерно значительное отставание в психомоторном развитии. Могут быть и более легкие формы течения заболевания, когда отсутствуют многие клинические признаки, но всегда присутствует катаракта и гепатоспленомегалия.

Диагностика основана на выявлении галактозурии (методом уринолизиса), протеинурии, гипераминоацидурии. Точный диагноз ставится путем тонкослойной хроматографии углеводов.

Лечение. Единственным методом является питание, лишенное лактозы. Из пищевого рациона исключают коровье и грудное молоко. Успех лечения зависит от:

- ❖ более раннего назначения диеты;
- ❖ наличия более адекватного заменителя грудного молока;
- ❖ от метода вскармливания с включением по мере роста ребенка естественных продуктов.

Детям до 1 года дают соевое молоко, смеси типа «Малютка» с декстрин-мальтозой, смеси с отдельными видами муки «Малыш», низколактозное молоко. Диета детей после 1 года более разнообразна, но исключаются молочные продукты, шоколад, кофе, субпродукты, фасоль, горох, молодой картофель. Диету назначают на длительное время, не менее 5–7 лет. Критерием эффективности лечения является отсутствие галактозы в моче.

При назначении диеты до клинически выраженных проявлений болезни удается предупредить метаболические расстройства и развитие ребенка будет нормальным. Если диета назначена в период нерезко выраженных проявлений – можно добиться компенсации нарушений метаболизма. Используют оперативное лечение катаракты.

Имеет место антенатальная профилактика заболевания у плода путем назначения безлактозной диеты будущей матери.

Фруктоземия – это наследственное заболевание, передающееся по аутосомно-рецессивному типу, связанное с резко сниженной активностью фермента фруктозо-1-фосфата альдозазы. Распространенность его 1:20000 населения. При недостаточной активности этого фермента ассимиляция фруктозы задерживается до фруктозо-1-фосфата, который накапливается в тканях и оказывает токсическое действие на клетки.

Клиника фруктоземии напоминает галактоземию, но она

обычно возникает, когда ребенок, начинает получать соки, плоды и овощи или употреблять сахар. Ребенок не принимает фрукты, у него появляется рвота, характерно развитие гипотрофии, гепатоспленомегалии, асцита. Дача больших количеств фруктозы может привести к острой гипогликемии, которая может сопровождаться судорогами, тремором и развитием коматозного состояния.

Диагностика фруктоземии основана на выявлении фруктозурии (реакция Селиванова) при нагрузке фруктозой, гипогликемии, гипофосфатемии, признаках поражения печени.

Лечение фруктоземии заключается в исключении из рациона соков, ягод, фруктов и овощей. При своевременном исключении фруктозы ребенок развивается нормально и проявления заболевания претерпевают обратное развитие.

Основные виды терапии некоторых наследственных заболеваний обмена веществ приведены в таблице 13. В основе лечения лежат следующие принципы:

- ❖ уменьшение поступления в организм веществ, обмен которых нарушен;
- ❖ введение недостающего метаболита;
- ❖ удаление токсичных веществ;
- ❖ сведение к минимуму введения препаратов или действия других факторов, способствующих ухудшению состояния больного;
- ❖ назначение витаминов, являющихся кофакторами дефектных ферментов;
- ❖ уменьшение образования токсичных метаболитов.

Уменьшение введения плохо метаболизируемых веществ достигается с помощью модификаций диеты. Данный метод используется у больных с болезнями обмена аминокислот, нарушениями в цикле синтеза мочевины и др.

3.8.9. Наследственные болезни обмена веществ соединительной ткани.

✓ *Синдром Марфана* относится к системным заболеваниям соединительной ткани. Описание этого синдрома впервые сделано Вильямсом в 1876 г. В последующие годы эта болезнь подробно была описана французским педиатром А.Марфаном.

Таблица 13

Особенности терапии при неонатальных формах наследственных заболеваний обмена веществ.

Заболевание	Лечение
Нарушения в цикле синтеза мочевины	Гемодиализ, перитонеальный диализ Высококалорийная диета с резким ограничением содержания белка и добавками аминокислот Внутривенное или энтеральное введение бензоната натрия (250 мг/кг в сутки) или фенилацетата (250–500 мг/кг в сутки), или фенил бутирата (500 мг/кг в сутки) L-аргинин (400–800 мг/кг в сутки) Пересадка печени
Некетотическая гиперглициемия	Внутривенное введение бензоната натрия (250 мг/кг в сутки) Пиридоксин (50 мг/кг в сутки) Декстрометорфан
Болезнь с запахом мочи кленового сиропа	Гемодиализ, перитонеальный диализ Высококалорийная диета с ограничением аминокислот с разветвленной цепью (40–60 мг лейцина на 1 кг массы) тиамин (50 мг – 500 мг/сут)
Изовалериановая ацидемия	Диета с ограничением содержания белка L-карнитин (100 мг/кг в сутки) Глицин (до 250 мг/кг/сут)
Метилмалоновая ацидурия	Диета с резким ограничением содержания белка (изолейцин, валин, метионин, треонин) L-карнитин (100 мг/кг в сутки) Метронидазол (10–15 мг/сут)
Пропионовая ацидемия	Гемодиализ, перитонеальный диализ Диета с резким ограничением содержания белка (изолейцин, валин, метионин, треонин) L-карнитин (100 мг/кг в сутки) Биотин (5–10 мг/сут) Метронидазол (10–15 мг/сут)
Дефицит 3-гидро-3-метилглутарил-CoA-лиазы	Частое кормление для исключения голодания Диета с низким содержанием белка и липидов (углеводное питание) L-карнитин (100 мг/кг в сутки)
Дефицит фруктозо-1,6-бисфосфата-зы	Диета с исключением фруктозы Внутривенное введение глюкозы и бикарбоната
Дефицит пируватдегидрогеназного комплекса	Диета с высоким содержанием жиров и низким – углеводов L-карнитин (100 мг/кг в сутки) Тиамин (до 200 мг/сут) Дихлоранетат (35–50 мг/кг в сутки) Липоевая кислота (до 500 мг/сут)
Дефицит пируваткарбоксилазы	Диета с высоким содержанием жиров и низким – углеводов Биотин (10 мг/сут) Аспартаговая кислота
Дефицит I комплекса дыхательной цепи митохондрий	Диета с ограничением углеводов Никотинамид (до 500 мг/сут) Рибофлавин (до 100 мг/сут) L-карнитин (50–100 мг/кг в сутки) Дихлоранетат (35–50 мг/кг в сутки)

В настоящее время доказано, что синдром Марфана имеет аутосомно-доминантный тип наследования с высокой пенетрантностью мутантного гена. При этом заболевании нарушается синтез коллагена и эластина из-за повреждения гена 15-й пары хромосом, ответственного за синтез фибриллина – белка, являющегося важным компонентом соединительной ткани, формирующим ее эластичность и сократимость. Фибриллина много в стенке аорты, связочном аппарате различных органов и коже. Это приводит к накоплению незрелого коллагена, повышенному выделению его метаболитов с мочой и появлению характерных фенотипических признаков.

Частота встречаемости синдрома Марфана, по данным некоторых авторов, составляет 0,15 на 10 тыс. населения, хотя определенное число случаев, надо полагать, остается нераспознанным. Наиболее характерные изменения отмечаются со стороны трубчатых костей в виде длинных «паукообразных» пальцев с частыми подвывихами и вывихами суставов как следствие слабости связочного аппарата. Пальцы могут быть искривлены как на руках, так и на ногах, отмечаются экзостозы пяточных костей, может встречаться сандалевидная щель, продольное и поперечное плоскостопие. Наблюдается слабость межреберных мышц, которая вместе с удлинением ребер способствует деформации грудной клетки с образованием одно- и двустороннего реберного горба, что приводит к формированию «куриной» груди или воронкообразной деформации грудной клетки. Для пациентов характерно изменение позвоночника в виде сколиоза, кифосколиоза, а также «крыловидные лопатки». Довольно часто отмечаются вегетативно-трофические расстройства: мраморность кожи, холодные цианотичные пальцы конечностей, гипергидроз или сухость кожи, ломкость и истерченность ногтей.

Полная картина синдрома Марфана наблюдается довольно редко. Ее характеризуют клиническая триада в виде поражения опорно-двигательного аппарата, изменений со стороны сердечно-сосудистой системы и патологии глаз.

Среди нарушений опорно-двигательного аппарата при

синдроме Марфана можно отметить такие изменения, как гипермобильность суставов с вывихами и подвывихами или недоразвитие суставных поверхностей вследствие слабости связочного аппарата, варусная и вальгусная деформация нижних конечностей, врожденный артроз бедра, явления остеопороза длинных трубчатых костей, развитие артрозов и анкилозов пальцев конечностей. Нарушения связочного аппарата могут сопровождаться образованием паховых и бедренных грыж. Выраженные изменения грудной клетки и позвоночника могут приводить даже к инвалидности. Однако надо отметить, что встречаются и стертые формы синдрома Марфана, которые могут остаться незамеченными, особенно у больных с превалирующими изменениями сердечно-сосудистой системы или глаз.

Важно знать, что существует возрастная динамика наиболее типичных признаков синдрома Марфана. При рождении имеют место лишь незначительные изменения опорно-двигательного аппарата в виде арахнодактилии. Астеническое телосложение проявляется на 1-3-м году жизни, характерный внешний вид больные приобретают к 3-4 годам, изменения скелета достигают максимума к 14-16 годам. Больные нередко предъявляют жалобы на длительные ноющие боли в спине, костях, околоуставных пространствах, дети поздно начинают ходить, им свойственна повышенная утомляемость, образование стрий, боли в суставах и частые их вывихи.

Тяжесть состояния и прогноз при синдроме Марфана зависит от степени поражения сердца и сосудов. Изменения сердечно-сосудистой системы отмечаются у 50-90% больных. Они служат наиболее частой причиной их смерти, особенно разрыв аневризмы аорты и патология митрального клапана, приводящая к развитию хронической сердечной недостаточности. Клапаны сердца тонкие, легкорастяжимые, поэтому пролапс митрального клапана – самое типичное проявление синдрома Марфана.

Синдром Марфана проявляется типичной патологией глаз: вывих или подвывих хрусталика, сопровождающийся миопией, спазмом аккомодации, гетерохромией радужки, реже

встречаются вторичная глаукома, дегенеративные изменения желтого пятна, расширение вен глазного дна, отслойка сетчатки, миопический астигматизм и другие более редкие изменения.

Тактика ведения больных. Следует проводить как консервативное, так и хирургическое лечение синдрома Марфана. Медикаментозное лечение должно обеспечивать нормализацию или стабилизацию патологического процесса в период подготовки больных к оперативному лечению: при этом используют β -блокаторы, препараты калия, сердечные гликозиды, мочегонные, широкий спектр витаминотерапии. По показаниям назначают массаж и лечебную физкультуру. Проводят необходимую санацию хронических очагов инфекции носоглотки и ротовой полости. Консервативное лечение должно быть ранним и проводиться в стационаре под наблюдением кардиолога и кардиохирурга. Большое внимание следует также уделять диспансерному наблюдению за больными и членами их семей.

Самыми эффективными методами лечения являются своевременная хирургическая коррекция аневризмы аорты и клапанов сердца, удаление хрусталиков, торакопластика и другие хирургические вмешательства. Хирургическое лечение принято проводить после окончания роста больного, так как до этого времени продолжается прогрессирующее увеличение деформаций. Расслаивающаяся аневризма аорты очень неблагоприятна в прогностическом плане.

Таким образом, знание фенотипических особенностей и патологии сердечно-сосудистой системы при синдроме Марфана позволяет быстро и своевременно его распознать, а также решить вопрос о тактике лечения.

В обобщенном и слегка упрощенном виде возможные подходы к лечению наследственных болезней представлены в табл. 14.

Применение комбинированных патогенетических методов лечения при наследственных болезнях обмена позволяет полностью устранить клиническую картину в 12% случаев и существенно улучшить ее в 57%. Успехи патогенетического лечения в будущем во многом будут зависеть от высоких

медицинских технологий (гемосорбция, плазмафорез, тканеспецифическая доставка лекарств, ферментотерапия).

Несмотря на успехи симптоматического, патогенетического и хирургического лечения наследственных болезней, вопрос о возможности их этиологической терапии не снимается. Принципиальные стороны генной терапии, под которой понимают доставку новых генетических «конструкций» в клетки индивида, обеспечивающую терапевтический эффект, уже давно решены. В 1990 г. после экспериментальных успехов были проведены первые клинические испытания и провозглашено начало новой эры в медицине – эры генотерапии.

Таблица 14

Патогенетические подходы к лечению наследственных болезней обмена веществ.

Уровень коррекции	Характер лечения	Пример нозологической формы
Субстрат пищи	Диетическое ограничение	Фенилкетонурия, галактоземия, гистидинемия и многие другие заболевания с известным первичным дефектом
	Диетическое добавление	Болезнь Хартнапа (мальабсорбция триптофана), гликогеноз III типа
	Усиленное выделение Метаболическая ингибция Альтернативные пути обмена	Гепатолентикулярная дегенерация, первичный гемохроматоз, семейная гиперхолестеринемия, болезни накопления
Продукт гена	Возмещение или добавление недостающего продукта	Врожденная гиперплазия надпочечников, гипотиреоз, гипофизарная карликовость, гемофилия.
Ферменты	Добавление кофактора	Гомоцистинурия, гипофосфатемия, лейциноз
	Модификация ферментативной активности	Гиперурикемия, порфирия, недостаточность ингибитора протеаз
	Возмещение фермента	Болезнь Гоше, болезнь Фабри (на стадии клинических испытаний)

3.9. Просеивающие (скринирующие) программы по выявлению наследственных болезней обмена веществ (НБО)

Термин – «скрининг» (с англ. Screening - просеивание) означает предположительное выявление недиагностированной ранее болезни с помощью тестов, обследований или других процедур, дающих быстрый ответ. Основная цель первичной

диагностики НБО заключается в том, чтобы выявить здоровых индивидов и отобрать индивиды для последующего уточнения диагноза. Программы первичной биохимической диагностики наследственных болезней могут быть массовыми и селективными. Массовое просеивание принадлежит к числу принципиальных нововведений практики мирового здравоохранения XX века и характеризуется следующими свойствами:

- ❖ Слепой (безотборный) подход к обследованию, что противопоставляет просеивание традиционному подходу к диагностике: не жалобы больного и его клиническое состояние является основанием для использования диагностических тестов, а результаты их применения – для клинического обследования и наблюдения.
- ❖ Профилактический характер обследования, т.е. выявление ранее не диагностированной болезни, создающее предпосылки для эффективного лечения. Просеивание обеспечивает лишь вторичную профилактику заболевания, так как не предотвращает, а только рано выявляет его.
- ❖ Массовый характер обследования. В зависимости от заболевания просеивание осуществляется в популяционных рамках или в контингентах не подразделенных больных (умственно отсталые, с гематологическими заболеваниями и т.д.), что соответствует подразделению просеивания на массовое и селективное.
- ❖ Двухэтапный характер обследования, обусловленный «слепым» подходом и отчасти несовершенством методов просеивания. Просеивание не дает возможности для установления окончательного диагноза, а лишь выявляет предположительных больных, которые должны быть обследованы повторно, и у которых должен быть подтвержден диагноз.

Таким образом, просеивание – это обследование контингентов с целью подразделения их на группы с высокой и низкой вероятностью заболевания.

Началом массового просеивания новорожденных на НБО явилась разработка методических, организационных и терапевтических подходов к учреждению программы массового просеивания на фенилкетонурию (ФКУ) в США под руководством Р. Гатри. В дальнейшем эта диагностика с помощью программ массового просеивания включала гистицинемию, гомоцистинурию, болезнь «кленового сиропа мочи», галактоземию, гемоглобинопатию, врожденную гиперплазию надпочечников, гипотиреоз, муковисцидоз, аргинин-янтарную ацидурию.

Свойства просеивания как специфического подхода к диагностике определяют требования к просеивающим методам, которые должны быть:

- ❖ диагностически значимыми, т.е. положительные и отрицательные результаты должны соответствовать наличию или отсутствию заболевания (в практике просеивания ложно положительные результаты допускаются, тогда как ложно отрицательные дискредитируют программу);
- ❖ надежными, т.е. одинаково интерпретироваться разными исполнителями;
- ❖ адаптированными к использованию легко доступного биологического материала в малом количестве;
- ❖ приемлемыми для обследуемых и исполнителей;
- ❖ экономичными.

В практике массового просеивания на НБО используется кровь (пуповинная, капиллярная, венозная, цельная нативная, цельная высушенная на хроматографической бумаге), а также сыворотка. Массовое просеивание на НБО позволяет выявить заболевания в пресимптомной стадии, когда оно еще курабельно, либо выявление здоровых носителей до рождения у них потомства, когда имеется возможность методами пренатальной диагностики установить наличие заболевания у плода и в случае необходимости сделать терапевтический аборт.

Наследственные болезни обмена веществ, включаемые в программы массового просеивания, отбираются по следующим критериям:

- ❖ заболевания, приводящие к выраженному снижению трудоспособности и жизнеспособности без своевре-

менного выявления и лечения;

- ❖ заболевания, достаточно распространенные в популяции (частота не менее 1:50000 – 20000 новорожденных);
- ❖ заболевания, которые поддаются лечению с достижением принципиального эффекта для больного, и для которых разработаны эффективные методы профилактики;
- ❖ заболевания, для которых разработан адекватный просеивающий тест.

Этим критериям в европейских популяциях строго соответствуют фенилкетонурия, гипотиреоз, менее строго – адреногенитальный синдром (врожденная адrenaльная гиперплазия) и галактоземия.

Массовый скрининг предусматривает обследование всех новорожденных с помощью простых диагностических тестов. Селективный скрининг проводится, как правило, среди специальных контингентов умственно отсталых, больных детей с нарушением зрения, слуха, речи, опорно-двигательного аппарата, а также с группой риска по НБО, выявленной при массовом скрининге. Селективные диагностические программы предусматривают проверку биохимических аномалий обмена (моча, кровь) у пациентов, у которых подозреваются генные наследственные болезни. В селективных программах могут использоваться простые качественные реакции (например, тест с хлоридом железа для выявления фенилкетонурии или динитрофенилгидразином для выявления кетокислот) или более точные методы, позволяющие обнаружить большие группы отклонений. Например, с помощью тонкослойной хроматографии мочи и крови можно диагностировать наследственные нарушения обмена аминокислот, олигосахаридов и гликозаминогликанов (мукополисахаридов). Газовая хроматография применяется для выявления наследственных болезней обмена органических кислот. С помощью электрофореза гемоглобинов диагностируется вся группа гемоглобинопатий.

Клиническая вариабельность муковисцидоза, создающая трудности в его диагностике, а также необходимость ранней диагностики заболевания свидетельствуют о поиске путей скрининга новорожденных.

Для проведения скринирующих исследований предпола-

гаются определение уровня альбумина в меконии, иммуно-реактивного трипсина в пятне крови новорожденного, а также другие тесты. Нормальный уровень альбумина в меконии – менее 3 мг/г. У новорожденных, больных муковисцидозом, обычно этот показатель приближается к 80 мг/г. Иммунореактивный трипсин, измеренный в сухом пятне крови, в 2-5 раз выше у новорожденных, больных муковисцидозом, чем у здоровых детей.

Для углубленного биохимического анализа – от количественного определения метаболита до определения активности фермента (использование нативных тканей или культивированных клеток), например, с помощью флюорометрических методик.

МВ **Показаниями для применения биохимических методов диагностики у новорожденных** являются такие симптомы, как судороги, кома, рвота, гипотония, желтуха, специфический запах мочи и пота, ацидоз, нарушенное кислотно-основное равновесие, остановка роста. У детей биохимические методы используются во всех случаях подозрения на наследственные болезни обмена веществ (задержка физического и умственного развития, потеря приобретенных функций, специфическая для какой-либо наследственной болезни клиническая картина).

Биохимические методы применяются для диагностики наследственных болезней и гетерозиготных состояний у взрослых (гепатолентикулярная дегенерация, недостаточность альфа-1-антитрипсина, недостаточность Г-6-ФД и т.д.)

/// Самый ранний сейчас способ снижения количества детей с врожденными патологиями – это проведение массового скрининга беременных женщин при помощи ультразвуковой диагностики, а также скринирование содержания альфа-фетопротеина в сыворотке крови всех беременных.

Современное состояние науки таково, что можно вполне успешно предотвращать появление на свет детей с тяжелыми и неизлечимыми врожденными пороками; многие аномалии новорожденных можно вовремя выявить и лечить, возвращая маленьких граждан к полноценной жизни. Однако в огромных количествах появляются на свет дети, которым помочь нельзя, и умирают те, кому помочь можно.

Для этого необходимость генетических предсказаний очевидна.

3.10. Наследственная предрасположенность к болезням. Мультифакториальные заболевания (МФЗ)

Болезни, в патогенезе которых играет роль наследственность, и проявление которых зависит от действия факторов внешней среды, называются болезнями с наследственным предрасположением.

Генетическая природа всех болезней с наследственным предрасположением неодинакова. Различают моногенные и полигенные болезни с наследственным предрасположением. *Моногенные болезни* с наследственным предрасположением – это болезни, при которых предрасположенность детерминируется одним геном во взаимодействии с точно известным фактором среды. *Полигенные болезни* с наследственным предрасположением – это болезни, при которых предрасположенность определяется многими генами во взаимодействии со многими факторами среды. По этой причине такие болезни называют мультифакториальными.

Мультифакториальные заболевания -- это такие патологические состояния, для проявления которых необходимы два условия:

- ❖ Наличие наследственной предрасположенности.
- ❖ Неблагоприятные внешнесредовые воздействия.

Мультифакториальные заболевания занимают одно из ведущих мест среди хронических неинфекционных болезней человека. Они отличаются клиническим полиморфизмом. Сложное взаимодействие генетических и внешнесредовых факторов приводит к формированию клинического постоянства мультифакториальных заболеваний в отдельных семьях и в популяции в целом.

К мультифакториальным заболеваниям относятся: сахарный диабет, гипертоническая болезнь, язвенная болезнь желудка, атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, бронхиальная астма, шизофрения, эпилепсия и др.

Необходимо учитывать, что объектом наблюдения врача

любой специальности должен стать не только больной, но и члены его семьи. Врач «общей практики», и особенно семейный врач, должен уметь на основании методов клинко-генетического обследования больного и его родственников выявлять группы повышенного риска, у которых, в первую очередь, нужно применять соответствующие профилактические мероприятия.

Мультифакториальные болезни или болезни с наследственным предрасположением составляют в настоящее время 92% от общей патологии человека.

Механизм развития МФЗ – патологический фенотип проявляется тогда, когда суммарное действие генетических и средовых факторов достигает или превышает некоторое пороговое значение подверженности.

Мультифакториальные болезни при всем их разнообразии характеризуют некоторые общие черты:

- ❖ Высокая частота в популяции.
- ❖ Существование клинических форм, образующих непрерывный ряд от скрытых субклинических до резко выраженных проявлений.
- ❖ Более раннее начало и некоторое усиление клинических проявлений в нисходящих поколениях.
- ❖ Значительные половые и возрастные различия в популяционной частоте нозологических форм.
- ❖ Относительно низкий уровень по манифестным проявлениям болезни у монозиготных близнецов (60% и ниже) и существенно превышающий соответствующий уровень и дизиготных близнецов.
- ❖ Несоответствие закономерностей наследования простым менделевским моделям. Учитывая разнообразные механизмы, влияющие на развитие и течение болезни, не удастся проследить четких закономерностей передачи заболевания из поколения в поколение. Анализ родословных при мультифакториальных болезнях основан не на законах Менделя, а на эмпирически полученных данных.
- ❖ Зависимость степени риска для родственников больного от частоты болезни в популяции (она тем выше, чем реже

встречается данное заболевание), риск возрастает с рождением каждого следующего больного, кроме того, он повышается по мере увеличения степени тяжести болезни пробанда.

- ❖ Сходство клинических и других проявлений болезни у ближайших родственников и пробанда, что отражает коэффициент наследуемости (для полигенных болезней он превышает 50-60%).

Относительная роль генетических и средовых факторов различна как для данной болезни, так и для каждого больного. Для болезней с наследственной предрасположенностью характерны признаки полигенного наследования,

Болезни с наследственной предрасположенностью условно можно подразделить на три основные группы; а) врожденные пороки развития; б) психические и нервные болезни; в) соматические болезни среднего возраста. Примеры некоторых часто встречающихся болезней с наследственной предрасположенностью представлены в табл. 15.

Каждая форма болезни с наследственной предрасположенностью - генетически гетерогенная группа. Отдельные болезни, например, ишемическая болезнь сердца, язвенная болезнь желудка, гипертония в действительности не одна болезнь, а гетерогенная группа болезней со сходными фенотипическими проявлениями, которые обусловлены различными генетическими и негенетическими факторами. Например, установлено несколько моногенных форм гиперхолестеринемий, обуславливающих ишемическую болезнь сердца.

Для проявления болезней необходимо конкретное сочетание наследственных и внешних факторов. Чем сильнее будет выражена наследственная предрасположенность и больше вредных факторов среды, тем выше вероятность для индивида заболеть. Для болезней с наследственной предрасположенностью характерна зависимость проявления и тяжести течения от пола и возраста. Одна из характерных особенностей рассматриваемых болезней — их повышенная частота встречаемости определенных семьях, которая обусловлена генетическим фондом семьи.

Среди многочисленных *мультифакториальных болезней* большую группу по числу форм и частоте возникновения занимают злокачественные новообразования. Генеалогическим и близнецовым методами была показана значительная роль наследственных факторов в возникновении рака.

Таблица 15

Примеры болезней с наследственной предрасположенностью

Группы и разновидности заболевания	Распространенность на 1000 человек
<i>Врожденные пороки развития:</i>	
Расщелина губы и неба	1-2
Анэнцефалия и черепно-мозговая грыжа	1
Вывихи бедра	2-5
Гидроцефалия	0,5
Косолапость	5
<i>Психические и нервные болезни:</i>	
Шизофрения	10-20
Эпилепсия	8-10
Рассеянный склероз	0,02-0,7
<i>Соматические болезни среднего возраста:</i>	
Псориаз	10-20
Бронхиальная астма	2-5
Язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки	20-50
Ишемическая болезнь сердца	50-100
Гипертоническая болезнь	100-200
Диабет	10-20

3.10.1. Генетические болезни соматических клеток

Рак - как наследственное заболевание. Однако роль факторов окружающей среды также значительна. Известны связанные с профессией формы рака у рентгенологов, рак кожи у лиц, контактирующих с каменноугольной смолой, рак легких у работников асбестовых заводов, первичный рак печени как следствие вирусного гепатита и др.

В последние годы достигнуты большие успехи в

расшифровке генетической природы злокачественных новообразований, однако многие процессы взаимодействия генетических и средовых факторов ещё неясны. Злокачественные новообразования относятся к группе *генетических болезней соматических клеток*, поскольку генетический аппарат в злокачественных клетках всегда имеет мутационные изменения на генном, хромосомном или геномном уровнях. Закономерности генетических болезней соматических клеток очень сложны и ещё трудны для классификации. В большинстве случаев злокачественных новообразований нет четкого разделения, какие этапы обусловлены наследственностью, а какие факторами среды. Однако существуют методические подходы, которые помогают дифференцировать роль наследственных и средовых факторов. Это популяционно-статистические, близнецовые исследования и биохимические исследования.

Популяционно-статистические исследования показывают, что распространенность таких форм злокачественных новообразований как рак молочной железы и рак желудка, в различных популяциях различаются. Например, частота рака молочной железы у женщин Северной Америки и Западной Европы в 8 раз выше, чем у женщин японского и китайского происхождения, а риск возникновения рака желудка у японцев и китайцев в десять раз ниже, чем у жителей Западной Европы. Это свидетельствует о роли особенностей культуры и образа жизни людей, а так же особенностей генетического фонда в возникновении злокачественных новообразований,

Генеалогический анализ показывает, что если у женщины возник рак молочной железы, то у ее дочери риск возникновения рака той же формы в 2-3 раза выше. Подобная закономерность получена при раке желудка. Это говорит о семейном характере некоторых форм рака. Действительно существуют семьи, где злокачественные новообразования наблюдаются практически у всех прямых родственников.

Молекулярно-генетические методы изучения мутаций позволяют проводить доклиническую диагностику ряда наследственных заболеваний. Так, уже сейчас возможно выявление генов: а) вызывающих злокачественные

новообразования (ретинобластома, опухоль Вильмса, разные формы колоректального рака, рак молочной железы и др.); б) способствующих развитию атеросклероза (рецептор ЛПНП, ApoB, система свертывания крови и др.); в) определяющих некоторые формы гипертонической болезни.

3.10.2. Новые подходы в изучении генетики мультифакториальных заболеваний

Мультифакториальная модель наследования частых заболеваний была предложена Фолкнером. Эта модель предполагает, что предрасположенность к возникновению заболевания зависит от большого числа генов с аддитивным эффектом, и что эта предрасположенность реализуется в результате взаимодействия с большим числом внешнесредовых факторов. Для того, чтобы развилось заболевание, количественное значение предрасположенности должно превысить некий порог. Положение порога на нормальной кривой подверженности заболеванию определяется частотой заболевания в популяции. Мультифакториальная модель наследования частых заболеваний была очень популярной у медицинских генетиков в 60–70-е годы. Для десятков хронических заболеваний были получены оценки коэффициентов наследуемости, которые варьировали в широких пределах: от 0,3 для инсулинзависимого сахарного диабета до 0,9 в случае биполярных психозов и системной красной волчанки. Однако мультифакториальная модель наследования МФЗ является очень абстрактной и неизбежно упрощает взаимодействие между генами, формирующими предрасположенность. Для оценки доминантной и эпистатической компонент требуется большой материал, включающий сотни и даже тысячи семей, а главное, она не дает возможности индивидуализировать гены, и потому путь от генов к заболеваниям через гипотетическую предрасположенность остается для исследователей, по образному выражению Фогеля и Мотульского, черным ящиком. Стремление генетиков упростить ситуацию в изучении частых

заболеваний и перевести ее в форму, удобную и перспективную для изучения – выявлять эффекты главного гена на мультифакториальном фоне – привело к созданию нового класса моделей наследования частых заболеваний и количественных признаков и даже направления, получившего название «генетическая эпидемиология». Первыми моделями такого рода была смешанная модель для аутосомного локуса Мортон и МакЛина, общая модель для генетического анализа родословных Эльстона и Стюарта и ряд других моделей. Использование комплексного сегрегационного анализа для выявления моногенно наследуемых форм среди МФЗ оказалось успешным лишь в очень ограниченном числе случаев: при раке молочной железы (после чего были идентифицированы два рака молочной железы – BRCA1 и BRCA2), раке простаты и при таком количественном признаке, как уровень IgE. Примерно в то же время, только благодаря выделению особых клинических форм МФЗ, удалось выявить моногенно наследуемые формы атеросклероза (семейная гиперхолестеринемия), диабета взрослых у молодых (MODY), гипертонической болезни и некоторых других заболеваний с помощью классического генетического анализа.

Новые возможности в изучении генетики МФЗ появились в связи с успешной реализацией программы «Геном человека» и выявлением разнообразных ДНК-полиморфизмов, довольно часто встречающихся в геноме человека. Частые ДНК-полиморфизмы теоретически создавали предпосылки для картирования генов предрасположенности к МФЗ. Сама идея картировать гены предрасположенности к МФЗ существует давно, однако ее реализация не могла до последнего времени осуществиться. Действительно, если есть гены предрасположенности к определенному МФЗ, то они должны быть сцеплены с заболеванием. Однако в отличие от менделирующих заболеваний, когда только один ген должен быть сцеплен с заболеванием, но зато это сцепление должно быть абсолютным, при МФЗ сцепление должно выявляться для всех генов, участвующих в формировании предрасположенности, однако сцепление будет неполным, так как

соответствующий ген встречается не у всех больных МФЗ. Чем меньше вклад гена в формирование предрасположенности, тем слабее он должен быть сцеплен с заболеванием. Предложены две гипотезы генетики МФЗ. Согласно первой из них, предрасположенность к МФЗ может определяться относительно небольшим числом полиморфных генов, согласно второй, – большим числом генов с малым эффектом. К настоящему времени проделано большое число исследований по анализу сцепления между различными генами-кандидатами и различными МФЗ. В качестве примера можно указать на исследования по сцеплению генов предрасположенности к бронхиальной астме, проведенные методом геномного скрининга. Теоретически такой скрининг позволяет одновременно выявлять все участки всех хромосом, обнаруживающих сцепление с бронхиальной астмой. Одно исследование было проведено в Оксфорде, второе – в США в рамках совместного проекта по изучению генетики астмы, третье – для гагтеритов Северной Дакоты. Из результатов этих 3 исследований вытекает, что довольно большое количество локусов, возможно, сцеплены с бронхиальной астмой. Однако только часть из них повторяется более чем в одном исследовании. К последним относятся локусы в 5q, 6p, 11q, 12q и 13q. В ряде случаев ранее с помощью ассоциаций было показано, что в сцепленных с астмой регионах хромосом локализуются гены-кандидаты. Так, в 11q13 картирован ген рецептора IgE, в 5q – гены цитокинов, в 12q – гены инсулиноподобного фактора роста, синтазы закиси азота, α -интерферона и ряд других генов, в 6q – ген фактора некроза опухоли и главный комплекс гистосовместимости и т. д.

Сходные результаты геномного скрининга на выявление регионов хромосом, сцепленных с тем или иным частым заболеванием, получены для сахарного диабета, ожирения, псориаза, рассеянного склероза и др. Это сходство заключается в том, что довольно большое число хромосомных регионов обнаруживает слабое сцепление с каждым из перечисленных заболеваний, т. е. пока условно картируется множество локусов, формирующих предрасположенность к МФЗ, что служит

доказательством сложной генетической природы этих заболеваний. В независимых исследованиях большая часть условно сцепленных с одним и тем же заболеванием локусов различается: часто остаются сомнения в статистической достоверности сцепления тех или иных локусов. Требуется подтверждение сцепления за счет увеличения числа семей, вовлеченных в исследование, и набора маркерных генов в предполагаемых областях сцепления. Все это позволяет считать, что стратегия идентификации генов МФЗ с помощью сцепления пока не слишком эффективна.

Первые исследования ассоциаций между группой крови АВО и различными заболеваниями были выполнены еще в 20-е годы в Институте экспериментальной биологии под руководством Н. К. Кольцова. Поиск ассоциаций между различными полиморфными системами и разными заболеваниями активно продолжается и сейчас. Его всплеск связан с изучением генов главного комплекса гистосовместимости HLA, для которых был показан очень высокий полиморфизм, а вскоре выявлены ассоциации со многими хроническими заболеваниями, особенно с теми, в патогенезе которых предполагалась существенная аутоиммунная компонента. К последним относятся анкилозирующий спондилит, при котором антиген В27 встречается у 90% больных, болезнь Рейтера (тот же антиген В27 встречается почти у 80% больных при его частоте в популяции 9,4%), псориаз (частота антигена Сw6 у больных составляет почти 80%, а в популяции – 33%) и т. д. Исследование ассоциаций генов системы HLA и ДНК-полиморфизмов в других генах, в отличие от первых исследований ассоциаций между полиморфными генами и хроническими заболеваниями, которые имели случайный характер, стало более целенаправленным, исходящим из имеющихся представлений о патогенезе заболевания, с которым пытаются установить ассоциацию определенной генетической системы, т.е. используется представление о генах-кандидатах.

Принципиально важен вопрос о том, что означают ассоциации между полиморфными генами и хроническими

заболеваниями. Теоретически возможны два варианта. Первый предполагает, что соответствующий ген имеет непосредственное отношение к формированию предрасположенности, так как его продукт прямым или косвенным образом задействован в патогенезе заболевания. Вторым вариантом возникновения ассоциации более сложен. В этом случае ассоциированный ген не имеет никакого отношения к заболеванию, но неравновесно сцеплен с другим геном, который и является собственно предрасполагающим геном. На основании стандартной процедуры обнаружения ассоциаций выбрать, какой из вариантов является правильным, не представляется возможным. Ген, обнаруживающий ассоциацию, или неравновесно сцепленный с ним ген предрасположенности, по определению не может быть главным геном. Напомним, что главным может быть такой ген, в котором есть мутации, не встречающиеся у здоровых индивидуумов. В то же время, в случае ассоциации мы имеем дело с полиморфным геном, и аллели этого гена чаще встречаются у больных, реже, но обязательно встречаются, и у здоровых людей.

Нынешний всплеск интереса к поискам ассоциаций для различных МФЗ связан с обнаружением многочисленных ДНК-полиморфизмов разных типов.

3.10.3. Другая модель полигенного наследования

Все гены системы, определяющие развитие болезни, подвержены минимальным мутациям, которые дополняют друг друга. При этом проявление патологического признака в семье может меняться от нулевого до максимального в зависимости от количества генов, подвергшихся мутациям.

Следующая модель предполагает, что на фоне действия нескольких мутантных генов заболевание может возникнуть в результате влияния одного так называемого главного гена.

Мультифакториальным заболеваниям присущи определенные закономерности наследования. Так, риск возникновения заболевания и выраженность клинической картины зависят от:

- ❖ Количества пораженных родственников и степени их родства с пробандом.
- ❖ Возраста, в котором происходит проявление заболевания в семье.
- ❖ Клинической его тяжести.
- ❖ Количества лиц менее пораженного пола.
- ❖ Частоты встречаемости данной патологии в популяции.

Следовательно, при мультифакториальных заболеваниях имеет место поколение соответствующих патологических состояний среди близких родственников пробанда, нередко с различной частотой поражения лиц мужского или женского пола. Чем выше генетический риск (степень наследственной отягощенности), тем меньшая интенсивность внешнесредовых воздействий необходима для проявления «порогового эффекта», то есть развития болезни.

3.11. Врожденные пороки развития

3.11.1. Классификация пороков развития

Врожденные пороки развития проявляются сразу или через короткое время после рождения. Эти пороки возникли еще в период эмбрионального развития. Они связаны с нарушением структуры органа или части тела, что влечет за собой функциональные патологии.

Аномалии развития приводят к некоторым особенностям строения органов, но не влияют на их функционирование. Врожденные пороки развития обуславливают до 20 % смертей еще в неонатальном периоде развития человека, поэтому необходимы знания причин возникновения, механизмов развития, профилактики и лечения таких заболеваний. В зависимости от причин пороки развития подразделяют на наследственные, экзогенные и мультифакториальные.

Наследственные пороки обусловлены патологическими гаметами родителей, имеющих изменения хромосом или генов. Последствия этого начинают проявляться практически сразу после оплодотворения. Нарушается метаболизм клеток, деление и их взаимодействие. В результате этого, в зависимости

от глубины генетических нарушений, зародыш может погибнуть на ранних стадиях развития или родиться с разной степенью нарушений.

Экзогенные пороки возникают под действием тератогенных факторов. Разнообразных химических, физических и биологических факторов внешней среды, Эти факторы действуют во время эмбриогенеза, нарушают нормальное развитие органов, тканей или частей тела.

Мультифакториальные пороки возникают под действием как экзогенных, так и генетических факторов. К этой группе относятся пороки, причина которых четко не выяснена.

В зависимости от последовательности возникновения, пороки развития подразделяются на первичные и вторичные. Первичные обусловлены непосредственным действием определенного фактора, а вторичные являются следствием существования первичного. Важно установить, какой порок является первичным, что очень важно для лечения и медико-генетического прогноза,

Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) принята классификация пороков развития в основу, которой положены анатомо-физиологические принципы. То есть указывается конкретно структура каждого органа или канал функции нарушения. Например, нарушение твердого тела, расщепление позвоночника, различные пороки сердца, шейные и поясничные ребра, атрезия наружного слухового прохода, недоразвитие участков кишечной трубки и многое другое.

Пороки могут быть изолированными, если встречаются в пределах одной системы органов, или множественными, если характерны для органов разных систем..

Врожденные пороки, аномалии развития, врожденные дефекты – это синонимы, которые употребляют для описания нарушения структуры, поведения, функции и метаболизма обнаруженных при рождении. Наука, изучающая причины этих нарушений называется *тератология* (от греч. тератос - уродство).

Под термином «врожденные аномалии» (или дефекты) подразумевается любая функциональная или структурная

аномалия, которая есть у новорожденного или появляется позже, - аномалия, вызванная либо унаследованным состоянием, либо средовым событием, предшествующем рождению.

По современным данным, из общего числа аномалий развития примерно лишь 20 процентов имеют наследственную природу -- генные, хромосомные или геномные нарушения, 10% обусловлены внешними факторами -- алкоголем, лекарствами, вирусами, химическими веществами и др.; в 70% случаев происхождение аномалий остается невыясненным.

Многие пороки являются результатом нарушения морфогенеза.

Морфогенез -- это реализация генетической программы в пространстве и во времени, осуществляемая под влиянием многих факторов среды. В строго определенный период онтогенеза, в строго определенном месте начинается активация или репрессия строго определенных генов, ведущая к дифференцировке клеток и органогенезу. Выполнение морфогенетической программы начинается с оплодотворения, интенсивно продолжается во внутриутробном периоде, а затем уже в детстве и даже во взрослом состоянии.

Общепризнаны следующие *механизмы тератогенеза*:

- ❖ Нарушение клеточного деления, митотическая активность под влиянием внешних факторов может снижаться или возрождаться.
- ❖ Нарушение миграции отдельных клеток или целых пластов.
- ❖ Нарушение дифференцировки, нарушение специализации клеток. Нарушение адгезии.

Мутации в определенных локусах могут нарушать процесс морфогенеза в эмбриональном периоде.

Врожденные пороки развития подразделяют на *изолированные* (в одном органе, например, стеноз привратника), *системные* и *множественные*.

Этиология врожденных пороков развития может быть: наследственной, мультифакториальной, экзогенной. Нас интересуют экзогенные.

Экзогенно обусловленные пороки развития являются следствием действия на органогенез тератогенных факторов в эмбриональном периоде.

Врожденные аномалии человеческого организма разделяются на две подгруппы:

А. Врожденные пороки развития: центральной нервной системы и органов чувств, лица и шеи, сердечно-сосудистой системы, дыхательной системы, органов пищеварения, костно-мышечной системы, мочевыделительной системы, половых органов, эндокринных желез, кожи и ее придатков, прочие пороки.

Б. Множественные врожденные пороки: хромосомные болезни; комплексы пороков, вызванные генными нарушениями; комплексы пороков, возникшие в эмбриональном периоде (с 16-го дня после оплодотворения до начала 11-й недели); комплексы пороков неустановленного происхождения; неуточненные (неклассифицированные) комплексы множественных пороков.

Обращает внимание то обстоятельство, что подгруппа А выделена на основе анатомо-физиологического принципа классификации, то есть пороки строения классифицируются в зависимости от подразделения тела человека на системы органов. Подгруппа Б выделена по этиологическому принципу, то есть в зависимости от причин и условий возникновения аномалии.

Как правило, использование различных принципов при распределении любых объектов исследования по группам систематиками не приветствуется, но перед нами тот редкий случай, когда это и оправдано, и целесообразно.

Наибольшая чувствительность зародыша человека к тератогенным факторам проявляется первый раз в конце 1-й – начале 2-й недели беременности и второй раз – между 3-й и 6-й неделями. Эти два срока называют критическими периодами развития.

В зависимости от стадии онтогенеза, когда патогенный фактор действовал на развитие организма, врожденные пороки развития бывают следствием *гамеопатий, бластопатий, эмбриопатий и фетопатий.*

Чувствительность закладок разных органов к действию экзогенных факторов в разные сроки пренатального онтогенеза сильно варьирует. В эмбриональном формировании какого-либо органа есть предельный срок, в течение которого повреждающий фактор может вызвать в органе развитие порока. Этот промежуток времени называют тератогенным терминационным периодом. Наибольшая чувствительность к тератогенам – с 3-й по 8-ю неделю беременности (период органогенеза).

Использование методов молекулярной биологии в эмбриологии обогатило последнюю знанием *генов, ответственных за нормальное развитие.*

Эмбриональные гены Идентифицированы многие гены и генные семейства, которые играют важную роль в раннем эмбриогенезе. Гены эмбрионального развития человека гомологичны по нуклеотидным последовательностям таковым и других видов животных. Большинство этих генов регулируют выработку белков, называемых *транскрипционными факторами*. Они контролируют транскрипцию РНК с молекулы ДНК, активируя или подавляя экспрессию генов. Важнейшие транскрипционные факторы контролируют многие гены, координирующие эмбриологические процессы, например, сегментацию тела, эмбриональную индукцию, миграцию и дифференцировку клеток и др.

Несколько семейств эмбриональных генов человека уже подробно изучены на молекулярном и хромосомном уровнях. Они представлены, как правило, кластерами в определенном локусе хромосом. Краткая характеристика некоторых из этих генов приводится ниже,

Гомеобоксные гены (homeobox - HOX) расположены во 2, 7, 12 и 17 хромосомах. Их продукты определяют транскрипционные факторы осевой дифференцировки эмбриона. Экспрессия этих генов играет важную роль в раннем эмбриогенезе. Мутаций HOX генов у человека не обнаружено, что говорит о том, что любые мутации в этом семействе ведут к прекращению развития эмбриона на самых ранних стадиях.

Спаренные гены (paired - box - PAX) кодируют небольшие белки, регулирующие начальные этапы развития. У человека обнаружено 8 PAX генов. Мутации в гене PAX 3 приводят к развитию аутосомно-доминантного синдрома Варденбурга (глухота, гетерохромия радужки, белая прядь волос надо лбом). Мутации в гене PAX 6 приводят к аниридии.

Гены цинковых пальцев (zinc finger) кодируют транскрипционные факторы, образующие комплекс с ионами цинка, похожий на палец. Эти белки играют важную роль в развитии эмбриона. Например, мутация в гене этой группы, локализованном в хромосоме 7, приводит к развитию аномалий черепа и рук, нарушению развития почек и половой дифференцировки.

В табл. 16 указаны гены развития и их роль в клинических синдромах.

Гены гомеобокса (homebox) известны благодаря гомеодомену – консервативной последовательности ДНК, которая называется гомеобоксом. Последний кодирует транскрипционные факторы, активирующие каскады генетических регуляторных феноменов, таких как сегментация и формирование осей тела. За становление краниокаудальной оси отвечает комплекс дрозофиллы Ном-С. Эти гены относятся к классам гомеопатических генов Antennapedia и Bithorax. Так гены, обуславливающие развитие головных структур, локализованы на 3'-конце ДНК и экспрессируются первыми, в то время как гены, контролирующие развитие каудальных структур проявляются позже и лежат ближе к 5'-концу (рис. 62). Эти гены сохранены у человека и существуют в виде четырех копий – **HOX A, HOX B, HOX C и HOX D**. Каждый кластер лежит на отдельной хромосоме, а гены в каждой группе нумеруются от 1 до 13 (рис62).

Хорошо доказано тератогенное действие ионизирующей радиации, лекарственных веществ (талидомид, варфарин, аминоптерин, стероидные гормоны и др.).

Существует вполне обоснованное мнение, что алкоголь является наиболее частой причиной врожденных аномалий.

Таблица 16

Роль генов в развитии врожденных пороков

Ген	Хромосома	Врожденные пороки
FMR-1	xq27-xq28	Умственная отсталость, связанная с ломкостью X-хромосомы
PAX-3	2q37	Синдром Варденбурга, болезнь Гиршпрунга
IGF		Задержка внутриутробного роста
GHR		Карликовость Ларона
HOXA13		Кистостопагенитальный синдром
FGFR1	8p11	Синдром Пфайфера
FGFR2	10q25-10q26	Синдромы Джексона-Вейса, Крузона, Аперта
FGFR3	4p16	Ахондроплазия, танатофорная дисплазия
MSX2	5q34	Бостоновский краниосиностоз, трехфаланговый большой палец руки
HOXD13	2q31	Синдактилия, полидактилия
NKX2-5	5q35	Пороки межпредсердной перегородки, задержка предсердно-желудочкового проведения
TBX5	12q24	Синдром Голта-Орама
PAX2	10q24-10q25	Синдром легкой колобомы
WT1	11p13	Опухоль Вильмса
SRY	Yp11	Женский организм с генотипом XY, дисгенез гонад, синдром Сваера
RET	10q11	Болезнь Гиршпрунга
Мюллеровский фактор угнетения	19p13	Персистенция Мюллерового протока
PAX6	11p13	Отсутствие радужной оболочки
SHH	7q36	Галопрозэнцефалия
7-Дегидрохолестеролредуктаза	7q32	Синдром Смита-Лемли-Опица

3.11.2. Фетальный алкогольный синдром (алкогольная эмбриопатия)

Синдром вызван употреблением алкоголя во время беременности. Минимальные диагностические признаки: пренатальная гипотрофия; микроцефалия, умственная отсталость; отмечаются низкие масса и длина тела при рождении (рис. 63), расщелина губы и неба; бывает одно- или двусторонней (рис. 64), полидактилия (рис. 65).

Одновременно с этим существует ряд болезней, которые, сопутствуя беременности, могут повышать вероятность возникновения врожденных пороков развития, уродств и (или) досрочного прерывания беременности.

В начале 40-х годов по Австралии прокатилась волна заболеваний коревой краснухой. Эта эпидемия сопровождалась значительным повышением числа новорожденных, появившихся на свет с различными аномалиями – врожденной катарактой, микроцефалией, глухонемой, пороками сердца. Уже в 1945 году Н.Грегг сумел доказать связь между этими патологиями и заболеванием матери краснухой в первые месяцы беременности.

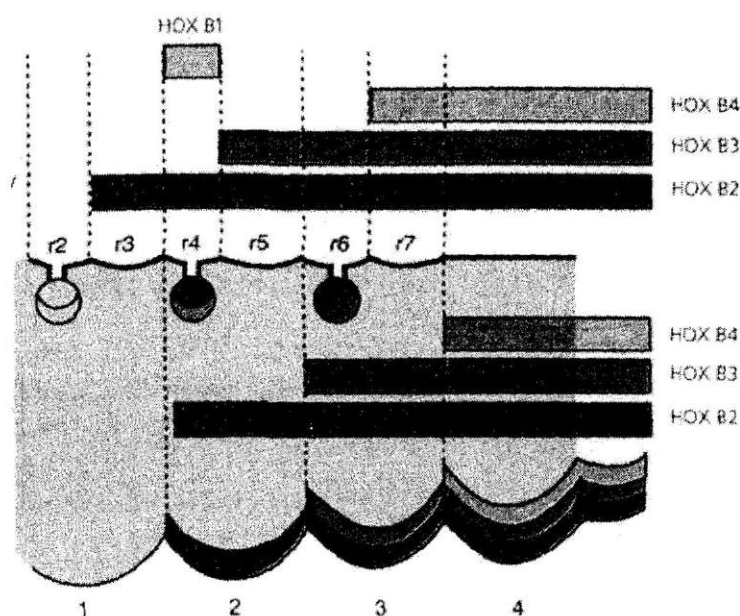


Рис.62. Экспрессия генов кластера HOX В гомеобокса в заднем мозге, ганглиях и горловых дугах. За исключением HOX В 1, экспрессия генов осуществляется способом частичного перекрывания от переднего до заднего сегментов (r 2- r 7).

То, что многие вирусы легко проходят через плацентарный барьер и проникают в клетки зародыша, было известно задолго до Грегга, однако именно он первым установил, что вирусные болезни могут стать причиной уродств.



Рис. 63. Особенности лица при фетальном алкогольном синдроме (алкогольная эмбриопатия)

Кроме вируса коревой краснухи, тератогенный эффект обнаружен и у вируса цитомегалии. Пожалуй, только в отношении этих двух вирусов, точнее, их тератогенной активности, сходятся мнения большинства исследователей. Что же касается других вирусов, то такие данные противоречивы. Опубликовано много наблюдений, связывающих появление на свет детей с врожденными аномалиями и перенесенной матерью во время беременности вирусной инфекцией: грипп, ветряная оспа, герпес, корь, сар и др.

В том, что касается бактериальных инфекций и их влияния на плод, тоже нет единодушия. Правда, расхождения во мнениях имеют несколько иной характер, чем при споре о действии вирусов: говоря о бактериях, одни исследователи вообще отвергают их тератогенный эффект, другие же более осторожны и не исключают по крайней мере, опосредованного влияния бактерий.

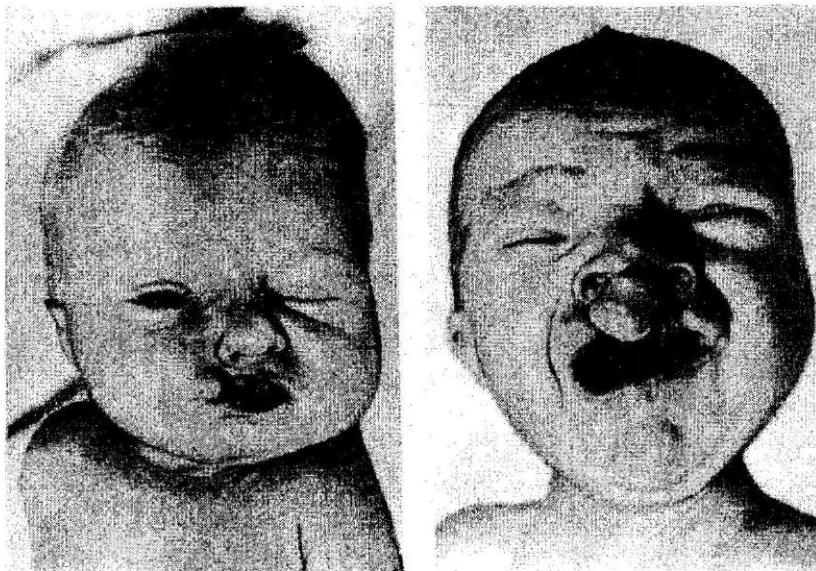


Рис. 64. Расщелина губы и неба. а – односторонняя; б – двусторонняя

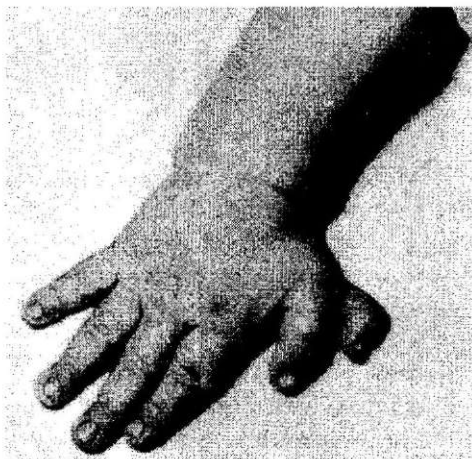


Рис. 65. При преаксиальной полидактилии дополнительный палец находится со стороны первого пальца

К сожалению, вирусными и бактериальными инфекциями список заразных болезней, обладающих тератогенными свойствами, не исчерпывается. Существуют еще так называемые протозойные инфекции. В частности, врожденные дефекты могут возникать при токсоплазмозе.

Токсоплазма (*Toxoplasma gondii*) – это одноклеточное простейшее, проникающее в клетки хозяина и в них проходит различные стадии своего жизненного цикла. Для подавляющего большинства взрослых людей эти паразиты не очень страшны: заражение может вызвать лишь легкое недомогание, а сама болезнь – токсоплазмоз – обычно протекает практически бессимптомно. Однако совсем не такими безобидными становятся токсоплазмы, если их носителем является беременная женщина.

От зараженной матери токсоплазмы через плаценту проникают к зародышу и заселяют его клетки, причем проявляют наибольшее сродство к клеткам нервной системы. У детей, оставшихся в живых, нередко возникают поражения центральной нервной системы и органов чувств – слепота, гидро- и микроцефалия, а иногда даже анэнцефалия.

Характерным признаком токсоплазмоза плода являются мозговые кальцификаты. Часто встречается гибель плода в утробе матери, либо новорожденного в первые месяцы жизни.

Существенным признаком, указывающим на наследственную или врожденную патологию тератогенной природы, является нарушение течения беременности и пренатального развития плода.

Возможные причины задержки внутриутробного развития со стороны плода следующие: хромосомные аномалии, генные мутации, хронические инфекционные заболевания плода (цитомегалия, сифилис, врожденная краснуха и т.д.).

Внутриутробную задержку развития необходимо отличать от малых размеров плода, обусловленных генетически (врожденная гипопункция щитовидной железы, различные формы наследственной карликовости, синдромы).

3.11.3. Мониторинг врожденных пороков развития новорожденных

Мониторингу врожденных пороков развития посвящено

большое число работ как за рубежом, так и у нас в стране. За рубежом данное направление (мониторинг пороков) разрабатывалось с начала 60-х годов, и на протяжении всего этого времени создавались, апробировались и модифицировались методологические концепции проведения и осуществления такого мониторинга с учетом различной структуры здравоохранения в разных странах. Функционирующие в настоящее время Европейский и Международный регистры или мониторинговые программы обладают возможностью в кратчайшие сроки (за счет объединения данных) решать важные научно-практические задачи. В нашей стране эти исследования носили в основном частный характер, использование различных методов затрудняет проведение сравнительных оценок публикуемых данных.

В основу проведения мониторинга врожденных пороков развития в клинике акушерства и гинекологии берутся основные методические рекомендации, предложенные Европейским регистром. Выбор метода исследования позволяет сравнить полученные данные с международными и, соответственно, формировать базу данных.

Частота врожденных пороков развития за последние годы была различной: от 20,19 до 32,4 на 1000 рождений. Средняя их частота, по данным Европейского регистра, – 23,6 на 1000 рождений за период с 1980 г. по 1994 г. Размах колебаний по данным разных регистров, составляет от 15,3 (Белфаст) до 32,4 (Страсбург).

При сравнении частоты выявляемых врожденных пороков развития по нозологическим формам с данными Европейского регистра отмечены более высокие показатели следующих пороков: гидроцефалии, агенезии и дисгенезии почек, множественных врожденных пороков развития, дефектов невральнoй трубки.

Достаточно убедительным объяснением этого факта может быть квалифицированное использование данных ультразвуковой диагностики в постнатальный период, так как в 80% случаев первично порок был выявлен при этом исследовании.

В последние годы, среди врожденных пороков развития новорожденных увеличился удельный вес гидроцефалии,

агенезии и дисгенезии почек, врожденных пороков сердца, несмотря на то, что данные пороки достаточно диагностируются в III триместре беременности.

Раздел 4

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Для изучения наследственности человека в зависимости от конкретной цели применяются следующие методы: клинико-генеалогический, биохимический, прямая и непрямая ДНК-диагностика, близнецовый, популяционно-статистический, дерматоглифический, генетики соматических клеток.

4.1. Клинико-генеалогический метод

Генеалогический метод – метод родословных, т.е. прослеживания болезни или признака в семье с указанием типа родословных связей между членами родословной, установление генетических закономерностей. Суть генеалогического метода сводится к выявлению родословных связей и прослеживанию признака или болезни среди близких и дальних, прямых и не прямых родственников. Состоит из 2 этапов: составления родословной и генеалогического анализа.

Составление родословной сопровождаются краткой записью о каждом члене родословной с точной характеристикой его родства по отношению к пробанду (легенда родословной). Для наглядности родословную изображают графически, используя стандартные символы. При составлении родословных используют условные обозначения, предложенные Г. Юстом в 1931г. (рис. 66).

Анализируя родословные, необходимо помнить о возможности неполного пенетрирования доминантного аллеля, обусловленное взаимодействием генов или факторами среды. Показатель пенетрантности может быть вычислен как отношение фактического числа носителей признака к числу ожидаемых носителей этого признака в данной семье. На рис.67

приведена родословная с синдромом Марфана. Первая задача при анализе родословных - установление наследственного характера признака. Если в родословной встречается один и тот же признак (или болезнь) несколько раз, то можно думать о наследственной природе. Необходимо исключить возможность фенкопии. Вторая задача - установить тип наследования. Определение типа наследования конкретной родословной является серьезной генетической задачей. Необходимо знать основные критерии разных типов наследования.

4.1.1. Родословные болезни с аутосомно-доминантным типом наследования характеризуются:

- Болезнь встречается в каждом поколении родословной, что называют передачей болезни по вертикали (рис. 67).
- Соотношении больных и здоровых приближается к 1:1.
- Нормальные дети больных родителей имеют нормальными всех детей.
- Соотношение больных мальчиков и девочек равное.
- Больные мужчины и женщины одинаково передают болезнь своим детям – мальчикам и девочкам.
- Гомозиготы могут рождаться от двух больных родителей. Болезнь у них обычно протекает тяжелее, чем у гетерозигот.

4.1.2. Родословные с аутосомно-рецессивным типом наследования

Заболевания с данным типом наследования проявляются только у гомозигот. Для родословных характерно, что признак проявляется далеко не в каждом поколении. Для редких аутосомно-рецессивных заболеваний характерно следующее:

- Родители обычно клинически нормальны.
- В браке больного со здоровым рождаются здоровые дети (если здоровый не гетерозигота).
- В браке больного с носителем мутантного аллеля рождаются 50% больных детей, что имитирует доминантный тип наследования.

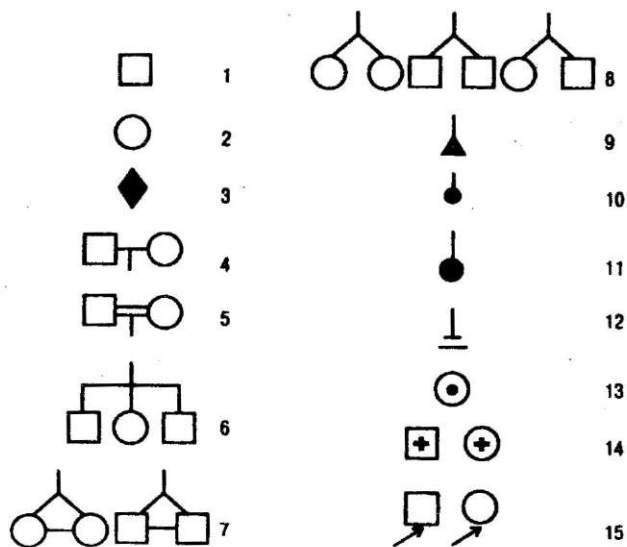


Рис. 66. Символы, используемые при составлении родословных: 1-лицо мужского пола; 2 - лицо женского пола; 3 – пол неизвестен; 4 - брак; 5 - родственный брак; 6 - сибсы; 7 - монозиготные близнецы; 8 - дизиготные близнецы; 9 - выкидыш; 10 - аборт; 11 - мертворожденный; 12 - бездетный брак; 13 - гетерозиготная носительница мутантного гена в X-хромосоме; 14 - умерли; 15 - пробанд

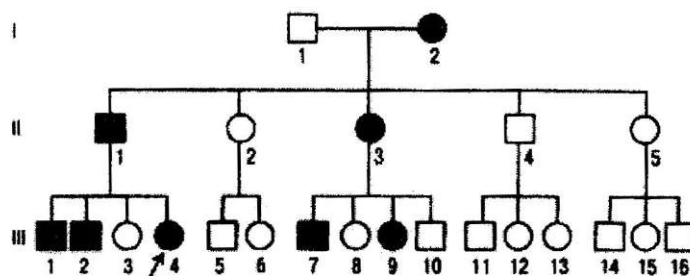


Рис.67. Родословная с аутосомно-доминантным типом наследования (синдром Марфана)

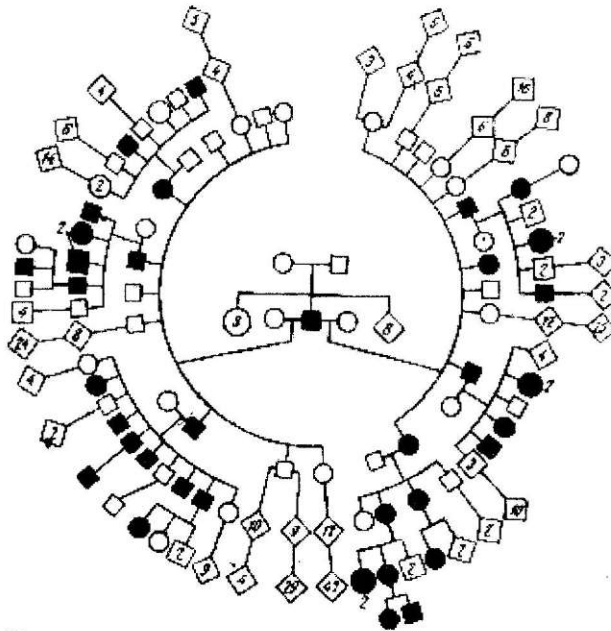


Рис.68 Доминантное наследование хондродистрофической карликовости(по Stephens).

- Оба пола поражаются одинаково.
- Вероятность появления рецессивного потомства возрастает в близкородственных браках, где оба родителя могут являться носителями одного и того же рецессивного аллеля, полученного от общего предка.
- Обращает внимание распространение заболевания в последнем поколении по горизонтали (рис. 69).

Примером аутосомно-рецессивного типа наследования является родословная семьи с синдромом Тея-Сакса (рис. 69) и миопатии Дюшенна (рис. 70).

4.1.3. Родословные при доминантном X-сцепленном типе наследования

Гены расположенные в X-хромосоме и не имеющие аллелей в Y-хромосоме, представлены в генотипах мужчин и женщин в

разных дозах. Женщина, унаследовав от одного из родителей патологический аллель, является гетерозиготой, а мужчина гемизиготой; для данного типа наследования характерно:

- ❑ Поражаются и мужчины и женщины, но больных женщин в 2 раза больше, чем мужчин, в связи с большей возможностью получения женщинами соответствующего аллеля либо от отца, либо от матери. Мужчины могут наследовать этот признак только от матери.
- ❑ Больные женщины в среднем передают патологический аллель 50% сыновей и 50% дочерей.
- ❑ Больной мужчина передает патологический аллель всем дочерям и не передает сыновьям, поскольку последние получают от отца Y-хромосому.
- ❑ В среднем женщины болеют менее тяжело, чем мужчины (они гемизиготны).

Примером такого типа наследования является родословная с витамином Д-резистентным рахитом (наследственная гипофосфатемия), рис. 71.

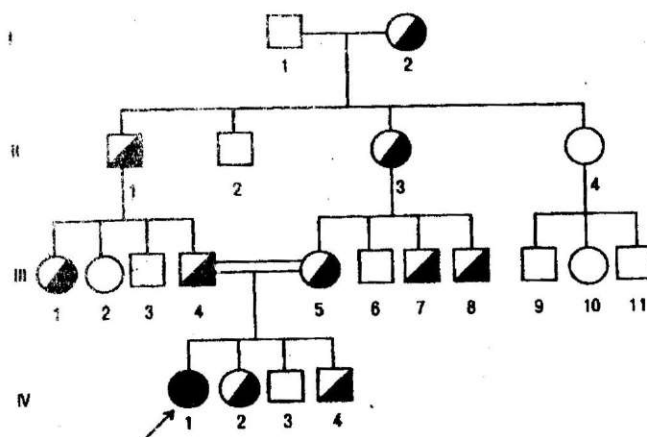


Рис.69. Родословная с аутосомно-рецессивным типом наследования болезни (синдром Тея - Сакса -GM2 - ганглиозидоз).

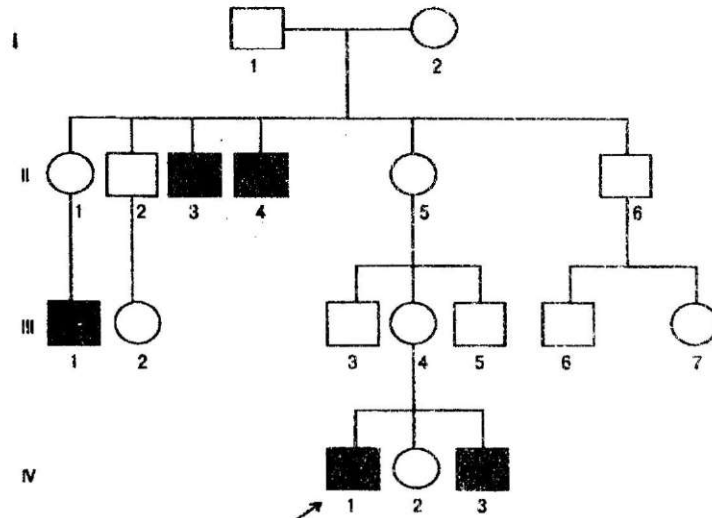


Рис.70. Рецессивно - аутосомное наследование псевдогипертрофической прогрессивной миопатии (типа Дюшенна).

4.1.4. Родословные при рецессивном X-сцепленном наследовании признаков

Больные – только мальчики, т.к. наблюдается преимущественное проявление признака у гемизиготных мужчин.

Признак наследуется мужчинами через поколение от деда по материнской линии к внуку.

У женщин патологический признак проявляется лишь в гомозиготном состоянии, вероятность чего возрастает при близкородственных браках.

Сестры-носители передают ген 50% сыновей и 50% дочерей.

Здоровые мужчины не передают болезни.

На рис.71, 72 изображены родословные наследования Витамин Д- резистентного рахита и гемофилии соответственно.

4.1.5. Y-сцепленный (голандрический) тип наследования

Наличие Y-хромосомы только у представителей мужского пола объясняет особенности данного типа наследования:

Признак обнаруживается лишь у мужчин и передается по мужской линии из поколения в поколение от отца к сыну (рис. 73).

В Y-хромосоме обнаружен ряд генов: детерминирующий развитие семенников, контролирующий интенсивный рост тела, конечностей и зубов, определяющий оволосение ушной раковины

Наследование, ограниченное полом. Экспрессивность некоторых генов и признаков зависит от уровня вырабатываемых гормонов. Гены, имеющиеся в кариотипе обоих полов, но проявляющиеся лишь у одного пола, называются *ограниченные полом*. Например, облысение (зависимый от пола признак) характерно только для мужчин, хотя такой ген может быть и у женщин. Этот ген не проявляет своей активности, т.к. в организме женщины нет достаточного количества тестостерона. Особи обоих полов человека обладают одинаковым генетическим потенциалом, необходимым для образования половых органов, свойственных другому полу. Однако они обычно не образуются, т.к. уровень специфических половых гормонов у мужчин и женщин существенно отличается. Примерами независимых от половых гормонов признаков являются цвет глаз, цвет волос, количество зубов, праворукость, интеллект и др.

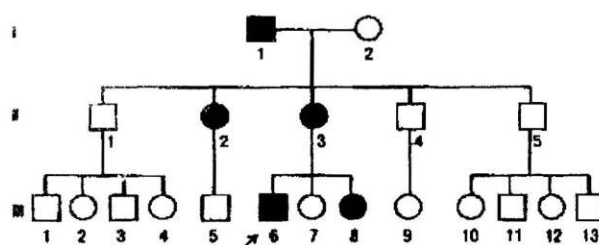


Рис. 71. Родословная с X-сцепленным доминантным типом наследования (витамин Д - резистентный рахит)

4.1.6. Митохондриальная наследственность

Митохондрии передаются с цитоплазмой ооцитов. Для митохондриального типа наследования характерны следующие признаки:

1. Болезнь передается только от матери.
2. Больны и девочки, и мальчики.
3. Больные отцы не передают болезни ни дочерям, ни сыновьям.

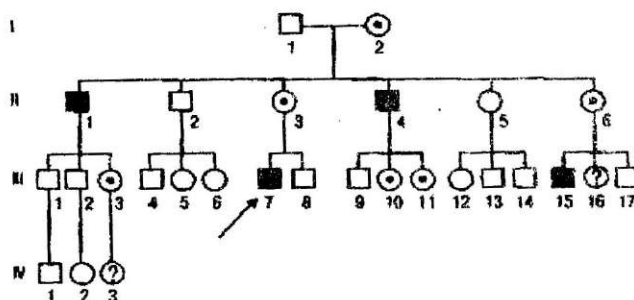


Рис.72. Родословная с X-сцепленным рецессивным типом наследования болезни (гемофилия)

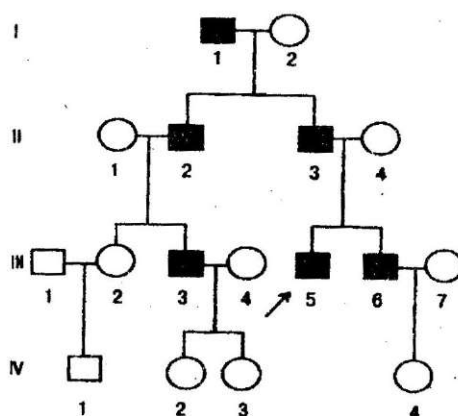


Рис. 73. Родословная с Y-сцепленным (голандрическим) типом следования

Открытия второй половины XX века свидетельствуют о том, что наряду с наследованием болезней по классическим законам Менделя (моногенные болезни, когда потомству передается единственная патологическая мутация) существуют многочисленные отклонения от этих законов в наследовании патологических признаков.

Множество заболеваний развивается в результате наследований мутаций митохондриальных генов: новым разделом медицины в конце 20-го столетия стала митохондриальная патология, а также генетически детерминированные болезни тканевого дыхания и клеточной биоэнергетики.

4.1.7. Митохондриальные болезни

Обнаружение внеядерного генома митохондрий в 60-х годах 20-го столетия открыло новую страницу в области патологии человека, стали известны митохондриальные болезни. В митохондриальном геноме, наследуемом только от матери через цитоплазму яйцеклетки, насчитывается порядка 16600 нуклеотидных пар.

Классическими патогномичными проявлениями митохондриальных болезней считаются миопатии и энцефалопатии, лактат-ацидоз, органические ацидемии и феномен «рваных», или шероховатых красных мышечных волокон (*ragged red fibers - RRF*), выявляемый при световой микроскопии мышечных биоптатов.

Типичными примерами митохондриальных болезней являются синдромы Кернса-Сейра (офтальмоплегия, пигментная дегенерация сетчатки, атриовентрикулярный сердечный блок, атаксия), миоклонусэпилепсия с прерывистыми мышечными волокнами (*MERRF*-синдром), миоклонус – эпилепсия с инсультоподобными проявлениями (*MELAS* - синдром), *NARP* – синдром (нейрогенная мышечная гипотония, атаксия, пигментный ретинит). Однако теперь выясняется значительный клинический полиморфизм митохондриальных болезней.

С недостаточностью митохондриальных ферментов

связано возникновение неонатального нейродистресс – синдрома (лактат-ацидоз), острого нейро- и гепатотоксического синдрома Рейе (Reye) , а также подострой некротизирующей энцефалопатии Лея (Leigh). В ряде случаев она служит причиной синдрома внезапной смерти. С приобретенными в течение жизни мутациями митохондриальных генов связывают процессы старения человека.

Создана программа диагностики митохондриальных болезней у детей. Она включает исследование уровня лактатов и пируватов крови как скрининг-тест, проводимого после физической нагрузки или внутривенного введения раствора глюкозы, исследование спектра органических кислот крови и мочи методом хромато-масс-спектрометрии, электронную микроскопию митохондрий и гистохимическое исследование ферментов дыхательной цепи митохондрий в биоптате скелетной мышце.

Молекулярно-генетическая диагностика болезни дыхательной цепи митохондрий проводится в ряде лабораторий. Однако ее возможности ограничены, так как синтез ферментов тканевого дыхания в значительной степени определяется ядерным геном, и только часть из них контролируется генами митохондрий.

4.2. Цитогенетический метод

Цитогенетические методы предназначены для изучения структуры хромосомного набора или отдельных хромосом. Объектом могут быть делящиеся соматические, мейотические и интерфазные клетки.

Получение препаратов митотических хромосом.

Первое главное условие цитогенетической диагностики - выявление делящихся клеток. Культуры клеток можно получить из кусочков кожи (растут фибробласты), костного мозга, эмбриональных тканей, хориона, клеток амниотической жидкости. Наиболее удобным объектом является культура лимфоцитов периферической крови. Достаточно взять 1-2 мл венозной крови и добавить ее в смесь питательной среды с

фитогемаглютинином (ФГА). Последний вызывает иммунологическую трансформацию лимфоцитов и их деление. Продолжительность культивирования 48-72 часа.

Вторым методическим условием является использование колхицина, разрушающего веретено деления и останавливающего клеточное деление на стадии метафазы. Колхицин добавляют в культуры клеток за 2-3 часа до окончания культивирования. Следующим условием для получения хороших метафазных пластинок является гипотонизация клеток. В гипотоническом растворе хлорида кальция или цитрата натрия клетки набухают, ядерная оболочка разрывается и хромосомы свободно плавают в цитоплазме. Клеточную суспензию фиксируют смесью метанола и уксусной кислоты (3:1), затем суспензию центрифугируют и меняют фиксатор. Смесь клеток с фиксатором может сохраняться при температуре 4 градуса Цельсия в течение нескольких недель.

4.2.1. Окраска препаратов

Все методы окраски препаратов можно разделить на 3 группы:

- простые (рутинные),
- дифференциальные (флюоресцентные),
- избирательные.

Наиболее распространен метод окраски по Гимзе, или простая окраска (“рутинная окраска”). Краситель Гимзе окрашивает все хромосомы равномерно по всей длине. При этом контурируются центромера, спутники и вторичные перетяжки. При простой окраске возможна только групповая идентификация хромосом. Структурные хромосомные аномалии (транслокации, делеции, инверсии) могут быть идентифицированы с помощью дифференциальной окраски. Совокупность морфологических особенностей полного хромосомного набора, свойственного клеткам данного вида, обозначается термином “кариотип”. Диплоидное число хромосом у человека 46. Размер хромосом может быть выражен

абсолютной длиной (в микрометрах) или длиной относительной (в процентах). Доля длины короткого плеча к длине всей хромосомы, принятой за 100% (центромерный индекс). Центромерный индекс 50% – это метацентрическая хромосома. Форма хромосомы (мета-, субмета- и акроцентрическая) определяется положением первичной перетяжки. Классификация и номенклатура равномерно окрашенных хромосом человека выработана на международных совещаниях в Денвере (1960 г.), Лондоне (1963г.) и Чикаго (1966г.), их современная интерпретация представлена на таблице 17.

Таблица 17

Линейные параметры равномерно окрашенных хромосом
(цит. по А.А Прокофьевой- Бельговской, 1969)

Параметр	Группа и номер хромосомы																
	A			B		C			D	E	F	G	Y				
	1	2	3	4-5	6	X-7	8	9	10-11	12	13-15	16	17	18	19-20	21-22	
Центромерный индекс, %	49±2	38±3	47±3	29±3	37±3	35±4	39-40±3	35-36±3	33±3	29±3	18±4	40-41±3	34±3	29±3	45±3	25±3	18±4

Под дифференциальной окрашиваемостью хромосом понимают их способность к избирательному окрашиванию. Дифференциальное окрашивание обеспечивается сравнительно простыми температурно-солевыми воздействиями на фиксированные хромосомы. При этом выявляется структурная дифференцировка хромосом по длине, выражающаяся в виде чередования эу- и гетерохроматических районов (темные и светлые полосы) - рис.74. Протяженность этих участков специфична для каждой хромосомы, соответствующего плеча и района. Каждая хромосома имеет свой рисунок исчерченности (рис.74). При дифференциальной окраске метафазных хромосом в кариотипе можно оценить около 200- 400 участков. Выделены 4 основных метода окрасок хромосом: Q-, G-, R-, C- окраски. Обозначение линейной структуры хромосом строится на следующих принципах (рис. 74 а,б).

Каждая хромосома рассматривается как непрерывная совокупность сегментов, независимо от их окраски, поэтому “межсегментов” (interbands) не существует. Хромосомные плечи, обозначаемые латинскими *p* – короткое плечо и *q* – длинное плечо, подразделяются на районы (regions), районы на сегменты (bands) – участки хромосом, четко отличающиеся от соседних по интенсивности окраски. Районы и сегменты нумеруются арабскими цифрами, от центромеры к теломере, отдельно для каждого плеча. Так символ 1p22 означает второй сегмент в районе 2 короткого плеча аутосомы первой.

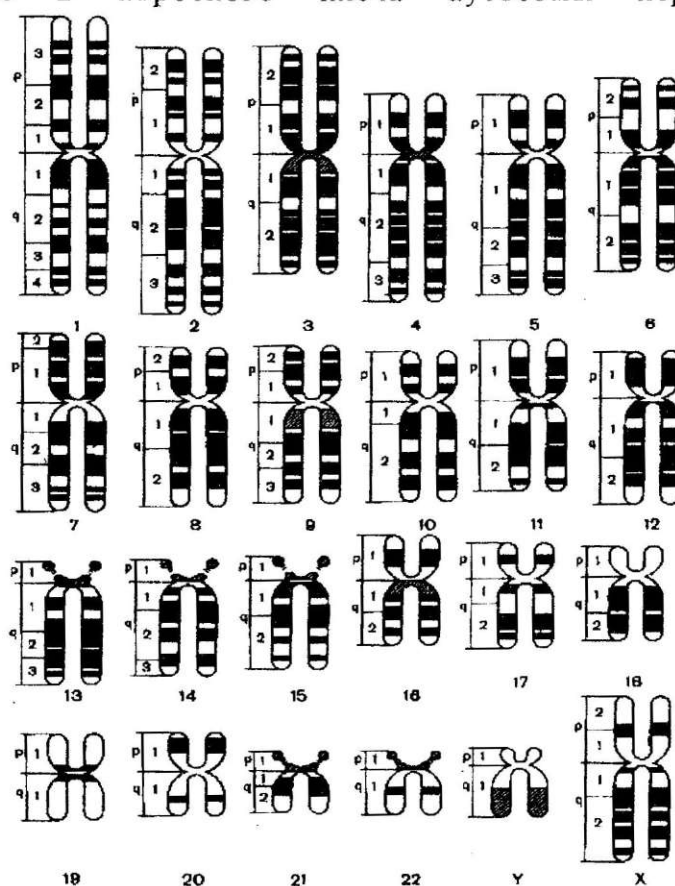


Рис.74 а. Обобщенное схематическое изображение дифференциальной окраски хромосом по G-, R- и Q-методам

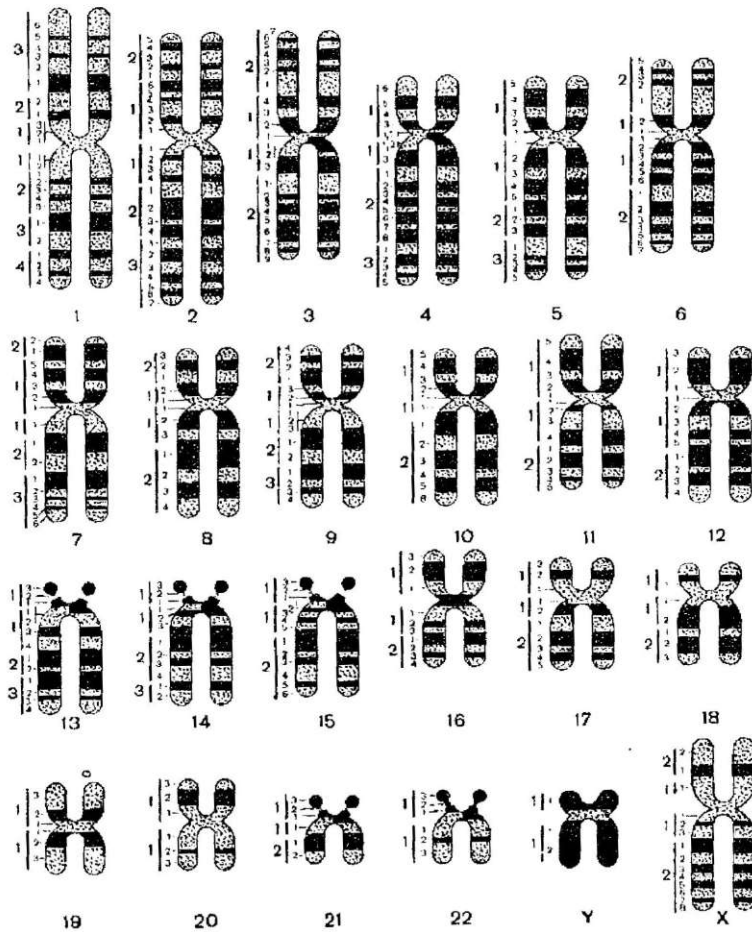


Рис.74 б. Схематическое изображение дифференциальной окраски хромосом акрихином и его производным.

Механизм образования сегментов неясен. Предполагается, что окрашенные сегменты – это гетерохроматинные, поздно реплицирующиеся участки хромосом с повторяющимися последовательностями ДНК, а неокрашенные – это эухроматиновые участки, в которых расположены кодирующие последовательности. На рис. 75 изображена идиограмма хромосомного набора человека.

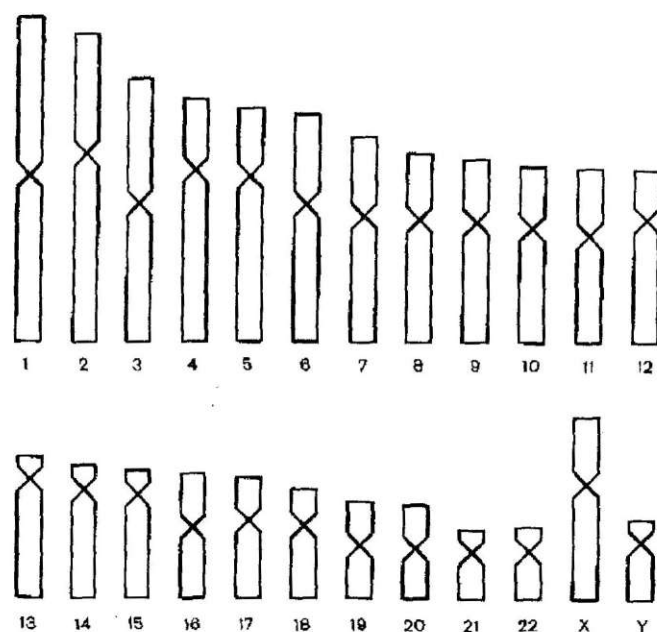


Рис. 75. Идиограмма хромосомного набора человека, построена по данным морфометрии индивидуально идентифицируемых хромосом, приведенным в таблице 17.

При специальном окрашивании хромосом используют флюоресцентное алкилирующее вещество акрихин-иприт (Q-метод). Самый крупный ярко светящийся сегмент имеется в Y-хромосоме, в хромосомах 1, 9 и 16 ярким свечением выделяются районы вторичных перетяжек. Для Q-окраски используются нефлюоресцирующие основные красители (азуры, метиленовый синий), причем применяются их смеси (красители Романовского-Гимзы и др.). По числу, величине и расположению выявляющихся сегментов, рисунок G-окраски аналогичен рисунку (рис. 73) при Q-окраске. Темно окрашивающиеся G-сегменты соответствуют флюоресцирующим Q-сегментам.

R-окраска. Рисунок противоположен рисунку при G-окраске: R-положительные сегменты соответствуют G-отрицательным и наоборот. Существует несколько методик R-окраски.

С-окраска. В отличие от предыдущих трех типов дифференциальной окраски при С-окраске в каждой хромосоме человека краситель воспринимают лишь центромерный и около центромерный районы во всех хромосомах, плюс длинное плечо в Y-хромосоме. По локализации выделяют 4 типа С-хроматина. Собственно центромерный, присущий всем хромосомам; гетерохроматин вторичных околоцентромерных перетяжек аутосом 1, 9 и 16; гетерохроматин коротких плеч акроцентрических аутосом; гетерохроматин длинного плеча Y-хромосомы.

Кроме вышеназванных дифференциальных окрасок имеются методы избирательных окрасок, т.е. окрасок отдельных районов индивидуальных хромосом (применение соединений серебра: Ag-As-окраска или Ag-Sat-окраска). Метод информативен для идентификации акроцентрических хромосом.

В решении вопроса диагностики хромосомных болезней различные методы дифференциального окрашивания применяют в комбинации. Благодаря дифференциальному окрашиванию хромосом можно выявить даже незначительные хромосомные поломки: делеции, транслокации.

4.2.2. Метод определения полового хроматина

Отличительной особенностью женского пола является содержание в интерфазных ядрах соматических клеток **полового хроматина** (тельце Барра). Барр и Бертрам в 1949 году открыли небольшие хроматиновые плотные тельца в ядрах нейронов самок кошек. В дальнейшем такие тельца были описаны в ядрах нейронов и других интерфазных клеток самок различных видов животных, в том числе человека. Эти тельца были названы тельцами Барра, или половым хроматином. *Половой хроматин* — это небольшое округлое тельце, хорошо окрашивающееся основными красителями, представляющими собой инактивированную вторую X хромосому. Оно обнаруживается в интерфазных ядрах клеток млекопитающих и человека около ядерной оболочки. В лейкоцитах половой хроматин имеет вид

«барабанных палочек». Половой хроматин идентифицируется в большинстве клеточных ядер самок (60-70%). В клетках самцов он обычно не выявляется. Вторая X-хромосома инактивируется и спирализуется еще в раннем эмбриогенезе до дифференцировки половых желез. Инактивация одной из X-хромосом является механизмом, поддерживающим баланс генов во всех соматических клетках мужчин и женщин. Для нормального функционирования клеток достаточно наличие только одной X-хромосомы, поэтому вторая не активируется. Клетки мужчин содержат только одну X-хромосому, которая остается деспирализованной и активной, поэтому в ядрах клеток мужчин половой хроматин не обнаруживается. Таким образом, *при нормальном генотипе соматические клетки женщин имеют одно тельце Барра, а клетки мужчин не имеют их вообще.* Тельца Барра отсутствуют в первичных половых клетках и овоцитах, появляются в клетках эмбриона спустя 2-3 недели развития. В кариотипе нормальной женщины имеются две X-хромосомы, одна из них инактивирована и образует глыбку полового хроматина. У женщины, имеющей кариотип XO (моносомия X, или синдром Шерешевского - Тернера), ядра клеток вообще не содержат полового хроматина. При трисомии по X-хромосоме в клетках у женщины обнаруживаются две глыбки полового хроматина. У мужчин с кариотипом 47, XXУ имеется одна глыбка также как у нормальных женщин. Половой хроматин представлен одной из X-хромосом, находящейся в инактивированном виде.

Ход определения полового хроматина:

- ❖ Стерильным шпателем получают соскоб из слизистой оболочки ротовой полости (внутренняя поверхность щеки).
- ❖ Соскоб наносят посередине предметного стекла.
- ❖ Мазок фиксируют в 96% спирте.
- ❖ Через 15-20 минут мазок подсушивают на воздухе.
- ❖ На мазок наносят 1-2 капли раствора ацеторсеина. Накрывают покровным стеклом и микроскопируют вначале под малым увеличением, а затем под масляной иммерсией.

У женщин половой хроматин определяется в 20-60% ядер. Количество глыбок полового хроматина всегда на единицу меньше, чем число X-хромосом. В норме у женщин в каждом ядре содержится одно тельце полового хроматина. Изменение количества X-хромосом приводит к изменению количества полового хроматина. Так, при синдроме Тернера 45,X0 – половой хроматин отсутствует, а у индивидуумов с кариотипом 48,XXXX – 3 глыбки полового хроматина (рис. 76).

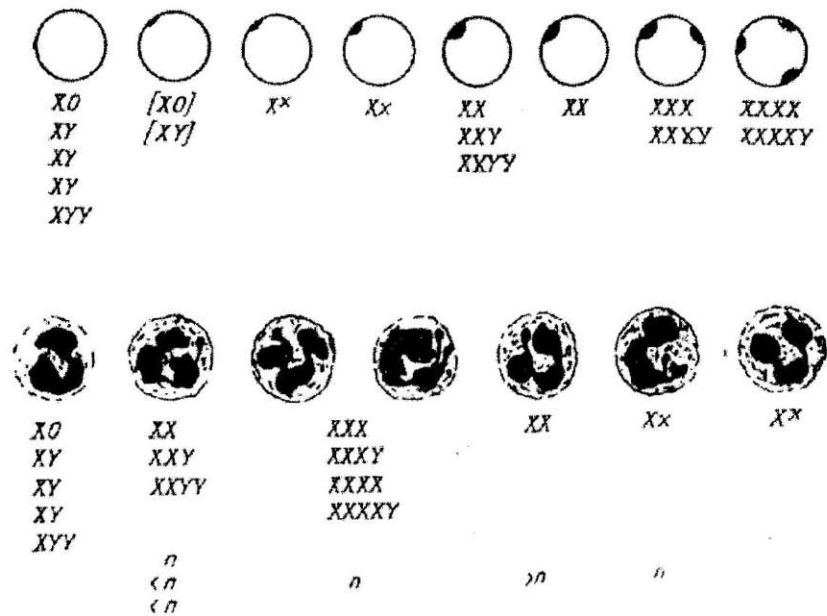


Рис. 76. Связь между величиной и числом половых хроматин и типом половых хромосом (X-хромосом), а также строением и числом барабанных палочек полиморфноядерных лейкоцитов.

У мужчин с кариотипом 46,XY половой хроматина нет. При кариотипе 47,XXY определяется одна глыбка полового хроматина.

Половой хроматин выявляется также в сегментоядерных лейкоцитах в виде выроста (барабанные палочки), в вагинальном эпителии или в клетках волосяной луковицы.

Y-хроматин (син. F-тельце, F-хроматин). Для выявления мужского Y-полового хроматина (F-тельце) мазки окрашивают акрихином и рассматривают в люминесцентном микроскопе. При окрашивании ядра флюоресцентными красителями Y-хромосома отличается от остальных интенсивным свечением своего длинного плеча. Y-хроматин выявляется в ядрах соматических клеток мужчин. Количество Y-телец соответствует числу Y-хромосом в кариотипе. Частота Y-хроматинположительных ядер в клетках слизистой оболочки щеки нормального мужчины в среднем 25-30%.

Определение полового хроматина позволяет без кариологического анализа определить набор половых хромосом. Данный метод проводится при массовых обследованиях женщин с целью скрининга для более детального изучения хромосом. Присутствие в кариотипе человека Y-хромосомы обеспечивает развитие мужского пола независимо от количества X-хромосом. Особи с кариотипом 47, XXУ, 48, XXXУ и др. будут иметь мужской фенотип.

Как уже упоминалось, половые хромосомы X и Y имеют гомологичные и уникальные участки. Гомологичные участки, составляющие лишь 5 % каждой из хромосом, имеют аллели одних и тех же генов. Между ними возможен кроссинговер и обмен аллельными генами во время мейоза. Свойственные только X-хромосоме или Y-хромосоме участки, содержат уникальные, характерные только им гены. Гены, находящиеся в половых хромосомах, называются *сцепленными с полом*.

Наследование, сцепленное с полом. Признаки, наследуемые через половые хромосомы, получили название сцепленных с полом. У человека признаки, наследуемые через Y-хромосому, могут быть только у лиц мужского пола, а наследуемые через X-хромосому — у лиц как одного, так и другого пола.

Женщины могут быть как гомо-, так и гетерозиготными по генам, локализованным в X-хромосоме, поэтому рецессивные аллели генов у них проявляются только в гомозиготном состоянии. Поскольку у лиц мужского пола только одна Y-хромосома, все локализованные в ней гены, даже рецессивные, сразу же проявляются в фенотипе. Такой организм называют *гемизиготным*.

Половой хроматин может быть определен в клетках любых тканей, но чаще всего исследуют эпителиальные клетки слизистой оболочки щеки (буккальный соскоб). Этот подход может использоваться в виде экспресс-метода для выявления возможности изменения числа половых хромосом, что используется при медико-генетическом консультировании. Определение полового хроматина используется также в судебно-медицинской экспертизе, когда по пятнам крови или останкам необходимо установить половую принадлежность.

Таким образом, показано, что в соматических клетках женщин активна только одна X-хромосома, вторая X-хромосома инактивируется на ранних этапах эмбриогенеза. Инактивация второй X-хромосомы случайна в разных клетках и тканях. В одних клетках может инактивироваться материнская X-хромосома, в других - отцовская. В связи с этим женщины являются «мозаиками» на клеточном уровне, т.к. имеют одни популяции клеток с активной материнской в одних органах, и другие с активной мужской X-хромосомой в других. Это свойство обуславливает разную экспрессивность и пенетрантность наследственных болезней, передающихся через X-хромосому.

Значение инактивации X-хромосомы. а) поддержание генного баланса между клетками мужского и женского организмов; б) осуществление различных вариантов экспрессии генов X-хромосом при их гетерозиготности в разных частях женского организма (мозаицизм); в) определение полового хроматина используют для установления пола при судебно-медицинских экспертизах частей тела, а также для уточнения диагноза некоторых наследственных болезней.

Показания для экспресс-метода определения полового хроматина:

- ❖ клиническая картина синдрома Шерешевского-Тернера и синдрома Клайнфельтера;
- ❖ отставание в росте, физическом и половом развитии девочек;
- ❖ нарушение половой дифференцировки у мальчиков (гипогонадизм, крипторхизм);

- ❖ первичная и вторичная аменорея у женщин;
- ❖ бесплодие у мужчин и женщин;
- ❖ нарушение сексуальной ориентации;
- ❖ асоциальное поведение у мальчиков.

Одним из направлений медико-генетического консультирования в клинике является цитогенетическое обследование пациенток с отягощенным акушерским анамнезом для выявления сбалансированных и несбалансированных перестроек в кариотипе. Чаще всего встречаются различные типы сбалансированных транслокаций (1;4), (2;5), (13;14), (X;19) инверсии хромосом 1, 9 и 10, делеция длинного плеча Y-хромосомы. Аберрантные хромосомы выявлены у супругов или имеющих ребенка с пороками развития, или страдающих привычным невынашиванием беременности. Всем этим супружеским парам во время беременности показана инвазивная пренатальная диагностика. Кроме того, различные типы аномалии X-хромосомы диагностированы у женщин с нарушениями репродуктивной системы. Это моносомии X, изо-X, делеции короткого плеча X-хромосомы, мозаицизм.

При цитогенетических исследованиях (Побединский Н.М. с соавт. 2001) абортусов наиболее часто встречаются следующие кариотипы: 46,X; 69,XXX; 46,XY/47,XY+C; 47,XY+8; 47,XX+10; 47,XY+C; 47,XX+D; 47,XY+21; 48,XY+C+F; 48,XY+E+G; 69,XXY. Из представленных данных видно, что 40% абортусов, исследованных цитогенетически, имели хромосомную патологию разных типов. Самопроизвольные выкидыши плодами с хромосомной патологией – проявление естественного отбора в популяции человека. Цитогенетические исследования эмбрионов после самопроизвольных выкидышей очень важны как для врача, так и для пациентки, так как устанавливается истинная причина самопроизвольного прерывания беременности.

4.3. Биохимические методы

Биохимические методы направлены на выявление биохимического фенотипа организма. Впервые биохимические

методы стали применять для диагностики генных болезней еще в начале XXI века. В последние годы их широко используют в поиске новых мутантных аллелей. С их помощью описано более 1 000 врожденных болезней обмена веществ. Для многих из них выявлен дефект первичного генного продукта. Наиболее распространенными среди таких заболеваний являются болезни, связанные с дефектностью ферментов, структурных, транспортных или иных белков. Дефекты ферментов устанавливают путем определения содержания в крови и моче продуктов метаболизма, являющихся результатом функционирования данного белка. Дефицит конечного продукта, сопровождающийся накоплением промежуточных и побочных продуктов нарушенного метаболизма, свидетельствует о дефекте фермента или его дефиците в организме. Объектами биохимической диагностики могут быть моча, пот, плазма и сыворотка крови, форменные элементы крови, культуры клеток (фибробласты и лимфоциты). Программы первичной биохимической диагностики наследственных болезней могут быть массовыми и селективными. Известны массовые просеивающие программы в диагностике фенилкетонурии, врожденного гипотиреоза и т.д.

К примеру, биологическим материалом для просеивающей диагностики фенилкетонурии являются высушенные пятна капиллярной крови новорожденных на хроматографической бумаге. В пятнах крови определяют количество фенилаланина с помощью одного из 3-4 методов: микробиологический тест Гатри, флюориметрия, распределительная хроматография на бумаге, тонкослойная хроматография.

Селективные диагностические программы предусматривают проверку биохимических аномалий обмена (моча, кровь) у пациентов, у которых подозреваются генные наследственные болезни. В селективных программах могут использоваться простые качественные реакции (тест с хлоридом железа для выявления фенилкетонурии). Например, с помощью тонкослойной хроматографии мочи и крови можно диагностировать наследственные нарушения обмена аминокислот, гликозаминогликанов. Газовая хроматография

применяется для выявления наследственных болезней обмена органических кислот. С помощью электрофореза гемоглобинов диагностируется вся группа гемоглинопатий.

Биохимическую диагностику наследственных нарушений обмена проводят в 2 этапа. На первом этапе отбирают предположительные случаи заболеваний, на втором более точными и сложными методами уточняют диагноз заболевания. Для определения содержания в крови, моче или амниотической жидкости промежуточных, побочных и конечных продуктов обмена, кроме качественных реакций со специфическими реактивами на определенные вещества, используют хроматографические методы исследования аминокислот и других соединений.

Показаниями для применения биохимических методов диагностики у новорожденных являются следующие симптомы: судороги, кома, рвота, гипотония, желтуха, специфический запах мочи и пота, ацидоз, остановка роста. У детей биохимические методы используются во всех случаях подозрения на наследственные болезни обмена веществ (задержка физического и умственного развития, потеря приобретенных функций, специфическая для какой-либо наследственной болезни клиническая картина).

Нарушения первичных продуктов генов выявляют с помощью биохимических методов.

Современные достижения в области разработки микроаналитических методов исследования расширили возможности лабораторных исследований в диагностике молекулярных болезней. Микроанализ предусмотрен в некоторых автоматических биохимических анализаторах (например, *FP-901-M*, Финпипет, Финляндия).

Анализаторы *Ciba Corning Diagnostics* в микрообъемах крови (65-140 мкл) позволяют исследовать показатели равновесия кислот и оснований крови, парциальное давление кислорода, углекислого газа, уровень глюкозы, лактата, содержание гемоглобина и его вариантов в крови и ряд других. Аналогичны возможности нового анализатора *Radiometer ABL 6XX*. Широкий перечень микроаналитических исследований

может быть осуществлен методами флюоресцентного анализа на отечественном флюориметре ЭКО-03.

Очень высокой чувствительностью отличаются газохроматографические методы (на отечественных аппаратах «Цвет»), методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (*BioRad 1530* и др.), капиллярного электрофореза (*Beckman P/ACE-5000*).

Возможности микроанализа расширились благодаря внедрению методов иммуноферментного анализа (*ELISA*), радиоиммунологических методов (*RIA*), иммунофлюоресцентного анализа.

Современные приборы тандемной масс-спектрометрии (например, *Micromass*, Великобритания, *Sciex API-300 Perkin Elmer* или *Hewlett-Packard MSD 5970*, США) позволяют исследовать спектр аминокислот, органических кислот, содержание карнитина и ацилкарнитина в образце капиллярной крови, взятой у новорожденного на фильтровальную бумагу – карту Гатри. Объем исследуемой пробы составляет 6-8 мкл.

Эта технология уже используется в ряде стран для проведения массового скрининга новорожденных на аминокислотопатии, органические ацидопатии, на выявление дефицита карнитина, болезней тканевой биоэнергетики.

Наиболее высокой чувствительностью и специфичностью обладают молекулярно-генетические методы диагностики (молекулярная ДНК-гибридизация по Southern и ее варианты), которые в сочетании с методами праймерной амплификации ДНК (полимеразная цепная реакция) займут доминирующее положение в биохимических, иммунологических, бактериологических и вирусологических лабораториях уже в ближайшем будущем.

Введение технологии *FISH* (флюоресцентной *in situ* гибридизации) значительно повысило выявляемость хромосомных болезней у детей при использовании хромосомоспецифических ДНК-зондов.

Совершенно новые возможности открывает разработка метода лабораторного анализа на микрочипах. Исследования проводятся в микрокапиллярах, регистрация данных

обеспечивается электронными системами. Кроме обычных биохимических исследований, эта технология позволяет проводить полимеразную и лигазную цепные реакции, определять последовательности нуклеотидов в ДНК и РНК, выявлять генные мутации.

Практическое применение уже получили методы чрезкожной оксигенометрии, пульс-оксиметрии, билирубинометрии, гемоглобинометрии, неинвазивные исследования содержания воды и жира в организме по данным измерения биоэлектрического сопротивления тела, плетизмографии.

Внедряются новые методы, основанные на пероральном введении безвредных нерадиоактивных изотопов азота, углерода, водорода и их определении в секретах, кале, моче, выдыхаемом воздухе.

Используются методы протонной и фосфорной ЯМР-спектроскопии мозга, мышц, которые позволяют без взятия крови определить в тканях содержание макроэргических фосфатов (АТФ, креатинфосфат), фосфогексоз, а также молочной кислоты, кетонных тел.

Методы молекулярно-генетической диагностики, в частности *полимерная цепная реакция* с праймерной гибридизацией ДНК, позволяют проводить очень широкий спектр исследований ДНК клеток, полученных путем соскоба со слизистых оболочек рта, выделенных из секретов или амниотической жидкости.

Находят распространение методы биохимического исследования жидкости, получаемой при подкожном диализе (содержание глюкозы, лактатов).

Исследование тканевого кровотока с помощью цветовой доплерографии практически вытеснили из практики лабораторной диагностики такие лабораторные методы, как определение величины почечного кровотока с помощью внутривенно введенного парааминогиппурата (клиренс ПАГ), печеночный клиренс бромсульфалеина.

Перспективы развития методов объективной диагностики энзимопатий связаны с дальнейшим развитием и широким

внедрением молекулярно-генетических методов, с использованием нерадиоактивных изотопов при изучении метаболизма, с введением в клиническую практику бескровной ЯМР-спектроскопии тканей.

Диапазон лабораторной диагностики молекулярных болезней значительно расширился в связи с тем, что для исследования стали доступными такие биологические материалы, как амниотическая жидкость, ткани плаценты, а также кровь, фибробласты кожи плода. Введение в клиническую медицину методов амниоцентеза, биопсии ворсин хориона, кордоцентеза (пункции пупочных сосудов плода) открыло новые разделы, такие как фетальная медицина, фетальная хирургия, пренатальная диагностика и терапия наследственных и врожденных болезней плода .

В настоящее время получены многочисленные данные о химическом составе околоплодной жидкости, активности ферментов, содержание гормонов, эмбриональных белков. Простое определение оптической плотности амниотической жидкости позволяет установить повышенную концентрацию билирубина и прогнозировать тяжесть гемолитической болезни новорожденных. Индекс лецитин/сфингомиелин в амниотической жидкости достаточно надежен для предсказания риска развития респираторного дистресс-синдрома. Определение 17-гидрооксикортикостероидов в амниотической жидкости дает возможность распознать вероятность адреногенитального синдрома.

Цитологические исследования клеток амниотической жидкости позволяют установить кариотип плода и наличие у него хромосомных болезней начиная с 8-14 нед беременности, что обосновывает постановку вопроса о прерывании беременности.

Достижения молекулярной генетики позволяют выявлять многие наследственные болезни у плода на основе полимеразной цепной реакции и праймерной ДНК-гибридизации. Более того, стала возможной доимплантационная диагностика серьезных заболеваний при экстракорпоральном оплодотворении яйцеклетки.

4.4. Молекулярно-генетические методы

Специфической особенностью наследственных болезней является то, что их причиной (и в большинстве случаев единственной) являются изменения ДНК. Вполне понятно, что ДНК-диагностика как технология, направленная на обнаружение причины заболевания, является наиболее адекватным, объективным и информативным подходом к диагностике наследственных болезней.

Хотя ДНК-диагностика основана на весьма сложных, трудоемких и относительно дорогостоящих исследованиях, она имеет важные преимущества перед традиционными методами диагностики. Объект исследования – ДНК – остается практически неизменным на протяжении жизни организма, начиная со стадии оплодотворенной яйцеклетки, и это позволяет проводить исследования на любой стадии развития организма. Таким образом, с помощью ДНК-диагностики можно решать следующие задачи, которые часто не удается решить другими методами:

- ❖ подтверждение клинического диагноза или дифференциальная диагностика у пациента;
- ❖ пресимптоматическая диагностика – когда клинические признаки заболевания с поздним дебютом отсутствуют;
- ❖ пренатальная диагностика по ДНК плодного материала (ворсины хориона, клетки амниотической жидкости, кровь плода);
- ❖ преимплантационная диагностика по ДНК клеток дробящейся яйцеклетки, оплодотворенной *in vitro*.

Пресимптоматическая диагностика является принципиально новой возможностью, позволяющей в ряде случаев осуществлять эффективное превентивное лечение (например, в случае болезни Вильсона-Коновалова). Но даже в тех случаях, когда эффективное лечение заболевания отсутствует, получение информации о наличии или отсутствии патологического гена для членов семей со случаями наследственного заболевания имеет большое морально-психологическое значение и служит важнейшим фактором для принятия многих жизненно важных

решений, связанных с планированием семьи и деторождения, выбора работы и т.д.

Наиболее важной является пренатальная диагностика, которая позволяет предотвратить рождение больных детей с тяжелыми наследственными болезнями, такими, как миодистрофия Дюшенна, муковисцидоз, миотоническая дистрофия, и позволяет семье, имеющей больного ребенка с наследственным заболеванием, родить здорового ребенка. По сути пренатальная диагностика является единственным эффективным средством профилактики для многих наследственных болезней.

С помощью методов диагностики можно также определить носительство поврежденного гена для женщин в случае X-сцепленных заболеваний (миодистрофия Дюшенна, гемофилия А и В и др.). Женщина-носительница, как правило, является клинически здоровой, однако ее сыновья с вероятностью 0,5 будут больны. Для женщин-носительниц необходимо рекомендовать пренатальную диагностику, в то время как женщины-неносительницы не нуждаются в дальнейшем генетическом консультировании.

Таким образом, ДНК-диагностика позволяет решить ряд проблем для семей с наследственными болезнями, многие из которых просто неразрешимы другими методами. Это определяет значительную роль ДНК-диагностики не только для генетического консультирования, но и для акушерства и педиатрии в целом.

В ДНК-диагностике различают прямые и косвенные методы.

Прямые методы основаны на поиске мутаций, приводящих к заболеванию. Как правило, они являются точными, могут быть использованы для подтверждения клинического диагноза и, в ряде случаев, для прогноза течения заболевания. Немаловажно также, что они могут быть информативны в семьях без пробанда, поскольку анализ мутаций возможен у родителей больного ребенка.

Недостатком данного подхода является сложность поиска патологических мутаций, особенно в больших (многоэкзонных) генах. В ряде случаев сложно определить, является ли

обнаруженное изменение в структуре гена патологическим, и, таким образом является ли оно причиной заболевания.

Косвенные методы основаны на анализе тесно сцепленных с патологическим геном полиморфных маркеров. Анализ наследования аллелей этих полиморфных маркеров и заболевания в семье позволяет определить, с какими аллелями в данной родословной сцеплен поврежденный ген, и, следовательно, проследить его наследование в данной семье по сцепленным с ним маркерным аллелям. Определенными условиями для проведения не прямой (косвенной) ДНК-диагностики являются уверенность в клиническом диагнозе, отсутствие генетической гетерогенности и доступность необходимых сведений о членах семьи – как правило, для исследования требуется генетический материал пробанда.

Обычный подход – по возможности использовать прямые методы ДНК-диагностики, а к косвенным методам прибегают либо как к дополнительным, либо в случае невозможности обнаружить мутации в исследуемой семье.

Для ДНК-диагностики в постнатальном периоде (у больных) обычно используются ядродержащие клетки крови; для дородовой диагностики чаще всего используются клетки ворсин хориона, амниотической жидкости, кровь плода.

В любом случае необходимым условием проведения ДНК-диагностики является знание гена, ответственного за заболевание, или его примерного расположения относительно известных ДНК-маркеров (картирование гена) см. выше. В настоящее время известны гены для подавляющего большинства распространенных тяжелых наследственных болезней, известны также гены для многих менее распространенных и редких заболеваний. Кроме того, гены, ответственные за большое количество наследственных заболеваний, картированы. Группа таких заболеваний, гены которых локализованы, но пока не идентифицированы, является наиболее динамичной: с одной стороны, идут интенсивные исследования, направленные на идентификацию картированных генов, а с другой – осуществляется картирование новых наследственных заболеваний. Всего в

каталоге наследственных заболеваний Мак-Кьюсика (один из адресов электронной версии каталога в Интернете – <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>); включающем описания наследственных болезней, заболеваний с наследственной предрасположенностью и записи о генах, мутации в которых приводят к таким болезням, более 10 300 записей. В настоящее время трудно даже оценить, для какого количества наследственных болезней может быть проведена или уже проводится ДНК-диагностика. По-видимому, таких заболеваний более 1000. Рутинная ДНК-диагностика 385 заболеваний проводится в 280 лабораториях Западной Европы (адрес европейского каталога лабораторий ДНК-диагностики в Интернете – <http://www.eddna1.com>). Это не означает, что каждая лаборатория занимается диагностикой большого количества наследственных болезней – их число редко превосходит 10–12. Однако, обычно лишь ДНК-анализ части из этих заболеваний ориентирован на регион, в котором расположена лаборатория, остальные, более редкие заболевания диагностируются на молекулярно-генетическом уровне для населения всей страны. Кроме того, расширяются связи между лабораториями на международном уровне, особенно в странах Европейского Союза.

В основе этих молекулярно-генетических методов лежат “манипуляции” с ДНК и РНК.

- -секвенирование;
- -клонирование ДНК;
- -обратная транскрипция ДНК;
- -метод гибридизации ДНК;
- -полимеразная цепная реакция (ПЦР);
- -FISH анализ.

Молекулярно-генетические методы анализа позволяют установить молекулярную причину генетической патологии и установить локализацию повреждения в наследственном материале.

Это разнообразная группа методов, предназначенных для выявления вариаций в структуре исследуемого участка ДНК вплоть до расшифровки первичной последовательности

оснований. В основе этих методов лежат “манипуляции” с ДНК и РНК.

4.4.1. Основные этапы молекулярно-генетических методов:

1. Получение образцов ДНК или РНК является исходным этапом всех методов. Источником геномной ДНК могут быть любые ядросодержащие клетки. На практике чаще используют периферическую кровь (лейкоциты), хорион, амниотические клетки, культуры фибробластов. Основная задача - накопление нужных фрагментов ДНК в условиях *in vitro*. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это метод амплификации ДНК в условиях *in vitro*. В соответствии с нуклеотидной последовательностью концов исследуемого участка синтезируется 2 олигонуклеотидных праймера (затравки). Длина праймеров 20 - 30 нуклеотидов. Процесс амплификации заключается в осуществлении повторяющихся циклов.

2. Рестрикция ДНК на фрагменты с помощью рестриктаз. Основное их свойство – разрывать двухцепочную ДНК в определенных последовательностях нуклеотидов. Рестриктазы – ферменты, выделенные из бактериальных клеток, которые разрезают молекулу ДНК на фрагменты в строго определенных местах. Применение этих ферментов дает возможность получить относительно короткие фрагменты ДНК, в которых достаточно легко можно определить последовательность нуклеотидов. Разработка метода обратной транскрипции ДНК на молекулах мРНК определенных белков с последующим клонированием этих ДНК привела к появлению ДНК-зондов. Использование таких зондов для гибридизации с ДНК клеток соответствующего пациента дает возможность точно локализовать неблагоприятную генную мутацию.

3. Электрофорез фрагментов ДНК. Каждый фрагмент ДНК занимает определенное положение в виде дискретной полосы в конкретном месте геля.

4. Визуализация и идентификация фрагментов ДНК в геле. Разработаны и другие методы выявления специфических фрагментов ДНК с помощью блот-гибридизации по Саузерну.

4.4.2. ДНК-диагностика наследственных патологий

Общее количество генов в геноме человека по разным оценками составляет 30-36 тысяч. Сейчас картировано в хромосомах несколько тысяч генов (~ 6 тысяч). Остается еще много работы по картированию ~ 30 тысяч генов. Предполагается, что эта задача будет решена через 5-7 лет. Далеко не все гены генома могут вызвать развитие патологических процессов. Общее количество наследственных патологий у человека приближается к 6 тыс. Однако большее количество их формируется под влиянием около 300 генов для наиболее распространенных наследственных болезней и около 200 генов - для сравнительно редких генетических заболеваний. Это связано с тем, что нарушение в одном и том же гене может служить причиной разных форм и видов наследственных болезней. Например, известно около 200 аномальных гемоглобинов, которые являются следствием разных структурных или регуляторных мутаций в генах, которые кодируют синтез собственно двух полипептидных цепей α и β . Для большинства наследственных болезней уже разработаны точные и эффективные методы диагностики на любой стадии онтогенеза, в том числе и пренатальной. Рассмотрим пример нарушения в структуре и регуляции генов. Довольно показательной является *мышечная дистрофия Дюшена* - наиболее распространенное нервно-мышечное заболевание, которое встречается с частотой ~ 1 на 5 тыс. мальчиков-младенцев. Причиной болезни являются мутации в гене белка дистрофина. Этот ген локализован на коротком плече X-хромосомы. Известны размеры гена (2,4 млн. пар оснований), размер мРНК (14 тыс. оснований) и белка дистрофина (427 кДа), а также функция последнего - стабилизация сарколеммы (цитоплазматическая мембрана) мышечного волокна. Мутации в этом гене вызывают или полное (миодистрофия Дюшена) или частичное (миодистрофия Беккера) отсутствие соответствующего белка, следствием чего является разрушение мышечных волокон. Тяжелые формы заболевания служат причиной ранней инвалидности и смерти больного.

Пока отсутствуют надежные методы терапии мышечной дистрофии Дюшенна, а постановка диагноза с точной локализацией генетического дефекта до недавнего времени была невозможной - вплоть до установления полной последовательности нуклеотидов всех 85 экзонов гена. Сейчас это стало реальностью благодаря знанию первичной структуры гена, возможности синтезировать олигонуклеотидные праймеры, использовать полимеразную цепную реакцию (ПЦР) для синтеза соответствующих последовательностей и использовании их в диагностике (гибридизация). Это дало возможность не только определять местонахождение дефекта в гене, но и работать над программами его коррекции методами генотерапии.

4.4.3. Генодиагностика в онкологии

Изучение молекулярно-генетических причин и механизмов злокачественной трансформации также, как и ранняя диагностика рака становятся все более важными, поскольку частота онкологических заболеваний постоянно возрастает. Так, частота ретинобластомы за последние 30 лет выросла почти в 3 раза и составляет сейчас 1 на 10-15 тыс.; нефробластомы и нейробластомы — 1 на 8-10 тыс.; частота карциномы почек ежегодно возрастает на 2%; рака молочной железы - на 1,2%, частота случаев меланомы за 60 лет прошедшего века выросла в 20 раз. Неуклонно увеличивается частота рака легких, яичников, органов желудочно-кишечного тракта, щитовидной железы и т.д. То, что рак является генетической болезнью, стало очевидным фактом. Постоянно возрастает количество выделенных, клонированных и картированных генов, которые имеют отношение к формированию и развитию опухолей. Вместе с этим, основные закономерности молекулярной индукции злокачественной трансформации и функционирования раковой клетки остаются невыясненными.

Молекулярная онкогенетика имеет принципиальное значение для фундаментальной биологии, теоретической медицины и клиники. Исследования по молекулярной онкогенетике развиваются в нескольких направлениях; 1) молекулярная

диагностика наследственных форм рака; 2) диагностика и выяснение молекулярных механизмов вирусиндуцированных форм рака; 3) поиск и диагностика молекулярных маркеров неблагоприятного прогноза при раковых заболеваниях; 4) диагностика микрометастазов; 5) поиск и диагностика полиморфных ДНК-маркеров, для выявления склонности к раку.

Гены, задействованные в процессах злокачественной трансформации клеток, классифицируются на две группы: гены контроля клеточного цикла и гены общего контроля. Мутантные гены первой группы относятся к категории генов склонности к злокачественной трансформации. Вторая группа генов поддерживает стабильность генома путем репарации его повреждений, противостоит мутациям генов первой группы. Для того, чтобы возникла опухоль, необходимо по меньшей мере два события; мутации в одном из аллелей генов первой группы делают клетку потенциальной опухолевой, мутации в другом аллеле этого же гена делают опухоль злокачественной, то есть завершают процесс опухолевой трансформации. В результате, если мутации в обоих группах генов возникли в генеративных клетках, то это вызывает у потомства определенные формы опухолей, а если происходят мутации конкретных генов в соматических клетках (соматическая мутация), то могут возникать разные опухоли у данного индивидуума.

Рассмотрим несколько примеров *молекулярно-генетической диагностики* наследственных форм рака. Наглядным примером гена-супрессора, который выполняет отрицательную регуляцию клеточного цикла, есть ген RB1, который определяет склонность к ретинобластому - злокачественной опухоли сетчатки глаза, которая наследуется по аутосомно-доминантному типу и обусловлена мутацией в одном из аллелей этого гена. Опухоль развивается вследствие инактивации неповрежденного аллеля, которая происходит в клетках сетчатки в раннем детском возрасте, а то и в период пренатального развития. Но эта мутация может возникнуть не только в клетках сетчатки, но и в других соматических клетках.

А если так, то потомство человека с герминальной мутацией в гене RB1 становится предрасположенным к возникновению опухолей. У самого этого человека соматические мутации вызовут лишь ретинобластому, но нарушение функции RB1 могут выявиться во многих других опухолях - таких, как остеосаркома, лимфоидный лейкоз, мелкоклеточный рак легких, опухоли половых органов, рак молочной железы и т.п.

Знания молекулярной природы изменений, которые служат причиной опухолевого роста, дают возможность делать прогноз заболевания. Особенно важной является ранняя, досимптомная идентификация маркеров неблагоприятного прогноза, ассоциированных со стойкостью опухоли к терапии, так как дает возможность искать и использовать другие, более эффективные методы превентивной терапии. Сейчас уже накоплено большое количество информации о молекулярно-генетической природе разных опухолей, выявлены молекулярно-генетические маркеры последних. Определение таких маркеров и является основой современной генодиагностики опухолевой трансформации, довольно информативным для диагностики в онкологии есть изучение уровней экспрессии таких прогностических маркеров. Известно, что для рака легких неблагоприятной диагностикой является повышенная экспрессия циклинзависимых киназ, которые кодируются генами *cdc25A* и *cdc25B*.

Досимптомная диагностика рака классическими методами практически невозможна. Так же сложно осуществлять диагностику микрометастазов в крови, лимфоузлах, костном мозгу, других тканях и органах организма. Только молекулярно-генетические методы ПЦР и гибридизация со специфическими ДНК-зондами дают возможность идентифицировать одиночные трансформированные или метастазные клетки среди большого количества нормальных клеток (порядка 1-2 на 10^6 клеток). Такого уровня чувствительности не дает ни один из известных биохимических или иммунологических методов.

В последнее время значительное внимание ученых

привлекают последовательности ДНК в некодирующих районах генов или вообще в межгенных (спейсерных) локусах, так называемые полиморфные локусы. Оказалось, что при генетических болезнях соматических клеток, к которым относится рак, полиморфизм ДНК даже за пределами кодирующих последовательностей может играть важную роль, а соответствующие полиморфные маркеры - быть маркерами молекулярной диагностики. Анализ таких полиморфизмов в значащих частях конкретных генов (экзонах), так и в незначащих (интронах), как в границах гена, так и вне границ имеет большую перспективу для выявления склонности к злокачественным новообразованиям, в особенности в группах риска, дает возможность своевременно обнаружить болезнь или проводить превентивную терапию.

4.4.4. Генодиагностика инфекционных болезней

По своей методологии генодиагностика инфекционных патологий принципиально не отличается от диагностики наследственных и онкологических заболеваний. В этом случае задача состоит в выявлении генов, специфических для возбудителей или продуктов их экспрессии. Для этого используются специальные ДНК-зонды, специфические для геномов различных возбудителей. Зонды могут быть не просто специфическими по отношению к ДНК исследуемого патогена, но и соответствовать гену, который кодирует один из факторов патогенности. В таком случае становится возможным не только идентифицировать возбудителя, но и сделать заключение о его патогенности.

Общепризнанным становится использование ДНК-технологий - для диагностики вирусных болезней.

4.5. Секвенирование генома человека

Методы секвенирования – определение нуклеотидной последовательности ДНК.

Конкуренцию двух способов секвенирования – метода Сэнгера и Рича-Максэма – время решило в пользу первого. В

секвенировании ДНК применяется преимущественно “shotgun” – стратеги (возрастает число дорожек разделения, длина фрагментов увеличивается до 1 000 п.н., сокращается время разделения). Продукты полимеразной цепной реакции (PCR) обнаруживаются путем гибридизации с радиоактивной или флюоресцентной меткой и разделением на геле в случае необходимости количественного определения. Несмотря на практически безраздельное господство метода Сэнгера, поиски новых принципов секвенирования продолжаются. Существует секвенирование ДНК путем гибридизации на олигонуклеотидной микроматрице (ЧИПс). В настоящее время полностью определена последовательность нуклеотидов многих генов (α , β - глобиновых цепей гемоглобина, гормонов: инсулина, гормона роста, хорионического, соматотропина, пролактина). Преимущество ДНК-диагностики в том, что объектом исследования являются молекулы ДНК, поэтому ее можно проводить не только на тех тканях, где работают “экспрессируются” соответствующие гены, но практически на любых клетках организма, из которых можно выделить ДНК, и в любой стадии развития. Вполне реально поэтому досимптомная диагностика наследственных заболеваний, в том числе, и пренатальная диагностика, основанная на исследовании клеток плода, даже проэмбриональных стадий развития (гаметы, зиготы, дробящиеся зародыши). Для диагностики моногенных болезней у плода выделяют ДНК из биоптатов хориона (плаценты), из клеток амниотической жидкости (амниоцитов) или из лимфоцитов пуповинной крови. Основным источником ДНК для диагностики в постнатальном периоде являются лимфоциты крови.

Таким образом, различают прямую и непрямую ДНК-диагностику наследственных болезней.

Главные преимущества прямого метода – высокая (до 100%) точность и возможность диагностики без анализа ДНК пробанда. Последнее обстоятельство особенно важно в случае пренатальной диагностики тяжелых, зачастую смертельных заболеваний, когда родители обращаются за помощью уже после того как умер больной ребенок. Согласно данным до 80%

семей с высоким риском муковисцидоза обращаются по поводу необходимости дородовой диагностики уже после смерти больного ребенка. Прямая ДНК-диагностика заключается в обнаружении конкретных повреждений в известном гене. Ее преимуществом являются высокая точность, а также отсутствие необходимости обследования родственников тестируемого лица. Необходимым условием применения прямой ДНК-диагностики является идентификация гена, повреждение которого приводит к развитию заболевания.

Непрямой (косвенный) метод широко применяется для диагностики тех заболеваний, гены которых еще не идентифицированы, мутации неизвестны или трудно выявляемы. Единственным и неизменным условием такой диагностики являются данные о наличии молекулярных маркеров, расположенных в непосредственной близости от мутантного гена или внутри него. Такими молекулярными маркерами могут быть полиморфные сайты и гипервариабельные по числу однотипных простых повторов участки ДНК. Метод непрямой ДНК-диагностики более универсален, однако уступает по точности прямому методу. Кроме того он может быть применен при наличии пробаанда, анализ ДНК которого позволяет установить, с каким именно молекулярным маркером каждой хромосомы родителей сцеплен мутантный ген.

Наиболее сложными для диагностики являются случаи патологии, обусловленные присутствием в кариотипе плода трудно идентифицируемой традиционными цитогенетическими методами, как правило, добавочной маркерной хромосомы. Для изучения таких кариотипов используется метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с ДНК-зондами, специфичными для отдельных хромосом или их участков, который позволяет проводить идентификацию аберрантных хромосом и анализ анеуплоидии по интерфазным ядрам, что существенно облегчает анализ мозаицизма хромосом.

FISH (fluorescence *in situ* hybridization) – анализ превосходит классические методы кариотипирования по разрешающей

способности и экономичности, и в меньшей степени зависит от уровня цитогенетика. С его помощью возможно определение числа хромосом в ядрах амниоцитов, цитотрофобласта, лимфоцитов и любых других клеток в течение 24–48 часов. При одновременном применении центромероспецифических зондов, взаимодействующих с хромосомами 13, 18, 21, X и Y, выявляется 90–95% всех фетальных ХА. Поэтому данный вариант FISH-анализа имеет гораздо более высокую информативность, чем другие скрининговые методы. Особую ценность он приобретает при проведении пренатальной экспресс-диагностики с целью уточнения степени мозаицизма в неделящихся клетках ворсин хориона и амниотической жидкости.

Надо отметить, что центромероспецифические зонды не всегда пригодны для обнаружения несбалансированных Робертсоновских транслокаций, доля которых среди всех трисомий составляет около 5%, и многих других структурных ХА. Поэтому в ПД для FISH-верификации транслокаций часто используются коммерческие хромосомоспецифические ДНК-библиотеки (т.е. смесь уникальных последовательностей ДНК, покрывающих всю длину хромосомы). Этот вариант позволяет установить семейный характер сверхкомплектных маркерных хромосом, который наблюдается у 40% случаев, что нередко играет решающую роль в выборе тактики ведения беременности.

Для успешного анализа многих ХА плода, например микроделетий, инсерций или инверсий, часто необходим микро-FISH-метод. Суть его состоит в том, что с помощью микроманипулятора или проточной сортировки изолируют aberrantные хромосомы, их ДНК амплифицируют, продукты полимеразной цепной реакции (ПЦР) метят и используют затем как зонды сплошной окраски для гибридизации с нормальными метафазными хромосомами. Таким образом удается идентифицировать участки, присутствующие на аномальной хромосоме и выявить ее делетированные районы. С помощью «обратного» окрашивания можно определить, является ли данная фетальная транслокация, наследуемая от одного из

родителей, сбалансированной, что чрезвычайно важно для решения вопроса о прерывании беременности.

Таким образом, FISH-анализ в комплексе с методами классической цитогенетики резко повышает эффективность ПД практически всех видов хромосомопатий.

Быстрым и экономичным скрининговым методом определения анеуплоидии и триплоидии плода является тест, основанный на количественной флуоресцентной мультиплексной ПЦР. При его постановке амплифицируются небольшие повторяющиеся последовательности ДНК, маркирующие хромосомы 21, 18, 13, X, Y, а последующий количественный флуоресцентный анализ ПЦР-продуктов позволяет дифференцировать образцы с нормальным и патологическим кариотипом. Продолжительность ПЦР-анализа составляет несколько часов. С помощью количественного ПЦР-метода возможно обнаружение нуклеотидной последовательности, соответствующей SRV-гену Y-хромосомы в крови женщин, беременных мужским плодом, после 7-недельного гестационного периода. Положительный результат удастся получить при наличии одной мужской фетальной клетки среди 12800 клеток матери. ПЦР-тест весьма эффективен при анализе малого количества генетического материала, например, при раннем амниоцентезе, выделении фетальных клеток, циркулирующих в материнском кровотоке, или трансцервикальном лаваже.

В последнее время показана принципиальная возможность *определения кариотипа по клеткам плода, циркулирующим в материнском кровотоке.*

С помощью современных иммунофлуоресцентных и магнитных модулей для проточной сортировки клеток (FACS, MAGS и др.) удастся получить обогащенную фракцию фетальных клеток, в которой их содержание может достигать 10%. Для выделения эритробластов используются меченные флуорохромами или железными частицами моноклональные антитела против белков, присутствующих на их мембранах – рецептора трансферрина (CD 71), гликофорина A и рецептора

тромбоспондина. Использованию этого метода в клинической практике в качестве скрининга анеуплоидий препятствуют значительная трудоемкость и высокая стоимость сортировки фетальных клеток. В связи с этим этот метод остается пока экспериментальным.

В настоящее время в связи с развитием методов экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) широкое распространение получает преимплантационная диагностика хромосомных заболеваний. Преимущество данного подхода состоит в том, что он исключает проведение терапевтических аборт, поскольку хромосомные и генные нарушения определяются на уровне овоцитов – эмбрионов, и возможно перенести в полость матки неповрежденные эмбрионы. Полярное тельце овоцита или бластомер эмбриона (4-8 стадия клеточного деления) предварительно изолируется с помощью микроманипулятора, а затем ДНК плода исследуется с помощью FISH или ПЦР. Преимплантационная диагностика особенно показана женщинам старше 35 лет, у которых 1/3 овоцитов имеют хромосомную патологию. Наиболее надежным является анализ полярных телец методом FISH, в котором используются ДНК-зонды для одновременного определения хромосом X, Y, 13, 18 и 21. Значительную часть пациентов среди тех, которые нуждаются во вспомогательных репродуктивных технологиях, составляют индивидуумы со сбалансированными транслокациями.

Перспективным является измерение содержания в крови беременной, начиная с 6 недели, белка РАРА (pregnancy associated protein A), использование раннего скрининга маркерных сывороточных белков беременной и УЗИ плодов в I триместре; анализ кариотипа по клеткам плода, флоатирующим в крови матери; проведение цитогенетической диагностики хромосомных болезней на предимплантационных зародышах человека.

В настоящее время доступны молекулярной диагностике около 30 моногенных болезней (муковисцидоз, миодистрофия Дюшенна, гемофилия А, В, фенилкетонурия, болезнь

Виллибранда, бетта-талассемия, болезнь Дауна, синдром Х-фрагильной хромосомы и т.д.). В табл. 18 указаны наследственные болезни, выявляемые с помощью метода ДНК-диагностики.

Таблица 18

Спектр наследственных болезней, выявляемых с помощью методов ДНК-диагностики

Наследственные заболевания	Локализация генов
Х- и Y-сцепленные формы	
Гемофилия А	Xq28
Гемофилия В	Xp27.1-27.2
Ломкость X-хромосомы	Xq27.3
Миодистрофия Дюшенна-Беккера	Xp21.2
Болезнь Хантера	Xq28
Болезнь Леша-Нихена	Xq26-q27.2
Агаммаглобулинемия	Xq21.3-q22
Х-сцепленная нервальная амиотрофия	Xq13.1
Спинально-бульбарная амиотрофия	Xq11-q12
Чистая дисгенезия гонад, XX-мужчины и некоторые другие нарушения полового развития	Yp
Аутосомные формы	
Муковисцидоз	7q31.2
Нервальная амиотрофия	1q22; 17p11.2
Хорея Гентингтона	4pter-p16.3
β-талассемия	11p15.5
Недостаточность α-антитрипсина	14q31-q32.3
Недостаточность 21-гидроксилазы (гиперплазия коры надпочечников)	6p21.3
Семейная гиперхолестеринемия	19p13.2-p13.1
Болезнь Вильсона-Коновалова (гепатолентикулярная дегенерация)	13q14.3-q21.1
Миотоническая дистрофия	19q13.2-13.3
Болезнь Виллебранда	12pter-p12
Фенилкетонурия	12q24.1
Атаксия-телеангиэктазия	11q23.1
Атаксия Фридрейха	9q13-q21.1
Спинальная амиотрофия	5q13
Недостаточность ацил-СоА-дегидрогеназы	1p31

Методы молекулярной генетики позволяют не только определить нуклеотидную последовательность в отдельных фрагментах ДНК, соответствующих структурным генам, но и размножить (клонировать) эти гены и получать в большом количестве белки с помощью рекомбинантных молекул ДНК.

С помощью методов генной инженерии стало возможным получение в больших количествах некоторых первичных генных продуктов на основе человеческих генов. Это определяет перспективы терапии наследственных болезней, обусловленных дефицитом нормального продукта гена в человеческом организме, связанным с генными мутациями. Дальнейшее совершенствование этих методов в перспективе может стать основой лечения генных болезней. Конечной целью является разработка эффективных методов профилактики и лечения наследственных заболеваний. К примеру, в настоящее время известно уже более 50 наследственных заболеваний ЦНС, ген которых клонирован и интенсивно изучается.

Одним из наиболее важных практических приложений достижений молекулярной генетики является разработка методов ДНК-диагностики, что без преувеличения революционизировало всю систему медико-генетического консультирования. Внедрение ДНК-диагностики имеет не только большое медицинское, но социально-экономическое значение, способствуя охране генетического здоровья населения и уменьшению «генетического груза» в популяции.

В последнее время появились клонотеки к ДНК. Ученые США и Англии представили каталог 60 000 кДНК мозга человека и 10 000 – эмбриона человека, 1 000 тканеспецифических кДНК из островков Лангерганса поджелудочной железы человека и т. д.

И вот в 2001 году объявлено о том, что полная расшифровка наследственности человека состоялась. Что же означает расшифровка генома человека, что она дает реально практического и вообще, что от нее следует ждать дальше? Последовательность генома – это молекулярная анатомия наследственности. Расшифровка генома человека ознаменовала лишь окончание одного из этапов Большого пути.

Современное состояние оценивают как «постгеномная эра».

Страницы научных журналов и средств массовой информации пестрят словами: «геномика», «протеомика», «фармакогенетика», «клонирование» и т.п. Обусловлено это

действительно потрясающими прорывами в изучении наследственности человека, в том числе секвенированием (расшифровкой нуклеотидной последовательности) ДНК всего генома человека. Это – последовательность нуклеотидов в каждой из 24 хромосом и в митохондриях.

Одним из главных стратегических результатов исследования генома человека для медицины явилось создание фундамента нового направления молекулярной медицины. Это направление позволяет более точно определять молекулярные механизмы, лежащие в основе здоровья и болезней человека. Развитие патологических процессов прослеживается на молекулярном уровне от первичного продукта гена до исхода заболевания.

Серьезные изменения наметились в генетических программах сугубо медицинского назначения. Так, в предыдущие годы основное внимание уделялось методам специфической ДНК-диагностики (и это было оправдано). В настоящее время в связи с новыми методическими разработками (ДНК-биочипы, компьютерные программы и др.) на 1-е место выходят исследования по комплексному мониторингу предрасположенности к болезням. Следовательно, главное внимание будет уделяться уже не моногенным, а мультифакториальным болезням.

Наши знания генома человека, несомненно, приведут к прогрессу в диагностике, лечении и профилактике многих болезней. Накопленная в постгеномную эру в медицине генетическая информация будет проверяться и использоваться здравоохранением на протяжении всей жизни человека. Так, новорожденных детей обследуют на излечимые болезни (гипотиреоз, фенилкетонурия, адреногенитальный синдром). Уже есть предпосылки для выявления детей с высоким риском раннего атеросклероза и их лечения для предупреждения изменений в сосудах во взрослом состоянии. Супруги еще до планирования деторождения могут получить сведения о своем генетическом статусе в отношении наследственной болезни у ребенка.

4.6. Картирование генома человека

Существуют цитогенетическое, физическое, генетическое картирование.

4.6.1. Генетическое картирование генома человека

В основе построения генетических карт лежит процесс мейоза и происходящая при этом перетасовка генетических признаков. Это позволяет определить относительное расположение генов в геноме исследуемого организма, хотя на клетку приходится только 54 хиазмы, а на бивалент-2, 36. При изучении генетики человека скрещивание, столь широко применяемое в экспериментальной науке, исключается, и приходится пользоваться только семейными родословными и сравнением ДНК членов семьи.

При генетическом картировании сейчас широко используются полиморфные маркеры различного рода.

В последние годы в картировании (и вообще при изучении генома) огромную роль играет полимерная цепная реакция [PCR], позволяющая резко уменьшить количество ДНК на лабораторном столе. Первая карта генома человека опубликована в 1987 г. В 1992г. Genethon опубликовал уже более современную генетическую карту человека второго поколения.

Параметры этой карты таковы: банк CEPH (15 семей). Использовано всего 5849 маркеров, прежде всего микросателлитов. Распределение маркеров по хромосомам различно и оно в общем соответствует их физическому размеру: так, хромосома 1 имеет 427 маркеров, хромосома X1- 261, а хромосома XX1-84 маркера. Обездолена хромосома У- у нее только шесть маркеров. Фактически не картированы центромерные и теломерные области хромосом; величина максимальных немаркированных участков еще значительна и в среднем составляет 15,6 сМ (сМ-сантиморганиды). Получено два класса карт: “скелетная” (skeletal) и “структурная”(framework) карты.

4.6.2. Физическое картирование генома

Проведено физическое картирование хромосомы человека 21q. Эта хромосома самая маленькая и поэтому она лучше изучена. Она является носителем генов болезни Альцгеймера, синдрома Дауна и некоторых других. В Российской программе "Геном человека" заслуживает внимания физическое картирование хромосомы 3. Хромосома 3 - одна из самых больших, ее размер 215 млн.п.н. Фрагменты ДНК получают в основном при гидролизе рестриктазой Not I. Последняя расщепляет хромосому 3 на 350 фрагментов. К настоящему времени для 250 из них получены маркера, именно STS (Sequence Tagged sites), таким образом, остается маркировать 100 фрагментов. О цитогенетическом картировании следует сказать только, что оно находит сейчас широкое использование, а радиоавтографическая метка вытесняется флюоресцентной.

Проект «геном человека» действует во многих странах, он доказал свою жизнеспособность и эффективность, и есть все основания рассматривать его как путь в биологию XXI века, поскольку он неисчерпаемый источник новых знаний. Задача проекта - секвенирование всех 3 млрд.п.н., составляющих геном человека.

4.7. Близнецовый метод

Этот метод заключается в изучении закономерностей наследования признаков в парах одно- и близнецовых близнецов. В настоящее время широко применяют в изучении наследственности и изменчивости у человека для определения соотносительной роли наследственности и среды в формировании различных признаков, как нормальных, так и патологических. Он позволяет выявить наследственный характер признака, определить пенетрантность аллеля, оценить эффективность действия на организм некоторых внешних факторов (лекарственных препаратов, обучения, воспитания).

Ряд признаков и заболеваний обусловлены многими генами. Это полигенные признаки. На их развитие большое влияние оказывают факторы внешней среды, поэтому их

называют мультифакториальными. Их наследование не подчиняется законам Менделя. Примерами полигенного наследования является наследование количественных признаков (например, роста, массы тела, долгожительства, интеллекта). Для изучения законов наследования таких признаков используют *близнецовый метод*. В частности, близнецовый метод позволяет оценить степень влияния наследственности и среды на развитие какого-либо нормального или патологического признака, определить роль культуры, воспитания, обучения и т.д. Каждую пару близнецов изучают по патологии или степени проявления определенных признаков. При этом проводят сопоставление: а) монозиготных и дизиготных близнецов, б) партнеров в монозиготных парах, в) партнеров в дизиготных парах, г) данных близнецового анализа с общими данными популяции.

Монозиготные близнецы.

Как правило, у человека рождается один ребенок, но в среднем в одном случае из 80-90 рождений появляются двойни (примерно 1%).

Примерно одна треть из числа двоен — монозиготные близнецы. Они развиваются из разьединившихся бластомеров одной оплодотворенной яйцеклетки на две части и имеют одинаковую генотип. Монозиготные близнецы всегда одного пола.

Около 33% идентичных близнецов имеют два полноценных независимых хориона, что свидетельствует о разделении зародыша еще до образования ткани трофобласта на 5-е сутки беременности. У оставшейся части 67 % близнецов хорион общий, в этих случаях разделение зародышей произошло после образования трофобласта. Если разделение зародыша происходит между 5 и 9 сутками развития, то эмбрионы имеют общий хорион, но отдельные амнионы. Незначительное количество монозиготных близнецов имеет общий хорион и общий амнион, это означает, что разделение зародыша произошло после 9 суток беременности (рис.77). Такие зародыши в редких случаях могут срастаться между собой какими либо частями тела, образуя сиамских близнецов.

Дизиготные близнецы рождаются чаще (примерно 65% от общего количества двоен). Они развиваются из двух одновременно созревших и оплодотворенных разными сперматозоидами яйцеклеток. Такие двойняшки могут быть как однополые, так и разнополые. С генетической точки зрения они сходны не более чем обычные братья и сестры (сисбсы), т.к. имеют примерно по 50 % одинаковых генов. Но они какое-то время развиваются в общей среде при внутриутробном (пренатальном) и частично при постнатальном периодах развития.

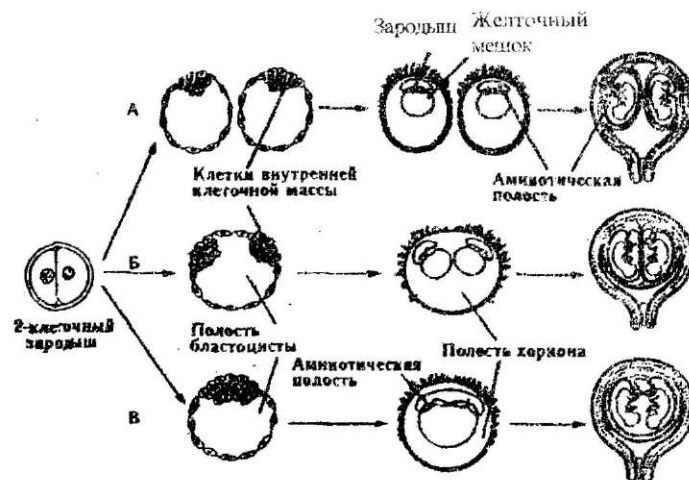


Рис. 77. Схематический рисунок, иллюстрирующий зависимость между временем разделения зародыша человека, образования монозиготных близнецов и их взаимоотношениями с зародышевыми оболочками.

На частоту рождения близнецов влияет возраст матери. Так, отмечено, что двуяйцевые близнецы чаще рождаются у женщин в возрасте 35-45 лет, а также у женщин, лечившихся гонадотропными гормонами. Имеется наследственная предрасположенность к рождению близнецов. Есть данные, что данный признак передается со стороны матери и наследуется рецессивно, сцепленно с полом.

Анализ групп монозиготных и дизиготных близнецов.

Для этой цели сопоставляют монозиготных и дизиготных близнецов по разным признакам; цвет волос, глаз, пигментация кожи, функции органов, гомеостатические показатели, температура, форма носа, глаз, губ, ушных раковин, пальцевые узоры, болезни и т. п. Сущность близнецового метода состоит в сравнении внутриварного сходства в группах моно- и дизиготных близнецов, что позволяет с помощью специальных формул оценить относительную роль наследственности и факторов среды в развитии каждого конкретного признака. Если у близнецов имеется сходство по какому-то признаку, то такие пары называются *конкордантными*. Если один из близнецов обладает данным признаком, а другой — нет, то пара называется *дискордантной*. Например, по группе крови пара считается конкордантной, если оба близнеца имеют одну группу крови, но если группа крови различна у близнецов, то они дискордантны. Степень конкордантности оценивается в процентах (табл.19).

Для доказательства роли наследственности в развитии признака достаточно сравнить долю (процент) конкордантных пар в группах моно- и дизиготных близнецов. Например, если один из монозиготных близнецов болен диабетом, то второй заболевает в 65% случаев (в 65% случаев они конкордантны) (таблица20). А если один из дизиготных близнецов заболел диабетом, то второй заболевает только в 18% случаев. Большая конкордантность в группе генетически идентичных партнеров монозиготных пар доказывает, что в этиологии диабета наследственное предрасположение играет существенную роль.

Определение зиготности близнецов. Для определения зиготности близнецов используется изучение сходства (конкордантности) и различия (дискордантности) партнеров близнецовой пары по совокупности признаков, которые мало изменяются под влиянием внутренней и внешней среды. Определение зиготности включает исследование конкордантности и дискондартности близнецов по таким признакам, как цвет и форма волос, цвет и разрез глаз, форма ушей, бровей, носа, губ, подбородка и др. К другим методам

диагностики зиготности близнецов относятся: метод карiotипирования (исследование хромосом), иммуногенетический, когда близнецов партнеров сравнивают по эритроцитарным антигенам (системы групп крови АВО, MN, Rh), составу белков сыворотки крови и др. Эти менделирующие признаки не изменяются в течение жизни индивида, не зависят ни от каких внешних факторов, т.е. являются идеальными генетическими маркерами. Для диагностики зиготности используются также данные дерматоглифики (исследование кожного рельефа пальцев рук и ладоней), изучение способности чувствовать вкус особого вещества - фенилтиокарбамида, которая наследуется как моногенный признак. Используется трансплантационный тест (перекрестная пересадка кожи близнецов). Так как между монозиготными близнецами возможна трансплантация, и отторжения пересаженных органов не происходит, то это является наиболее достоверным признаком монозиготности.

Количественная оценка степени наследуемости. Известно, что такие признаки, как пол, группы крови, цвет волос и глаз, полностью определяются генотипом. А восприимчивость к инфекционным заболеваниям - кори, эпидемическому паратифу определяется внешней средой. В отношении многих других признаков выводы не столь очевидны. Даже некоторые инфекционные заболевания (полиомиелит, туберкулез) хоть и вызываются факторами вирусной или бактериальной природы, в некоторой степени зависят от наследственной предрасположенности. Для количественной оценки роли наследственности в развитии того или иного признака производят расчет по формуле Хольцингера:

$$Cmz - Cdz / 100 - Cdz$$

Н - коэффициент наследуемости (%); Cmz - процент конкордатных пар в группе монозиготных близнецов; Cdz - то же в группе дизиготных близнецов.

E - влияние среды; E = 100% - Н

Например, для сахарного диабета степень наследственности в проявлении этой патологии составляет:

$H=(65-18)/(100-18) \times 100=57\%$, а влияние среды $E=100\% - H=100\%-57\%=43\%$. Результаты вычислений по формуле Хольцингера подтверждают, что заболевание диабетом обусловлено генетическими факторами не меньше, чем условиями среды.

Если признак, например, группа крови, полностью обусловлен генотипом и не зависит от воздействий среды, то в группе монозиготных близнецов конкордантность (С) партнеров полная в силу идентичности их генотипов ($C=100\%$), а конкордантность в группе дизиготных близнецов, определяемая случайным сочетанием генов их родителей, будет, например, 40 % ($C_{dz}=40\%$), тогда $H=(100-40)/(100-40) \times 100=100\%$, а $E=0\%$. Иной результат получается для признака, развитие которого не зависит от генотипа и полностью обусловлено влиянием среды (например, при некоторых инфекционных заболеваниях). В этом случае процент конкордантных пар в группах моно- и дизиготных близнецов один и тот же, например, по 90% в обеих группах. Подставляя эти значения в формулу Хольцингера, получим $H=0\%$, $E=100\%$. Следовательно, коэффициент наследуемости для разных признаков различен, он изменяется от 100% для признаков, полностью обусловленных генетическими факторами, до 0 % для признаков, целиком зависящих от влияния среды. В большинстве случаев развитие признаков определяется совместным изменением генотипа и условий среды. Тогда коэффициент наследуемости меньше 100% и больше 0%, причем он тем больше, чем сильнее влияние генетического фактора.

Из таблицы 19 видно, что при туберкулезе, например, вероятность заболевания второго близнеца в монозиготной паре в 2 раза больше, чем в дизиготной.

Следовательно, при идентичном генотипе сходная реакция на внешний фактор (туберкулезная инфекция) наступает чаще, чем при разных генотипах, что доказывает существенную роль генетических факторов. При многих хронических внутренних заболеваниях, психических болезнях и пороках развития различия в частоте заболеваемости второго близнеца при

болезни первого среди монозиготных близнецов значительно выше, чем среди дизиготных. В таблице представлены значения коэффициента наследуемости для некоторых признаков человека. При H , равном единице, признак полностью определяется наследственным компонентом; при H , равном нулю, определяющую роль играют факторы среды. Коэффициент, близкий к 0,5, свидетельствует примерно об одинаковом влиянии наследственности и среды на формирование признака.

Из данных представленных в табл. 19 видно, что для многих признаков наряду с наследственностью значительную роль играют условия среды, при которых происходит реализация генотипа в фенотип. Установление роли наследственности и среды в развитии различных патологических состояний позволяет врачу правильно оценить ситуацию, осуществлять необходимую терапию или проводить профилактические мероприятия.

Суть метода заключается в сравнении проявления признака в разных группах близнецов при учете сходства или различия их генотипов. Монозиготные близнецы, развивающиеся из одной оплодотворенной яйцеклетки, генетически идентичны, так как имеют 100% общих генов. Поэтому среди монозиготных близнецов наблюдается очень высокий процент конкордантных пар, в которых признак развивается у обоих близнецов. Сравнение монозиготных близнецов, воспитывающихся в разных условиях постэмбрионального периода, позволяет выявить признаки, в формировании которых существенная роль принадлежит факторам среды. По этим признакам между близнецами наблюдается дискордантность, т.е. различия.

Установление относительной роли наследственности и среды в развитии различных патологических состояний позволяет врачу правильно оценить ситуацию и проводить профилактические мероприятия при наследственной предрасположенности к заболеванию.

Трудности близнецового метода связаны, во-первых, с относительно низкой частотой рождения близнецов в популяции 1:86–1:88, что осложняет подбор достаточного

количества пар с данным признаком; во-вторых, с идентификацией монозиготности близнецов, что имеет большое значение для получения достоверных выводов. С помощью близнецового метода проведены многочисленные исследования природы предрасположенности к сердечно-сосудистым болезням.

В таблицах 19 и 20 представлены некоторые обобщенные данные по изучению генетической компоненты в происхождении болезней этой группы.

Таблица 19

Конкордантность некоторых признаков человека у монозиготных и дизиготных близнецов.

Болезнь	Конкордантность близнецов (%)	
	монозиготных	дизиготных
Гипертоническая болезнь	26,2	10,0
Инфаркт миокарда	19,6	15,5
Инсульт	22,4	10,8
Ревматизм	26,0	10,5
Сахарный диабет	65	18
Туберкулез	37	15
Шизофрения	70	13

Таблица 20

Генетический анализ наследственной предрасположенности к некоторым мультифакториальным болезням

Показатель	ИБС	Р	СД	ЯБ	Ш
Частота в общей популяции (%)	19	2	0,6	0,6	1
Частота повторных случаев среди родственников 1-й степени родства, (%)	30-60	10	10	8	14
Конкордантность близнецов:					
монозиготных	67	37	42	50	67
дизиготных	43	7	12	14	18

Примечание: ИБС – ишемическая болезнь сердца, Р – ревматизм, СД – сахарный диабет, ЯБ – язвенная болезнь, Ш – шизофрения.

Близнецовым методом показана наследственная предрасположенность к некоторым инфекционным болезням (туберкулез, полиомиелит). Конкордантность монозиготных близнецов по этим заболеваниям в несколько раз выше, чем дизиготных. В таблице 20 представлены доказательства генетической предрасположенности к широко распространенным болезням, полученные клинико-генеалогическим и близнецовым методами для одних и тех же нозологических форм.

4.8. Популяционно-статистический метод

С помощью популяционно-статистического метода изучают наследственные признаки в больших группах населения, в одном или нескольких поколениях. Этим методом можно рассчитать частоту встречаемости в популяции различных аллелей гена и разных генотипов по этим аллелям, выяснить распространение в ней различных наследственных признаков, в том числе заболеваний. Он позволяет изучить мутационный процесс, роль наследственности и среды в формировании фенотипического полиморфизма человека по нормальным признакам, также в возникновении болезней, особенно с наследственной предрасположенностью. Этот метод используют и для выяснения значения генетических факторов в антропогенезе, в частности в расообразовании. Например, сравнивая частоту какой-либо болезни в одной и той же популяции в группах живущих или работающих в разных условиях людей, можно определить роль внешних факторов в происхождении болезней. При статистической обработке материала, получаемого при обследовании группы населения по интересующему исследователя признаку, основой для выяснения генетической структуры популяции является закон генетического равновесия Харди-Вайнберга. На основании этого закона, имея данные о частоте встречаемости в популяции рецессивного фенотипа, обладающего гомозиготным генотипом (aa), можно рассчитать частоту встречаемости указанного аллеля (a) в генофонде данного поколения.

Распространив эти сведения на ближайшие поколения, можно предсказать частоту появления в них людей с рецессивным признаком, а также гетерозиготных носителей рецессивного аллеля.

Математическим выражением закона Харди-Вайнберга служит формула $(pA + qa)^2$, где p - и q - частоты встречаемости аллелей A и a соответствующего гена. Раскрытие этой формулы дает возможность рассчитать частоту встречаемости людей с разным генотипом и, в первую очередь, гетерозигот – носителей скрытого рецессивного аллеля:

$$p^2 AA + 2pq Aa + q^2 aa.$$

Например, альбинизм обусловлен отсутствием фермента, участвующего в образовании пигмента меланина и является наследственным рецессивным признаком. Частота встречаемости в популяции альбиносов (aa) равна 1:20000. Следовательно, q равен

$1/20000$, тогда $q = 1/141$, а $p = 140/141$. В соответствии с формулой закона Харди-Вайнберга, частота встречаемости гетерозигот равна $2pq$, т.е. соответствует $2 \times (1/141) \times (140/141) = 280 / 20000 = 1/70$. Это означает, что в данной популяции гетерозиготные носители аллели альбинизма встречаются с частотой 1 на 70 человек.

Генетика человека в XXI веке, конечно же, это не только молекулярный и клинический уровни. Она по-прежнему будет захватывать все пространство между двумя мирами – молекулярным и популяционным, причем популяционный уровень будет не менее значимым, чем молекулярный.

Мутационный груз человечества накапливался в популяциях в форме сбалансированного полиморфизма или наследственной патологии. Он характеризует наше прошлое, и мы сейчас живем с этим грузом в катастрофически изменяющихся, с генетической точки зрения условиях. В XX веке появилось много факторов и условий, изменяющих наследственность человека, с которыми он как биологический вид не сталкивался на протяжении своей длительной эволюции. Это – миграция населения и расширение границ браков, планирование семьи у здоровых индивидуумов и репродуктивная

компенсация в отягощенных наследственной патологией семьях, насыщение среды обитания человека мутагенами, репродукция ранее летальных или стерильных гомо- и гетерозигот, элиминация определенных генотипов в связи с пренатальной диагностикой.

Генетические процессы в популяциях человека (изменение частот генов и генотипов, мутационный процесс, отбор) обладают большой инертностью. Вот почему генетические последствия изменения среды обитания человека проявятся не через 1-2 поколения, а скорее всего через десятки поколений. Задача современной популяционной генетики человека – научиться предсказывать нежелательные последствия на уровне популяций и использовать все методы для снижения неблагоприятных генетических эффектов от действия факторов окружающей среды, от изменения демографической структуры человечества, а также для уменьшения груза накопленной в предыдущих поколениях наследственной патологии. Современные достижения генетики человека уже позволяют это сделать.

Генетика человека прошла действительно большой путь развития от простого накопления сведений о семейных болезнях и наследственных признаков до расшифровки нуклеотидной последовательности всего генома, от вероятностного прогноза рождения ребенка с наследственной болезнью до достоверной пренатальной и доклинической диагностики, от концепции вырождения наследственно отягощенных семей до нормоконирования патологических генотипов.

Одной из главных биологических ценностей человеческого рода является его генетический полиморфизм.

Генетическая структура современных популяций испытывает большие нагрузки. В современном обществе наблюдаются следующие новые популяционные процессы: расширение круга потенциальных брачных партнеров, интенсивная миграция населения, планирование семьи, снижение давления отбора. Круг потенциальных брачных партнеров расширен в связи с преодолением религиозных, классовых, этнических и географических барьеров.

Уровень миграции населения в мире, в том числе в Украине, неизмеримо возрос. Такого размаха миграции человечество еще не испытывало.

Расширение круга потенциальных брачных партнеров приводит к формированию более гетерогенных с генетической точки зрения популяций. Это новое явление в биологии человека, последствия которого еще предстоит изучать.

Во всем мире принято планирование семьи, что с генетической точки зрения можно назвать искусственным ограничением деторождения или уменьшением числа потомков. Семьи с патологией достигают планируемого числа детей за счет большего числа беременностей, несмотря на неблагоприятные исходы некоторых из них. Планирование семьи как бы уравнивает шансы семей с патологией и без патологии иметь одинаковое количество детей. Этот феномен назван репродуктивной компенсацией.

Уменьшение давления отбора благодаря улучшению условий жизни и медицинской помощи уже наблюдается во многих странах. Беременности, имеющие серьезные биологические причины к самопроизвольному прерыванию, сохраняются благодаря усилиям врачей. Индивиды, потенциально неспособные к деторождению, благодаря высоким медицинским технологиям имеют потомство.

Хотя многие факторы, безусловно, ведут к изменению генетической структуры популяций и повышению наследственной изменчивости, как показывают многочисленные исследования украинских ученых, популяционные генетические процессы обладают большой силой инерции. Именно поэтому не следует ожидать, что новые явления в биологии человека и в среде его обитания в короткий срок могут вызвать опасный «взрыв» наследственности человека или резкий подъем частоты наследственных болезней, врожденных пороков развития, как иногда об этом пишут.

Теоретические модели генетической структуры популяций человека в большинстве случаев предполагают, что размер таких популяций бесконечен, что на них не действуют отбор и мутационный процесс и что в них реализуется свободное

скрещивание, или панмиксия. При выполнении этих условий реализуется одно из фундаментальных правил популяционной генетики – сохранение постоянства частот генов при переходе к следующему поколению, известное как правило Харди-Вайнберга. Однако, в реальных популяциях человека ни одно из этих условий в действительности не выполняется. Очевидно, что популяции, особенно сельские, имеют ограниченный размер и что они в большей или меньшей степени изолированы от таких же окружающих популяций. Следствием этого будут случайное изменение частот генов, в том числе генов рецессивных заболеваний, которые не находятся под действием отбора, при переходе к следующему поколению, выраженное тем больше, чем меньше размер популяции; и уменьшение генетического разнообразия популяций. В результате при случайном повышении частоты таких рецессивных генов в определенной популяции в ней повышаются шансы выщепления гомозигот и, следовательно, появления больных с рецессивными наследственными болезнями. Описанный процесс случайного изменения частот генов в популяции называется *дрейфом генов* и по своим последствиям – уменьшению генетического разнообразия популяции и увеличению шансов огомозиготирования генов – он сходен с эффектами инбридинга. Таким образом, популяционная генетика позволила предположить, в каких популяциях человека можно было ожидать накопления редкой наследственной, прежде всего аутосомно-рецессивной патологии.

Второй механизм популяционного накопления гомозигот по редкой наследственной патологии – это инбридинг, обусловленный распространением во многих популяциях традиции заключения близкородственных браков. В отличие от дрейфа генов инбридинг, по крайней мере в течение небольшого числа поколений, мало влияет на частоты генов в популяциях, а изменяет только частоты генотипов, увеличивая, против ожидания, долю гомозигот.

Впервые Бочковым Н.П. в Узбекистане, где частота кровнородственных браков (преимущественно между

двоюродными сибсами) составляет как минимум 10%, популяционный груз рецессивных заболеваний был выше, чем 3 больных на 1000 человек обследованного населения, т.е. был одним из самых высоких в мире.

Спектр аутосомно-рецессивных заболеваний чрезвычайно широк, среди них выявлено несколько предположительно «новых» форм. Родители в абсолютном большинстве семей с аутосомно-рецессивными заболеваниями были близкими родственниками. Высокие значения груза аутосомно-рецессивных заболеваний в среднеазиатских популяциях объясняются широким распространением традиции заключения кровнородственных браков, но одновременно с этим заметный вклад вносит также дрейф генов, обусловленный генетической изоляцией среднеазиатских популяций. Позднее сходная ситуация, когда причиной накопления рецессивной наследственной патологии служит высокая частота кровнородственных браков, была выявлена для ряда арабских популяций Ближнего Востока.

Генетически изолированные популяции представляют интерес не только с точки зрения обнаружения новых наследственных заболеваний или детального описания клинических проявлений тех наследственных заболеваний, которые накапливаются в подобных популяциях, но и для картирования генов наследственных заболеваний. Для того, чтобы картировать ген наследственного заболевания надо обнаружить его сцепление с маркерными генами. Маркерный ген обязательно должен быть полиморфным. Чем выше полиморфизм маркерного гена, тем больше его информативная ценность для анализа сцепления. У человека, имея в виду небольшой размер семей, сцепление маркерного гена и гена заболевания можно выявить только тогда, когда оба гена находятся не только в одной хромосоме, но и физически расположены достаточно близко к друг другу. Сначала это были маркеры, обнаруживающие полиморфизм длин рестрикционных фрагментов, затем им на смену пришли микро- и минисателлиты, различающиеся по числу простых повторов нуклеотидов в определенных участках хромосомы. Наконец, в

настоящее время наиболее часто для анализа сцепления используется так называемый однонуклеотидный полиморфизм (ОНП). ОНП теоретически наблюдается с частотой 1 на 100-300 нуклеотидов, и по форме представляет собой обычно диаллельный полиморфизм.

4.9. Методы дерматоглифики и пальмоскопии

Дерматоглифика – наука, изучающая наследственную обусловленность рисунков, которые образуют линии кожи на кончиках пальцев, ладонях и подошвах человека. Название происходит от двух греческих слов: *derma* – кожа и *glyphe* – гравировать. Дерматоглифика подразделяется на: дактилоскопию – изучение рисунка пальцев; пальмоскопию – изучение особенностей строения ладоней; плантоскопию – изучение особенностей строения подошв. Метод предложен в 1892 г. Ф.Гальтоном в качестве одного из методов изучения кожных гребешковых узоров пальцев и ладоней, а также сгибательных ладонных борозд. Он установил, что указанные узоры являются индивидуальной характеристикой человека и не изменяются в течение его жизни. Дерматоглифические исследования имеют важное значение в определении зиготности близнецов, в диагностике ряда наследственных заболеваний, а также в отдельных случаях спорного отцовства.

Ладонный рельеф очень сложный. В нем выделяют ряд полей, подушечек и ладонных линий. Подушечек на ладони 11 и их делят на три группы:

Пять концевых (апикальных) подушечек на концевых фалангах пальцев.

Четыре межпальцевых подушечки располагаются против межпальцевых промежутков.

Две ладонные проксимальные подушечки – тенар и гипотенар.

Ладонь дистально ограничена запястно-фалангеальными сгибательными складками, а проксимально – запястной или браслетной сгибательной складкой. Как на ладонях, так и пальцевых подушечках кожные гребешки идут потоками. Точки

встречи этих потоков образуют трирадиусы или дельты. На каждой из 4 межпальцевых подушечек обычно есть трирадиусы, их обозначают малыми буквами латинского алфавита (a, b, c, d) начиная от указательного пальца (a) и кончая мизинцем (d), рис.78.

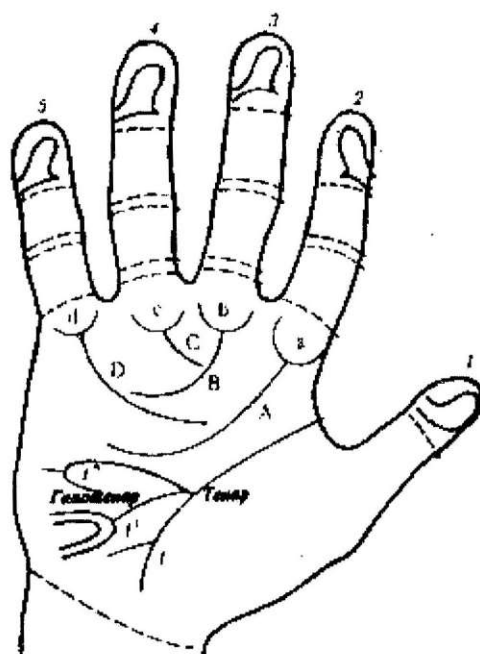


Рис.78. Кожные складки и узоры ладони человека

Гребешковые узоры обычно изучают под лупой, отпечатки узоров при помощи типографской краски делают на чистой, белой, лучше мелованной бумаге или на целлофане. Как на кончиках пальцев, так и на ладонных возвышениях могут наблюдаться различные папиллярные узоры в виде завитков, петель и дуг, открытых в ульнарную или радиарную сторону. То же самое наблюдается и на тенаре и гипотенаре. Однако здесь чаще бывают дуги, рис.78.

На средней и основной фалангах пальцев гребешковые линии идут поперек пальцев, образуя различные узоры- прямые, серповидные, волнообразные, дугообразные и их сочетания.

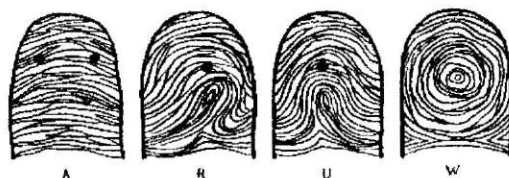


Рис.79. Папиллярные кожные узоры человека:
 А - дуги, R - петля открытая в радиарную сторону, U - в ульнарную, W - завиток

Больше всего работ посвящено изучению узоров на кончиках пальцев. Гальтон выделил три формы папиллярных узоров: завитки, пѐтли и дуги. Их обозначают соответственно: W; L; A. Петли могут быть открытые как в ульнарную, так и в радиарную сторону. Их направление обозначают первой буквой этих слов. Символ U обозначает петлю, открытую в ульнарную сторону, символ R – петлю, открытую в радиарную сторону. Таким образом, в настоящее время выделяют четыре основных пальцевых папиллярных узоров – W; R; U; A. В дугах потоки гребешковых линий не пересекаются. Таким образом, в дуге нет трирадиуса, или дельты. В петле есть одна дельта, а в завитке две дельты.

Общепринятыми показателями особенностей кожных узоров на пальцах являются:

1. Общий гребневой счет (общее число папиллярных линий) - сумма, подсчитанных на всех 10 пальцах папиллярных линий между центром узора и дельтой.
2. Индекс интенсивности узора – сумма дельт на 10 пальцах обеих рук.
3. Частота отдельных узоров – отношение числа узоров того или иного типа (дуги, петли радиарные, петли ульнарные, завитки) к общему числу учтенных узоров.

В популяционных исследованиях вычисляют ряд индексов, отражающих в основном дельтовый показатель, т.е. отношение петель и завитков на всех 10 пальцах по формуле

$$A + 2W / 10.$$

Наиболее широкое применение имеет формула

$$Dt_{10} = A + 2W / (A + L + W) \cdot 10.$$

В групповых исследованиях пользуются изучением количественного значения узора, т.е. числа гребешков от дельты до центра узора (гребешковый счет). В среднем на одном пальце бывает 15–20 гребешков, на всех 10 пальцах для мужчин – 144,98, а для женщин – 127,23. Кожные узоры наследственно обусловлены и не меняются в течение всей жизни человека.

При изучении кожного рельефа ладони исследуют:

1. Ход главных ладонных линий A, B, C, D.
2. Ладонные узоры на тенаре и гипотенаре.
3. Пальцевые узоры (форму узоров и гребневой счет).
4. Осевые трирадиусы.

В настоящее время установлена наследственная обусловленность кожных узоров, хотя характер наследования окончательно не выяснен. На характер пальцевого и ладонного узоров организма большое влияние оказывает мать через механизм цитоплазматической наследственности. Изучение людей с хромосомными болезнями выявило у них специфические изменения не только рисунков пальцев и ладоней, но и характера основных стигматических борозд на коже ладоней. Характерные изменения этих показателей наблюдаются при болезни Дауна, при синдромах Клайнфельтера, Шерешевского-Тернера, что позволяет использовать методы дерматоглифики и пальмоскопии для диагностики этих заболеваний.

4.10. Методы генетики соматических клеток (ГСК)

Методы ГСК, основанные на размножении соматических клеток в искусственных условиях, позволяют не только анализировать генетические процессы в отдельных клетках организма, но благодаря полноценности наследственного материала, заключенного в них, использовать их для получения генетических закономерностей целостного организма.

Для генетических исследований человека используют следующие приемы:

1. простое культивирование,
2. клонирование,
3. селекцию,
4. гибридизацию.

Благодаря методам ГСК можно изучать механизмы первичного действия и взаимодействия генов, регуляцию генной активности. Развитие этих методов определило возможность точной диагностики наследственных болезней в пренатальном периоде.

Раздел 5

МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КОНСУЛЬТИРОВАНИЕ (МГК). ПРЕНАТАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ВРОЖДЕННЫХ И НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Ведущим методом в объективной оценке состояния плода является пренатальная диагностика.

Современная пренатальная диагностика состоит как минимум из 3-х этапов.

I этап – медико-генетическое консультирование, во время которого формируется группа высокого риска по врожденной и наследственной патологии плода.

II этап – скринирующий, предусматривает обследование всех или почти всех беременных с помощью неинвазивных методов: ультразвукового сканирования и анализа маркерных сывороточных белков α -фетопротеина (АФП), хорионического гонадотропина (ХГ) в крови в наиболее информативные строки.

III этап – инвазивная пренатальная диагностика для точного определения хромосомных и ряда моногенных заболеваний плода.

Современная акушерско-гинекологическая клиника, стремящаяся оказывать всестороннюю помощь семье в рождении здорового ребенка и сохранении репродуктивного здоровья, должна активно привлекать медико-генетическую службу.

В настоящее время наиболее распространенным и эффективным подходом к профилактике врожденных и наследственных заболеваний является активное сотрудничество медико-генетической, акушерско-гинекологической и педиатрической служб, т.е. необходимо возрастание интегрирующего значения медицинской генетики в общей системе профилактики болезней человека. На рис. 80 представлена схема профилактики врожденной и наследственной патологии у плода и новорожденного, а также выявление наследственно обусловленных форм нарушений репродуктивной системы женщины.

Суть заключается в определении прогноза рождения ребенка с наследственной патологией, объяснении вероятности этого события консультирующимся и помощи семье в принятии решения о дальнейшем деторождении.



Рис. 80. Основные разделы работы отделения клинической генетики в акушерском центре

Показаниями для МГК являются:

- рождение ребенка с врожденным пороком развития;
- установленная или подозреваемая наследственная болезнь в семье;
- задержка физического развития или умственная отсталость у ребенка;
- повторные спонтанные аборт, выкидыши, мертворождения;
- близкородственные браки;
- воздействие подозреваемых на тератогенность или известных тератогенов в первые 3 месяца беременности;
- Неблагополучное протекание беременности.

Задачи МГК:

- Установление точного диагноза врожденного или наследственного заболевания.
- Определение типа наследования этого заболевания.
- Расчет величины риска повторения заболевания в семье.
- Объяснение смысла медико-генетического прогноза обратившимся.
- Диспансерное наблюдение и выявление группы повышенного риска среди родственников индивида с наследственной болезнью.
- Пропаганда медико-генетических знаний среди врачей и населения.

Виды МГК:

- проспективное;
- ретроспективное.

Проспективное консультирование – это наиболее эффективный вид профилактики наследственных болезней, когда риск рождения больного ребенка определяется еще до наступления беременности или на ранних ее сроках. В этом случае супруги, направленные на консультацию, не имеют больного ребенка, но существует определенный риск его рождения, основанный на данных генеалогического

исследования, анамнеза или течения настоящей беременности.

Ретроспективное консультирование – это консультирование относительно здоровья будущих детей после рождения в семье больного ребенка.

Этапы консультирования.

Медико-генетическая консультация состоит из 4 этапов: диагноз, прогноз, заключение, совет. При этом необходимо откровенное и доброжелательное общение врача-генетика с семьей больного.

Первый этап консультирования начинается с уточнения диагноза болезни. Это требует близкого контакта между генетиком и врачом-специалистом в области той семейной патологии, которая явилась предметом консультирования (акушер, педиатр, невропатолог и др.). Исходным моментом диагностики служит клинический диагноз. В медико-генетических консультациях диагноз уточняют с помощью генетического анализа (что и отличает врача-генетика от других специалистов), широко используют генеалогический и цитогенетический методы, а также специфические методы биохимической генетики, специально разработанные для диагностики наследственных болезней и нечасто применяемые в клинической практике.

На *втором этапе* консультирования задача врача-генетика заключается в определении риска рождения больного ребенка. Исходным моментом служит родословная обследуемой семьи.

Генетический риск выражает вероятность появления определенной аномалии у обратившегося или его потомков. Он определяется двумя способами: либо путем теоретических расчетов, основанных на генетических закономерностях, либо с помощью эмпирических данных.

На *третьем этапе* консультирования врач-генетик должен прийти к заключению о риске возникновения болезни у детей консультирующихся супругов и дать им соответствующие рекомендации. Составляя заключение, врач должен учитывать тяжесть семейной патологии, величину риска рождения больного ребенка и морально-этическую сторону вопроса.

Заключительный этап – совет врача-генетика.

5.1. Расчет риска при доминантном и рецессивном типе наследования

Полное доминирование – когда один ген полностью подавляет действие другого. Например:

A – карие глаза у человека
a – голубые глаза у человека

P – O AA x □ aa

G: A; a;

F₁ Aa – 100% (карие)

Доминантный ген проявляется в 100% случаев.

При рецессивном типе наследования – рецессивный ген (a) проявляется только в гомозиготном состоянии (aa).

Aa – карие глаза у человека

P – O Aa x □ Aa

G: A; a; A; a;

F₁ AA, 2Aa, aa (25%)

Рецессивный ген проявляется в 25% случаев.

Расчеты генетического риска существенно различаются в зависимости от цитогенетической формы заболевания.

Если у пациента обнаружен транслокационный вариант болезни Дауна, то обязательно исследуют кариотип родителей. Выявление у кого-либо из родителей сбалансированной транслокации делает необходимым при последующих беременностях внутриутробную диагностику путем амниоцентеза, т.к. риск рождения ребенка с болезнью Дауна в этих случаях повышен. Так, при транслокации типа 13/21, выявленной у отца, риск составляет 2,5%, а при выявленной у матери – около 10%. Если у одного из родителей обнаружена транслокация типа 21/21, то риск составляет 100%.

Практика *медико-генетического консультирования* показывает, что амниоцентез целесообразен в случаях, когда риск рождения ребенка не менее 1%, есть любые сбалансированные транслокации или мозаицизм у одного из родителей, а возраст матери превышает 35 лет.

При трисомной форме *болезни Дауна* риск рождения больного ребенка зависит от возраста матери: до 35 лет его считают близким к 1%, к 40 годам – 1%, а в 45 лет и старше – около 3%. Генокопии и фенокопии усложняют постановку диагноза. Врач должен иметь в виду, что некоторые сходные признаки могут иметь как наследственную, так и ненаследственную природу. Установление причины заболевания является важным условием прогноза рождения здорового ребенка.

Генокопии и фенокопии усложняют постановку диагноза. Врач должен иметь в виду, что некоторые сходные признаки могут иметь как наследственную так и ненаследственную природу.

Фенокопии, морфозы и генокопии. Иногда факторы внешней среды и аномальные гены оказывают сходное действие. Например, у женщин, перенесших во время беременности краснуху, часто рождаются глухонемые или с врожденной катарактой дети, фенотипы этих больных не отличаются от соответствующих генетических аномалий. Такие изменения называют фенокопиями.

Фенокопия — это определенная модификация признака под влиянием внешних факторов, копирующая признак, характерный для другого генотипа. Фенокопии не наследуются, так как при этом не изменяется генетический аппарат гамет. Обычно повреждающий фактор действует на определенном этапе развития, когда организм восприимчив к нему. Один и тот же агент в зависимости от периода действия может вызывать разные фенокопии, соответствующие разным мутациям. А в появлении одной и той же фенокопии могут быть «виновны» разные факторы: климатические, физические, химические, биологические. Например, к развитию кретинизма, кроме наследственных предпосылок, может приводить отсутствие йода в рационе ребенка или тяжелые травмы головного мозга. У светлогокожего европейца при продолжительном воздействии ультрафиолетовых лучей кожа становится пигментированной и копирует темный цвет кожи монголоида, у которого другой генотип. Причинами фенокопии у детей могут быть также

сифилис, токсоплазмоз и другие заболевания матери во время беременности. Если изменения не имеют приспособительного значения, а представляют собой аномалии и уродства, то они называются *морфозами*. Обычно морфозы связаны с действием различных химических веществ или радиации.

С другой стороны, ряд сходных признаков, в том числе и патологических, может вызываться различными неаллельными генами. Такое явление называется *генокопией*. Генокопии - это одинаковые по фенотипическому проявлению признаки, связанные с действием разных генов. Примером генокопий могут служить различные виды гемофилии, клинически проявляющейся понижением свертываемости крови на воздухе. Эти одинаковые по фенотипическому проявлению формы связаны с мутациями разных генов. Гемофилия А вызвана мутацией гена, контролирующего синтез фактора VIII (антигемофильного глобулина), а причиной гемофилии В является дефицит белкового фактора IX свертывающей системы крови. Примером генокопий являются также различные формы талассемии — заболевания, сопровождающегося распадом эритроцитов, желтухой, увеличением селезенки. Известны две формы этого заболевания (а и Б). При этом заболевании тормозится скорость синтеза разных полипептидных цепей гемоглобина, которые кодируются разными генами.

Пенетрантность и экспрессивность. Пенетрантность - это вероятность проявления определенного аллеля в признак. При полной пенетрантности признак проявляется у всех несущих данный аллель индивидуумов, при неполной - только у части. Количественно пенетрантность выражается процентом особей, у которых аллель проявился. Например, пенетрантность некоторых форм шизофрении (доминантный признак) для гомозигот составляет 100%, а для гетерозигот - 20%. В основе неполной пенетрантности лежит взаимодействие генетических и средовых факторов. Знание пенетрантности патологических аллелей необходимо при медико-генетическом консультировании для предсказания возможности рождения здоровых или больных детей.

Экспрессивность - это степень выраженности признака, т.е.

сила фенотипического проявления аллеля. По степени развития признака можно судить о силе действия аллеля. Примерами экспрессивности доминантных генов у человека являются: различные степени расщепления губы и неба, различная степень полидактилии, различная глубина вертлужной впадины и др. Выраженность признака может колебаться от особи к особи. Если изменчивость признака отсутствует, говорят о постоянной экспрессивности, например, группы крови АВО. При переменной экспрессивности обнаруживается разная степень проявления признаков. В основе этого лежит как действие факторов среды, так и взаимодействие генов. Степень экспрессивности может оцениваться количественно с помощью статистических показателей.

Полиморфизм признаков. Практически все признаки имеют разную степень проявления и выраженности. Это связано с наличием разных аллелей у индивидуумов, различными взаимодействиями генов и влиянием внутренних и внешних факторов. Этим обеспечивается колоссальное разнообразие сочетаний различных признаков и их вариантов.

Онтогенетическая изменчивость является разновидностью фенотипической изменчивости. Этот тип изменчивости связан с определенными этапами развития индивидуума в процессе онтогенеза. При этом фенотип меняется довольно значительно, хотя генотип не претерпевает изменений. Благодаря *дифференциальной экспрессии генов*, на каждом этапе развития функционирует только необходимая в этот период часть генома. Это обуславливает определенную дифференцировку клеток и последующий морфогенез. Поэтому на каждом этапе развития организм имеет определенный размер, форму тела, структуру внутренних органов и др. У животных, развивающихся с метаморфозом, личинка вообще полностью фенотипически отличается от взрослого организма и может обитать в другой среде. Человек также в различные периоды развития выглядит по-разному, хотя обладает стандартным, консервативным генотипом. Особенно значительны фенотипические превращения на ранних этапах эмбрионального развития, когда в течении первых 3-х месяцев

из одной клетки формируется плод, имеющий сотни разнообразных клеток и все разновидности тканей и органов. Существенным модификациям подвергается человек во время рождения, на разных стадиях роста и развития, полового созревания, репродуктивного периода и старения. Порядок и направление онтогенетических модификаций изменяться не может, т.к. программа развития определена геномом.

Таким образом, онтогенетическая изменчивость - это постепенные изменения фенотипа в процессе индивидуального развития в результате дифференцировки, роста и морфогенеза. Например, один и тот же человек выглядит по-разному в разном возрасте. Генотип при этом не изменяется, меняются лишь генетические программы развития. Последовательность изменений чрезвычайно стабильна на протяжении тысячелетий, так как определена геномом. Такого рода изменчивость называется *эпигеномной*, так как ее механизмы связаны с «включением» и «выключением» генов.

5.2. Расчет риска при полигенном типе наследования

Ряд признаков и заболеваний обусловлен многими генами, поэтому их обозначают термином «полигенные». Передача их потомкам не подчиняется законам Г. Менделя.

Если при доминантном типе наследования частота встречаемости заболеваний доходит до 50%, при рецессивном – до 25%, то при полигенном – до 5%.

Предположение о полигенном типе наследования высчитывают путем сравнения частоты заболеваемости в популяции с частотой заболеваемости в семье:

$$\frac{\text{популяционная частота}}{\text{семейная частота}} \times 100\%$$

Риск повторного рождения больного ребенка увеличивается с повторной беременностью.

Например, расщепление позвоночника при первых родах наблюдается в 4% деторождений, при повторных родах частота доходит до 10%.

На частоту проявления этих заболеваний оказывают влияние пол родителя, больного этим заболеванием, и пол самого больного ребенка (пилоростеноз чаще бывает у мальчиков, а врожденный вывих бедра – у девочек).

При мультифакториальных болезнях риск рождения больного ребенка основан не на законах Менделя, а на следующих основаниях:

1. Вероятность проявления болезни зависит от степени родства с пораженным членом семьи, так как это определяет число общих генов.

2. Число больных родственников определяет прогноз для пробанда.

Например, при сахарном диабете риск для sibсов пробанда в зависимости от числа больных родственников будет следующим:

- а) если родители здоровы, вероятность равна 5-10%;
- б) если болен один из родителей, риск равен 10-20%;
- в) если больны оба родителя, риск возрастает до 40%.

Риск для детей пробанда в зависимости от поражаемости его родителей составит или 10%, или 20%.

3. Генетический прогноз зависит от степени тяжести болезни пораженного родственника, поскольку степень тяжести при мультифакториальных болезнях определяется суммарным действием нескольких генов. Так, человек, получивший 4 гена, от которых зависит артериальная гипертензия, будет иметь более тяжелую форму заболевания, и, конечно, большую вероятность передачи патологического гена потомству.

4. Степень наследственной отягощенности для пробанда увеличивается, если его больной родитель относится к редко поражаемому полу. Например, в случае язвенной болезни желудка и 12-и перстной кишки в каждой семье, отягощенной этим заболеванием, вероятность передачи генов потомству одинакова. Однако, вероятность заболеть всегда больше для лиц мужского пола, и в том случае, если поражены женщины – родственницы пробанда. Риск для детей пробанда заболеть язвенной болезнью 12-и перстной кишки возрастает в результате двух факторов:

а) оба они мужского пола (язвенная болезнь относится к заболеваниям с преимущественным поражением лишь лиц мужского пола);

б) язвенной болезнью болеет мать пробанда, то есть в данном случае больной родитель относится к реже пораженному полу.

Таким образом, разнообразие типов наследственной передачи признаков в полной мере демонстрирует сложность установления типа наследования.

Одним из основных методов в практике МГК является составление родословных. Это необходимо, так как изучение каждой семьи, где хотя бы один из ее представителей имеет генетические нарушения, должно включать в себя не только изучение этого нарушения у больного и его родителей, но и генеалогический анализ. Если такой анализ был проведен тщательно, с широким охватом прямых и боковых ветвей, то нередко удается обнаружить сходные заболевания у дальних родственников.

Важность такого обнаружения имеет двойное значение: во-первых, врач-генетик получает достаточную уверенность в том, что болезнь не представляет собой новую мутацию и не возникла случайно при формировании половых клеток родителей. Напротив, он убеждается в том, что аномальные гены или хромосомы в обследуемой семье существуют, передаются из поколения к поколению.

Во-вторых, генеалогическое дерево с выявленными больными родственниками позволяет более точно определить характер наследования патологического признака в данной семье.

Расчет вероятности проявления нарушений развития будет зависеть от множества причин: от того, например, одним или несколькими генами определяется дефект или предрасположение к нему. Если несколькими, то необходимо знать каков характер их взаимодействия друг с другом и как эти гены наследуются: независимо, или же они находятся в определенном сцеплении.

Задача осложняется тем, что вредные мутации могут иметь различную степень проявления.

Для анализа некоторых врожденных аномалий (особенно не подчиняющихся формальным законам генетики) иногда прибегают к понятиям количественной наследственности.

Концепция количественной наследственности основана на допущении того, что у человека существует предрасположение к определенному заболеванию. Это предрасположение зависит от взаимовлияния двух причин: с одной стороны, это влияние нескольких генов, расположенных в различных участках хромосом, с другой – факторов внешней среды. Каждая из этих причин сама по себе еще не приводит к пороку, но в комплексе при определенном стечении обстоятельств предрасположение достигает критического уровня, и, как следствие, проявляется болезнь.

Так, моногенные формы наследственной предрасположенности проявляются в виде болезней вследствие загрязнения воздуха, влияния лекарств и т.д.

Недостаток α_1 -антитрипсина реализуется в заболевание эмфизему легких и закупоривание бронхов, если особь будет гомозиготной по одному из 13 аллелей. Это наследственная болезнь в гомозиготном состоянии. Но и гетерозиготные формы заболевают, если контактируют с вредными веществами и курят.

У некоторых людей имеется наследственная непереносимость лактозы. Из-за отсутствия фермента β -галактозидазы поступление в организм молока приводит к нарушению пищеварения.

5.3. Влияние генотипической среды и факторов внешней среды на проявление признаков.

Следует учитывать, что пенетрантность сахарного диабета и многих других заболеваний зависит от условий среды и продолжительности жизни (чем больше продолжительность жизни, тем выше пенетрантность).

Пенетрантность может отсутствовать (признак не проявляется). Степень выраженности признака может быть различная (количество пальцев на руках и ногах соответственно: 5, 5 – 6, 6; 5, 6 – 5, 7 и 6, 6 – 6, 6).

Экспрессивность – степень выраженности признака. Так, совокупность признаков заболевания может проявляться от легких (едва уловимых) до тяжелых: различные формы шизофрении, гипертонии, сахарного диабета.

Многие морфологические, физиологические, психологические и патологические особенности человека определяются полимерными генами. Например, рост, масса тела, величина артериального давления, характер, память и др. Развитие таких признаков подчиняется общим законам полигенного наследования и существенно зависит от влияния условий среды. При наличии неблагоприятных условий наблюдается, предрасположенность к патологии, например, к гипертонической болезни или к ожирению (при нездоровом образе жизни). Данные признаки при благоприятных условиях (здоровом образе жизни) могут и не проявиться или проявиться в незначительной степени. Таким образом, контролируя условия среды, можно обеспечить в значительной степени профилактику ряда полигенных заболеваний.

Плейотропия. Считается, что конкретный ген определяет развитие одного определенного признака. Однако для некоторых генов это не всегда справедливо. Известны гены, которые влияют не только на признаки, связанные с ними, но также могут оказывать влияние на развитие других признаков. Плейотропный ген вызывает проявление своего специфического признака (*основной эффект*) и связанных с ним других признаков (*вторичный эффект*). Зависимость нескольких признаков от одного гена называется *плейотропией*, а ген, имеющий множественное фенотипическое воздействие, называется *плейотропным геном* (гр. pleios - полный, tropos - способ). При плейотропии наблюдается проявление множественных эффектов одного гена.

Плейотропия у человека. У человека встречается заболевание *серповидно-клеточная анемия*. Аллель гена, вызывающая это заболевание, меняет тип гемоглобина, его свойства, а также форму эритроцитов. Это происходит из-за присутствия в них дефектного гемоглобина, называемого серповидно-клеточный гемоглобин или гемоглобин S. Молекула гемоглобина S (HbS) имеет структуру, отличающуюся

аминокислотным составом от нормального гемоглобина А (HbA), что приводит к изменению его свойств и пространственной ориентации внутри эритроцитов. Человек может иметь один аллель для нормального гемоглобина и другой для серповидно-клеточного (HbA, HbS). В этом случае гетерозиготные индивидуумы (Aa) являются носителями гена серповидно-клеточной анемии. Они практически нормальны или имеют незначительные симптомы заболевания. Брак между двумя носителями приводит к появлению больных детей, детей-носителей и здоровых.

Вышеописанный случай демонстрирует, что один ген, изменяющий структуру гемоглобина (основной эффект), приводит к изменениям его упаковки в эритроците, изменениям формы эритроцитов и способности гемоглобина связывать и переносить газы (вторичные эффекты).

Известно так же такое наследственное заболевание человека как *арахнодактилия (синдром Марфана)*, При этом заболевании определенный ген вызывает нарушение развития соединительной ткани (первичный эффект гена). В результате этого наблюдается несколько вторичных эффектов: нарушение строения хрусталика, аномалии в строении скелета, нарушение сердечно-сосудистой системы и др. Рecessивный ген *фенилкетонурия* также проявляет плеiotропное действие. Люди гомозиготные по этому аллелю, даже вовремя прошедшие курс лечения, отличаются от здоровых уровнем содержания фенилаланина в крови, коэффициентом умственного развития, размером головы, интенсивностью цвета волос.

Следует различать *относительную* и *прямую плеiotропию*. В случае *относительной*, как например, при серповидно-клеточной анемии, существует одно первичное действие патологического гена - это изменение структуры гемоглобина (основной эффект). А все остальные симптомы этой болезни (вторичные эффекты, нарушение структуры эритроцитов, нарушение связывания газов и др.) являются лишь следствием первичного действия. При *прямой* плеiotропии все разнообразные дефекты вызываются одновременно непосредственным действием этого гена - его экспрессией, в клетках различных органов или тканей. Например, болезнь

арахнодактилия, при которой патологический ген одновременно экспрессируется в клетках нескольких органов. При этом нарушается образование соединительной ткани сразу в нескольких местах организма, что ведет к множественным патологиям,

При *плейотропии* ген, влияя на какой-то один основной признак, может также изменять, модифицировать проявление других генов, в связи с чем введено понятие о *генах-модификаторах*. Последние усиливают или ослабляют развитие признаков, кодируемых «основным» геном. Возможно, что каждый ген является одновременно геном основного действия для «своего» признака и модификатором для других признаков. Таким образом, фенотип формируется в результате взаимодействия генов друг с другом и всего организма с внешней средой.

Факторы, влияющие на проявление признаков (экспрессию генов). Все гены определяют только *фенотипический потенциал* организма. Иное дело, каким он окажется в действительности. На фенотип большое влияние могут оказывать различные факторы внешней и внутренней среды. Например, плохо питающиеся люди обычно бывают ниже ростом, чем допускают их гены. Человек под действием солнечных лучей приобретает более смуглую кожу. У кроликов окраска шерсти зависит от температуры и др. Таким образом, факторы внешней среды оказывают значительное влияние на проявление признаков.

Многие внутренние факторы (например, гормоны) также оказывают существенное действие на развитие признаков организма. В частности, половые гормоны сильно воздействуют на репродуктивные системы, а также существенно влияют и на другие признаки организма. Гены и признаки, проявление которых определяется уровнем половых гормонов, называются *зависимыми от пола* (см. стр. 299). При отсутствии действия гормона признак не проявляется. Например, самцы и самки обладают одинаковым генетическим потенциалом, необходимым для образования половых органов, свойственных противоположному полу но они не образуются т.к. уровень соответствующих гормонов недостаточный. В разном возрасте

организм вырабатывает разное количество гормонов, что также влияет на экспрессию генов и развитие признаков. Например, гормонами контролируется процесс полового созревания; у мальчиков «ломка голоса», рост семенников; у девочек — увеличение молочных желез, появление характерных жировых отложений.

Развитие зародыша также зависит от факторов среды, а больше от взаимодействия генов (их продуктов). Многие признаки зависят от влияния продуктов других генов-модификаторов. Считалось, что цвет глаз определяется одной парой генов, причем карий цвет глаз доминирует над голубым. Теперь известно, что в этом процессе могут участвовать также две пары генов-модификаторов в результате чего у голубоглазых родителей может родиться кареглазый ребенок. Таким образом, отклонения от ожидаемых закономерностей проявления признаков может зависеть от многих причин. Это обуславливает различную степень выраженности признаков (экспрессивность) и разную вероятность проявления признаков (пенетрантность).

5.4. Гетерозиготные носители и наследственная предрасположенность

Выявление в популяции гетерозиготных индивидуумов, которые сами не болеют, но гетерозиготны, особенно важно в случаях с аутосомно-рецессивным типом наследования в семьях, где есть болезни, сцепленные с X-хромосомой (гемофилия, миопатия Дюшенна) и при близкородственных браках.

Если гетерозиготность установлена на основании генеалогического анализа, можно использовать клинические и биохимические методы. Так, повышенный уровень креатинфосфокиназы в сыворотке крови матери или сестер больного псевдогипертрофической миопатии Дюшенна указывает на гетерозиготность по гену миопатии. Уменьшение в сыворотке крови матери или сестер больного гемофилией уровня антигемофильного глобулина может быть доказательством гетерозиготного носительства гена

гемофилии. Следует обратить внимание на маленькие клинические признаки основного заболевания у носителя патологического гена. Так, женщины, гетерозиготные по гену миопатии Дюшенна, часто жалуются на слабость в ногах и быструю утомляемость.

В последнее время гетерозиготных носителей некоторых наследственных болезней можно выявить ДНК-диагностикой.

5.5. Пренатальная диагностика

Пренатальная диагностика (ПД) – сравнительно новое направление медицинской генетики, возникшее 20 лет назад на стыке клинической медицины и таких фундаментальных наук как генетика, молекулярная биология, биохимия, цитогенетика. Ее основной задачей является разработка комплекса приемов, позволяющих объективно оценить состояние плода человека уже в ранних стадиях развития и организовать рациональную профилактику рождения детей с тяжелыми некорректируемыми пороками наследственной или экзогенной природы.

Более 40% спонтанных аборт и около 70% случаев мертворождений связаны с хромосомными aberrациями (ХА), которые проявляются различными аномалиями развития у носителей: умственной и физической отсталостью, нарушениями полового развития, множественными врожденными пороками развития (МВПР). Популяционная частота хромосомных aberrаций среди новорожденных составляет 0,6 – 0,8%, а у новорожденных с МВПР она возрастает до 40% (В.С.Баранов с соавт., 1997). Лечение большинства таких пациентов пока малоэффективно, а прогноз весьма неблагоприятен.

Поэтому в современных условиях интенсивно развиваются методы дородовой диагностики ХА, а их использование в практическом здравоохранении позволяет предупредить рождение детей с тяжелой патологией. Вопрос о проведении пренатальной диагностики должен ставиться только лишь после оценки следующих критериев:

- Болезнь должна быть достаточно тяжелой, чтобы было

- оправдано прерывание беременности.
- Лечение болезни плода невозможно и неудовлетворительно.
 - Консультирующаяся семья должна быть согласна на прерывание беременности.
 - Существует точный тест для постановки пренатального диагноза.
 - Достаточно высокий генетический риск неблагоприятного исхода беременности.
- При организации и развитии системы пренатальной диагностики должны выполняться следующие условия (Н.П.Бочков,1997):
- Диагностические процедуры должны быть безопасны для здоровья матери и плода.
 - Частота осложнений беременности после пренатальной диагностики не должна заметно повышаться со спонтанным уровнем, т.е. процедура не должна повышать вероятность потери плода сразу после ее проведения или в отдаленный период.
 - Врачи, владеющие техникой пренатальной диагностики, должны знать вероятность постановки ложноположительных и ложноотрицательных диагнозов или, другими словами, должны хорошо знать ограничения метода.

Пренатальная диагностика должна включать два этапа:

Первый этап – выявление женщин (точнее семей) с повышенным риском неблагоприятного в генетическом плане исхода беременности при медико-генетическом консультировании или первичном обследовании всех беременных, в том числе с использованием методов просеивающей диагностики.

Второй этап – собственно пренатальная диагностика. Анализы проводятся только у тех женщин, которые обладают фактором риска.

Группа специалистов по пренатальной диагностике (акушер-гинеколог, врач-генетик, врач-лаборант-генетик)

должны знать диагностические ограничения метода не вообще, а в их собственной лаборатории.

Группа специалистов должна строго соблюдать стандарты для процедур и лабораторных анализов, осуществлять текущий контроль качества работы, а также иметь статистику исходов беременностей и расхождений диагнозов (контроль после абортов или после рождения). В табл. 21 представлены основные методы пренатальной диагностики.

Таблица 21
Методы пренатальной диагностики

Методы (группа)	Вид метода	Сроки проведения (триместр беременности)
Просеивающие	Медико-генетическое консультирование	До и во время беременности
	Определение уровня АФП в сыворотке крови беременной	2
	Хорионический гонадотропин	2
	Неконъюгированный эстриол	2
	Ацетилхолинэстераза	2
Неинвазивные	Врожденные нарушения метаболизма	2
	УЗИ	1, 2, 3
Инвазивные	Биопсия хориона	1
	-трансервикальная щипцовая	
	-трансервикальная с помощью катетера	
	-трансервикальная щипцовая под оптическим контролем	
	-трансабдоминальная аспирация иглой	2,3
	Биопсия плаценты (трансабдоминальная аспирация иглой)	
	Амниоцентез	
Кордоцентез	2,3	
Фетоскопия	2,3	
Фетоамниография	2,3	
Биопсия тканей плода (кожа, мышцы, печень, почки, опухоли и др.)	2,3	

5.5.1. Показания для пренатальной диагностики

- Возраст матери определен в 35 лет.
- Наличие в семье предыдущего ребенка с хромосомной

патологией, в том числе с синдромом Дауна (предшествующий анеусомик).

- Перестройки родительских хромосом.
- Наличие в семье заболеваний, наследуемых сцеплено с полом.
- Синдром fragile X-хромосомы.
- Гемоглобинопатии.
- Врожденные ошибки метаболизма.
- Различные наследственные заболевания, диагностируемые методом сцепления с ДНК-маркерами.
- Дефекта нервной трубки.
- Другие показания для цитогенетической пренатальной диагностики.

Одним из наиболее частых поводов для обращения за медико-генетической консультацией в клинику акушерства и гинекологии является возраст беременной старше 35 лет как у нас, так и за рубежом. В результате большей осведомленности акушеров-гинекологов о повышенном риске наследственной патологии у плодов «возрастных» женщин, наметилась четкая тенденция раннего (в I триместре) направления «возрастных» беременных на консультацию к генетику для определения прогноза для потомства и целесообразности инвазивной пренатальной диагностики.

Спектр наследственных заболеваний, с которыми семьи обращаются за консультацией в клинику акушерства и гинекологии, весьма разнообразен. Это синдромы: Шерешевского-Тернера, Дауна, ихтиоз, Элерси-Данго, микроцефалия, полидактилия, трисомия X, фенилкетонурия.

Мультифакториальные заболевания: врожденный вывих бедра, врожденный сколиоз, пороки развития половой системы, расщелина губы и неба, склеродермия, гипотиреоз, эпилепсия, болезнь Аддисона, гипертоническая болезнь, сахарный диабет, псориаз, лимфогранулематоз, острый лейкоз, тугоухость.

У женщин с наследственными заболеваниями течение беременности и родов нередко осложнено, так как в этот период меняются клинические проявления многих наследственных заболеваний, чаще в худшую сторону. В таких случаях нередко

нарушается процесс вынашивания беременности и развития плода.

Значительную долю больных гинекологической клиники составляют пациентки с нарушениями менструальной и генеративной функций. Участие хромосомных и генных мутаций в генезе значительной части заболеваний несомненно. Выявление наследственного генеза нарушения репродуктивной системы позволяет оптимально проводить их коррекцию, а в ряде случаев прекратить безуспешную борьбу с бесплодием и сохранить здоровье женщины.

5.5.2. Неинвазивные методы пренатальной диагностики

Ведущим неинвазивным методом является ультразвуковое сканирование, позволяющее выявить до 80% всех врожденных пороков развития (ВПР).

УЗИ предназначено главным образом для выявления врожденных пороков развития (табл. 22). Оптимальные сроки проведения УЗИ (лучше 2 раза) – 17–23-я неделя. УЗИ используется для выявления задержки роста эмбриона или плода, начиная с 6–8 недели беременности. УЗИ может применяться и как просеивающий, и как уточняющий метод.

Для проведения детального повторного УЗИ, как уточняющей диагностической процедуры, выделяют следующие показания:

1. Повышенное содержание АФП в сыворотке крови на 16–18 неделе беременности.
2. Неблагополучное протекание беременности, задержка развития плода.
3. Рождение предыдущего ребенка с врожденными пороками развития.
4. Наличие врожденных пороков развития у кого-либо из супругов (или родственников 1–3 степени родства по линиям обоих супругов).
5. Наличие болезней (диабет, эпилепсия, алкоголизм и др.) у женщин, повышающих риск рождения ребенка с врожденными пороками развития.

6. Воздействие тератогенного фактора (радиация, химические вещества, вирусные инфекции) в первые 10 недель беременности.

Таблица 22

Врожденные пороки развития, диагностируемые с помощью УЗИ

Система или орган	Порок
ЦНС	Анэнцефалия, спинномозговая грыжа, энцефалоцеле
Конечности	Редукционные пороки, тяжелые формы карликовости с укорочением конечностей, тяжелый несовершенный остеогенез
Сердце	Тяжелый порок сердца
Почки	Агенезия почек, поликистоз почек
Желудочно-кишечный тракт	Атрезия 12-перстной кишки, дефекты передней брюшной стенки

С помощью тщательно проведенного рутинного УЗИ в 20 недель беременности можно выявить до 20% хромосомных нарушений и около 40% трисомий по хромосоме 21. При синдроме Дауна у плода часто обнаруживаются утолщенная (более 5 мм) шейная складка, внутриутробная задержка развития, умеренный гидронефроз, укорочение бедренных костей, гипер-эхогенный кишечник и пороки сердца (Р.Свайдерс, К.Николаидес, 1997). Комбинация эхографических отклонений с задержкой внутриутробного развития плода и аномальным количеством околоплодных вод свидетельствует о наличии хромосомной патологии с вероятностью до 82,4%.

Увеличение воротникового пространства (3 мм и более) при сроке беременности от 10 до 14 недель является общим фенотипическим проявлением трисомий, синдрома Шерешевского-Тернера и триплоидии; увеличение воротникового пространства наблюдается только у 5% плодов с нормальным кариотипом.

Развитие неинвазивных методов ПД привело к выработке концепции о значительной эффективности последовательного

и комбинированного пренатального скрининга хромосомных заболеваний.

Но пока хромосомные болезни не подлежат скринингу, ибо хромосомные дефекты неустраимы, а возможность коррекции, то есть моделирования нормального фенотипа с помощью диеты или гормонов – это главное условие ВОЗ для введения скрининг-программ на наследственные и врожденные болезни. Однако методы молекулярной цитогенетики станут незаменимы для пренатальной диагностики риска рождения ребенка с умственной отсталостью.

Если хромосомные аномалии исключены как причина задержки нервно психического развития ребенка, необходимо независимо от возраста провести обследование на нераспознанную фенилкетонурию и врожденный гипотиреоз. При этом в условиях детских поликлиник не следует игнорировать и простейшую пробу Феллинга на выявление фенилкетонурии (качественная реакция мочи с треххлористым железом).

5.5.3. Просеивающие методы. Скрининг-программы

В детском возрасте проявляется подавляющее большинство *наследственных болезней обмена веществ и энергии*. Известный каталог V. McKusick «Менделевское наследование у человека» включает более 4000 наследуемых признаков, из них около 1500 серьезных наследственных болезней и синдромов и около 1000 ферментопатий. Это «ошибки» генетической программы развития (или «ошибки природы»), для распознавания которых требуются самые современные диагностические и аналитические технологии (современная ультразвуковая аппаратура, ЯМР – томография, газовая хроматография-масс-спектрометрия, или тандемная масс-спектрометрия, молекулярно-генетические методы и др.).

Скрининг – программы (от англ. *to screen* - просеивать) направлены на выявление при массовых обследованиях детей скрытых заболеваний. Чаще всего речь идет о наследственных или врожденных болезнях, признаки которых отсутствуют у

новорожденных, но в дальнейшем приводят детей к инвалидизации. Ниже представлены основные требования к скрининг - программам в соответствии с рекомендациями ВОЗ.

1.Обследование на выявление заболевания у ребенка, которое развивается постепенно и в манифестной фазе приводит к инвалидности; при этом имеются проверенные методы предупреждения формирования патологического фенотипа.

2.Тип наследования болезни и ее патогенез должны быть четко установлены, а для семьи – доступна медико-генетическая консультация.

3.Методы скрининга, подтверждения диагноза и превентивного лечения должны быть доступны для практического здравоохранения.

4.Ложноположительные результаты методов скрининга должны быть редкими, ложноотрицательные - исключены.

5.Стоимость программ не должна превышать расходов на содержание и лечение детей, ставших инвалидами из-за данного заболевания.

6.Права семьи и самого ребенка, у которого по данным скрининга обнаружено наследственное (врожденное) заболевание, должны быть защищены (полная информация родителей о скрининг-программе, право на отказ от включения их новорожденного в число обследуемых, конфиденциальность при подтверждении диагноза – сохранение врачебной тайны).

5.5.4. Скрининг на фенилкетонурию

Скрининг новорожденных на фенилкетонурию введен во всех развитых странах мира, так как без обследования в доклинической стадии и при отсутствии диетической коррекции у ребенка развивается умственная отсталость. Концентрация фенилаланина определяется непосредственно в образце капиллярной крови, взятой из прокола кожи пятки новорожденного на фильтровальную бумагу – карту Гатри, методом Гатри (рост колоний *B.subtilis* в среде в присутствии крови ребенка и ингибитора роста микробов 2-тиенилаланина). В последние годы отдается предпочтение флюорометрическому методу.

При положительном результате скрининг-теста ребенок направляется на дополнительное обследование – определение концентрации фенилаланина, тирозина в венозной крови на аминоканализаторе (или другими методами) и для окончательного решения вопроса о переводе его на диету с ограниченным содержанием фенилаланина (белковые гидролизаты типа «Минафен», «Лофеналак» и др.).

Хотя ген фенилаланин-гидроксилазы клонирован, методы молекулярной диагностики пока не получили распространения вследствие множественности вариантов мутаций данного гена. Исследование полиморфизма длин рестрикционных фрагментов ДНК используется в пренатальной диагностике данного заболевания, но метод малодоступен для практических лабораторий.

Следует подчеркнуть, что в условиях практической педиатрии не следует отказываться от постановки простейшей пробы Феллинга с треххлористым железом на первом году жизни, если независимо от возраста у ребенка появляются признаки задержки нервно-психического развития.

5.5.5. Скрининг на врожденный гипотиреоз

В подавляющем большинстве случаев скрининг на врожденный гипотиреоз позволяет выявить редкие случаи гипоплазии, дистопии или аплазии щитовидной железы как пороки ее развития (их частота 1 на 3500 новорожденных). Наследственные нарушения биосинтеза тиреоидных гормонов как причина врожденного гипотиреоза (синдром Пендреда и др.) крайне редки, хотя методы скрининга позволяют выявлять и эти заболевания.

Скрининг-тест на врожденный гипотиреоз проводится путем исследования крови, взятой на карту Гатри одновременно со взятием капиллярной крови для определения и содержания фенилаланина. В образце крови определяют активность тиреотропного гормона гипофиза (ТТГ), которая повышается при гипотиреозе. Определение проводится радиоиммунологическим методом. Тест считается положительным,

если активность ТТГ превышает пороговое значение 20 мЕД/мл (*Abbott IMs-analyzer*). Положительный результат требует повторного исследования крови на активность ТТГ. Если при повторном исследовании крови, взятой на бумагу, получены значения в пределах 50 мЕД/мл, ожидают результатов полного обследования, лечение не назначается, при более высоких значениях заместительная терапия начинается уже на этом этапе подтверждения диагноза. Полное обследование ребенка включает определение уровня ТТГ, тироксина (T_4), трийодтиронина (T_3), в плазме крови и окончательно подтверждает необходимость назначения заместительной терапии *L*- тироксином.

5.5.6. Скрининг на муковисцидоз

Отдельного рассмотрения требует скрининг на муковисцидоз в связи с достаточно высокой распространенностью этого наследственного заболевания.

Муковисцидоз – ранее именовавшийся как кистозный фиброз поджелудочной железы – аутосомно-рецессивное заболевание, крайне редко проявляющееся в период новорожденности (мекониальный илеус). В грудном и раннем возрасте характеризуется развитием повторных, рецидивирующих пневмоний, переходящих позднее в хроническую пневмонию, а также синдрома нарушенного кишечного всасывания и гипотрофии. Частота муковисцидоза в европейской популяции относительно высока (1-на 1700 – 3000 новорожденных, в Украине значительно ниже, так как скрининг не проводится), частота гетерозиготного носительства составляет 4-5% населения. Однако окончательного решения о необходимости введения массового скрининга на это заболевание на международном уровне пока не принято. Возражение противников скрининга состоит в том, что отсутствуют методы патогенетически обоснованной превентивной терапии данного заболевания. С этим можно согласиться лишь частично; ранняя диагностика и превентивная терапия микробных инфекций, назначение панкреатина и его

аналогов позволили значительно увеличить длительность жизни больных: проблема вышла за рамки педиатрической и приобрела характер общемедицинский, так как значительный процент среди больных теперь составляют взрослые.

Ген муковисцидоза *CFTR* (локализован на хромосоме 7q31) контролирует синтез мембранного клеточного белка - регулятора мембранного ионного транспорта. Этот ген клонирован, установлены его мутантные локусы при муковисцидозе, причем в европейской популяции доминирует мутация дельта – *F-508*, хотя известно несколько сотен других точковых мутаций.

Патогенетический маркер муковисцидоза – повышенное содержание хлорида в поте больных (содержание хлора более 60 ммоль/л), причем нередко матери больных детей сообщают о необычно соленом вкусе пота ребенка. До выяснения природы генной мутации исследование хлоридов пота (после пилокарпинового электрофореза) было единственным диагностическим признаком болезни.

Другим маркером муковисцидоза считалось повышенное содержание альбумина в меконии, что послужило основанием для разработки мекониального скрининг-теста на альбумин (цветная реакция с красителем, или *BM*-тест), но частота ложноположительных результатов исследования оказалось весьма значительная, и от этого метода пришлось отказаться.

Значительно меньше число ложноположительных результатов дает тест на иммунореактивный трипсин в крови ребенка, взятой на карту Гатри. Этот метод стал основным скрининг-тестом в Европе и США.

Метод молекулярной диагностики – полимеразной цепной реакции с зондом дельта – *F-508* позволяет подтвердить наличие муковисцидоза примерно у 60% больных, у остальных имеются мутации в других локусах. Несмотря на это, молекулярно-генетическую диагностику целесообразно проводить у всех детей, у которых выявлен высокий уровень иммунореактивного трипсина в крови. В этом случае возможны следующие комбинации данных:

А. Положительны результаты потовой пробы на хлориды и идентифицирован ген дельта – *F-508*. Диагноз – муковисцидоз.

Б. Потовая проба на хлориды повторно отрицательна, но ген дельта – *F-508* обнаружен. Диагноз – гетерозиготность по гену муковисцидоза.

В. Уровень иммунореактивного трипсина в крови высокий, потовая проба повторно положительна, но ген дельта – *F-508* не идентифицирован. Диагноз – муковисцидоз, обусловленный другими мутациями гена *CFTR*.

Опыт проведения выборочных скрининговых программ показал, что контролируемая антибиотикотерапия микробно-воспалительных заболеваний легких при муковисцидозе, а также ферментотерапия и диетотерапия значительно улучшают отдаленный прогноз заболевания, поэтому введение скрининг-программы массового обследования новорожденных следует считать вполне обоснованным. Для этого может быть применена следующая последовательность: определение активности иммунореактивного трипсина в крови, содержание хлорида в поте и, по возможности, ДНК-диагностика.

5.5.7. Скрининг на органические ацидемии (ацидурии)

Органические ацидемии (ацидурии) – большая группа наследственных болезней обмена веществ и биоэнергетики, среди которых наиболее часто встречаются метилмалоновая, пропионовая, глутаровая, метилглутаконовая и многие другие ацидемии. У новорожденных их общим проявлением служит состояние метаболического нейродистресс-синдрома, гипогликемии, кетоацидоза с частыми летальными исходами. У выживших детей отмечаются задержка нервно-психического развития, неврологические симптомы. Наблюдаются и поздние формы патологии с постепенным развитием энцефалопатий, миопатий, глухоты, нарушение зрения. Суммарная частота органических ацидемий достаточно высока – 1 на 1000 новых новорожденных. Для многих из этих заболеваний разработаны методы превентивной диетотерапии, витаминотерапии, антиоксидантной терапии, что обосновывает целесообразность

введения массового скрининга новорожденных. Однако до настоящего времени нет универсального практически доступного метода, который можно было бы применить для целей скрининга новорожденных. Рекомендации использовать в качестве скрининг-метода хромато-масс-спектрометрический анализ органических кислот крови, взятой у ребенка на фильтровальную бумагу, пока представляются нереальными. Также едва ли осуществимо предложение применить для целей скрининга метод протонной ЯМР – спектроскопии крови для обнаружения органических кислот.

5.5.8. Скрининг на дефицит α_1 -антитрипсина

Дефицит α_1 -антитрипсина обнаруживается у детей с частотой 1:2000-1:5000, однако его значение для патологии детского возраста не совсем ясно, α_1 -антитрипсин – основной ингибитор протеолитических ферментов, прежде всего лейкоцитарной эластазы. Первоначально дефицит α_1 -антитрипсина был выявлен у взрослых, страдающих хроническими обструктивными заболеваниями легких, однако у детей, страдающих хроническими бронхолегочными заболеваниями, его обнаруживают крайне редко.

Более характерными проявлениями недостаточности α_1 -антитрипсина в детском возрасте служат неонатальный холестаз, необъяснимое увеличение размеров печени, хронический гепатит с развитием цирроза печени. Фенотипы полиморфных вариантов и дефицит α_1 -антитрипсина (фенотип *Pi ZZ*) выявляются методом малодоступного иммуно-электрофореза, поэтому обследованию подлежат дети из семей высокого риска по хроническим заболеваниям печени и легких (селективный скрининг).

5.5.9. Скрининг на другие наследственные болезни обмена веществ

Предложены методы и в отдельных странах проводятся скрининг-обследования новорожденных на галактоземию,

адреногенитальный синдром, ферментопатии цикла Кребса-Гензелейта (нарушения связывания токсичного аммиака в молекулу мочевины), недостаточность биотинидазы. Однако эта наследственная патология обмена встречается редко, поэтому ее включение в скрининг-программы пока недостаточно обосновано. Не имеется достаточных оснований для введения массового скрининга новорожденных на гомоцистинурию, хотя такие предложения существуют.

В Японии, ФРГ, Австрии проводится массовый скрининг на 8 наследственных болезней, а также на органические ацидопатии, галактоземию, гомоцистинурию, дефицит биотинидазы. Вводится обязательный скрининг грудных детей на нейробластому (исследование содержания ванилилминдальной и гомованилиновой кислот в моче грудных детей). Однако перечисленные заболевания встречаются редко, и пока введение массовых скрининг-программ на эти болезни у нас не совсем обосновано.

В странах Средиземноморского региона и в США осуществляется скрининг новорожденных на гемоглобинопатии – талассемии и серповидно-клеточную анемию. В Украине нет такой необходимости, хотя в клиниках отдельные больные могут выявляться.

Соответствующими приказами Министерства здравоохранения Украины введен массовый скрининг новорожденных на 2 заболевания – фенилкетонурию и врожденный гипотиреоз, однако пока нельзя говорить о полном охвате методами скрининга всех рождающихся детей.

5.5.10. Скрининг на другие скрытые заболевания

Скрининг на целиакию (кишечный инфантилизм).

Обсуждается целесообразность введения скрининга на целиакию, частота которой в европейских странах достаточно высока – 1 на 3000 детей. Надежность диагностики повысилась в связи с тем, что разработана микротехнология определения

антиглиадиновых и антиэндомиозиальных антител в крови (эндомиозиум – соединительнотканная прослойка под эпителием кишечника). Кроме того, существует достаточно эффективная методика лечения целиакии – исключение злаковых продуктов из диеты ребенка.

5.5.11. Скрининг на гиперхолестеринемию

Предлагалось проведение массового скрининга школьников на выявление гиперхолестеринемии с целью профилактики ранних форм ишемической болезни сердца, раннего атеросклероза, гипертонической болезни. Пока такой скрининг считается неоправданным по нескольким соображениям:

гиперхолестеринемия, выявленная при первичном обследовании, у многих детей не обнаруживается при повторном обследовании;

информация о наличии гиперхолестеринемии у ребенка часто представляет собой психологический стресс как для обследуемого, так и для родителей;

пока не доказано, что перевод детей с гиперхолестеринемией на диету с низким содержанием холестерина эффективно предупреждает ранние формы ишемической болезни сердца и эссенциальную гипертонию.

5.5.12. Скрининг анеуплоидий у плода

Одной из наиболее современных и информативных скрининговых программ является интегрированный тест (ИТ), разработанный N. J. Wald в 1999 г. и успешно используемый сегодня в различных европейских клиниках.

Основная цель проведения интегрированного теста – выявление группы женщин с высоким риском рождения ребенка с синдромом Дауна (СД), а также открытыми дефектами нервной трубки.

ИТ проводится в два этапа и является сочетанием комбинированного и тройного (четвертного) теста.

Известно, что концентрация сывороточных маркеров изменяется как со сроком беременности, так и при подозрении на хромосомные аномалии.

Первый этап ИТ включает в себя определение уровня PAPP-A (связанного с беременностью плацентарного белка) в крови женщины и измерения толщины воротникового пространства у эмбриона. Уровни PAPP-A в первом триместре беременности имеют тенденцию к снижению у женщин с риском рождения ребенка с СД. Толщина воротникового пространства (ТВП) у плода в первом триместре в норме не превышает 30 мм. С увеличением ТВП возрастает частота выявления хромосомных аномалий.

Идеальный срок для выполнения первого этапа ИТ – 12 недель беременности, однако, возможно выполнение теста в 10–13 нед (срок гестации определяется от первых суток последней менструации). В том случае, если имеются данные ультразвукового исследования, произведенного ранее, в определении срока беременности можно ориентироваться на значения КТР (копчикотеменной разрез плода). Первый этап считается выполненным, когда соблюдены следующие условия:

- произведено ультразвуковое исследование с измерением КТР и толщины воротникового пространства эмбриона (измерение последнего целесообразно при КТР 45-84 мм);
- определен уровень PAPP-A;

Второй этап ИТ включает в себя определение уровня AFP (альфа-фетопротеина), и E₃ (несвязанного эстриола) и β -hCG (свободной бета-субъединицы хорионического гонадотропина человека) в крови женщины. Возможно дополнительное определение Inhibin-A (ингибина-A). Проводится второй этап обследования в сроке 15–16 нед беременности (возможно его проведение до 22 нед).

Концентрация α -фетопротеина и несвязанного эстриола уменьшается, а уровень хорионического гонадотропина имеет тенденцию к повышению при СД.

5.6. Инвазивные методы исследования в пренатальной диагностике врожденных пороков развития и наследственных заболеваний

Инвазивная ПД обоснована и целесообразна только тогда, когда риск рождения больного ребенка выше риска осложнений после применения хирургических манипуляций, предназначенных для получения плодового материала (хорионбиопсия, амниоцентез и кордоцентез), табл. 23, 24.

Наиболее низкий уровень перинатальных потерь отмечается после амниоцентеза, который выполняется обычно на 16–20 неделе беременности, поскольку до этого срока в околоплодных водах присутствуют лишь единичные фибробласты плода. Частота спонтанных абортос после амниоцентеза составляет 1,7%.

Хорион- и плацентобиопсия применяется для получения небольших кусочков ворсин хориона или кусочков плаценты в период с 7-ой по 16-ю неделю беременности. Процедура осуществляется трансабдоминально или трансцервикально под контролем УЗИ. После трансцервикальной хорионбиопсии примерно у 10% женщин отмечается небольшое кровотечение, очень редко маточная инфекция, после трансабдоминального соскоба сокращения мускулатуры матки отмечаются у 2–5% женщин. Трансцервикальный метод имеет больше противопоказаний, обусловленных клиническими условиями и анатомическими особенностями. Одним из осложнений хорионбиопсии является спонтанный аборт (выкидыш). Общие потери плода после хорионбиопсии составляют в среднем 2,5–3%. Отмечено, что ранняя хорионбиопсия (в срок до 8 нед. беременности) может индуцировать поперечные врожденные ампутации конечностей, так называемые редукционные пороки. В связи с этим хорионбиопсию рекомендуется проводить после 8 недели беременности, а после 11 недели – плацентобиопсию. Образцы хориона (ворсины) подлежат лабораторной (цитогенетической, молекулярно-генетической, биохимической) диагностике наследственных болезней. Считается, что в 4% случаев лабораторная диагностика биоптатов хориона

дает ложноположительные результаты, а иногда ложноотрицательные. Точность анализов во многом зависит от квалификации врача-лаборанта-генетика.

Таблица 23

Показания для различных методов инвазивной пренатальной диагностики

Метод (материал)	Показания
Цитогенетическое исследование (клетки хориона, культивированные амниотические клетки или лимфоциты плода)	Возраст женщины к моменту родов 35 лет и более; наличие хромосомной мутации у одного из родителей; рождение предыдущего ребенка с хромосомной болезнью; низкий уровень АФП в сыворотке крови беременной; результаты УЗИ, предполагающие хромосомную болезнь плода.
Молекулярно-генетическое, биохимическое или иммунологическое исследование (хорион, амниотические клетки, кровь)	Высокий риск рождения ребенка с генной болезнью по результатам медико-генетического консультирования (ретро- или проспективного) или просеивающих программ выявления гетерозиготного носительства; диагностика инфекции плода, иммунодефицитов, иммунологической несовместимости матери и плода.
Патоморфологическое исследование (кожа и мышцы плода)	Высокий риск рождения ребенка с наследственным заболеванием кожи (ихтиозы, эпидермолизы), с мышечной дистрофией Дюшенна.
Фетоскопия	Уточнение диагноза врожденных пороков развития

Амниоцентез применяется с целью проведения хромосомного анализа, определения пола ребенка. Амниоцентез желательно проводить в максимально ранние сроки беременности, чтобы была возможность ее безопасного прерывания. Так как время культивирования клеток с момента проведения пункции составляет 2–3 недели для хромосомных, 4 недели для биохимических исследований. Необходимо учесть динамику накопления амниотической жидкости: 180мл – 16 недель; 220мл – 17 недель; 360 мл – 18 недель. Увеличение срока беременности сопровождается увеличением количества клеток в амниотической жидкости с одновременным снижением их жизнедеятельности. Оптимальное соотношение количества и жизнеспособности клеток достигается в 16 недель гестации. Датские ученые выявили связь между амниоцентезом и

возрастающим риском развития респираторного дистресс-синдрома и пневмонии у новорожденных. Тем не менее в Израиле, Канаде, Франции, Англии и во многих других странах амниоцентез в течение последних десятилетий остается основным методом получения клеток плода для последующего кариотипирования (Линдина Л.И. с соавт., 1997; Горин В.С. с соавт., 2001).

Амниоцентез, или прокол плодного пузыря, с целью получения околоплодной жидкости и находящихся в ней слущенных клеток амниона плода. Диагностическая значимость метода не вызывает сомнений. Эта процедура осуществляется на 15–18 неделе беременности. Амниоцентез делают чресбрюшинно под контролем УЗИ, чтобы не повредить плаценту. Также возможен чрезвлагалищный амниоцентез, но такой подход применяется редко. Из амниотической полости извлекают 8–10 мл жидкости. Из биохимических показателей жидкости только концентрация альфа-фетопroteина (АФП) является диагностически значимой. Уровень АФП существенно повышается при аномалиях нервной трубки и дефектах передней брюшной стенки. Основным источником диагностического материала при амниоцентезе являются клетки. Их обязательно культивируют (на это затрачивается 2–4 недели) и для цитогенетических, и для биохимических исследований. Только молекулярно-генетические варианты диагностики с помощью полимеразной цепной реакции не требуют культивирования клеток.

Фетоскопия (введение зонда и осмотр плода)- метод визуального обследования плода для выявления врожденных пороков развития используется редко – только при особых показаниях. Под контролем ультразвукографии через переднюю брюшную стенку беременной в амниотическую полость вводится фетоскоп с фиброоптическим источником света, системой линз и операционным каналом. Метод позволяет провести непосредственный осмотр и оценку состояния плода, произвести биопсию кожи плода, получить образцы крови с сосудов пуповины. Оптимальные сроки оценки анатомической структуры плода 15–18 недель гестации, т.к. именно в эти сроки ликвор чрезвычайно прозрачный, а относительно небольшие

размеры плода облегчают ориентацию. Дело в том, что почти все врожденные пороки развития, которые можно увидеть с помощью оптического зонда, диагностируются с помощью УЗИ. Понятно, что процедура УЗИ проще и безопаснее. Для фетоскопии требуется вхождение зонда в амниотическую полость, что может вызвать осложнение беременности. Выкидыши отмечаются в 7–8% случаев фетоскопии. В 5% случаев возникают кровотечения, инфицирование, излитие околоплодных вод.

Таблица 24

Общая схема пренатально-диагностического обследования беременных с целью оценки развития плода

Вид исследования	Цель исследования
Первый этап	
1. Ультразвуковое обследование беременных. Осуществляется во всех женских консультациях и кабинетах. Оптимальный срок 10-14 нед.	Установление срока и характера течения беременности. Обязательная оценка толщины воротникового пространства, состояния хориона. Формирование групп риска по хромосомной патологии и врожденным порокам развития у плода.
2. Биопсия хориона по показаниям. Осуществляется в МГК или МГЦ. Срок 8–12 нед.	Цитогенетическая диагностика хромосомной патологии, диагностика отдельных форм моногенных болезней методами биохимического или ДНК-анализа по клеткам плода
Второй этап	
1. Ультразвуковое обследование. Осуществляется во всех женских консультациях или кабинетах. Срок 20–24 нед.	Оценка анатомии плода с целью выявления врожденных пороков развития, маркеров хромосомных болезней, ранних форм задержки развития плода, патологии плаценты, аномального количества вод.
2. Исследование крови матери на α -фетопротеин, хорионический гонадотропин и другие маркеры. Срок 16–20 нед. Осуществляются взятие крови в женских консультациях, анализ в региональных лабораториях (ИФА).	Формирование групп риска по рождению детей с врожденными пороками развития и хромосомными болезнями
3. Инвазивная диагностика в группах риска (плацентоцентез, кордоцентез, амниоцентез). Осуществляется в МГК или МГЦ.	Цитогенетическая диагностика хромосомной патологии, диагностика моногенного заболевания методом биохимического или ДНК-анализа
Третий этап	
1. Ультразвуковое обследование. Осуществляется во всех женских консультациях. Срок 32–34 нед.	Оценка темпов развития плода. Выявление врожденных пороков развития с поздним проявлением

Кордоцентез, то есть взятие крови из пуповины стало использоваться шире после того, как эту процедуру стали осуществлять под контролем УЗИ, т.е. без фетоскопии. Процедуру проводят в срок с 18 по 22-ю неделю беременности. Образцы крови являются объектом для цитогенетических (культивируются лимфоциты), молекулярно-генетических и биохимических методов диагностики наследственных болезней.

Кордоцентез используют для диагностики хромосомных болезней, гематологических наследственных болезней (гемоглобинопатии, коагулопатии, тромбоцитопении), иммунодефицитов, гематологического статуса при резус-сенсбилизации, внутриутробных инфекций. Процедура с первой попытки успешна в 80–97% случаев. Преимущество кордоцентеза по сравнению с амниоцентезом заключается в том, что кровь является более удобным объектом для исследования, чем клетки амниотической жидкости. Лимфоциты культивируются быстрее (2–3 дня) и надежнее, чем амниоциты.

Кордоцентез вызывает осложнения в среднем в 3,2–6,5% случаев (Баранов В.С. с соавт., 1997). Частота фетальных потерь в течение 2 недель от момента его выполнения зависит от того, по каким показаниям он проводился, и составляет 1, 7 и 14% соответственно при нормальном развитии плода, структурных аномалиях и задержке развития плода. Кроме того, риск перинатальной смерти после кордоцентеза во многом зависит от квалификации и опыта хирурга.

5.7. Алгоритм пренатального мониторинга

В последние годы изыскиваются новые подходы к диагностике ВПР и ХА на более ранних сроках беременности. Хотя большинство анеуплоидных эмбрионов ассоциируется с нарушенной беременностью, значительное количество бессимптомных случаев пролонгирования беременности плодами с ХА побуждает к проведению пренатального скрининга уже в I триместре.

Одним из относительно новых и универсальных

эхографических маркеров хромосомных аномалий у плода в конце I и в начале II триместра беременности является расширение воротникового пространства /ВП/, которое расценивается как высоко информативный и чувствительный УЗ признак наследственной и врожденной патологии.

Первые работы, в которых авторы описывали этот эхографический признак, появились в 1992г., а с 1994 г. опубликовано уже несколько сотен исследований, посвященных изучению этого маркера. В англоязычной медицинской литературе наибольшее распространение получил термин «nuchal translucency» («воротниковая прозрачность»), который был предложен К.Nicolaides в 1994г. на IV Всемирном конгрессе по ультразвуковой диагностике в акушерстве и гинекологии в качестве унифицированного единого наименования этого признака. В отдельных работах встречались такие обозначения, как nuchal fold («воротниковая складка») и nuchal oedema («воротниковый отек»). В русскоязычной литературе наибольшее распространение получил термин «воротниковое пространство» (дословный перевод — «воротниковая прозрачность» не совсем точно отражает сущность этого эхо-признака). В украинской литературе используется дефиниция «комірцевий простір».

5.7.1. Расширение воротникового пространства: взаимосвязь с хромосомными аномалиями и врожденными пороками развития

Частота обнаружения этого эхо-маркера у плода колеблется от 0,5 до 6%. Частота выявления хромосомных aberrаций у плодов с этим признаком в срок 10–14 нед. (период, в который наиболее часто отмечается ВП) варьирует от 24 до 75% и составляет в среднем 30–40%, поэтому во многих центрах пренатальной диагностики обнаружение расширения ВП является обоснованным показанием к пренатальному кариотипированию. При толщине ВП свыше 3 мм риск хромосомной патологии у плода повышается в 23,8 раза. С увеличением толщины ВП возрастает частота обнаружения хромосомных аномалий (табл.25), в то время как при ВП

меньше 2,5 мм фактический риск трисомии у женщин 35 лет и старше ниже возрастного.

Таблица 25

Изменение риска хромосомной анеуплоидии у плода, рассчитанного на основе возраста матери, в зависимости от толщины ВП

ВП, мм	Возрастной риск трисомии (1: «х»)
< 2,5	(?) 4,5
3	(?) 3
4	(?) 18
5	(?) 28
>5,5	(?) 36

Примечание: Риск ХА у плода, обусловленный возрастом матери, при толщине ВП < 2,5 мм снижается в 4,5 раза; > 2,5 мм возрастает в 12 раз.

Было установлено, что при трисомии 21 толщина ВП в среднем составила 5,3 мм, при трисомии 18 – 6,6 мм, при моносомии X – 10,3 мм. Однако в большинстве исследований не отмечается достоверной зависимости между степенью расширения ВП и характером хромосомной аномалии.

Зависимость между толщиной воротникового пространства и частотой хромосомных аномалий отражена в табл. 26.

Таблица 26

Частота хромосомных аномалий, а также врожденных пороков сердца у плодов в зависимости от толщины ВП.

ВП	Частота хромосомных аномалий, %	Частота пороков сердца, %
3	7	9,1
4	27	71,4
5	53	71,4
6	49	100
7	83	100

Сочетание расширенного ВП с иммунобиохимическими сывороточными маркерами (integrated test)

Во второй половине 90-х годов во многих странах мира получил широкое распространение иммунобиохимический скрининг новых сывороточных маркеров хромосомных аномалий, проводимый в I триместре беременности. Наибольшую популярность получило определение экскреции PAPP-A – специфического плазменного протеина, продуцируемого трофобластом и выявляемого в сыворотке материнской крови с 28-х суток после зачатия. Постепенно его экскреция прекращается к концу I триместра. Впервые ассоциация между снижением продукции PAPP-A и трисомией 21 у плода была показана в 1991 г. В. Grambati. Снижение продукции PAPP-A (0,27–0,62 Мом – для трисомии +21; 0,17–0,32 Мом для трисомии +18) оказалось высокоспецифичным для распространенных трисомий с чувствительностью в среднем от 60 до 80%. Частота выявления эмбрионов с ХА при изолированном использовании только одного этого маркера составляет 42%. Кроме этого, низкий уровень PAPP-A ассоциирует с внематочной беременностью, пузырным заносом, угрозой спонтанного аборта и замершей беременностью. Параллельно с этим маркером еще с 1987 г. также широко определяется Бета – субъединица ХГЧ, превышение экскреции которого в среднем составляет 2,5 Мом. Этот признак также оказался характерным для беременностей трисомными плодами. В действительности в зависимости от характера трисомии или моносомии Х наблюдаются различные показатели снижения или повышения продукции указанных маркеров. Бета – субъединица хорионического гонадотропина – определяет его функциональную специфичность, представляет собой цепочку, включающую в себя 145 аминокислотных остатков.

ХГ продуцируется клетками плацентарного синцитиотрофобласта и, возможно, цитотрофобластом. Клетки синцитиотрофобласта выстилают тонким слоем поверхность ворсин хориона и находятся, таким образом, в близком контакте с материнским кровотоком. ХГ появляется в материнском кровотоке вскоре после имплантации эмбриона, его уровень повышается до 8-й недели гестации (в этот срок

можно начинать его измерение при осуществлении скринирующих программ). В норме с 8-й по 12-ю неделю беременности уровень ХГ начинает незначительно, а с 18-недели – значительно снижаться. Он зависит от массы тела беременной: чем выше она, тем ниже значение маркера. При двойне показатели повышаются в 2 раза и более.

Уровень ХГ может повышаться также и при различных осложнениях беременности: гипертонической болезни, угрозе прерывания, гипотрофии плода, патологии плаценты, HELLP-синдроме (гемолиз, тромбоцитопения, повышение уровня ферментов печени). Понижение концентрации ХГ может отмечаться при угрозе антенатальной гибели плода.

Помимо этих маркеров, а также АФП и неконъюгированного эстриола, исследуемых не только во II триместре беременности, в некоторых странах определяют ингибин А – маркер гранулезоклеточных опухолей яичника, который также применяется для ранней прееклинической диагностики преэклампсии и оценки успешности оплодотворения по технологии ЭКО. Ингибин В – маркер функции клеток Сертолли у мужчин, а у женщин позволяет сделать прогностическую овуляторную оценку мелких фолликулов и зачатия. СА – 125 (канцер-антиген 125 – маркер онкопатологии), SP – 1 (специфический бета – 1-гликопротеин), также весьма чувствительны в плане обнаружения трисомии +21 на ранних сроках беременности.

Имеется уже не одна сотня публикаций об успешном применении двух, трех, а то и четырех сывороточных маркеров (трипло-, тэтра-скрининг) для выявления анеуплоидных эмбрионов в ранние сроки беременности. Благодаря этому эффективность скрининга дополнительно возрастает на 7–15%. Кроме того, десятки публикаций последних лет показали, что сочетание иммуно-биохимических маркеров с расширенным ВП у плода (integrated test) еще в большей степени повышает диагностическую точность такого подхода. Суммарная чувствительность его с индивидуальным учетом фактора возраста матери превышает 85%, а в некоторых исследованиях почти приближается к 90%.

Таким образом, расширение ВП является не только маркером хромосомных аномалий, но наблюдается и при различных врожденных пороках развития, выявление большинства которых потенциально возможно только с середины II триместра беременности. Кроме этого, расширенное ВП следует рассматривать также как фактор высокого риска перинатальных потерь. Поэтому обоснованным при расширении ВП в 10–14 нед является пренатальное кариотипирование, особенно при регистрации патологических кривых скоростей кровотока в венозном протоке плода и/или в артерии пуповины, при которых выявляемость ХА практически составляет 100%. Прогностическая точность в обнаружении ХА в большей степени возрастает (85-89%) при сочетании расширенного ВП с различными сывороточными иммуно-биохимическими маркерами. Сочетание различных морфологических, гемодинамических, иммуно-биохимических факторов значительно увеличивает вероятность ХА у плодов с расширенным ВП, которая с учетом возраста матери, приближается к 100%. Плоды с нормальным кариотипом не следует относить к группе высокого риска по врожденным порокам развития, особенно сердечно-сосудистой системы. За ними необходимо осуществлять динамическое Гэхографическое наблюдение. Пренатальный скрининг в I триместре дает неоспоримые преимущества для врачей и, в первую очередь, для пациентов, позволяя своевременно решить вопрос о прогнозе для потомства, целесообразности вынашивания или прерываний беременности.

Использование другого скринирующего теста – определения содержания α -фетопротеина в сыворотке крови беременных дает возможность выделить среди них женщин с подозрением на порок развития центральной нервной системы плода. В дальнейшем диагноз уточняется с помощью исследования α -фетопротеина в амниотической жидкости и ультразвукового метода.

Установлена также взаимосвязь снижения содержания α -фетопротеина в сыворотке крови матери и болезни Дауна у

плода. Обнаружение в сыворотке крови беременной (в 16–20 нед.) низкого уровня α -фетопротеина и эстриола в сочетании с высоким уровнем хорионического гонадотропина служит основанием для исследования кариотипа плода, позволяет провести своевременную диагностику болезни Дауна и элиминацию аномального плода.

Одновременно с выявлением женщин группы риска по рождению детей с наследственной патологией определение сывороточных маркеров (α -фетопротеин, эстриол, хорионический гонадотропин) дает возможность диагностировать ранние симптомы нарушения течения беременности. Часто эти изменения предшествуют проявлению клинических признаков патологии беременности, что позволяет своевременно проводить профилактику и лечение.

Дополнительным маркером, позволяющим формировать группы риска по рождению детей с наследственной патологией, является 17- β -гидроксипрогестерон (17-ОП) – патогенетический маркер врожденной гиперплазии коры надпочечников (адреногенитального синдрома). Повышение содержания 17-ОП в крови матери служит показанием к дальнейшему обследованию беременной (определение НЛА, амниоцентез).

Под влиянием гормонов фетоплацентарного комплекса усиливается перестройка метаболизма материнского организма, в частности изменяется углеводный обмен («диабет беременных»). В связи с этим необходима дифференциальная диагностика данного состояния с истинным диабетом (определение содержания сахара в крови).

Реактивация вирусных инфекций может приводить к определенным осложнениям беременности, но значительно более опасно для плода первичное инфицирование матери во время беременности. Выявление нарастания титров антител к вирусу краснухи, а также к вирусам цитомегалии и простого герпеса в период интенсивного органогенеза должно насторожить в отношении возможных уродств плода и даже его гибели. Кроме того, во II триместре беременности следует повторить исследования на ВИЧ, реакцию Вассермана и гонококк.

Повышение активности свертывающей системы крови происходит, как правило, со II триместра нормальной беременности и нарастает на протяжении III триместра к моменту родов, что отражает приспособление организма женщины к кровопотере во время родов. Адекватность этого приспособления оценивается по тромбозластограмме.

Основными методами контроля за состоянием плода в III триместре являются методы функциональной диагностики, в первую очередь ультразвуковое исследование и кардиотокография.

Кардиотокография – наиболее распространенный метод оценки состояния плода. Применяемые в настоящее время в клинической практике методы визуальной и балльной оценки кардиотокограмм (КТГ) позволяют выявить наличие или отсутствие нарушений состояния плода с точностью 75%. Математический анализ КТГ показал, что здоровый плод можно диагностировать в 86% наблюдений, а нарушение его состояния – в 87%. Дифференцировка различных состояний плода возможна в 75% случаев. Еще более надежные результаты получены при автоматизированном анализе КТГ, значительно повышающем точность диагностики состояния плода по сравнению с ручной обработкой.

Одной из наиболее важных задач практического акушерства остается точное определение срока беременности, что необходимо для профилактики недонашивания и перенашивания, диагностики гипотрофии, аномалий развития плода, а также для решения важных научных задач.

В I триместре беременности у пациенток с привычным невынашиванием в анамнезе целесообразно исключить волчаночный антикоагулянт или при возможности провести исследование на антитела к спектру отдельных фосфолипидов, поскольку в клинике нередко наблюдается ассоциация волчаночного антигена с нарушениями, микроциркуляции, тромбоцитопенией и повторяющейся антенатальной гибелью плода. Это состояние описано как антифосфолипидный синдром.

В I и II триместрах беременности по показаниям для

диагностики врожденных и наследственных заболеваний применяют инвазивные методы пренатальной диагностики.

Основными показаниями к инвазивной пренатальной диагностике являются структурная перестройка хромосом у одного из родителей, возраст матери старше 35 лет, рождение ранее ребенка с множественными врожденными пороками развития, пренатально диагностируемые моногенные заболевания.

Относительными показаниями следует считатьотягощенный акушерский анамнез, осложненное течение данной беременности (угроза выкидыша, многоводие, гипотрофия плода), проведение рентгенологических процедур, прием лекарственных препаратов, инфекционные заболевания во время беременности. Риск в этих ситуациях и объем пренатальной диагностики определяются индивидуально во время медико-генетического консультирования.

В настоящее время основными методами инвазивной пренатальной диагностики являются амниоцентез в I и II триместрах беременности, биопсия хориона, получение крови и кожи плода. Инвазивная пренатальная диагностика осуществляется с 7 нед. беременности. В настоящее время с помощью биопсии хориона возможна диагностика широкого спектра хромосомных и генных заболеваний.

Исследуя амниотическую жидкость, можно диагностировать хромосомную патологию у плода, болезни обмена, врожденную гиперплазию коры надпочечников, пороки развития нервной трубки и ряд других заболеваний.

В настоящее время возможно проведение амниоцентеза в I триместре беременности. В эти сроки беременности по культуре клеток амниотической жидкости можно определить кариотип плода в 68% наблюдений. Получение амниотической жидкости в I триместре значительно увеличило число пренатально диагностируемых заболеваний. Наиболее успешно этот метод применен для пренатальной диагностики врожденной гиперплазии коры надпочечников, обусловленной недостаточностью 21-гидроксилазы в I триместре беременности.

Во II триместре беременности возможно получение крови плода с последующей диагностикой многих заболеваний, наследственных иммунодефицитных состояний. По лимфоцитам крови плода в течение нескольких дней вне зависимости от срока беременности можно установить кариотип, что необходимо, если при ультразвуковом исследовании диагностированы пороки развития и требуется срочно решить вопрос об их внутриутробной коррекции или методе родоразрешения.

Для диагностики высоколетальных, наследственных заболеваний кожи (ихтиозиформная эритродермия, буллезный эпидермолиз) в строго определенные сроки беременности применяется биопсия кожи плода с последующим морфологическим исследованием биоптатов.

На основе анализа ДНК, выделяемой из клеток хориона амниотической жидкости или крови плода, а также использования ДНК-зондов в настоящее время возможна пренатальная диагностика гемофилии, миопатии Дюшенна, муковисцидоза, врожденного поликистоза почек и некоторых других заболеваний.

Инвазивные манипуляции противопоказаны при клинических симптомах прерывания беременности, острых инфекционных заболеваниях, инфекции половых путей, опухолевидных образованиях матки больших размеров. Основным осложнением инвазивных процедур является угроза прерывания беременности. В настоящее время частота этого осложнения значительно снизилась в результате проведения всех манипуляций под ультразвуковым контролем и не превышает 2%.

5.7.2. Медико-генетическое консультирование при экстракорпоральном оплодотворении методом интрацитоплазматической инъекции сперматозоида

Вспомогательные репродуктивные технологии прочно заняли свое место в комплексе медицинского лечения бесплодия. Количество детей, родившихся благодаря

экстракорпоральному оплодотворению и переносу эмбрионов в полость матки, постоянно возрастает, и к настоящему времени в мире родилось около 1 млн. таких детей.

В последние годы предпочтительным, а в некоторых случаях и единственным методом лечения мужского бесплодия стал метод интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в ооцит (JCSI). Внедрение этого метода в практику экстракорпорального оплодотворения открыло новые возможности в лечении даже, казалось бы, самых бесперспективных форм бесплодия, обусловленного как мужским, так и женским фактором. Число детей, родившихся при применении этого метода, оценивается как более 300000.

Однако с самого начала введения JCSI в практику встал вопрос о его возможном негативном влиянии на здоровье потомства. Мужчины, включенные в эти программы, часто страдают различными серьезными нарушениями сперматогенеза и имеют повышенный риск носительства хромосомных aberrаций, мутаций или делеций участков Y-хромосомы. Реальный риск передачи потомству тяжелых нарушений сперматогенеза и хромосомных аномалий еще не определен и требует тщательного дальнейшего изучения. Некоторые авторы заключают, что количество врожденных пороков не возрастает при применении метода JCSI. Однако, по мнению других исследователей, уровень пороков развития у детей, родившихся после применения этого метода, более 7%.

Из приведенных данных справедливо сделать вывод, что консультирующиеся пары должны получать полную информацию о возможном риске перед проведением процедуры JCSI.

Пациенты должны быть информированы о том, что часть хромосомных aberrаций может выявляться не сразу после рождения, а проявляться в старшем возрасте, при попытке реализации репродуктивной функции.

Можно остановиться на возможных психологических проблемах, связанных с зачатием вне организма матери, что может влиять на отношения между родителями и ребенком. Также возможно, что родившийся ребенок, зачатый *in vitro*, не

будет полностью соответствовать ожиданиям родителей, и это может сказываться на психоэмоциональном развитии уже в детстве.

В ходе обсуждения вопроса о возможности осуществления различных манипуляций эмбрионами все чаще встает ключевая морально-этическая проблема вспомогательных репродуктивных технологий – статус эмбриона, с какого момента его следует рассматривать как личность, имеющую право на жизнь и ее защиту в законодательном порядке. Также возникает ряд проблем: правомерности манипуляции с гаметтами и эмбрионами с терапевтическими и исследовательскими целями, замораживания половых клеток и эмбрионов и их использования реципиентами, анонимности доноров гамет, эмбрионов, суррогатных матерей, их прав и обязанностей, выбора пола плода при риске носительства связанных с полом заболеваний или без медицинских на то показаний, селекции эмбрионов при многоплодных беременностях.

На XXVI Всемирном конгрессе по фертильности и стерильности, проходившем в Сан-Франциско в 1998 г., подчеркивалось отсутствие исследований, позволяющих научно достоверно исключить отрицательные эффекты экстракорпорального оплодотворения и переноса эмбрионов и подтвердить безопасность этих процедур, а также указывалось на необходимость проведения дальнейших исследований, особенно в связи с внедрением в практику все новых вспомогательных методов репродукции.

Анализ литературы позволяет утверждать, что репродуктивные потери, перинатальная смертность и заболеваемость, а также врожденные пороки развития не связаны с методами искусственного оплодотворения. Прежде всего они объясняются длительностью бесплодного периода и потерей самого ценного для репродукции – времени. Как правило, ранее бесплодная женщина вступает в первую беременность в возрасте старше 30-35 лет – возрасте повышенного генетического риска для репродукции. При этом следует принять во внимание, что за этот период у данной

категории женщин помимо «первичной» репродуктивной недостаточности, часто связанной с многочисленными абортами и инфекционными заболеваниями генитальной сферы, происходит «накопление» и других патологических состояний, оказывающих мощное воздействие на ход эмбриогенеза. Беременность у 80-90% женщин протекает патологически на всем своем протяжении, сопровождается фетоплацентарной недостаточностью, угрозой выкидыша и требует медикаментозной поддержки в виде гормонов, антибиотиков и других сильнодействующих средств. В то же время при проведении экстракорпорального оплодотворения наименее обоснованным остается генетический аспект этой проблемы. Только в работах последних 2-3 лет начинают придавать этому значение, и появляются убедительные аргументы в пользу широкого внедрения в эту сферу деятельности достижений медицинской генетики. Начинает использоваться медико-генетическое консультирование бесплодных супружеских пар, кариотипирование будущих родителей, пренатальная диагностика: УЗИ, биопсия хориона, амниоцентез, определение α -фетопротейна. Кстати, несоблюдение такого алгоритма исследования, пренебрежение пренатальной диагностикой по вине самой женщины и приводит к сохранению дефектного плода и рождению ребенка с грубым пороком развития.

Становится очевидным целесообразность доимплантационной диагностики и определения кариотипа родителей. По результатам цитогенетического исследования, учитывая особенности анамнеза (к примеру, в прошлом трисомия 13) и возраст родителей (матери 34 года, отцу 46 лет), генетический риск повторного рождения больного ребенка составляет 2%. В связи с этим при наступлении следующей беременности в комплекс профилактических мероприятий следует включить:

трехкратное ультразвуковое обследование во время беременности в сроки 9-11, 20-22, 30-32 нед. гестации. В срок беременности 17-20 нед. необходимо определение уровня α -фетопротейна, хорионического гонадотропина, свободного

эстриола в сыворотке крови матери. Снижение уровня α -фетопротеина и свободного эстриола и повышение уровня хорионического гонадотропина могут свидетельствовать о хромосомной патологии у плода и являются показанием для проведения инвазивной пренатальной диагностики, которая (кстати) показана для всех беременных старше 35 лет. Инвазивная пренатальная диагностика осуществляется в I и II триместрах беременности, и предполагает биопсию хориона на 8-11-й неделе, амниоцентеза на 17-20-й неделе и кордоцентеза на 22-25-й неделе гестации с последующим цитогенетическим исследованием полученного материала.

Абсолютное женское бесплодие является показанием к экстракорпоральному оплодотворению (ЭКО) с последующим переносом эмбрионов в матку матери. Детей, родившихся благодаря применению этого метода, в обиходе часто называют «пробирочными» детьми, т. к. начальные этапы развития яйцеклетки и эмбриона при ЭКО происходят в искусственных условиях - «в пробирке». Метод состоит из следующих этапов; уточнение характера и причин бесплодия; назначение препаратов, стимулирующих рост и созревание сразу нескольких фолликулов - индукция суперовуляции; контроль ответа яичников на применение указанных препаратов при помощи серии ультразвуковых и гормональных исследований; пункция фолликулов, отсасывание их содержимого и извлечение из них яйцеклеток; помещение яйцеклеток в специальную питательную среду и условия; получение и подготовка сперматозоидов; соединение яйцеклеток и сперматозоидов (инсеминация яйцеклеток) в «пробирке» и помещение их в инкубатор на 24-42 часа; контроль кариогамии и начальных этапов дробления зиготы под микроскопом; перенос делящихся эмбрионов в матку матери; назначение препаратов, поддерживающих имплантацию и развитие эмбрионов; диагностика беременности; ведение беременности и родов.

Таким образом, ЭКО представляет собой сложный, многоступенчатый процесс. Он требует назначения различных препаратов и многократной оценки состояния женщины в течение цикла, в котором производится попытка ЭКО.

Вероятность успеха и рождения «пробирочного» ребенка составляет 20-30 %. Это очень высокий процент, если учесть, что вероятность развития эмбриона после оплодотворения в естественном цикле у совершенно здоровых мужчины и женщины не превышает 30%. В настоящее время ЭКО используется практически при всех формах бесплодия, а именно: при мужском бесплодии, при эндометриозе, при неясной форме бесплодия и даже у женщин с удаленной маткой. Для *больных без матки* процедура ЭКО выглядит следующим образом: полученную у такой женщины яйцеклетку инсеминируют спермой мужа, а затем переносят образовавшийся эмбрион в матку другой женщины - так называемой «суррогатной», или «биологической» матери, согласившейся вынашивать ребенка и после родов отдать его «хозяйке» яйцеклеток, т.е. «генетической» матери.

Все шире применяется метод ЭКО у женщин с нефункционирующими яичниками, например, при «раннем климаксе», или *после их удаления*. В этих случаях пациентке переносят эмбрион, образовавшийся в результате *оплодотворения донорской (чужой) яйцеклетки* спермой мужа. После пересадки эмбриона проводится заместительная гормональная терапия, имитирующая состояние женщины при обычной физиологической беременности.

Замораживание гамет и эмбрионов. Возможности лечения бесплодия существенно расширились благодаря разработанной технике *замораживания сперматозоидов и предимплантационных эмбрионов*, что сделало процедуру ЭКО значительно более гибкой. Технология криоконсервирования яйцеклеток пока разработана не достаточно хорошо, т.к. они оказались очень чувствительными к замораживанию и необратимо повреждаются. Предимплантационные эмбрионы оказались более устойчивыми. Хотя замораживание с последующим оттаиванием несколько снижают оплодотворяющую способность спермы и жизнеспособность эмбрионов, вероятность наступления беременности после их применения остается достаточно высокой. Причем на

родившихся детей никакого отрицательного влияния эти процессы не оказывают.

Использование замороженной спермы позволяет провести процедуру ЭКО и в отсутствие мужа или если у мужа неважные показатели спермограммы. Замораживание и последующее соединение нескольких порций спермы дает возможность набрать минимальное количество нормальных сперматозоидов. Их используют для инсеминации яйцеклетки во время процедуры ЭКО или даже для проведения внутриматочной инсеминации. Замораживание является чрезвычайно ценным подспорьем при создании банка донорской спермы: во-первых, дает возможность использовать сперму с нужными характеристиками в любое время и в любом месте, а во-вторых, позволяет осуществлять двойной контроль доноров в отношении зараженности их спермы вирусом СПИДа, что практически исключает опасность инфицирования и женщины и плода.

Замороженные эмбрионы могут быть использованы в циклах, последующих за неудачной попыткой ЭКО. Если яйцеклеток и эмбрионов было получено больше, чем это необходимо для переноса (обычно не более 3-4), это дает возможность не проводить женщине повторную индукцию суперовуляции и пункцию яичников, а осуществить перенос оттаявших эмбрионов в матку в любом из последующих естественных циклов.

Таким образом, процедура ЭКО с использованием замороженной спермы или эмбрионов увеличивает шансы наступления беременности и не влияет на здоровье будущего ребенка. В последние годы появились сообщения о рождении здоровых детей даже после замораживания яйцеклеток.

Предимплантационная диагностика наследственных заболеваний. До последнего времени единственным способом предотвратить рождение больного ребенка было прерывание беременности после того, как в результате диагностических процедур (амниоцентеза, хорионбиопсии) получали подтверждение генетической патологии у плода. Не говоря о

небезопасности и не абсолютной надежности этих методов, следует сказать об огромной моральной травме, связанной с прерыванием беременности, на которую всегда возлагается столько надежд. Единственной альтернативой этим методам пренатальной диагностики является появившийся в последние годы метод *предимплантационной диагностики*.

Природа предусмотрела удивительный механизм: в процессе созревания яйцеклетка «сбрасывает» ровно половину своего хромосомного набора в «мусорную корзину» - так называемое полярное тельце (см. *Овогенез - стр. 191*). В случае гетерозиготности в полярное тельце могут уйти или «здоровые», или «больные» аллели, соответственно в яйцеклетке останется либо патологические, либо нормальные аллели. Если женщина больна или является носителем доминантного или рецессивного аллеля наследственного заболевания, то изучив генетический состав полярного тельца, можно точно предсказать генетический состав яйцеклетки и перспективность ее использования для ЭКО.

Итак, метод предимплантационной диагностики заключается в получении у женщины яйцеклетки, отделении от нее при помощи особых инструментов под микроскопом полярного тельца и изучение его при помощи специальных молекулярно-генетических реакций, направленных на выявление дефектных генов. В случае обнаружения в полярном тельце генов наследственных заболеваний, яйцеклетка признается здоровой, ее инсеминируют сперматозоидами мужа и образовавшийся эмбрион переносят в полость матки. При отсутствии в полярном тельце больного гена или в сомнительных случаях инсеминацию не производят. Уже сегодня возможна точная ранняя диагностика большого числа генных дефектов, например, муковисцидоза, гемофилии, болезни Тея-Сакса, миодистрофии Дюшена и др.

Достижением самых последних лет является *генная терапия*, применение которой возможно и на самых ранних стадиях развития эмбрионов. При этом выполняется не только диагностика, но и лечение больных зародышей (замена патологического аллеля на нормальный).

5.8. Биоэтические проблемы медицинской генетики

Во второй половине XX в. особенно бурно развивались фундаментальные науки, результаты которых быстро, а иногда и агрессивно внедрялись в жизнь и медицинскую практику. Вместе с тем непредсказуемость или неопределенность последствий от широкого применения достижений генетики (генная терапия, генетически модифицированные организмы для ксенотрансплантации) заставляют выработать меры предосторожности.

Прогресс медицины и общества приводит к увеличению продолжительности жизни больных с наследственными болезнями. Это значит, что при той же частоте рождения детей с наследственными болезнями по мере увеличения продолжительности их жизни будет увеличиваться число больных людей. Многие из них способны оставлять потомство.

В частности благодаря достижениям геномики «здоровье» и «болезнь» все чаще характеризуются молекулярно-генетическими терминами, что приводит к тенденции среди ряда исследователей рассматривать человеческую сущность как носительство конкретного гена. Подобные представления могут нарушить моральную ответственность и подорвать принципы солидарности в современном обществе.

В основе решения возникающих проблем лежат следующие центральные постулаты биоэтики.

Признание автономии личности (*personal autonomy*), что подразумевает право человека самому за себя решать все вопросы, которые касаются его (ее) сомы, психики, эмоционального статуса.

Справедливость (*justice*), которая подразумевает равный доступ членов общества к общественным благам. Это касается и медицины, и здравоохранения, и технологий, которые существуют на коллективные средства, и предполагает право налогоплательщика на равную или уравненную долю по потребности в доступе к необходимым для нормальной жизни средствам из общественных фондов.

Гиппократовское «не вреди», означающее, что этично

применять к какому-либо лицу только те воздействия, которые не принесут ему вреда.

В современной биоэтике гиппократовское «не навреди» расширяется до «не только не вреди, но и сотвори благо». Первое в англоязычной литературе обозначается как non-maleficence (не причинение вреда), второе – как beneficence (благодеяние).

Разработкой биоэтических проблем активно занимаются международные организации – Совет Европы, ЮНЕСКО, ВОЗ.

В 1997 г. Советом Европы была принята «Конвенция о защите прав и достоинства человека в связи с приложениями биологии и медицины: Конвенция о правах человека и биомедицине». В этом документе нашли отражение особенно близкие к генетике проблемы, например вопросы о получении этически приемлемого согласия на проведение медицинских процедур или исследований и защите лиц, которые сами не способны дать согласие, о равном доступе всех граждан к мероприятиям по охране здоровья, контролю качества профессиональных стандартов, недопущении дискриминации на основании генетической информации, об условиях этической приемлемости прогностического генетического тестирования, о допустимости интервенций в геном только соматических клеток человека, о запрете селекции по полу.

Конвенция Совета Европы будет дополнена протоколами, которые должны конкретизировать ее положения применительно к разным отраслям знания и практики. Для этого работают 4 группы экспертов: по генетике человека, по эмбриологии, по репродукции и по социальным аспектам здравоохранения.

На 29-й сессии Генеральной конференции ЮНЕСКО 11 ноября 1997 г. была единогласно принята «Всеобщая декларация о геноме человека и о правах человека», которая стала первым всеобщим правовым актом в области биологии, гарантирующим соблюдение прав и основных свобод и учитывающим необходимость обеспечения свободы исследований. В декларации постулируется, что геном человека лежит в основе изначальной общности всех представителей

человеческого рода, признания их достоинства и разнообразия и в его естественном состоянии не должен служить источником извлечения доходов. Никто не может подвергаться дискриминации на основании генетических характеристик, цели или результаты которой представляют собой посягательство на основные свободы и человеческое достоинство. Научные исследования генома человека и использование их результатов в биологии, генетике и медицине должны осуществляться после тщательной предварительной оценки связанных с ними потенциальных опасностей и преимуществ, с учетом всех других предписаний, установленных национальными законодательствами. В документе декларированы принципы добровольного информированного согласия заинтересованных лиц на проведение любых процедур и конфиденциальности генетической информации, право человека самому решать, быть или не быть информированным о результатах генетического анализа и его последствиях, а также право на справедливую компенсацию ущерба, причиненного в результате воздействия на геном, в соответствии с международным правом и национальным законодательством, всеобщий доступ к достижениям науки в области биологии, генетики и медицины, касающимся генома человека, при должном уважении достоинства и прав каждого человека.

Медицинская генетика, как часть медицины основывается на общемедицинских этических принципах уважения автономии личности (уважение самоопределения и выбора личности), благотворительности (наивысший приоритет – благополучие человека и повышение пользы его здоровью), не причинения вреда (или минимизации вреда, если его нельзя избежать), справедливого распределения благ медицины в обществе.

Все виды исследований и медицинских процедур должны осуществляться с информированного согласия объекта. Под информированным согласием понимается то, что пациент вступает в контакт с генетиком, врачом, исследователем добровольно, при этом врач (исследователь) обязан обеспечить его в доступной форме адекватной и правдивой информацией,

которая должна быть необходимой, достаточной и понятной, и помочь пациенту принять самостоятельное решение о том, на какие процедуры он согласен пойти, а на какие не согласен.

Из принципов уважения автономии личности, не причинения вреда, благодеяния вытекает неизменное правило – конфиденциальность генетической информации. Это правило проходит через все документы по биоэтической регламентации любой медицинской деятельности. Согласно этому правилу, информация о генетическом статусе человека может быть сообщена только ему, его опекунам и его врачам.

С учетом мнений профессионалов-генетиков из разных стран в рамках Программы по наследственным болезням ВОЗ была проведена работа по созданию этического руководства для деятельности медико-генетической службы.

Последний вариант документа Proposed International Guidelines on Ethical Issues in Medical Genetics and Genetic Services принят на совещании ВОЗ «Этические исследования в медицинской генетике» (15–16 декабря 1997 г., Женева) с участием экспертов из промышленно развитых и развивающихся стран и содержит рекомендации по проведению основных медико-генетических процедур: медико-генетического консультирования, генетического скрининга и ДНК-тестирования на наследственные заболевания с поздним возрастом начала и на мультифакториальные заболевания, пренатальную диагностику, работу банков ДНК и др.

Всего 20 лет назад самыми тонкими методами изучения наследственной патологии человека были цитогенетический анализ дифференциально окрашенных хромосом и биохимическое исследование метаболитов и ферментов методами электрофореза и хроматографии. Со второй половины 1980-х годов, особенно в связи с разработкой крупнейшего в истории медико-биологических наук международного научного проекта «Геном человека», ситуация радикально изменилась: причины, патогенез и клинические проявления разных форм патологии стали доступными для изучения и воздействия с помощью геномных или молекулярно-генетических технологий.

В 2000 г. в основном секвенирован геном человека. К настоящему времени уже выявлено, картировано и изучено несколько сот патологически измененных последовательностей ДНК, обуславливающих развитие различных заболеваний, и число их постоянно растет. Практически это означает возможность точного диагноза и прогноза наследственных заболеваний, поскольку изменения в геноме присутствуют и передаются от клетки к клетке не только во время уже разыгравшейся болезни, а постоянно, во всех клетках тела, имеющих хромосомы, в том числе в клетках тела зародыша с самого начала его внутриутробного развития.

Сказанное позволяет осуществлять раннюю доклиническую и дородовую ДНК-диагностику многих наследственных болезней. При болезнях, поддающихся лечению, ранняя диагностика помогает своевременно приступить к нему и добиться лучших результатов. Но так случается не всегда. Часто о безнадежном состоянии плода или угрозе жизни беременной узнают тогда, когда плод уже нельзя не признать новым индивидуумом. При фатальном прогнозе для беременной в случае сохранения беременности медики многих стран обычно делают выбор в пользу сохранения жизни женщины. Когда же необратимо поражен плод, то суждения медиков, пациентов, общества в разных этносах, культурах, религиях сильно разнятся. Согласно одной крайней точке зрения, искусственное прерывание беременности на основании даже безнадежного прогноза для плода, уже представляющего собой новый организм, категорически недопустимо. Представители другой крайней точки зрения считают, что в безнадежной ситуации не следует возлагать на женщину, ее семью, общество моральное и материальное бремя по содержанию до естественной кончины неизлечимо пораженного индивидуума, физическая жизнь в котором теплится некоторое время лишь с помощью комплекса интенсивных реанимационных мер. Врач-генетик, наблюдающий такую семью, по ряду международных и национальных этических регламентов предоставить своим пациентам исчерпывающую информацию о возникшей ситуации и всех ее возможных

последствиях и право сделать самостоятельный выбор о прерывании или сохранении беременности.

В медико-генетической практике это отчасти связано с тем, что проявление наследственных, том числе патологических, признаков подвержено широкой вариации (проявление или не проявление генотипа, время и степень манифестации). Вот почему, даже обнаружив определенное изменение в геноме, часто нельзя дать однозначный прогноз о его влиянии на здоровье человека, а следовательно, нельзя и предложить однозначную, этически приемлемую рекомендацию, скажем, о сохранении и лечении пораженного плода.

В соответствии с общепринятыми международными нормами генетический скрининг и досимптоматическое тестирование взрослых должны быть добровольными, причем их участники сами решают (на основе исчерпывающей информации), подвергнуться им тестированию или нет, исходя из своих взглядов и моральных принципов. Скрининг детей для ранней диагностики и своевременного лечения в интересах их здоровья должен быть обязательным и бесплатным (например, скрининг новорожденных на фенилкетонурию). Обязательным условием такого скрининга является доступность своевременного и адекватного лечения заболевания.

При проведении генетического скрининга и досимптоматического тестирования участники должны получить исчерпывающую информацию о целях, возможных результатах обследования и возможном выборе. Выявленные в результате скрининга больные, их родители (или носители гена наследственного заболевания с поздним возрастом начала) должны получить генетическую консультацию для всесторонней информации о заболевании, его значении для индивидуума и членов его семьи, методах, лечения и социальной поддержке, а также адекватную психологическую помощь.

Во многих странах законодательно запрещено проведение генетического скрининга заболеваний, которые в настоящее время не поддаются лечению. Тем не менее ВОЗ допускает осуществление досимптоматического тестирования взрослых при отсутствии методов лечения заболевания с соблюдением

следующих условий: полученная информация необходима для предотвращения ущерба здоровью родственников (например, для будущих детей): лицо, подвергающееся тестированию, получает полную информацию об ограничениях теста (неинформативный результат, невозможность точно предсказать возраст начала заболевания и пр.) и способно адекватно воспринять эту информацию.

Досимптоматическое тестирование детей на заболевания с поздним началом (или тестирование на предрасположенность к заболеваниям) при отсутствии методов лечения или профилактики, по мнению большинства исследователей и биоэтических комитетов, следует отложить до достижения возраста, когда молодой человек сможет принять собственное решение по этому вопросу.

Важным аспектом медико-генетического консультирования при проведении тестирования на доклинической стадии заболевания является оказание психологической поддержки консультирующимся при обнаружении у них носительства патологического гена.

Основное назначение генетической информации, полученной в результате генетического тестирования, является ее влияние на репродуктивный выбор семьи. При использовании такой информации может возникнуть опасность проведения евгенических процедур. Большинство международных и национальных биоэтических комитетов считают, что наилучшей защитой прав человека в таких случаях является свободно данное согласие на проведение медицинских процедур на основе полной и непредвзятой информации.

Особые проблемы возникают при попытках применения генетических технологий для решения немедицинских задач, таких, как выбор пола плода по желанию родителей, тестирование плода для возможного донорства тканей, дородовое определение отцовства (кроме случаев изнасилования или предполагаемого инцеста). Существующими международными документами проведение таких процедур запрещается.

Представленную картину об этических проблемах при

решении вопроса о прерывании беременности по результатам пренатальной диагностики несколько смягчают наметившиеся успехи в этиологическом лечении прежде неизлечимых наследственных и врожденных болезней с помощью генотерапии, т. е. путем искусственного генно-инженерного замещения поврежденных генетических структур нормальными донорскими или синтезированными в лаборатории *in vitro*. Такие методики генотерапии можно назвать своего рода «молекулярным протезированием». Это направление уверенно набирает силу уже не только в лабораториях, но и в клиниках.

Несмотря на то, что все процедуры генотерапии строго подчиняются общепринятым правилам безопасности при проведении генно-инженерных работ, введение генных конструкций в организм человека предъявляет повышенные требования к генетической безопасности. Особое значение имеет тип клеток, которые служат объектом генотерапии. Любое введение в клетки человека генетического материала может иметь отрицательные последствия, связанные с неконтролируемым встраиванием их в те или иные участки генома, что может привести к нарушению функции генов. Однако отрицательные последствия генотерапии соматических и половых клеток несоизмеримы по своему масштабу. В первом случае речь идет о судьбе одного тяжело больного индивидуума и риск, вызываемый лечебными процедурами, обычно ниже, чем риск смертельного исхода от первичного заболевания. Кроме того, степень генетического риска при генотерапии соматических клеток снижается при использовании генетических конструкций, не способных к встраиванию в геном клетки реципиента. В то же время при внесении генетических конструкций в половые клетки возникает возможность внесения нежелательных изменений в геном будущих поколений. В международных документах ВОЗ, ЮНЕСКО, Совета Европы признается этически допустимой только генотерапия соматических клеток.

Успехи в изучении генома человека делают реальным в настоящее время или в ближайшем будущем тестирование на предрасположенность к распространенным заболеваниям,

таким, как сердечно-сосудистые, онкологические, психические болезни и др. И если в решении этических проблем, возникающих при ДНК-тестировании при моногенных заболеваниях, в основном, достигнут консенсус, то этические проблемы, возникающие при тестировании на носительство генов предрасположенности к распространенным заболеваниям широко обсуждаются во всем мире. В первую очередь, это связано с тем, что генетическая информация, полученная в результате такого тестирования, имеет вероятностный характер. Ситуацию осложняет то обстоятельство, что в развитии распространенных заболеваний играют роль несколько генов предрасположенности, причем каждый из них вносит относительно небольшой вклад в развитие заболевания, а вклад факторов внешней среды в процесс развития заболевания значителен.

В то же время значительная коммерциализация работ в области геномики привела к тому, что большое число наборов для генетических тестов на предрасположенность к распространенным заболеваниям будет предлагаться фирмами-изготовителями непосредственно населению. Это может привести к тому, что такое тестирование будет проводиться чаще, чем это необходимо для общества и здравоохранения.

В настоящее время ВОЗ рекомендует проводить такое тестирование, только если его результаты могут быть эффективно использованы для профилактики и лечения заболевания, при условии полной информированности пациента и его добровольном согласии.

Все более широкое распространение генетических тестов может привести к дискриминации отдельных индивидуумов на основании генетической информации о них, если она становится доступной для третьих лиц.

Еще одной этической проблемой геномики, связанной с защитой конфиденциальности генетической информации, является доступ к образцам ДНК, хранящимся в банках ДНК, и генетическим регистрам. Широкое клиническое применение генодиагностики и генетического скрининга привело к накоплению образцов в банках ДНК.

Поскольку информация о ДНК важна не только для самого индивидуума, но и для его родственников, в первую очередь обсуждается вопрос, для кого должны быть доступны хранящиеся образцы. Моральный долг каждого человека – предотвратить нанесение вреда здоровью живущим или будущим его родственникам. Вот почему образцы ДНК должны быть доступны для кровных родственников донора ДНК (даже если они не финансировали ее хранение), чтобы они могли узнать свой собственный, генетический статус (но не статус донора). Супруг донора может быть проинформирован о факте помещения ДНК в банк, но не должен получать информацию о ней без согласия донора.

Рассмотренные в качестве примеров ситуации показывают, что генетика играет все более важную роль в здравоохранении. Генетические тесты уже используются не только профессионалами-генетиками для оказания помощи относительно небольшому кругу лиц с моногенными заболеваниями, они начинают все шире использоваться и другими специалистами. Успехи в фармакогеномике, которые ожидаются в ближайшие 10 лет, еще более расширят применение генетического тестирования.

5.8.1. Проблемы, связанные с генетическим скринингом

1. Со временем мы научимся определять, кто имеет высокую вероятность получить инфаркт или заболеть ревматоидным артритом. Будут ли страховые компании требовать сведений о генотипе каждого человека и каким-либо образом дискриминировать предрасположенных к тяжелым заболеваниям, хотя заболевание у них может и не развиваться? Окажутся ли в невыгодном положении те компании, которые не пользуются данными тестирования? Следует ли принимать законы, гарантирующие генетическую тайну?

2. Генетические дефекты отличаются друг от друга по степени тяжести обуславливаемых ими синдромов, и образуют по этому признаку непрерывный ряд. Кто должен решать, где проходит граница между тяжелыми и средними по тяжести нарушениями?

В Великобритании в случаях «тяжелых нарушений» разрешен аборт при сроках беременности больше 24 нед. Будет ли разрешен или поддержан программами скрининга аборт в случае излечимой болезни, такой как фенилкетонурия?

3. Человек, страдающий наследственным заболеванием, часто ощущает себя неполноценным членом общества. Существует опасность, что по мере роста наших успехов в борьбе с этими болезнями и снижением числа людей с генетическими дефектами, человек, имеющий генетическую аномалию, будет чувствовать себя изгоем. Мировоззрение таких людей сильно отличается от взглядов на мир здоровых людей. Жизненные ценности тоже различны. Общество должно научиться уважительно относиться к мнению больных. Не является ли ложным наше представление о жизненных ценностях?

4. Евгенические движения в начале XX в. показали, какие опасности связаны со знанием генетики. Евгеника — это учение о возможном улучшении генетики вида. Одним из используемых для этого методов является избирательное скрещивание. Негативная евгеника заключается в удалении вредных генов; позитивная — в добавлении генов, создающих преимущества. Нацисты, например, оправдывали уничтожение психически и физически уязвимых людей благой целью — создать генетически «чистую» расу. Известны попытки расовой дискриминации на основе генетики. Если удаление вредных генов станет нормой, не вдохновит ли это генетиков на разработку методов «конструирования» детей по желанию родителей: музыкальных, спортивных или, например, с математическими способностями?

5. Программы скрининга, призванные искоренить болезни, могут привести к усилению общественного давления на женщин или супружеские пары, заставляя их делать аборт, когда они сами этого не хотят. Так случилось с некоторыми женщинами на Кипре в результате проведения программы скрининга талассемии.

6. Если заболевание встречается в пределах одной расы, программы скрининга могут усилить дискриминацию. Это произошло при скрининге серповидноклеточной анемии в США в 1970-х годах.

7. То, что сейчас считается небольшим отклонением от нормы,

может в дальнейшем рассматриваться как нежелательный признак, например низкий коэффициент умственного развития (IQ).

8. Насколько точным должен быть тест, чтобы он мог быть использован? Этично ли, например, сказать кому-нибудь, что с вероятностью 80% он заболеет смертельной болезнью?

9. Что должен говорить генетик человеку, у которого диагностировано наследственное заболевание с поздним началом проявления, приводящее к ограничению его физических возможностей и довольно быстрому смертельному исходу (например, хорей Гентингтона)?

10. Если супруги решили не прерывать беременность, которая, как они узнали, принесет в мир ребенка с наследственной патологией, должны ли они оплачивать стоимость лечения, или это должно делать общество? В 1963 г. Фрэнсис Крик предсказал, что наступит день, когда нам придется получать лицензию на право иметь детей. Согласно закону, принятому в Китае в 1995 г., супруги, для которых существует повышенный риск наследственных дефектов, не имеют права завести ребенка без специального разрешения. В США было предложено лишать медицинской страховки те пары, которые, не взирая на информацию о патологии плода, решили не прерывать беременность.

11. Не подадут ли дети в суд на родителей, которые позволили им родиться, зная, что они больны?

12. Гены, которые окажут вредное влияние на жизнь человека, в начале жизни могут создавать для него жизненные преимущества.

Заключение

ВКЛАД ГЕНЕТИКИ В МЕДИЦИНУ

Прогресс молекулярной и клинической медицины, а также генетики человека позволяет идти дальше по пути нормоконцепции патологических генетических состояний. Успешно разрабатываются методы пренатального лечения. Знание механизмов влияния материнского организма на проявление различных аллелей или их комбинаций у плода является основой профилактики болезней через организм матери. В последние годы развивается гипотеза о периконцепционной профилактике (до и после зачатия). Предполагается, что оздоровление организма будущей матери за несколько месяцев до зачатия и на ранних сроках беременности способствует уменьшению частоты врожденных пороков развития мультифакториальной природы.

Для использования всех возможностей современной генетики и клинической медицины в диагностике, лечении и профилактике наследственных болезней необходима совместная работа врачей разных специальностей с врачами генетиками. К сожалению, на деле это не всегда получается так.

Можно выделить четыре типа ошибок, обусловленных недостаточным знанием врачами основ медицинской генетики.

а. Одинаковое отношение к больным с наследственной и ненаследственной патологией, т.е. без учета семейного накопления мутаций. Объектом наблюдения при наследственных болезнях должен быть не только пациент, но и его семья.

б. В генетической практике нередко лечащий врач негенетик относительно легко дает больному советы, неоправданные с генетической точки зрения, вместо того, чтобы направить больного на медико-генетическую консультацию.

в. Встречаются и сугубо клинические ошибки в диагностике болезней и рекомендациях. Например, больным с синдромом Марфана разрешают тяжелые нагрузки, что заканчивается осложнениями в виде разрыва аорты.

г. К генетическим заболеваниям относят трудные диагностические случаи, «списывая» их на наследственную природу.

Развитие мониторинговых систем по учету врожденных пороков развития на базе родильных домов требует особого внимания и широкого внедрения.

Использование методически правильной системы сбора данных по врожденным порокам развития позволит с большей точностью говорить о частоте данной патологии среди разных исходов беременности и предпринимать соответствующие профилактические мероприятия как общепопуляционного, так и индивидуального характера. В настоящее время мы видим осведомленность как врачей, так и населения о возможностях дородовой диагностики наследственной и врожденной патологии.

Угрожающе высокие частоты таких пороков развития, как дефекты нервной трубки, требуют незамедлительного внедрения преемственных методов профилактики этих дефектов. Назначение женщинам, планирующим беременность, и в первые месяцы беременности препаратов фолиевой кислоты (по результатам многочисленных зарубежных работ) оправдано и позволяет значительно снизить частоту этих пороков. Необходима дальнейшая популяризация среди населения возможностей предупреждения и дородовой диагностики наследственной и врожденной патологии.

Потребность в получении современных генетических знаний как врачами, так и населением уже довольно высока, и она будет возрастать по мере роста достижений в области молекулярной и клинической генетики и применения новых разработок в диагностике многих болезней человека, в лечении на основе генно-инженерных технологий, в профилактике и специализированном обслуживании соответствующих семей и групп риска населения. По мере распространения генетических знаний неизбежно повысится потребность отдельных людей знать параметры своего генетического здоровья. Уже сегодня в развитых странах мира генетическое тестирование населения на носительство мутантных генов, имеющих отношение к

наиболее значимым в социально-медицинском отношении болезням, становится важным и распространенным исследованием, частью процесса медико-генетического обследования индивидуума (семьи), обратившегося в медико-генетическое учреждение. В то время как в большинстве стран лишь обсуждаются проблема пользы и вреда генетического консультирования, подходы к интерпретации результатов и рекомендательным заключениям, в некоторых странах появились специальные правительственные институты: в Англии – Комиссия по генетическому тестированию, в США – Оперативная группа по генетическому тестированию.

Поток новой генетической информации быстро увеличивается, более ответственным становится медико-генетическое консультирование как основной вид медико-генетической помощи. Принимая во внимание сегодняшний уровень генетической информации, можно представить, как важно практикующему врачу-генетику обладать всей полнотой знаний в этой области.

ОСНОВЫ ГЕНЕТИКИ ЧЕЛОВЕКА **КРАТКИЙ СЛОВАРЬ НОВЫХ ТЕРМИНОВ**

Аллельные гены - определяющие развитие альтернативных признаков. Они располагаются в одних и тех же участках гомологичных хромосом. *Множественные аллели* — это совокупность аллелей, контролирующих развитие нескольких вариантов альтернативных признаков. Аллелей может быть несколько, но одновременно в генотипе нормального диплоидного организма присутствует только 2 аллеля, по одному в каждой гомологичной хромосоме.

Аллели доминантные - преобладающие у гетерозиготных организмов. Обуславливают развитие доминантных признаков как в гомозиготном АА, так и в гетерозиготном Аа состояниях.

Аллели рецессивные - не проявляющие активности в гетерозиготном состоянии. Обуславливают развитие признака только в гомозиготе – аа.

Амплификация генов - многократное увеличение числа копий одинаковых генов с целью интенсификации синтеза молекул, нужных в определенный момент времени.

Анализирующее скрещивание - скрещивание организма с неизвестной зиготностью с организмом, обладающим рецессивными признаками (гомозиготой рецессивной).

Аутосомы - совокупность хромосом кариотипа, за исключением половых.

Гаметы (зрелые половые клетки) - высокоспециализированные клетки, несущие гаплоидный набор хромосом, содержащих полную генетическую информацию о развитии и функционировании нового организма. В мужском организме образуются сперматозоиды, а в женском - яйцеклетки. Основная функция этих клеток - объединение геномов отца и матери во время оплодотворения и образование зиготы.

Ген - наследственный фактор, обуславливающий развитие конкретного признака организма. Он является элементарной дискретной единицей наследственности и представляет собой определенный участок молекулы ДНК. *Ген* - участок ДНК,

содержащий информацию о структуре РНК или белка.

Генетический код - особая последовательность азотистых оснований в нитях ДНК, определяющая структуру РНК или белка.

Генная инженерия - методы манипуляции молекулами нуклеиновых кислот.

Генная экспрессия - молекулярный механизм реализации наследственной информации, благодаря которому ген проявляет свой потенциал в конкретном фенотипическом признаке организма.

Генные мутации - внезапные стабильные изменения химической структуры генов, повторяющиеся в последующих циклах репликации и проявляющиеся у потомства в виде новых вариантов признаков.

Генетическое картирование - определение точной локализации генов в хромосомах.

Ген летальный - дефектный ген, вызывающий внутриутробную смерть или гибель сразу после рождения.

Гены сцепленные - гены, находящиеся в одной хромосоме, наследуются совместно.

Генетический груз - совокупность неблагоприятных аллелей в данной популяции.

Генетический фонд - совокупность генотипов всех организмов данной популяции. Каждый организм имеет особенности аллельного состава.

Генокопии - одинаковые признаки, развитие которых обусловлено разными генами.

Геном - совокупность генов в гаплоидном наборе хромосом, наследующиеся как единое целое от одного из родителей. Половые клетки содержат гаплоидный набор хромосом - один геном, а соматические (диплоидные) — два генома, один отцовский, второй материнский.

Генотип - совокупность всех генов данного организма. Термин «генотип» используется и в более узком смысле для обозначения тех генов, наследование которых в конкретном случае изучается, например Аа.

Гибридологический анализ - скрещивание между собой двух организмов, отличающихся по альтернативным признакам и анализ закономерностей проявления признаков у потомков в нескольких поколениях.

Гибриды - организмы, полученные в результате скрещивания организмов с альтернативными признаками.

Гомозиготы и гетерозиготы. Организм называется *гомозиготным* (*AA* и *aa*), если в обеих гомологичных хромосомах находятся одинаковые аллельные (изоаллельные) гены. Такой организм образует только один тип гамет (*A* или *a*). Группа гомозиготных особей называется «чистой линией». Такая группа не содержит «посторонних» аллелей. Если же аллельные гены различны, то такой организм носит название *гетерозиготного* (*Aa*), он образует два типа гамет (*A* и *a*). Отдельный организм может быть гомозиготным по одним признакам и гетерозиготным по другим.

Дигибридное скрещивание - скрещивание организмов и анализ потомков по двум парам альтернативных признаков.

Зигота - одноклеточный диплоидный зародыш, образованный в результате слияния генетических материалов женских и мужских гамет.

Изменчивость - заключается в возможности изменения наследственных признаков, а также в вариабельности их проявлений у различных представителей данного вида. Наследственность и изменчивость является основой эволюции. Новые признаки организмов появляются в результате изменчивости, а появившиеся изменения сохраняются в последующих поколениях благодаря наследственности.

Инициация - начальный этап синтеза нуклеиновых кислот или белков.

Интроны - последовательности азотистых оснований РНК, которые не кодируют аминокислоты.

Кариотип - совокупность хромосом особи определенного вида. Кариотип характеризуется количеством хромосом, их формой, размерами и генетическим составом.

Кластеры генов - группы различных структурных генов в

определенном участке хромосомы, объединенных общими функциями.

Клонирование генов - увеличение количества одних и тех же генов,

Кодирующая цепь (матричная) - одна из двух цепей ДНК, на которой идет транскрипция.

Коллинеарность - свойство, обуславливающее соответствие между последовательностями триплетов нуклеотидов (кодонов) мРНК и аминокислот полипептидных цепей.

Конститутивные гены - это гены, которые постоянно экспрессируются, так как белки, которые они кодируют, необходимы для постоянной клеточной деятельности.

Кроссинговер - рекомбинация генов во время мейоза. Обмен аналогичными участками гомологичных хромосом.

Моногибридное скрещивание - скрещивание организмов и анализ потомков по одной паре альтернативных признаков.

Мутон - наименьшая единица гена, подвергаемая мутации.

Наследственность - способность организмов передавать определенную программу развития, свойства и признаки из поколения в поколение. Благодаря этому родители и потомки имеют сходство в метаболизме, в составе тканей, характере обмена веществ, функциях, морфологических признаках и других особенностях.

Неконститутивные гены - это гены, обычно неактивные, но экспрессирующиеся только тогда, когда белок, который они кодируют, нужен клетке.

Обратная транскрипция - перенесение генетической информации от РНК к ДНК

Оператор - участок промотора, связывающий репрессор,

Оперон - последовательность специальных функциональных сегментов ДНК и структурных генов, которые кодируют синтез определенной группы белков одной метаболической цепи у прокариот.

Плейотропия - проявление множественных эффектов одного гена.

Полирибосомы (полисомы) - несколько рибосом, одновременно связанные с цепью мРНК.

Промотор - участок ДНК, к которому присоединяется РНК-полимераза и начинается транскрипция.

Процессинг - молекулярные механизмы обработки про-мРНК и превращение ее в мРНК.

Признаки - структурные, физиологические, патологические и другие характеристики организмов. Большинство признаков организма - *сложные*, т.к. их формирование требует образования многих веществ, в первую очередь белков. о таких процессах участвует большое количество генов.

Признаки альтернативные - различные варианты проявления определенного признака. Примеры альтернативных признаков; у гороха желтые или зеленые семена, морщинистые или гладкие, пурпурная или белая окраска цветков и т. д. Примерами альтернативных признаков у человека является праворукость или леворукость, положительный или отрицательный резус-фактор, наличие веснушек или их отсутствие, светлые или темные волосы и т. д.

Полигибридное скрещивание - скрещивание организмов и анализ потомков по двум и более парам альтернативных признаков.

Полирибосомы (полисомы) - несколько рибосом, одновременно связанные с цепью мРНК.

Промотор - участок ДНК, к которому присоединяется РНК-полимераза и начинается транскрипция.

Процессинг - молекулярные механизмы обработки про-мРНК и превращение ее в мРНК.

Рекон - наименьший участок ДНК, в пределах которого происходит рекомбинация.

Родословная - система расположения на схеме с помощью специальных символов признаков людей, связанных между собой родственными связями на протяжении нескольких поколений

Репарация ДНК - способность молекулы к исправлению повреждений с помощью специальных ферментов.

Репликация - уникальное свойство молекулы ДНК удваиваться перед делением клетки.

Репликон - отдельный фрагмент удваивающейся ДНК на

одной хромосоме.

Репрессор - белок-регулятор, не дающий возможность ферменту РНК-полимеразе присоединиться к промотору,

РНК - одноцепочечная макромолекула, состоящая из сотен нуклеотидов. Передает генетическую информацию от ДНК на белки.

РНК-полимераза - основной фермент синтеза РНК (транскрипции). Синтез белков — процесс образования полипептидной цепи из аминокислот на рибосомах по инструкции записанной в мРНК.

Синтез РНК - процесс образования полинуклеотидной цепи из нуклеотидов на матричной цепи ДНК.

Сплайсинг - процесс ферментативного «вырезания» интронов и «сшивания» экзонов.

Структурные гены - участки ДНК, кодирующие мРНК конкретных белков.

Терминаторный участок - участок ДНК, несущий сигнал об остановке транскрипции.

Терминация - заключительный этап синтеза нуклеиновых кислот или белков.

Точки инициации - участки нуклеиновых кислот, где начинается репликация, транскрипция или трансляция.

Транскриптон - участок молекулы ДНК, включающий промотор, транскрибируемую последовательность и терминатор.

Транскрипция - перенос информации с ДНК на РНК.

Трансляция - перенос информации с РНК на полипептидную цепь.

Транспозон - мобильный наследственный элемент в молекуле ДНК.

Трансгенез - перенос генов в геном другого организма.

Фенокопии - одинаковые признаки, развитие которых обусловлено геном или фактором среды.

Фенотип - совокупность всех признаков и свойств данного организма. В основе развития фенотипа лежит генотип. Примерами фенотипических признаков являются цвет, пол, размеры, частота сердечных сокращений, количество эритроцитов в мм³, эмоциональность и др. Термин «фенотип»

используется и в более узком смысле для обозначения конкретных признаков, которые изучаются в данном случае, например «карие глаза».

Хромосомы - палочкообразные тельца, образующиеся в момент деления клетки из хроматина в результате его суперспирализации. Хроматин состоит из ДНК и специальных белков. Хромосомы необходимы для равномерного распределения наследственного материала в дочерние клетки в процессе митоза или мейоза.

Цистрон - участок ДНК, содержащий информацию о синтезе одного белка.

Эзоны - последовательности азотистых оснований, которые кодируют аминокислоты.

Элонгация - процесс удлинения полинуклеотидной или полипептидной цепи.

Эписомы - плазмиды, которые реплицируются не самостоятельно, а в составе хромосомной ДНК, в которую они могут включаться.

**СПИСОК РЕКОМЕНДОВАННОЙ ДЛЯ
УГЛУБЛЕННОГО ЧТЕНИЯ ЛИТЕРАТУРЫ
(РАЗДЕЛ МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА)**

1. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж и др. Молекулярная биология клетки. Т.3 (под ред. Георгиева Г.П., М.: Мир, 1994)
2. Молекулярная биология. Структура и биосинтез нуклеиновых кислот/ Агол В.И., Богданов А.А., Гвоздев В.А. и др.-М.,1997
3. Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В. Геном человека и гены предрасположенности. Введение в предикативную медицину. – СПб.: 2000.
4. Баранов А.А., Шеплягина Л.А., Курмачева Н.А., Нестеренко О.С. Пренатальная и постнатальная профилактика иодного дефицита у детей первого года жизни.// Вестник Рос. Акад. межд. Наук. – 2001. - № 6. – с. 12-17.
5. Боринская С.А., Янковский Н.К. Структура прокариотических геномов.- Молекулярная биология,199, т.33, №6, с.941-957.
6. Бочков Н.П. Клиническая генетика. – М.: «Медицина», 1997. – 287 с.
7. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология.Пер. с англ.- Мир ,- 2002,-589с.
8. Жимулев И.Ф. Современные представления о структуре гена у эукариот // Соросовский образовательный журнал. – 2000, т.6, №7, с.17-26.
9. Игамбердиев А.У. Уникальная генетическая система митохондрий // Соросовский образовательный журнал. – 2000, т.6, №1, с.32-43.
10. Ланцов В.А. Репарация ДНК и Канцерогенез: Универсальные механизмы репарации а про – и эукариот и последствия их повреждения у человека. – Молекулярная биология.-1998, т.32, №5, с.757-772.
11. Льюин Б. Гены. М.: Мир, 1987, 544с.
12. Мацука Г.Х. Альтернативы в молекулярной биологии. -

- Молекулярная биология.-1998, т.32, №1, с.19-31.
13. Никонов С.В., Фоменкова Н.П., Никулин А.Д. с соавт. Структура рибосомы: РНК-белковые и белок – белковые взаимодействия.- Молекулярная биология.-1998, т.32, №5,с.773-778.
 14. Паткин Е.Л., Гайцхоки В.С. Сателлитные ДНК и болезни – возможные механизмы нестабильность минисателлитов. – Генетика, 2000, т.36, №9, с.1189-1194.
 15. Программированная клеточная гибель / под. ред. В.С. Новикова,-СПб.,1996.
 16. Прохорчук А.В., Рузов А.С. Метилирование генома и его роль в функционировании эукариотического организма.- Генетика.-2000, т.36, №11, с.1475-1486.
 17. Сингер М., Берг П. Гены и геномы. Пер.с англ.-Мир, 2002,- 764с.
 18. Сойфер В.Н. Международный проект «Геном человека» // Соросовский образовательный журнал. – 1998, №12, с.4-11.
 19. Сойфер В.Н. Исследования геномов к концу 1990 года.- Соросовский образовательный журнал. – 2000, т.6, №1, с.15-22.
 20. Свердлов Е.Д. Микросом генома. – Молекулярная биология.-1999, т.33, №6, с.917-940.
 21. Спирин А.С. Биосинтез белка: регуляция на уровне трансляции // Соросовский образовательный журнал. – 2000, т.6, №5,с.2-7.
 22. Спирин А.С. Биосинтез белка: Элонгация пептида и терминация трансляции // Соросовский образовательный журнал. – 1999, №6, с.2-7.
 23. Тейлор Д., Грин Н., Стаут У.-Биология , - изд-во Мир 2002.
 24. Translational Control / Ed. J.W.B Hershey etal. Cold Spring Harbor (N.Y): Cold Spring Harbor Labor. Prees, 1996, 794.
 25. Blumenthal T.Gene clusters and polycistronic transcription in eukaryote // Bio Essays.- 1998.- vol. 20. P. 480-487.
 26. Molecular and Cell Biology of Human Gene Therapeutics / Ed Dickson G. London; Glasqow; Weinheim; N.V.; Tokyo; Melbourn; Madres: Chapman and Hall Publishers, 1995, 403p.

РАЗДЕЛ « МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНЕТИКА»

1. Балаханов А.В. Ошибки развития. – СПб.: 2001. – 288 с.
2. Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В. Геном человека и гены предрасположенности. Введение в предикативную медицину. – СПб.: 2000.
3. Баранов В.С., Кузнецова Т.В., Иващенко Т.Э., Кащенко Т.К. Пренатальная диагностика. Медицинская диагностика (программы и алгоритмы): Справочник. СПб.: Интермедика, 1997. – с. 180 – 227.
4. Баранов А.А., Шеплягина Л.А., Курмачева Н.А., Нестеренко О.С. Пренатальная и постнатальная профи-лактика иодного дефицита у детей первого года жизни.// Вестник Рос. Акад. межд. Наук. – 2001. - № 6. – с. 12-17.
5. Берешева А.К. Роль молекулярно-цитогенетической диагностики в генетическом консультировании супружеских пар с нарушением репродуктивной функции: Автореферат. Харьков: 1995. – 17 с.
6. Бочков Н.П. Клиническая генетика. – М.: «Медицина», 1997. – 287 с.
7. Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б. Соловьев И.В. и др. Современные достижения молекулярной цитогенетики в диагностике. - Рос. вестн. перинат. и педиат. - 2002. - № 6. - с.17-23.
8. Германов В.Г., Федченко С.Н., Андрущенко О.Н. Клиническая генетика (учебное пособие). Луганск: 1999. – 116 с.
9. Горбунова В.Н., Баранов В.С. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. – СПб.: 1997. – 287 с.
10. Горин В.С., Серов В.Н., Жабин С.Г. Современные методы пренатальной диагностики хромосомных заболеваний. // Вестник 2000.: № 3. – с. 47-53.
11. Гулевская Т.С. с соавт. Прионные болезни человека и животных.- М.,1999.- с.27-61.
12. Козлова С.И., Демикова Н.С., Семанова Е., Блинникова О.Е.

Наследственные синдромы и медико-генетическое консультирование. – М.:1996. – 443 с.

13. Клинические лекции по акушерству и гинекологии /Под ред. А.Н.Стрижакова, А.И.Давыдова, Л.Д.Белоцерковцевой. – М.: Медицина, 2000. – С.122-138.
14. Кулаков В.И., Барашнев Ю.И. Современные биомедицинские технологии в репродуктивной и перинатальной медицине: перспективы, морально-этические и правовые проблемы. Рос. вестн. перинат. и педиат. - 2002. - № 6. - с. 4-22.
15. Островерхова Н.В. с соавт. Детекция анеуплоидии у спонтанных абортусов методом сравнительной геномной гибридизации. - Генетика, 2002. - т. 38, - № 12. - с. 1690-1698.
16. Завалишин И.А., Переседова А.В. Прионные болезни человека.- Рос.мед.журнал.-2002.-№4.-с.3-9.
17. Лаврова Д.Б., Самсыгина А.В., Михайлов А.В. Этиология и показатели высокого риска внутриутробного инфицирования плода// Педиатрия. – 1997. - №3. – С.94-98.
18. Лазюк Г.И. Тератология человека. М.: 1991. – 480 с.
19. Пренатальная диагностика врожденных пороков развития плода / Ромер Р., Пилу Д., Джети Ф. и др. – М.: 1994. – с. 222-267.
20. Пустотина О.А., Бубнова Н.И. Диагностика внутриутробной инфекции (компоненты последа и амниотической жидкости) //Акушерство и гинекология. – 1999. - №4. – С.3-5.
21. Снайдерс Р.Дж. М., Николандес К.Х. Ультразвуковые маркеры хромосомных дефектов плода. – М.: 1997. – 410 с.
22. Сопко Н.И., Гордиенко И.Ю., Тарапунова Е.Н. и соавт. Возможности пренатального скрининга в первом триместре беременности / Методические рекомендации. – К.: 2000. – с. 5–9.
23. Сопко Н.И., Зукин В.Д., Веселовский В.В., Зипченко В.М. Роль интегрированного теста в пренатальной диагностике хромосомных анеуплоидий. – Вісник асоціації акушерів-

- гінекологів в Україні – 2001, № 4. – с. 3–8.
24. Степанківська Г.К., Михайленко О.Т. Акушерство. – К.: Здоров'я. – 2000. – 514с.
 25. Шабалов Н.П. Неонатология. – С-Пб.: “Специальная литература”, 1997. – Т. II. – С. 43-76.
 26. De Arse M., Kearns A. The fragile X syndrome: the patients and their chromosomes. - *J. Lud. Genet.* 1984. - v. 21, p. 84-91.
 27. ISCN 1995. An international system for human cytogenetic nomenclature. F. Mitelman, S. Karger (ed.). Basel 1995. – 115.
 28. Mendelian inheritance in man. - 12-th ed.; Vol 1, 2, 3. - Baltimore; Y.H. University Press, 1998.
 29. Wald N.J., Cuckle H.S., Densern J.W., Kennard A., Smith D. Maternal serum screening for Down's Syndrome: the effect of routine ultrasound scan determination of gestational age and adjustment for maternal weight. *Br. J. Obstet, Gynaecol.* 1999. – 144–149.

От автора

Цель настоящей книги состоит в систематизированном и достаточно кратком изложении вопросов генетики, отражающих современный уровень знаний. В ее основу положено содержание курса лекций по общей и медицинской генетике.

Разделы «Молекулярные основы наследственности» и «Молекулярные основы изменчивости» написаны на основе, как новых лекционных материалов, так и ранее выпущенного автором пособия «Молекулярные основы генетики» (2002) с некоторыми изменениями и дополнениями, которые коснулись молекулярных основ патологии апоптоза, прионных болезней.

Разделы «Наследственные болезни и врожденные пороки развития», «Медико-генетическое консультирование» написаны на основе выпущенного автором пособия «Спадкові та вроджені хвороби, сучасні методи діагностики і тактика лікування» (С.С. Луб'яна, С.М.Федченко, 2002 р.) с дополнениями, которые в наибольшей степени коснулись природы мультифакториальных заболеваний (МФЗ), изложены новые подходы в изучении генетики МФЗ. Обращено внимание на болезни геномного импринтинга.

Материалы настоящего пособия отбирались с учетом их значения для последующего успешного освоения курса медицинской генетики, а в перспективе - и клинических дисциплин. Особые усилия автора были направлены на поиск оптимального соотношения объема излагаемых теоретических и практических данных. Медицинская направленность излагаемых сведений отражает четкую ориентацию на задачи подготовки врача. По этой причине все приведенные сведения относятся к человеку. Приведены ситуационные задачи, тесты и краткий терминологический словарь. Особое внимание в книге уделено организации текста. Материал каждой главы разделен на смысловые разделы и рубрифицирован, составлен подробный указатель.

Схемы и рисунки, приведенные в книге, частично выполнены автором, частично заимствованы из следующих источников: Б. Альбертс «Молекулярная биология клетки», изд-во Мир, 1996;

Н.П.Бочков «Медицинская генетика», М., 1997; К.Штерн « Основы генетики», М., 1965; Г.Ф.Жегунов с соавт. «Цитогенетические основы жизнедеятельности», Харьков-2002. Использовались журналы: «Генетика», «Соросовский образовательный журнал», «Молекулярная биология» и др. приведенные в списке литературы.

Заведующая кафедрой медицинской паразитологии и генетики Луганского государственного медицинского университета

УДК 575.113(07)

Федченко С.Н.

Общая и медицинская генетика // Учебное пособие для студентов медицинских вузов– Луганск, 2003. - 480 с.

ISBN 966-7709-17-5

Учебное пособие содержит современные данные о строении гена, биосинтезе белка. Изложены новые данные о строении промотора, энхансера, о свойствах генетического кода (колинеарности, непрерывности и т.д.), рассмотрены источники сложности транскрипции, трансляции, репликации ДНК. На основе новых медико-генетических знаний изложены современные методы диагностики наследственных заболеваний. Учебное пособие содержит сведения о генетической инженерии. Большое внимание уделено генной терапии и связанным с ней морально-этическим проблемам. В книге сформулированы основные положения молекулярной биологии и генетики, что делает ее незаменимым руководством для специалистов и самым современным пособием для студентов медиков, связывающих свое будущее с медициной 21 века. Пособие составлено в полном соответствии с программой Минздрава Украины для студентов медицинских и фармацевтических вузов IV уровня аккредитации.