

МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНЕТИКА

Горбунова В. Н.

УЧЕБНИК

для студентов медицинских вузов и
слушателей последипломного образования

Оглавление

Предисловие

Введение. Предмет медицинской генетики

Часть I. ОБЩАЯ ГЕНЕТИКА

Глава 1.1. Законы Менделя

Глава 1.2. Хромосомная теория наследственности

Глава 1.3. Спонтанный и индуцированный мутагенез

Глава 1.4. Цитогенетические карты генов

Глава 1.5. Типы наследования признаков

Глава 1.6. Генетика популяций

Глава 1.7. Структура вещества наследственности – ДНК

Глава 1.8. Центральная догма молекулярной генетики

Глава 1.9. Структура и экспрессия генов эукариот

Глава 1.10. Мутации генов

Глава 1.11. Обратная генетика, генная инженерия

Глава 1.12. Генетические основы развития

Глава 1.13. Структура генома эукариот, мобильная генетика

Глава 1.14. Эпигенетическая изменчивость

Глава 1.15. Геномика, проект «Геном человека»

Глава 1.16. Молекулярно-генетические основы эволюции

Часть II. МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНЕТИКА

Глава 2.1. Наследственные болезни, общая характеристика

2.1.1. Хромосомные болезни

2.1.2. Моногенные болезни

2.1.3. Мультифакториальные болезни

Глава 2.2. Методы медицинской генетики

2.2.1. Клинико-генеалогический метод

2.2.2. Близнецовый метод

2.2.3. Популяционный метод

2.2.4. Цитогенетический метод

- 2.2.5. Биохимический и иммунологический методы
- 2.2.6. Молекулярно-генетические методы
- Глава 2.3. Хромосомные болезни
 - 2.3.1. Трисомии
 - 2.3.1.1. Синдром Дауна
 - 2.3.1.2. Синдром Патау
 - 2.3.1.3. Синдром Эдвардса
 - 2.3.2. Аномалии половых хромосом
 - 2.3.2.1. Болезнь Клейнфельтера
 - 2.3.2.2. Болезнь Шерешевского-Тернера
 - 2.3.3. Структурные аномалии хромосом
- Глава 2.4. Менделирующие признаки человека
 - 2.4.1. Наследование групп крови (системы АВ0, MN, Rh)
- Глава 2.5. Аутосомно-доминантные заболевания
 - 2.5.1. Наследственные дисплазии соединительной ткани
 - 2.5.1.1. Наследственные коллагенопатии
 - 2.5.1.2. Болезнь Марфана
 - 2.5.1.3. Нарушения морфогенеза соединительной ткани
 - 2.5.2. Аутосомно-доминантные болезни нервной системы
 - 2.5.2.1. Моторно-сенсорные полинейропатии
 - 2.5.2.2. Боковой амиотрофический склероз
 - 2.5.2.3. Наследственные факоматозы
- Глава 2.6. Аутосомно-рецессивные заболевания
 - 2.6.1. Муковисцидоз
 - 2.6.2. Проксимальная спинальная амиотрофия
 - 2.6.3. Наследственные болезни обмена
 - 2.6.3.1. Фенилкетонурия
 - 2.6.3.2. Галактоземия
 - 2.6.3.3. Ганглиозидозы и сфинголипидозы
 - 2.6.3.4. Мукополисахаридозы
 - 2.6.3.5. Аденогенитальный синдром
 - 2.6.3.6. Гепатолентикулярная дегенерация
- Глава 2.7. Сцепленные с полом заболевания
 - 2.7.1. Фосфатдиабет
 - 2.7.2. Гемофилия А и В
 - 2.7.3. Миодистрофия Дюшенна/Беккера
 - 2.7.4. Отцовский или голландрический тип наследования
- Глава 2.8. Нетрадиционные типы наследования
 - 2.8.1. Митохондриальный или цитоплазматический тип наследования
 - 2.8.2. Однородительские дисомии и геномный импринтинг
 - 2.8.3. Болезни экспансии
 - 2.8.3.1. Синдром Мартина-Белл
 - 2.8.3.2. Митохондриальная дистрофия
 - 2.8.3.3. Хорея Гентингтона

- 2.8.4. Миодистрофия Ландузи-Дежерина как пример заболевания, обусловленного нарушением эпигенетической регуляции экспрессии генов
- Глава 2.9. Примеры биохимической классификации моногенных заболеваний
 - 2.9.1. Наследственные болезни мышц
 - 2.9.2. Наследственные кардиомиопатии
- Глава 2.10. Генетический контроль предрасположенности к мультифакториальной патологии
 - 2.10.1. Генетические факторы риска сердечно-сосудистой патологии
 - 2.10.2. Другие примеры использования генетических факторов риска
 - 2.10.3. Роль генов детоксикации в формировании наследственной предрасположенности
 - 2.10.4. Проблемы генетической паспортизации
- Глава 2.11. Фармакогенетика
- Глава 2.12. Генетические основы канцерогенеза
 - 2.12.1. «Рак – болезнь генов»
 - 2.12.2. Наследственные опухолевые синдромы
- Глава 2.13. Врожденные пороки развития
 - 2.13.1. Дефекты зародка нервной трубки
 - 2.13.2. Врожденные пороки сердца
 - 2.13.3. Расщелина губы и/или неба
- Глава 2.14. Медико-генетическое консультирование
 - 2.14.1. Цели и задачи медико-генетического консультирования
 - 2.14.2. Кто «виноват» в рождении детей с моногенной патологией?
 - 2.14.3. Показания для направления на консультацию к врачу-Генетику
 - 2.14.4. Организация медико-генетической службы
- Глава 2.15. Скрининговые программы как профилактика врожденной и наследственной патологии
 - 2.15.1. Биохимический скрининг маркерных белков при беременности
 - 2.15.2. Неонатальный биохимический скрининг
- Глава 2.16. Пренатальная диагностика наследственных заболеваний
 - 2.16.1. Пренатальная диагностика хромосомных болезней
 - 2.16.2. Пренатальная диагностика моногенных болезней
- Глава 2.17. Молекулярная диагностика инфекций
- Глава 2.18. Геномная дактилоскопия
- Глава 2.19. Лечение больных с врожденной и наследственной патологией

- 2.19.1. Симптоматическое лечение
- 2.19.2. Патогенетическое лечение
- 2.19.3. Этиологическое лечение

Заключение

Рекомендуемая литература

Предисловие

Введение. Предмет медицинской генетики

Фундаментальными свойствами живой природы, отличающими ее от неживой материи, являются способность к размножению и наследственность, которая заключается в том, что особи любых видов рожают только себе подобных и их потомки, в среднем, более похожи на своих родственников, чем на других представителей того же вида. При этом каждый вид характеризуется определенным уровнем изменчивости, и даже братья и сестры никогда не являются точными копиями друг друга и своих родителей.

Генетика это наука о наследственности и изменчивости. Как любая другая биологическая наука генетика состоит из общих и частных разделов. Общие разделы посвящены изучению материальных основ наследственности и изменчивости. Они включают анализ вещества наследственности, которым являются молекулы ДНК, изучение способа упаковки генетического материала в клетках и его наследственной передачи в ряду поколений, структуры и мутаций генов, типов наследования, основных информационных процессов, а также многие другие вопросы. В частных разделах генетики исследуются особенности проявления общих теоретических закономерностей у разных видов организмов. Среди них ведущее положение занимает генетика человека. Те ее направления, которые посвящены патологии человека, являются предметом *медицинской генетики*.

Основной целью медицинской генетики является изучение роли генетических составляющих в этиологии и патогенезе различных заболеваний человека. Эти болезни делятся на два класса: собственно

наследственные болезни, куда входят *хромосомные и генные заболевания*, и болезни с наследственной предрасположенностью, которые называют *мультифакториальными заболеваниями*. Хромосомными являются болезни, вызванные нарушением числа, либо структуры хромосом. Генные болезни обусловлены присутствием мутаций в генах. *Моногенными* называются болезни, обусловленные присутствием мутаций в одном гене. В этиологии мультифакториальных заболеваний наряду с действием неблагоприятных внешних факторов существенное влияние оказывают состояния не одного, а многих генов. Количество этих генов, формирующих наследственную предрасположенность к заболеванию, иногда исчисляется десятками или даже сотнями. К мультифакториальным относятся большинство наиболее распространенных болезней человека.

В задачи медицинской генетики входят: диагностика наследственных заболеваний, анализ их распространенности в различных популяциях и этнических группах, медико-генетическое консультирование семей больных, профилактика наследственных заболеваний на базе пренатальной (дородовой) диагностики, изучение молекулярно-генетических основ этиологии и патогенеза наследственных заболеваний, выявление генетических факторов риска мультифакториальных заболеваний.

В последние десятилетия произошел огромный прогресс в области медицинской генетики, значение которого трудно переоценить. Основой для этого послужили успехи в области молекулярной генетики, завершившиеся расшифровкой структуры генома человека, идентификацией всех его генов и определением молекулярной природы подавляющего большинства белков. В настоящее время происходит интенсивное изучение ассоциации различных генов человека с моногенными и мультифакториальными заболеваниями. Эти исследования являются основой для планомерной разработки совместно со специалистами различных медицинских профилей новых патогенетических и этиологических методов лечения наследственных

заболеваний, а также предупреждения развития тех заболеваний, к которым у человека имеется генетическая склонность.

Для эффективного внедрения в клинику этих достижений необходимо, чтобы каждый врач был знаком с основными законами наследственной передачи признаков и владел навыками их практического использования. Выявить больного с наследственной патологией, определить ее характер и направить в соответствующий центр для оказания специализированной медико-генетической помощи – вот те минимальные задачи, которые должен решать любой врач и, в первую очередь, участковый.

Часть I. ОБЩАЯ ГЕНЕТИКА

Глава 1.1. Законы Менделя

Основополагающие законы наследования были открыты во второй половине XIX века Грегором Менделем. В своих знаменитых опытах Г. Мендель скрещивал различные сорта гороха, различающиеся по семи стабильно наследующимся морфологическим признакам, касающимся, главным образом, формы и окраски семян или цветков. Затем на протяжении нескольких последующих поколений он проводил количественный учет растений отдельно по каждому из этих признаков. Оказалось, что при этих условиях все гибриды первого поколения были похожи на одного из родителей. Эти наблюдения явились основой для формулировки первого закона Менделя – *закона единообразия гибридов первого поколения*. Тот признак, который проявлялся у гибридов первого поколения, был назван Менделем *доминантным*, а не проявляющийся признак – *рецессивным*. В дальнейшем было показано, что этот закон относится к разряду общебиологических закономерностей. Следует подчеркнуть, что доминирование не всегда является абсолютным. Так, например, при скрещивании растений с красными и белыми цветками у гибридов может наблюдаться промежуточная, розовая окраска цветков. В этом случае говорят о *неполном доминировании*.

Во втором поколении при самоопылении гибридов появлялись растения, как с доминантным, так и с рецессивным признаком, в среднем, в соотношении 3:1. Это второй закон Менделя – *закон расщепления признаков*. Конечно, этот закон реализуется только на больших выборках. Если мы ограничимся анализом одной семьи, то есть исследуем потомство от скрещивания всего лишь двух гибридных растений, то соотношения по признакам могут оказаться любыми. Для получения этой закономерности необходимо суммировать результаты анализа потомства от скрещивания многих гибридных растений, причем, чем больше будет исследованная выборка потомков, тем точнее реальное распределение по признакам будет приближаться к гипотетическому значению 3:1. Для обнаружения этой закономерности Менделю пришлось подсчитать более 10 000 растений. Заметим, что при неполном доминировании во втором поколении будут наблюдаться все формы растений: первая родительская, гибридная и вторая родительская, в среднем, в соотношении 1:2:1 соответственно.

Наблюдаемые закономерности позволили Менделю высказать гипотезу о существовании двух дискретных наследственных факторов, ответственных за каждый из исследуемых признаков – доминантного, который он обозначил заглавной буквой *A*, и рецессивного – *a*. Следующее предположение заключалось в том, что только один из этих факторов попадает в зародышевые клетки или *гаметы*. Таким образом, исходные сорта гороха несут два одинаковых наследственных фактора, ответственных за изучаемый признак, в одном сорте это *AA*, а в другом – *aa*. Гибриды первого поколения несут оба наследственных фактора – *Aa*. И хотя рецессивный фактор (*a*) не проявляется в присутствии доминантного (*A*), но он и не исчезает. Эти два дискретных наследственных фактора не сливаются друг с другом, и каждый из них с равной вероятностью попадает в различные половые клетки. Более того, гаметы как с доминантным, так и с рецессивным факторами в равной степени участвуют в оплодотворении. В результате образуются растения трех типов: *AA*, *Aa* и *aa* в соотношении 1:2:1.

В дальнейшем для упрощения понимания закономерностей наследования было предложено использовать так называемую *решетку Пеннета* – таблицу, в первой строке и первом столбце которой записываются типы женских и мужских гамет, а на их пересечении типы образующихся потомков. В нашем случае эта таблица выглядит следующим образом:

Таблица 1.

Решетка Пеннета для моногибридного скрещивания

| Гаметы ♀/♂ | <i>A</i> | <i>a</i> |
|------------|-----------|-----------|
| <i>A</i> | <i>AA</i> | <i>Aa</i> |
| <i>a</i> | <i>Aa</i> | <i>aa</i> |

Поскольку рецессивный наследственный фактор не проявляется в присутствии доминантного, растения *AA* и *Aa* внешне будут идентичны друг другу, и по признаку будет наблюдаться расщепление 3:1. Эти гениальные предположения Менделя получили название *гипотезы чистоты гамет*. Заметим, что при неполном доминировании распределения по наследственным факторам и по признакам совпадают.

При описании схемы скрещивания в генетике используются следующие обозначения: родители – P (от лат. parentes – родитель), особи женского пола – ♀ (зеркало Венеры), мужского – ♂ (щит и копье Марса), скрещивание – x (знак умножения), потомство от скрещивания – F (от лат. filialis – сыновний) с цифровым индексом: F₁ – первое поколение, F₂ – второе и т.д. Черточка, стоящая справа от доминантного фактора, (*A*_) означает то, что на этом месте может стоять как доминантный, так и рецессивный фактор. Запишем в этих обозначениях схему скрещивания, использованную Менделем, которая в дальнейшем получила название *моногибридного скрещивания* – рис. 1.

P: *AA* x *aa*
гаметы: *A* *a*
потомство F₁: *Aa*

$$\begin{array}{l}
 F_1: \quad \quad \quad Aa \quad \times \quad Aa \\
 \text{гаметы:} \quad \quad \quad A \ a \quad \quad A \ a \\
 F_2, \text{ расщепление по генотипу:} \\
 \quad \quad \quad 1AA \quad : \quad 2Aa \quad : \quad 1aa \\
 F_2, \text{ расщепление по признаку:} \\
 \quad \quad \quad 3A_ \quad : \quad 1aa
 \end{array}$$

Рисунок 1. Моногибридное скрещивание

Подчеркнем еще раз, что успех этих опытов в значительной степени был предопределен тем, что Мендель вел количественный учет растений отдельно по каждому из признаков. Подобная методология скрещиваний, позволяющая получать и анализировать гибриды называется *гибридологическим анализом*. При изучении наследования сразу двух признаков (дигибридное скрещивание), оказывалось, что каждый из них ведет себя независимо друг от друга. Это приводит к тому, что во втором поколении наблюдаются 4 группы растений: имеющих одновременно оба доминантных признака или только один из двух доминантных признаков или не имеющих доминантных признаков, в соотношении 9:3:3:1. Разберем эту ситуацию более подробно. Обозначим доминантный и рецессивный наследственный фактор, ответственный за первый признак - A и a , а за второй признак – B и b , соответственно. В этих обозначениях исходные родительские сорта будут иметь наследственные факторы $AABB$ и $aabb$, а схема дигибридного скрещивания будет выглядеть следующим образом:

$$\begin{array}{l}
 P: \quad \quad \quad AABB \quad \quad \times \quad aabb \\
 \text{гаметы:} \quad \quad \quad AB \quad \quad \quad ab \\
 \text{потомство } F_1: \quad \quad \quad AaBb \\
 \\
 F_1: \quad \quad \quad AaBb \quad \quad \times \quad AaBb \\
 \text{гаметы:} \quad \quad \quad AB \ Ab \ aB \ ab \quad \quad AB \ Ab \ aB \ ab \\
 F_2, \text{ расщепление по генотипу:}
 \end{array}$$

1AABB : 2 AABb : 2AaBB : 4AaBb : 1AAbb : 2Aabb : 1aaBB : 2aaBb : 1aabb

F₂, расщепление по признакам:

9A_ B_ : 3A_ bb : 3aa B_ : 1aabb

Рисунок 2. Дигибридное скрещивание

Таблица 2.

Решетка Пеннета для дигибридного скрещивания

| Гаметы ♀/♂ | AB | Ab | aB | ab |
|------------|------|------|------|------|
| AB | AABB | AABb | AaBB | AaBb |
| Ab | AABb | AAbb | AaBb | Aabb |
| aB | AaBB | AaBb | aaBB | aaBb |
| ab | AaBb | Aabb | aaBb | aabb |

При тригибридном скрещивании количество различных комбинаций признаков в F₂ увеличивается до 8, и соотношения становятся еще более сложными (27:9:9:9:3:3:3:1). Попробуйте нарисовать схему тригибридного скрещивания и решетку Пеннета для этой схемы, и Вы убедитесь в справедливости этих соотношений.

На основании своих наблюдений Мендель сформулировал *закон независимого комбинирования признаков*. Однако этот закон оказался справедлив далеко не для всех признаков, определяемых одним наследственным фактором. Он соблюдается только в том случае, если эти наследственные факторы находятся в разных хромосомах. Но об этом речь будет идти позднее.

К сожалению, работы Грегора Менделя остались незамеченными современниками, и его законы были независимо вновь открыты в самом начале XX века тремя исследователями, один из которых В. Иогансен предложил назвать постулированные Менделем наследственные факторы *генами*, совокупность генов – *генотипом*, а совокупность признаков организма – *фенотипом*. Варианты наследственных факторов или

альтернативные состояния генов (доминантный, рецессивный) носят названия *аллелей*. Генотип может быть *гомозиготным* при наличии двух одинаковых аллелей (AA или aa) или *гетерозиготным*, если аллели разные (Aa). В некоторых случаях отношения доминантности и рецессивности отсутствуют и оба аллеля проявляются в фенотипе. Этот тип взаимоотношения аллелей называется *кодоминированием*.

Аллели или состояния генов влияют на характер развития признаков, что и служит основой для фенотипической изменчивости. Конечно, не менее важную роль в этом играют факторы окружающей среды. Если эта изменчивость не выходит за пределы нормы, то соответствующие аллели называют *нормальными или аллелями дикого типа*. Нормальные аллели, обычно, имеют широкое распространение, однако их частоты в разных популяциях и этнических группах могут существенно различаться. Те аллели, частоты которых в популяции превышают определенный уровень, например 5%, называют *полиморфными аллелями* или *полиморфизмами*. Аллели, приводящие к патологическому развитию признака, называют *мутантными аллелями или мутациями*. В популяциях они встречаются гораздо реже, так как оказывают отрицательное влияние на общую жизнеспособность и потому подвергаются давлению естественного отбора. Мутации разных генов ассоциированы с наследственными болезнями человека. Сочетания нормальных и мутантных аллелей различных генов определяют индивидуальную *наследственную конституцию* каждого человека. Таким образом, люди отличаются между собой не по наборам генов, а по их состояниям, то есть по наследственной конституции.

Законы Менделя справедливы для *моногенных признаков*, которые также называют *менделирующими*. Чаще всего, их проявления носят качественный альтернативный характер: коричневый или голубой цвет глаз, темная или светлая окраска кожи, наличие или отсутствие какого-то наследственного заболевания и т. д. В формировании других признаков, таких как рост, вес, характер телосложения или тип поведения, могут

участвовать десятки или даже сотни генов. Степень выраженности подобных признаков у отдельных особей часто может быть измерена количественно, и потому такие признаки называют *количественными*.

Является ли признак моногенным и подчиняется ли характер его наследственной передачи в ряду поколений законам Менделя, легко установить экспериментально, проводя определенные схемы скрещивания между растениями или животными. Но термин скрещивание не применим к человеку, так как браки между людьми заключаются на добровольной основе. Мы можем только изучать последствия этих браков, то есть составлять родословные человека, анализ которых и дает нам возможность судить о том, является ли тот или иной признак моногенным и подчиняется ли он законам Менделя.

Приведем пример подобного анализа. В качестве альтернативного признака выберем карюю и голубую окраску глаз. В русском селе на протяжении нескольких поколений дети во всех семьях голубоглазые, а в осетинском селе – кареглазые. Русский юноша женился на осетинке, а ее односельчанин женился на голубоглазой русской девушке. В каждой из этих двух семей родилось по пятеро детей, и все они оказались кареглазыми. На этом этапе мы с большой уверенностью можем утверждать, что карья окраска глаз доминирует над голубой. Дети этих двух семей воспитывались вместе, и два брата из первой семьи женились на двух сестрах из второй семьи. У первого брата родилось шестеро детей, и все оказались кареглазыми. У второго брата родилось семеро детей, из них один мальчик и одна девочка оказались голубоглазыми. Очевидно, что первый брат либо его супруга являются гомозиготами по карей окраске глаз. А второй брат и его супруга оба гетерозиготны по гену, контролирующему окраску глаз. Два сына первого брата женились на голубоглазых девушках. У первого сына пятеро детей оказались кареглазыми, а у второго трое из шестерых детей оказались голубоглазыми. Очевидно, что либо отец, либо мать этих двух

сыновей гетерозиготны в отношении окраски глаз, первый сын гомозиготен по карей окраске, а второй гетерозиготен.

Для того чтобы облегчить анализ наследственной передачи признака в семье строят ее родословную. При этом используют символы, представленные на рис. 3. На одной линии должны быть размещены все родственники, относящиеся к одному поколению. Поколения обозначают римскими цифрами, а отдельных членов каждого поколения – арабскими. В этом случае каждый член семьи будет иметь свой индивидуальный номер из одной римской и одной арабской цифры. Нарисуем родословную нашей семьи и постараемся определить возможные генотипы ее участников (рис. 4):

$I_1 (AA)$ – осетинская девушка, $I_2 (aa)$ – русский юноша (первая семья);

$I_3 (aa)$ – русская девушка, $I_4 (AA)$ – осетинский юноша (вторая семья).

$II_{1-3} (A_)$ – неженатые дети первой семьи;

$II_4 (Aa)$ и $II_9 (Aa)$ – семья первого брата;

II_5 и II_6 – семья второго брата, один из супругов AA , а другой Aa ;

$II_{7, 8, 10} (A_)$ – неженатые дети второй семьи.

$III_1 (aa)$ – голубоглазая девушка, вышедшая замуж за первого сына – $III_2 (AA)$;

$III_{3-6} (A_)$ – неженатые дети первого сына;

$III_7 (Aa)$ – второй сын, женившийся на голубоглазой девушке – $III_8 (aa)$;

$III_9 (aa)$ – голубоглазый сын первого брата;

$III_{10-13, 15} (A_)$ – кареглазые дети первого брата;

$III_9 (aa)$ – голубоглазая дочь первого брата.

Таким образом, голубоглазые люди являются рецессивными гомозиготами (aa), а кареглазые могут быть либо доминантными гомозиготами (AA), либо гетерозиготами (Aa). У двух голубоглазых родителей дети всегда голубоглазые. А у двух кареглазых родителей могут родиться голубоглазые дети с вероятностью 25% в том случае, если они оба гетерозиготны (Aa). Если хотя бы один из родителей гомозиготен по карей окраске глаз (AA), все дети будут кареглазыми, но голубоглазым может

оказаться кто-то из внуков. Если в браке кареглазого супруга с голубоглазым часть детей оказываются голубоглазыми, значит кареглазый супруг гетерозиготен по гену, контролирующему окраску глаз (Aa).

Глава 1.2. Хромосомная теория наследственности

На рубеже XIX и XX веков были изучены основные этапы деления клетки. Время жизни клетки с момента ее образования до деления составляет *клеточный цикл*. Клеточный цикл делится на стадии, ярчайшей из которых в морфологическом отношении является *митоз* или собственно деление клетки. Период между митозами называется *интерфазой*. Ключевая роль в митозе принадлежит *хромосомам* – таким структурам в ядрах клеток, которые в период деления отчетливо видны при световой микроскопии и использовании специфических методов окрашивания. Окрашивающееся вещество хромосом называется *хроматином*. Впервые существование хромосом было показано Флемингом в 1882 году. Термин хромосома впервые введен Валдеером в 1888 году (греч.: *chroma* - окраска; *soma* - тело).

Набор хромосом одной клетки называется *кариотипом*. Число и морфология хромосом относятся к видовым признакам. Различные виды организмов различаются по кариотипу, в то время как в пределах одного вида таких различий не наблюдается, и аномалии кариотипа чаще всего ассоциированы с тяжелыми патологическими состояниями. В каждой хромосоме есть важный функциональный участок, который называется *центромерой*. Центромера разделяет хромосому на два плеча: *короткое (p)* и *длинное (q)*. Хромосомы делят на группы в зависимости от их длины и локализации центромеры. В соматических клетках высших каждая хромосома представлена двумя копиями, то есть *диплоидным набором*. И только в половых клетках наблюдается одинарный или *гаплоидный набор* хромосом. Это обеспечивается за счет особой формы деления половых клеток – *мейоза*.

Первые обширные исследования, касающиеся структуры и морфологии хромосом, в нашей стране были проведены на растительных

объектах в 20-е годы прошлого века выдающимся цитологом и эмбриологом С. Г. Навашиным и его талантливыми учениками – М. С. Навашиным, Г. А. Левитским, Л. Н. Делоне. В 1924 году Г. А. Левитский опубликовал первое в мире руководство по цитогенетике: «Материальные основы наследственности», в котором, в частности, он ввел понятие кариотипа в том значении, в котором этот термин употребляется и в настоящее время.

Рассмотрим более подробно основные стадии клеточного цикла – рис. 5, этапы митоза – рис. 6 и мейоза – рис. 7.

Рисунок 5. Клеточный цикл

Клетка, закончившая деление находится в стадии G_0 . Самой длительной стадией интерфазы является период относительного покоя клетки – G_1 , ее продолжительность может значительно варьировать. Примерно в середине стадии G_1 имеется контрольная точка, при достижении которой клетка неизбежно вступает в деление. После G_1 начинается очень важная синтетическая стадия S , в процессе которой происходит удвоение каждой хромосомы с образованием двух *хроматид*, соединенных между собой одной центромерой. Далее следует подготовка к митозу – стадия G_2 и сам митоз – стадия M .

Рисунок 6. Митоз

Митоз, в свою очередь, также делится на стадии. На стадии *профазы* происходит исчезновение ядерной мембраны, конденсация или уплотнение хромосом за счет их спирализации, миграция центриолей к противоположным полюсам, приводящая к поляризации клетки, и формирование *веретена деления*, состоящего из микротрубочек. Нити микротрубочек тянутся от одного полюса до другого и к ним прикрепляются центромеры хромосом. В период *метафазы* центромеры располагаются по

экватору клетки перпендикулярно оси веретена деления. Именно в этот период хромосомы особенно отчетливо видны, так как они находятся в наиболее компактном состоянии. На стадии *анафазы* происходит разделение центромер, хроматиды превращаются в самостоятельные хромосомы и, увлекаемые центромерами, начинают двигаться к противоположным полюсам клетки по нитям веретена деления. На заключительной стадии – *телофазе* – происходит деспирализация хромосом, исчезает веретено деления, формируется ядерная мембрана и происходит разделение цитоплазмы. На стадии интерфазы при обычной световой микроскопии хромосомы как отдельные структуры не видны, окрашены только зерна хроматина, случайным образом распределенные по ядру.

Рисунок 7. Мейоз

Мейоз происходит только при образовании половых клеток, и он включает два клеточных деления: *мейоз I* или *редукционное деление* и мейоз II. Во время профазы мейоза I гомологичные хромосомы конъюгируют (сливаются) друг с другом по всей длине, образуя *бивалент*. В это время может происходить обмен участками между несестринскими хроматидами – *кроссинговер* или гомологичная рекомбинация (рис. 8.)

Рисунок 8. Кроссинговер

В точке рекомбинации образуется видимая в световой микроскоп крестообразная структура – *хиазма*. Обмен происходит только между двумя из четырех хроматид. Хиазмы формируются случайно, и их число, в среднем, зависит от длины хромосомы: чем длиннее хромосома, тем больше хиазм. На стадии метафазы биваленты выстраиваются в экваториальной плоскости, при этом центромеры случайно ориентируются относительно полюсов клетки. На стадии анафазы гомологичные хромосомы отделяются друг от друга и начинают двигаться к противоположным полюсам. При этом

расщепления центромеры не происходит, и сестринские хроматиды оказываются связанными. Однако они могут быть уже не идентичны друг другу из-за произошедшего кроссинговера. Таким образом, в процессе мейоза I из одной диплоидной клетки образуются две гаплоидные. Промежуток между первым и вторым делениями мейоза называется *интеркинезом*. Он может быть достаточно продолжительным, при этом хромосомы декомпактизируются и выглядят также как в интерфазе. Важно подчеркнуть, что на этой стадии не происходит удвоения хроматид.

В профазе мейоза II восстанавливается веретено деления, хромосомы располагаются в экваториальной плоскости. В анафазе II происходит расщепление центромер, и хромосомы двигаются к противоположным полюсам. Таким образом, на один акт удвоения хромосом приходится два последовательных цикла деления клетки. После завершения телофазы II диплоидная родительская клетка делится на четыре гаплоидные половые клетки, причем образовавшиеся гаметы не идентичны друг другу – фрагменты материнских и отцовских хромосом находятся в них в различных комбинациях.

Исследуя процессы митоза и мейоза У. Сэттон и Е. Бовери в 1902 г. пришли к заключению, что постулированные Менделем наследственные факторы или гены находятся в хромосомах, так как поведение хромосом соответствует поведению этих наследственных факторов. Действительно, Мендель предположил, что в соматических клетках содержатся две копии наследственного фактора, отвечающего за один и тот же признак или, как мы уже определили, два аллеля одного гена. Эти аллели могут быть идентичными – AA или aa , либо разными – Aa . Но в половые клетки попадает только один из аллелей – A или a . Вспомним, что гомологичные хромосомы в соматических клетках также содержатся в двух копиях, и только одна из них попадает в гаметы. При оплодотворении двойной набор хромосом и аллелей гена восстанавливается.

Прямые доказательства локализации генов в хромосомах были получены позднее Т. Морганом (1910) и К. Бриджесом (1916) в опытах на дрозофиле. Возвращаясь к законам Менделя, заметим, что независимое комбинирование справедливо только для тех признаков, гены которых находятся в разных хромосомах. Родительские аллели генов, локализованных в одной хромосоме, имеют большую вероятность совместного попадания в одну и ту же половую клетку. Таким образом, появилось представление о гене, как об участке хромосомы или хромосомном *локусе*, который отвечает за один признак и одновременно является единицей рекомбинации и мутации, ведущей к изменению фенотипа.

Хромосомы высших организмов состоят из *эухроматина* и *гетерохроматина*, сохраняющего свое компактное положение на протяжении всего клеточного цикла. Именно гетерохроматин виден в интерфазных ядрах в виде окрашенных гранул. Большое количество гетерохроматина локализовано в области центромеры и на концах хромосом, которые называются *теломерами*. Хотя функции гетерохроматина до конца не ясны, предполагается, что он играет важную роль в поддержании структурной целостности хромосом, в их правильном расхождении в процессе деления клетки, а также в регуляции работы генов. Эухроматин на препаратах имеет более светлую окраску, и, по-видимому, в этих районах локализована большая часть генов. Хромосомные перестройки чаще возникают в области гетерохроматина. Большая роль в изучении структуры и функций гетерохроматиновых и эухроматиновых районов хромосом принадлежит нашей выдающейся соотечественнице Александре Алексеевне Прокофьевой-Бельговской. Впервые детальное морфологическое описание десяти наиболее крупных хромосом человека и различных групп более мелких хромосом представлено в работах ведущих отечественных цитологов М. С. Навашина и А. Г. Андреса в середине 30-х годов прошлого века.

В 1956 году Тио и Леви, используя обработку гистологических препаратов колхицином, определили, что у человека 46 хромосом, состоящих

из 23 различных пар. Колхицин задерживает деление клеток на стадии метафазы, когда хромосомы в наибольшей степени конденсированы и потому удобны для распознавания. На рис. 9 представлена схема дифференциального окрашивания хромосом человека.

Рисунок 9. Схема дифференциального окрашивания хромосом человека

У женщин обе хромосомы каждой пары полностью гомологичны друг другу по форме и рисунку окрашивания. У мужчин такая гомология сохраняется только для 22 пар хромосом, которые называются *аутосомами*. Оставшаяся пара у мужчин состоит из двух различных *половых хромосом - X и Y*. У женщин половые хромосомы представлены двумя гомологичными X-хромосомами. Таким образом, нормальный кариотип женщины записывается как (46, XX), а мужчины - (46, XY). В половые клетки, как у мужчин, так и у женщин попадает только один набор хромосом. Все яйцеклетки несут 22 аутосомы и X-хромосому, а вот сперматозоиды различаются – половина из них имеет такой же набор хромосом, как и яйцеклетки, а в другой половине вместо X-хромосомы присутствует Y-хромосома. При оплодотворении двойной набор хромосом восстанавливается. При этом, кто родится – девочка или мальчик – зависит от того, какой сперматозоид принял участие в оплодотворении, тот, который несет X-хромосому или тот, который несет Y-хромосому. Как правило, это случайный процесс, поэтому девочки и мальчики рождаются примерно с равной вероятностью.

На начальных этапах анализа кариотипа человека индивидуальная идентификация могла быть осуществлена только в отношении трех первых наиболее крупных хромосом. Остальные хромосомы делили на группы в зависимости от их размера, расположения центромеры и наличия *спутников* или *сателлитов* – небольших компактных фрагментов, отделенных от хромосомы тонкими перетяжками. На рис. 10 изображены типы хромосом: *acrocentrics*, *metacentrics* и *submetacentrics* при локализации

центромеры соответственно на конце хромосомы, посередине и в промежуточном положении.

Рисунок 10. Типы хромосом

В соответствии с принятой классификацией у человека выделяют 7 групп хромосом: А, В, С, D, Е, F и G или 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7. Для лучшей идентификации хромосом делают их раскладку по группам или *кариограмму*. На рис. 11 изображен женский кариотип и его кариограмма.

Рисунок 11. Женский кариотип и его кариограмма

В начале 70-х годов XX века были разработаны методы дифференциального окрашивания хромосом с использованием красителя Гимза (G-, R-, C-, Q-методы). При этом на хромосомах выявляется характерная поперечная исчерченность, так называемые диски или *бэнды*, расположение которых специфично для каждой пары хромосом. Методы дифференциального окрашивания хромосом позволяют идентифицировать не только каждую хромосому, но и отдельные районы хромосом, последовательно пронумерованные от центромеры к теломере, а также сегменты внутри районов. Например, запись Xp21.2 означает короткое плечо X-хромосомы, район 21, сегмент 2. Эта запись очень удобна для определения принадлежности генов или других элементов генома к определенным хромосомным локусам. В частности, в области Xp21.2 локализован ген миодистрофии Дюшенна – *DMD*. Таким образом, были созданы методические основы для изучения особенностей кариотипа у разных видов организмов, определения его индивидуальной изменчивости и аномалий при определенных патологических состояниях. Тот раздел генетики, который занимается изучением хромосом и их аномалий, называется *цитогенетикой*.

Первые цитогенетические карты хромосом человека составлены К. Б. Бриджесом и Стертевантом ??? – так ли это?. Когда? - Уточнить

В первой половине XX века хромосомная теория наследственности получила значительное развитие. Было показано, что гены расположены в хромосомах линейно. Гены одной хромосомы образуют *группу сцепления* и наследуются вместе. Новые сочетания аллелей генов одной хромосомы могут образовываться за счет кроссинговера, причем вероятность этого события возрастает с увеличением расстояния между генами. Были введены единицы измерения генетического расстояния – *сантиморганы или морганиды*, названные так в честь основоположника хромосомной теории наследственности – Томаса Моргана. Считается, что два гена одной хромосомы находятся на расстоянии 1сантиморган (сМ), если вероятность кроссинговера между ними в процессе мейоза составляет 1%. Конечно, сантиморганы не являются абсолютными единицами измерения расстояния в хромосомах. Они непосредственно зависят от кроссинговера, который с разной частотой может происходить в разных участках хромосом. В частности, в области гетерохроматина кроссинговер проходит менее интенсивно.

Заметим, что описанный выше характер деления соматических и половых клеток – митоз и мейоз, справедлив для *эукариот*, то есть таких организмов, в клетках которых имеются ядра. У бактерий, которые относятся к классу *прокариот*, ядер нет, но одна хромосома в клетке присутствует и, как правило, она имеет кольцевую форму. Наряду с хромосомой, в клетках прокариот в большом количестве копий могут содержаться гораздо более мелкие кольцевые структуры, которые называются *плазмидами*.

В 1961 году М. Лайон выдвинул гипотезу о том, что у особей женского пола одна из X-хромосом инактивируется. Причем в разных клетках инактивации могут подвергаться X-хромосомы как отцовского, так и материнского происхождения. При анализе женского кариотипа инактивированная X-хромосома выглядит в виде компактной хорошо окрашенной структуры хроматина округлой формы, расположенной вблизи

от ядерной мембраны. Это *тельце Барра* или *половой гетерохроматин*. Его идентификация является самым простым способом цитогенетической диагностики пола. Напомним, что в Y-хромосоме практически нет гомологов генов X-хромосомы, однако инактивация одной из X-хромосом приводит к тому, что доза большинства генов, локализованных в половых хромосомах, у мужчин и женщин оказывается одинаковой, то есть инактивация X-хромосомы у женщин является одним из механизмов компенсации дозы генов. Процесс инактивации X-хромосомы называется *лайонизацией*, и он носит случайный характер. Поэтому в организме женщин соотношение клеток с инактивированной X-хромосомой отцовского, либо материнского происхождения будет примерно одинаковым. Таким образом, женщины, гетерозиготные по мутации в гене, локализованном в X-хромосоме, имеют мозаичный фенотип – одна часть клеток содержит нормальный аллель, а другая – мутантный.

Глава 1.3. Спонтанный и индуцированный мутагенез

Успеху в разработке хромосомной теории наследственности способствовало создание коллекций *генетических линий* многих видов микроорганизмов, растений и животных, в первую очередь дрозофилы и мыши. Генетическая линия – это совокупность сходных по фенотипу и генотипу особей одного вида, устойчиво размножающихся в условиях искусственного разведения. Большинство генетических линий – это мутантные гомозиготы по одному из генов, хотя наряду с этим созданы такие линии, в которых особи оказываются мутантными сразу по нескольким генам. В том случае, если мутантные гомозиготы оказываются нежизнеспособны или стерильны, генетические линии поддерживают путем скрещивания гетерозигот. При создании генетических линий часто используют близкородственное разведение или *инбридинг*. Генетические линии, моделирующие различные наследственные заболевания человека, широко используются для изучения их этиологии и патогенеза, а также для разработки адекватных методов профилактики и терапии.

На первых этапах генетические линии получали путем длительной селекции, отбирая из природных популяций особей с необычным фенотипом и проводя затем генетический анализ наследования этих фенотипических особенностей. Создание большого количества генетических лабораторных линий дрозофилы, отличающихся по морфологическим признакам, таким как цвет и форма глаз, крыльев, грудных и брюшных отделов туловища, характер жилкования, расположение щетинок и многим другим, привело к разработке методов количественной оценки концентрации и частоты возникновения мутаций в природных популяциях. Оказалось, что мутации возникают постоянно и в любых популяциях, в том числе и у человека. При этом они могут быть геномными, хромосомными или генными, то есть могут затрагивать целый геном, отдельные хромосомы или гены. Частота спонтанного возникновения генных мутаций, в среднем, колеблется в пределах 10^{-8} - 10^{-9} на ген за одно поколение. Большинство мутаций в гомозиготном состоянии оказывают неблагоприятный эффект на жизнеспособность или даже оказываются летальными, тем не менее, некоторые из них в гетерозиготном состоянии присутствуют в популяциях в достаточно высоких концентрациях.

Причины возникновения спонтанных мутаций долгое время оставались неизвестными. Однако уже в 20-е годы прошлого века было показано, что ионизирующее облучение резко увеличивает частоту возникновения как хромосомных перестроек, так и генных мутаций. При этом мутагенный эффект наблюдается при любой дозе облучения, и при повторном облучении он суммируется. Эти исследования ассоциируются с работами М. Демереца, М. Дельбрюка, Н. В. Тимофеева-Ресовского, Н. П. Дубинина. Был показан мутагенный эффект ультрафиолетового облучения. Однако гонады обычно защищены от прямого УФ-облучения, и потому его роль в возникновении и распространении в популяциях новых мутаций не так велика.

Спустя два десятилетия было обнаружено мутагенное действие некоторых химических соединений, таких как иприт, этиленмин,

формальдегид и др. Большой вклад в изучение молекулярных основ химического *мутагенеза* внес отечественный генетик И. А. Рапопорт. Оказалось, что при химическом мутагенезе наблюдается прямая зависимость от дозы и продолжительности обработки. При этом генные мутации возникают чаще, чем хромосомные перестройки. Кроме того, высокая частота возникновения мутаций может сохраняться на протяжении нескольких последующих поколений (задержанный мутагенез). Несмотря на понимание природы индуцированного мутагенеза, конкретные причины возникновения различных спонтанных мутаций чаще всего остаются неизвестными. В 1934 г. в Институте общей генетики АН СССР, директором которого в то время был академик Николай Иванович Вавилов, была организована лаборатория проблем гена и мутагенеза. Её возглавил приглашенный из США профессор Г. Дж. Мёллер, удостоенный в последствии, в том числе и за работы, выполненные сотрудниками этой лаборатории, почетного звания лауреата Нобелевской премии.

Открытие индуцированного мутагенеза резко ускорило создание новых генетических линий, так как мутации в большом количестве выявлялись в потомстве особей, обработанных *мутагенами*. В настоящее время идентифицировано огромное количество химических соединений с мутагенным эффектом. Среди них особое значение для медицинской генетики имеют вещества, применяемые в сельском хозяйстве (пестициды, инсектициды, гербициды, некоторые виды минеральных удобрений и др.), используемые в промышленном производстве (формальдегид, эпоксины, бензол, мышьяк, окислы азота и многие другие), а также некоторые лекарственные препараты (гормоны, антиконвульсанты, салицилаты, гепарин, некоторые антибиотики, например, биомицин, и психотропные средства – мажептил, хлорпропазин и др.). Важно подчеркнуть, что под влиянием мутагенов повышается частота возникновения мутаций на всех стадиях формирования половых клеток, от их закладки, которая происходит в начальные периоды эмбриогенеза родителей, до оплодотворения. При этом

опасность для здоровья будущего ребенка представляют хромосомные перестройки и доминантные мутации. Вновь возникшие рецессивные мутации чаще всего не будут проявляться в первом поколении, но их отдаленные последствия могут быть выявлены в виде повышения частоты возникновения рецессивной патологии в последующих поколениях. Чувствительным к действию мутагенов является первый триместр беременности до завершения органогенеза.

Заметим, кстати, что химические вещества и физические воздействия, обладающие мутагенным эффектом, оказывают также канцерогенное действие, то есть относятся к классу *канцерогенов*. Это связано с молекулярной этиологией онкологических заболеваний, в основе которой лежит накопление мутаций в определенных группах генов.

Многие мутагены способны оказывать тератогенное воздействие на плод в процессе беременности, то есть способны индуцировать врожденные пороки развития (ВПР) не наследственной природы. Однако класс тератогенов гораздо более широкий по сравнению с мутагенами, их эффект существенно зависит от стадии эмбриогенеза, то есть срока беременности, на котором плод подвергается такому воздействию. На самых ранних сроках до 15 дней беременности тератогены могут индуцировать *бластопатию*, которая завершается гибелью плода, но если плод выживает, то ВПР у него, как правило, не формируются. Следующий период активного органогенеза до 12 недели беременности является особенно чувствительным к действию тератогенов, которые могут вызывать не только гибель плода, но и быть причиной возникновения грубых пороков развития – *эмбриопатий*. Опасность возникновения ВПР под действием тератогенов сохраняется и на следующих стадиях беременности, хотя тяжесть и частота таких *фетопатий* существенно снижаются по мере развития зародыша. Тератогенным эффектом обладают многие химические соединения и лекарства (препараты цитостатического и противосудорожного действия, стероидные гормоны, некоторые антибиотики, соли ртути, ретиноевая кислота, избыток витамина

А, варфарин и др.), инфекционные агенты (цитомегаловирус, краснуха, токсоплазмоз, вирус герпеса и др.), физические воздействия (ионизирующее облучение, гипертермия, механические нарушения). Повышена вероятность рождения детей с ВПР у матерей, страдающих аутоиммунными болезнями, сахарным диабетом, эпилепсией, гипотиреозом и некоторыми другими заболеваниями. Тератогенным эффектом обладают большие дозы никотина и алкоголя, а также некоторые наркотические вещества (героин, кокаин и др.).

Напомним, что в организме человека действует системы детоксикации, направленные на выявление и нейтрализацию химических веществ с агрессивным и в том числе мутагенным эффектом. Протективным антиоксидантным действием обладают такие вещества как серотонин, цистеин, цитохром С, гистамин, глутатион, α -токоферол и другие витамины. К антимутагенам относятся некоторые пищевые продукты, в первую очередь овощи (капуста, лук, перец, редька, картофель), орехи и фрукты (ананасы, яблоки, виноград).

Тем ни менее, каждое новое соединение, которое выпускается для широкого использования среди населения, будь то пищевая добавка, косметическое, бытовое или любое иное средство, обязательно должно проходить проверку на мутагенный, тератогенный и канцерогенный эффекты.

В некоторых случаях мутация в определенном гене может возникнуть в период гаметогенеза в одной из половых клеток родителей, так называемая *мутация de novo*. Такие мутации могут приводить к отклонениям от менделеевского типа наследования. Например, если мутация *de novo* в гене, контролирующем окраску глаз, возникла в половой клетке одного из голубоглазых родителей, это может привести к тому, что у них родится кареглазый ребенок. Конечно, это событие очень редкое, сопоставимое с частотой возникновения новых мутаций в гене, но все же оно возможно.

Если мутация возникла не в зрелой половой клетке, а на более ранней стадии ее дифференцировки, то она будет присутствовать не в одной гамете,

а в определенном проценте зародышевых клеток. Такое явление в генетике называется *гонадным мозаицизмом*. Мутации могут возникать не только в половых клетках, но и в соматических. В этом случае они могут приводить к *соматическому мозаицизму*. В частности, если мутация возникла в раннем эмбриогенезе в одной из клеток, из которых в дальнейшем происходило развитие какого-то органа, то ее следствием может быть то, что она будет присутствовать во всех или в части клеток только этого органа. Например, если у ребенка один глаз карий, а другой голубой, или один глаз разноцветный, мы можем с определенной долей уверенности утверждать, что мутация в гене, контролирующем окраску глаз, возникла *de novo* в период эмбриогенеза в одной из клеток зародыша, участвующей в формировании глаза. А ее фенотипическое проявление зависит от того, на какой стадии развития и в какой клетке произошла мутация.

Соматические мутации в специфических генах, участвующих в контроле клеточного деления, дифференцировки, пролиферации, являются причиной развития многих онкологических заболеваний. Эти гены делятся на два класса: *доминантные и рецессивные онкогены*. Последние чаще называются *антионкогенами* или генами *супрессоров опухолей*. Продукты доминантных онкогенов участвуют в позитивном контроле деления клеток, тогда как супрессоры опухолей являются негативными регуляторами клеточного роста. Таким образом, рак – это болезнь генов, обусловленная мутациями, чаще всего возникающими *de novo* в тех соматических клетках и тканях, которые затем вовлекаются в процесс неоплазии. Во второй части учебника мы еще раз более подробно обсудим эти вопросы.

В связи с обсуждаемой проблемой необходимо подчеркнуть, что в процессе эволюции были выработаны очень мощные системы, направленные на стабилизацию генетического материала и предотвращение распространения мутации, возникшей в какой-то одной клетке. Это (1) *репарация* ДНК, то есть исправление дефектов, возникающих в процессе комплементарного синтеза ДНК, то есть *репликации*, (2) задержка деления

клетки в ответ на повреждение ДНК для того чтобы прошла репарация этого дефекта и (3) направление клетки к *апоптозу*, то есть программированной гибели, в том случае, если дефект не удастся репарировать.

Глава 1.4. Цитогенетические карты генов

Выявление большого количества генов, ассоциированных с определенными фенотипическими признаками, и создание мутантных генетических линий, проходившие параллельно с изучением структурной организации хромосом, явились основой для построения *цитогенетических карт генов*. Цитогенетические карты определяют принадлежность генов к отдельным хромосомам и их взаимное расположение внутри хромосомы относительно друг друга и видимых хромосомных маркеров, таких как центромера, теломеры, участки гетерохроматина, бэнды. Возможность построения карт генов обусловлена линейным характером и стабильностью расположения генов в хромосомах. Так же как кариотип, карты генов являются видовым признаком, то есть каждый вид характеризуется своей картой генов.

Основным методом построения карт генов является классический *генетический анализ* или анализ наследования признаков в родословных. Мы уже упоминали, что признаки, контролируемые генами, локализованными в разных хромосомах, наследуются независимо друг от друга, так как в процессе мейоза происходит независимое расхождение негомологичных хромосом по гаметам. При локализации генов в одной хромосоме они чаще всего вместе попадают от родителя в половую клетку. В разных половых клетках родительские аллели оказываются только в том случае, если между соответствующими генами проходит кроссинговер. Частота этого события является мерой расстояния между генами, исчисляемого в сантиморганах.

При построении карт генов на первом этапе проводят скрещивания между мутантными особями двух разных генетических линий и определяют,

насколько независимо комбинируют признаки в поколениях, то есть, сцеплены ли соответствующие гены. Таким образом, выявляют группы сцепления и определяют расстояния между генами. На следующем этапе необходимо сопоставить группы сцепления с хромосомами. В этом случае эффективным оказалось использование особей, несущих небольшие структурные перестройки, чаще всего делеции, индуцированные путем облучения или под действием других мутагенов. Если облучению подвергались особи, гетерозиготные по доминантному признаку, и этот признак исчезал при возникновении делеции, это означало, что соответствующий ген локализован в той же цитогенетической области, которая подверглась делеции. Эффективность построения и точность карт генов резко возрастает при увеличении числа картированных генов, а также других генетических маркеров. В настоящее время подробные цитогенетические карты построены для всех экспериментальных объектов (бактерий, дрожжей, многих растений, дрозофилы, мыши и т.д.).

Построение карт генов человека продвигалось очень медленными темпами из-за небольшого размера семей, длительного периода одного поколения, ограниченного числа информативных родословных и отсутствия методов цитогенетического анализа всех пар хромосом. Достаточно сказать, что принадлежность первого гена человека (гена цветовой слепоты) к X-хромосоме была определена в 1911 г., а картирование аутосомных генов началось только спустя более полувека. Однако появление во второй половине XX века новых биологических технологий, возможность работы на культурах клеток, а также успехи в области цитогенетики и молекулярной генетики резко ускорили этот процесс. В настоящее время степень детализации карт генов человека не только не уступает, но даже превосходит степень детализации карт генов хорошо изученных экспериментальных объектов, таких как дрозофила или мышь. Картирование генов является одним из наиболее значимых этапов их идентификации и изучения ассоциации с определенными заболеваниями человека.

Глава 1.5. Типы наследования признаков

Законы Менделя и хромосомная теория наследственности явились основой для изучения типов наследования признаков и проведения генеалогического анализа, то есть анализа родословных. Подчеркнем еще раз, что также как раньше мы будем говорить о наследовании моногенных или как их еще иногда называют менделирующих признаков, то есть таких признаков, проявления которых зависят от различных состояний одного гена. Такие признаки относятся к качественным, они существуют в виде альтернативных состояний, при этом переходные формы отсутствуют. Это справедливо даже для таких случаев, когда доминирование одного признака над другим не является полным.

Характер наследования моногенных признаков зависит от двух обстоятельств: (1) является признак доминантным или рецессивным и (2) находится ли соответствующий ген в аутосоме или в половой хромосоме. В соответствии с этим выделяют *аутосомно-доминантный* тип наследования, *аутосомно-рецессивный* и *сцепленный с полом*, который, в свою очередь, также может быть доминантным или рецессивным. При неполном доминировании расщепления по фенотипу и по генотипу полностью совпадают. Болезни, обусловленные мутациями в митохондриальной ДНК, также имеют свои особенности наследования.

Если речь идет об экспериментальных животных, то для изучения наследования используют моногибридные скрещивания и на протяжении последующих поколений проводят количественную оценку потомков, различающихся по исследуемому признаку. Скрещивания между гибридами первого поколения и родительскими формами ($Aa \times AA$ и $Aa \times aa$) называются *возвратными*, если при этом родительская форма относится к классу рецессивных гомозигот, скрещивание называется *анализирующим*.

При аутосомно-доминантном типе наследования при скрещивании гомозиготных альтернативных особей признак проявляется в каждом поколении вне зависимости от пола у всех потомков в F_1 и в 75% случаев –

в F_2 . Особи с доминантным признаком могут быть как гомозиготными (AA), так и гетерозиготными (Aa) носителями доминантного аллеля. Для того чтобы это выяснить, необходимо провести анализирующее скрещивание такой особи с рецессивной гомозиготой. Если исследуемая особь является доминантной гомозиготой, то все потомки от этого скрещивания будут иметь доминантный признак, и при этом будут гетерозиготами (Aa). Во втором случае в потомстве с равной вероятностью будут наблюдаться особи как с доминантным (Aa), так и с рецессивным (aa) признаком.

Мы уже говорили, что методы гибридологического анализа для человека не применимы. Определения типа наследования может проводиться только на основе анализа родословных. В некоторых случаях аутосомно-доминантное заболевание присутствует у одного из родителей больного. При этом вне зависимости от пола вероятность проявления признака в потомстве гетерозиготного носителя доминантной мутации составляет 50%, а гомозиготного – 100%. Но чаще всего (до 90% случаев) доминантные заболевания являются результатом мутации *de novo*. В этом случае они выглядят как спорадические заболевания.

При аутосомно-рецессивном типе наследования признак у гибридов первого поколения будет отсутствовать, однако в F_2 вероятность рождения особей с рецессивным признаком составит 25% вне зависимости от их пола. При проведении анализирующего скрещивания рецессивный признак, также как и доминантный, будет наблюдаться у половины потомков. Особи с рецессивным признаком являются гомозиготными носителями рецессивного аллеля (aa). Чаще всего они появляются в потомстве гетерозиготных родителей, которые сами не имеют рецессивного признака, но являются гетерозиготными носителями мутации. Таких родителей называют *облигатными* гетерозиготами. Вероятность рождения больного ребенка у облигатных гетерозигот по закону Менделя составляет 25%. Если речь идет об аутосомно-рецессивном заболевании, то родители больного ребенка, как правило, здоровы, но они могут иметь нескольких больных детей. Дети с

аутосомно-рецессивным заболеванием часто рождаются в родственных браках, причем вероятность рождения больного ребенка возрастает с увеличением степени родства между родителями. Аутосомно-рецессивные мутации могут накапливаться в популяции, так как гетерозиготные носители не подвержены давлению отбора. Если родители больного ребенка не состоят в родстве, то чаще всего они несут разные мутации в одном и том же гене, а их больные дети наследуют каждую из этих мутаций, то есть являются *компаунд-гетерозиготами*. Аутосомно-рецессивный тип наследования характерен для большинства наследственных ферментопатий.

Особенности наследования признаков, определяемых генами, локализованными в половых хромосомах, объясняются тем, что в Y-хромосоме генов немного и практически нет гомологов генов X-хромосомы. В результате рецессивные аллели большинства генов X-хромосомы проявляются у особей мужского пола. Такое состояние рецессивного аллеля, когда у него отсутствует гомолог – (a/-), называется *гемизиготным*. Заметим, что этот термин относится не только к генам, локализованным в половых хромосомах, но и к аутосомным генам в тех случаях, когда область локализации этого гена в одной из гомологичных хромосом делетирована, то есть отсутствует.

При X-сцепленном наследовании будут наблюдаться фенотипические различия в потомстве в зависимости от направления скрещивания, то есть в зависимости от присутствия в родительском поколении признака у матери или отца. Если признак доминантный и присутствует у гомозиготной матери, то в F₁ все особи независимо от пола будут иметь этот признак, а в F₂ будет наблюдаться расщепление 3:1, при этом признак будет отсутствовать только у половины особей мужского пола. В потомстве гетерозиготной матери вероятность рождения особей с доминантным признаком составит 50% независимо от пола. Если же доминантный признак в родительском поколении будет у отца, то в первом поколении этот признак будет

присутствовать только у дочерей, а во втором – как у дочерей, так и у сыновей с вероятностью 50%.

При рецессивном сцепленном с полом типе наследования признак чаще всего будет выявляться у особей мужского типа, и будет наблюдаться передача признака от «деда» к «внуку». Никогда не будет наблюдаться передача заболевания от отца к сыну, так как сын не наследует X-хромосому отца, она всегда материнского происхождения. В большинстве случаев особи мужского пола с рецессивным сцепленным с полом признаком с вероятностью 50% будут появляться в потомстве гетерозиготных матерей, не имеющих этого признака. Все потомки первого поколения у отца с рецессивным признаком не будут иметь этого признака, однако половина его дочерей будут нести мутацию в гетерозиготном состоянии, и вероятность рождения у них особей мужского пола с рецессивным признаком, как мы уже говорили раньше, составит 50%. Тип наследования признаков, определяемых генами Y-хромосомы, называется *голландрическим* и для него характерна передача признака от отца к сыну.

В последние десятилетия накопилось много фактов, свидетельствующих о наличии большого числа отклонений от менделеевских типов наследования. К неменделирующим заболеваниям с нетрадиционным типом наследования, относятся митохондриальные болезни, однородительские дисомии и болезни геномного импринтинга, а также болезни экспансии, обусловленные присутствием динамических мутаций. Митохондриальный или цитоплазматический тип наследования называют материнским. Мужские половые клетки, хотя и содержат очень небольшое количество митохондрий, обеспечивающие их подвижность, но не передают их потомству. Поэтому все митохондрии плода, независимо от его пола имеют материнское происхождение. Таким образом, женщина передает свой генетический материал не только через хромосомы, но и с митохондриальной ДНК (мтДНК), причем с равной вероятностью как

мальчикам, так и девочкам. В дальнейшем мы более подробно обсудим все типы наследования на примере различных болезней человека.

Подчеркнем еще раз, что рассмотренные выше закономерности наследования справедливы для моногенных признаков. В каталоге генов человека и генетических болезней, который на протяжении нескольких последних десятилетий составлялся при непосредственном участии и под руководством выдающегося медицинского генетика современности Виктора А. МакКьюзика (McKusick V. A. Mendelian inheritance in man: a catalog of human genes and genetic disorder. –2006. - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM/>), представлено описание более 16000 генов, ответственных за фенотипические моногенные признаки. Примерно для 11000 из них установлен тип наследования, картировано более 8000 генов человека. Около 4500 генов связано с различными моногенными заболеваниями. Примерно для 4000 моногенных болезней установлен тип наследования. Количество аутомных заболеваний превышает 3500, причем число доминантных и рецессивных заболеваний примерно одинаково, хотя доминантных все-таки несколько больше. Более 300 болезней наследуется по X-сцепленному типу, всего несколько (не более 10) – по Y-сцепленному и немногим более 20 заболеваний обусловлены мутациями в митохондриальных генах.

В некоторых случаях ни один из родителей не является носителем мутации, присутствующей у их ребенка. Мы уже писали о том, что мутации в определенном гене могут возникнуть *de novo* в период гаметогенеза в одной из половых клеток родителей. Некоторые аутомно-доминантные заболевания целиком обусловлены мутациями, возникшими *de novo*. К их числу относится ахондроплазия, при которой у большинства больных обнаруживается специфическая мутация в гене рецептора 3 фибробластных факторов роста (Fgf). Практически во всех случаях возникают *de novo* замены одной из гомологичных аминокислот (пролина) в генах трех Fgf-рецепторов, идентифицируемые у больных с различными наследственными формами краниосиностозов (неправильным зарастанием швов черепа у

ребенка). Частоты возникновения этих мутаций на три порядка превышают норму. Места возникновения этих специфических мутаций относятся к числу наиболее мутабельных в геноме человека или, как говорят, являются «горячими точками» мутагенеза, причем причины этой высоко специфической нестабильности до сих пор неизвестны.

Повышены частоты возникновения мутаций в генах миодистрофии Дюшенна и гемофилии А. Почти у 40-45% больных с этими X-сцепленными заболеваниями присутствуют мутации *de novo*. При медико-генетическом консультировании таких больных очень важно определить, унаследовал ли больной мутацию от своей гетерозиготной матери или она возникла *de novo*. В первом случае в такой семье при повторных беременностях необходимо проводить определенные профилактические мероприятия, направленные на предотвращение рождения больного ребенка. Во втором случае риск повторного рождения больного ребенка в данной семье не превышает общепопуляционного значения, и эта семья не нуждается в профилактических мероприятиях. В дальнейшем мы обсудим эту ситуацию более подробно.

В генетическом контроле подавляющего большинства признаков организма может участвовать более одного гена. В этом случае говорят о *полигенном* наследовании. Иногда количество этих генов может достигать десятков или даже сотен. Полигенное наследование характерно, в частности, для количественных признаков, показатели которых можно измерить, таких как рост, вес, продолжительность жизни, многие продуктивные свойства сельскохозяйственных растений и животных. Изменчивость по фенотипическим проявлениям таких признаков в популяциях соответствует нормальному распределению – рис. 12.

Рисунок 12. Пример нормального распределения

К классу полигенно наследуемых признаков относятся многие широко распространенные болезни человека – атеросклероз, гипертензия, сахарный диабет, язвенная болезнь, бронхиальная астма и многие другие мультифакториальные заболевания. Для изучения наследования количественных и других полигенных признаков используют статистические методы, разработанные в первой половине прошлого века Фишером.

Глава 1.6. Генетика популяций

Каждый вид организмов характеризуется определенным уровнем генотипической изменчивости, характер которой различен в разных популяциях. Изучение генетического разнообразия популяций и закономерностей его поддержания являются предметом *популяционной* генетики. Фундаментом для развития этого направления генетики послужила работа С. С. Четверикова «О некоторых моментах эволюционного процесса с точки зрения современной генетики», вышедшая в 1926 году. В ней впервые обсуждаются вопросы поддержания мутаций в природных популяциях, влияния на этот процесс отбора и изоляции, а также их значения в эволюции.

В больших популяциях, в которых нет предпочтения в образовании супружеских пар по родственным, национальным, религиозным, социальным или другим признакам (такие популяции называются панмиктическими от слова *панмиксия* – случайное скрещивание) соотношение между частотами аллелей и генотипов соответствует *закону Харди-Вайнберга*, независимо открытым этими двумя учеными в 1908 году. Для моногенных признаков он звучит таким образом: если частоты аллелей A и a равны p и q , тогда частоты гомозигот AA и aa будут равны p^2 и q^2 , а гетерозигот Aa – $2pq$ соответственно.

При отборе, направленном против определенного генотипического класса, мутациях или инбридинге, который возникает при близкородственных браках и в небольших географически изолированных популяциях, так называемых *генетических изолятах*, эти соотношения

нарушаются. К генетической изолированности могут приводить не только географические, но также национальные, социальные, религиозные и другие барьеры. Мутации, возникающие у членов изолированных замкнутых сообществ, получают более широкое распространение в генетических изолятах. Это явление называется *эффектом основателя*. Изменение частот аллелей в ряду поколений может произойти в силу случайной выборки особей, давших начало популяции или какой-то ее части. Такое явление называется *дрейфом генов*. Эффект основателя является одной из форм дрейфа генов. Миграции особей также могут сопровождаться дрейфом генов.

Инбридинг способствует распространению в генетических изолятах специфических мутаций, ассоциированных с редкими наследственными заболеваниями. Частоты некоторых мутаций в таких популяциях могут возрастать по сравнению с общим уровнем в несколько, а иногда и в несколько десятков раз. Классическим примером, иллюстрирующим эти положения, является этническая группа евреев восточно-европейского происхождения, так называемые евреи-ашкенази. В этой группе в десятки раз повышена частота таких редких лизосомных заболеваний, как болезнь Гоше, Тея-Сакса (амавротическая идиотия), Нимана-Пика, муколипидоз, с высокими частотами встречаются торсионная дистония, синдром Блума (одна из генетических форм нанизма, сочетающегося с повышенной чувствительностью к солнечному облучению, телеангиэктазией, нарушением пигментации кожи и предрасположенностью к злокачественным новообразованиям). Причем, повышение частот этих заболеваний, как правило, происходит за счет широкого распространения специфических мутаций в соответствующих генах. Еще одним примером является аутосомно-доминантная форма болезни Паркинсона, обусловленная мутациями в гене лейцинбогатой киназы 2 – *LRRK2*. У европейских больных с семейными формами заболевания с частотой 6% встречается специфическая мутация в гене *LRRK2* (G2019S), в то время как у таких же больных, но евреев-ашкенази, частота этой мутации достигает 30-40%.

Широкое распространение в этой этнической группе имеют определенные полиморфные мутации в двух генах, ассоциированных с раком молочной железы и яичников. Даже такое известное заболевание, как муковисцидоз, у евреев-ашкенази в значительной степени объясняется присутствием особой специфической мутации (W128X). Отметим, что в Израиле в комплексное обследование беременных входит анализ гетерозиготного носительства мутаций в некоторых из генов, ответственных за перечисленные выше заболевания.

Совершенно иной спектр наследственных заболеваний, встречающихся с повышенными частотами, наблюдается у финнов, то есть в другой изолированной этнической группе. Специфические финские мутации найдены, по крайней мере, для 30 различных моногенных заболеваний. Частота врожденного нефроза у финнов достигает значения 1:8000. Около 1% коренного населения Финляндии являются гетерозиготными носителями мутации, которая обнаруживается в гомозиготном состоянии более чем у 90% больных диастрофической дисплазией – одной из форм скелетной дисплазии, характеризующейся тяжёлым сколиозом, двусторонней врождённой деформацией кистей и стоп, утолщением ушных раковин, преждевременной кальцификацией рёбрных хрящей, наличием, в большинстве случаев, расщелины твёрдого нёба. С повышенной частотой среди финнов встречаются две формы наследственной офтальмопатии, каждая из которых обусловлена специфической мутацией. Это складчатая атрофия сосудистой оболочки и сетчатки глаза, а также плоская роговица глаза II-го типа, при которой наблюдается помутнение роговицы и корнеальной паренхимы, уже в раннем детском возрасте формируются старческие бляшки диска зрительного нерва или стекловидной пластинки, при этом уровень гиперметропии достигает или даже превышает +10D. С повышенными частотами в финских популяциях встречаются инфантильный цероидный липофусциноз, семейный амилоидоз, одна из генетических форм

прогрессирующей миоклонической эпилепсии (Унверрихта-Лундборга). Примеры подобных генетических изолятов не являются единичными.

В общем случае распространенность различных мутаций в популяциях зависит от двух сил, действующих в разных направлениях, – частоты возникновения мутаций и негативного или позитивного отбора по отношению к их носителям. Так например, мутация, оказывающая негативный эффект на жизнеспособность в гомозиготном состоянии, может получить широкое распространение в популяции, если в гетерозиготном состоянии она дает какие-то преимущества. Классическим примером является мутация в гене β -глобина, которая в гомозиготном состоянии приводит к серповидно-клеточной анемии. Мутантный гемоглобин имеет пониженную растворимость и повышенную способность к полимеризации, в результате чего эритроциты больных принимают серповидную форму. Такие эритроциты теряют пластичность, закупоривают мелкие сосуды и гемолизируются. Затем развиваются очаги ишемии и инфаркты во внутренних органах, спинном и головном мозге. Заболевание часто встречается в Центральной Африке, Индии, странах Средиземноморья, Ближнего и Среднего Востока, в том числе Азербайджане, Узбекистане и Армении. Оказалось, что в тех же регионах мира распространен малярийный плазмодий, вызывающий тяжелое инфекционное заболевание – малярию. Гетерозиготные носители мутаций в гене β -глобина обладают повышенной устойчивостью к малярии. Частоты гетерозиготного носительства мутации в гене β -глобина в этих популяциях достигают 5-8%.

Совокупность перечисленных выше факторов приводит к *полиморфизму популяций*, то есть устойчивому сосуществованию в пределах одной популяции нескольких генетических форм, при этом разные популяции могут различаться по уровням или частотам полиморфизма. Важной характеристикой особи с определенным генотипом является ее *приспособленность (W)*, то есть вероятность дожить до репродуктивного возраста и оставить потомство. Общая приспособленность популяции

является средней величиной из приспособленностей всех особей, а ее нормированное отклонение от максимально возможного значения – $(W_{\max} - W)/W_{\max}$ – определяет *генетический груз* популяции, который является усредненной мерой распространенности в популяции мутаций, снижающих приспособленность особей. Он определяет долю в общей популяции гомозиготных и гетерозиготных носителей мутаций, обладающих негативным влиянием на жизнеспособность. Природные популяции растений и животных, также как человека, отягощены различными мутациями. Применительно к человеку генетический груз определяет распространенность в различных популяциях мутаций, ассоциированных с наследственной патологией. Доминантные мутации проявляются постоянно, часть рецессивных мутаций выявляется у редких гомозигот, но основная доля генетического груза подобно айсбергу скрыта в *генофонде* популяции в гетерозиготном состоянии. По мнению выдающегося русского генетика С. С. Четверикова мутации в природных популяциях составляют эволюционный резерв вида. Это направление популяционной генетики интенсивно развивалось в нашей стране в первой половине и середине прошлого века в работах Г. Меллера, Н. П. Дубинина, а затем Р. Л. Берг, М. Д. Голубовского и др. Оказалось, что концентрация различных мутаций в популяциях, включая те, которые приводят к летальному эффекту в гомозиготном состоянии, достигает нескольких десятков процентов, причем состав этих мутаций постоянно меняется, и в разные годы широкое распространение получают различные специфические мутации.

В заключение подчеркнем, что популяционно-генетические исследования имеют первостепенное значение для проведения эпидемиологических исследований с целью правильной организации медико-генетического консультирования населения и профилактики наследственной патологии.

Глава 1.7. Структура вещества наследственности – ДНК

В процессе развития хромосомной теории наследственности было показано, что гены содержатся в хромосомах. Но из чего состоят сами хромосомы, и какое вещество хромосом является материальной основой генов? Ответы на эти вопросы, являющиеся предметом *молекулярной генетики*, долгое время оставались неизвестными. Пониманию природы вещества наследственности способствовали опыты по *трансформации* – искусственной передаче наследственных признаков, выполненные на бактериях в 1944 г. О. Эйвери, К. МакЛеодом и М. МакКарти. В этих опытах впервые было показано, что за трансформацию ответственны молекулы *дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК)*, присутствие которых в ядрах клеток было открыто еще в позапрошлом веке в 1869 г. Фридрихом Мишером, назвавшим эти молекулы нуклеином. Трансформирующая активность ДНК была подтверждена в многочисленных последующих опытах на многих экспериментальных объектах. Оказалось, что ДНК является основным веществом хромосом всех исследованных видов. Наряду с ДНК в хромосомах содержатся белки: около 20% белков в хромосоме прокариот и 50-60% – в хромосомах эукариот, причем большая часть этих эукариотических белков – до 80% – относится к специфическому классу *гистонов*.

В хромосомах эукариот ДНК упакована очень компактно, особенно в период деления клетки. Во время митоза длина хромосом становится короче в тысячи раз. Очевидно, что это возможно только для высокоорганизованных структур. В соответствии с современными представлениями существует не менее пяти уровней упаковки ДНК в хромосомах. Ключевая роль в процессах упаковки ДНК и структурной организации хромосом принадлежит гистонам.

Определение химической структуры и пространственной организации молекул ДНК явилось одним из самых ярких открытий XX века. В 1953 г. Джеймс Уотсон и Френсис Крик на основании рентгеноструктурного анализа кристаллов ДНК, выполненного Р. Франклином, предложили модель, в

соответствии с которой ДНК состоит из двух полимерных цепей, образующих форму двойной спирали – рис. 13.

Рисунок 13. Структура ДНК

В основании каждой из полимерных цепей лежат последовательности из одинаковых сахаров (дезоксирибозы), соединенных между собой остатками фосфорной кислоты или фосфодиэфирной связью. Дезоксирибоза содержит 5 атомов углерода, то есть является пентозой – рис. 14.

Рисунок 14. Дезоксирибоза

Каждый сахар, в свою очередь, соединен гликозидной связью с одним из четырех азотистых оснований: двух пуринов – *аденина* (А) и *гуанина* (G), и двух пиримидинов – *цитозина* (С) и *тимина* (Т) – рис.15.

Рисунок 15. Структура пуринов и пиримидинов

Азотистое основание, сахар и остаток фосфорной кислоты вместе составляют *нуклеотид*. Таким образом, цепь ДНК представляет собой последовательность нуклеотидов. Две цепи ДНК удерживаются вместе за счет водородных связей между нуклеотидами. Аденин связывается с тимином, а гуанин с цитозином. Это правило А-Т, G-С называется *правилом комплементарности*. В результате две нити ДНК оказываются комплементарными или взаимодополняющими друг друга. Каждая нить ДНК имеет форму спирали, и при их объединении образуется двойная спираль. В зависимости от положения атомов углерода в остатке дезоксирибозы выделяют 5'- и 3'-концы ДНК. Нить ДНК начинается с 5'-конца и заканчивается 3'-концом. В двойной спирали нити ДНК находятся в противоположной ориентации по отношению друг к другу. Мы уже упоминали о том, что связи между нуклеотидами в двойной спирали ДНК водородные и потому легко рвутся даже при относительно небольшом

нагревании молекулы. Этот нормальный физиологический процесс называется *денатурацией* или *плавлением* ДНК. При восстановлении температурных условий происходит восстановление водородных связей по правилу комплементарности с образованием двойной спирали ДНК. Этот процесс называется *гибридизацией*.

Длина молекул ДНК измеряется в нуклеотидах или, точнее, в парах оснований (п.о.), тысячах пар оснований – *килобазах* (кб) и миллионах пар оснований – *мегабазах* (мб), и эта длина может варьировать от нескольких нуклеотидов до десятков и даже сотен миллиардов пар оснований. Суммарная длина молекулы ДНК человека составляет $3,2 \times 10^9$ п.о. Основная масса ДНК эукариот находится в ядрах клеток в составе хромосом в суперскрученном состоянии за счет взаимодействия с гистонами и другими белками хромосом. Около 5% ДНК находится в митохондриях – самых крупных после ядра органеллах клетки. У прокариот ДНК содержится в хромосоме и плазидах. Если выделить молекулу ДНК из одной клетки человека и развернуть во всю длину, ее физический размер составит почти два метра. Нужно обладать очень богатым воображением, чтобы представить себе, что в ядре каждой нашей клетки имеется молекула ДНК такого гигантского размера, и как же она суперскручена, как замечательно она упакована, что ей там не только не тесно, но она способна выполнять свои удивительные функции!

Два свойства отличают нуклеиновые кислоты от других типов молекул. Во-первых, молекулы ДНК способны размножаться, то есть сами себя воспроизводить. Этот процесс называется *репликацией*, и он осуществляется с помощью фермента *ДНК-полимеразы*, способного вести комплементарный синтез ДНК по однонитевой матрице. При делении клетки процессу образования хроматид из родительской хромосомы предшествует репликация ДНК, которая происходит на синтетической стадии S клеточного цикла. При этом две нити ДНК расходятся, и каждая из них служит матрицей для комплементарного синтеза новых нитей ДНК – рис. 16.

Заметим, кстати, что появление молекул ДНК, способных к самовоспроизводству, ассоциируется с возникновением жизни на Земле, так как жизнь невозможна без размножения.

Рисунок 16. Репликация ДНК

Вторым уникальным свойством ДНК является то, что в них в виде последовательности нуклеотидов записана информация, определяющая разнообразие всех форм жизни. Недаром ДНК сравнивают с энциклопедией жизни!

Несмотря на эти открытия, многие ученые долго не могли согласиться с тем, что ДНК является этим загадочным веществом наследственности. Действительно, основным структурным элементом *полипептидных цепей*, а значит и белков, являются *аминокислоты*. Число их вариантов равно 20. Разнообразие ДНК достигается за счет вариации всего лишь 4 типов нуклеотидов. Казалось невероятным, что такая простая молекула, как ДНК, может кодировать такие сложные множества белков. Кроме того, в начале изучения химической структуры ДНК было неверное представление о том, что расположение нуклеотидов в этих молекулах упорядочено, а сами они напоминают периодические кристаллы. Оказалось, что это ошибка, и все дело в том, что порядок нуклеотидов варьирует по длине этой гигантской молекулы. Варьирующий порядок нуклеотидов и определяет огромную информационную ёмкость ДНК.

Глава 1.8. Центральная догма молекулярной генетики

Какая же информация записана в молекуле ДНК, и как происходит расшифровка или декодирование этой информации? В начале XX века в 1902 году Арчибальд Гаррод высказал предположение о том, что некоторые наследственные заболевания обусловлены врожденными ошибками метаболизма. В 30-е годы в работах Бидла и Эфрусси, выполненных на дрозофиле, было убедительно показано, что мутации блокируют

определенные этапы биосинтеза конечного продукта. И, наконец, в 1952 году были найдены прямые доказательства предположения А. Гаррода на примере известного наследственного заболевания человека – гликогеноза 1 типа. Было показано, что болезнь развивается вследствие снижения активности всего лишь одного фермента – глюкозо-6-фосфатазы. Так было сформулировано важнейшее положение: «один ген – один фермент», названное впоследствии *центральной догмой молекулярной генетики*. В дальнейшем было показано, что это положение справедливо не только для ферментов, но и для других белков. Современная формулировка центральной догмы молекулярной генетики звучит так: «*один ген – одна полипептидная цепь*», так как многие белки состоят из разных полипептидных цепей, при этом каждая из них кодируется собственным геном. Но и это положение оказывается справедливо не для всех генов. Конечными продуктами примерно четверти генов человека являются не белки, а *рибонуклеиновые кислоты (РНК)*.

РНК, также как ДНК, состоят из четырех типов произвольно чередующихся нуклеотидов. Правда, в РНК функции Т выполняет другой нуклеотид – У (урацил) – рис.15. Второе важное структурное отличие заключается в том, что в РНК в основании располагается другой сахар - не дезоксирибоза, а рибоза. Рибоза также содержит 5 углеродных атомов, однако в отличие от дезоксирибозы атом водорода при втором атоме углерода в рибозе замещен на гидроксильную группу (-ОН). РНК функционируют в виде одонитевых структур, хотя они и способны образовывать двунитевые структуры, в частности, с молекулами ДНК.

Разберем более подробно, как происходит переход от ДНК к полипептидной цепи – рис. 17.

Рисунок 17. Центральная догма молекулярной генетики

Первым шагом на пути расшифровки информации в молекуле ДНК является *транскрипция* – синтез молекул РНК, комплементарных определенным участкам в молекуле ДНК. Транскрипция происходит в ядрах клеток и осуществляется с помощью фермента – *РНК-полимеразы*. Те участки молекулы ДНК, которые транскрибируются, как раз и являются генами. Молекулы РНК, которые образуются в результате транскрипции, носят название преРНК или точнее первичный РНК-транскрипт. Серия модификаций превращает преРНК в информационную или *матричную РНК - мРНК*. Большой вклад в открытие и изучение роли мРНК внесли исследования С. Бреннера и Ф. Жакоба, выполненные в 1961 году на микроорганизмах. При процессинге преРНК, то есть переходе от преРНК к мРНК, происходят изменения на концах молекулы. Это *полиаденилирование* – присоединение полиА-последовательности к 3'-концу, и *кэпирование* – присоединение гуанозин-3-фосфата к 5'-концу молекулы преРНК. Концевые модификации обеспечивают стабилизацию мРНК и возможность ее продвижения к нужным органеллам, в первую очередь, к рибосомам. У прокариот процессинг преРНК ограничивается только этими концевыми модификациями.

Но у эукариот, в том числе и у человека, одной из главных смысловых модификаций при переходе от преРНК к мРНК является *сплайсинг*. Для того чтобы определить, что такое сплайсинг, нужно вспомнить о прерывистой структуре большинства генов эукариот. В отличие от прокариот, кодирующие области генов эукариот, которые называются *экзонами*, как правило, перемежаются с длинными некодирующими участками – *интронами*. В процессе транскрипции и экзоны, и интроны переписываются в молекулу преРНК. А потом в ходе процессинга преРНК действует механизм избирательного вырезания интронов и сшивки экзонов с образованием мРНК. Это и есть сплайсинг – рис.18. Поскольку интроны суммарно, в среднем, значительно длиннее экзонов, молекулы мРНК могут быть в десятки раз короче молекул преРНК.

Рисунок 18. Сплайсинг

На следующем этапе мРНК переходит в цитоплазму клетки и транслируется. *Трансляция* – это синтез полипептидной цепи по молекуле мРНК. На рис. 19 изображены основные этапы трансляции.

Рисунок 19. Трансляция мРНК

Трансляция происходит на *рибосомах* – небольших органеллах, широко представленных в клетках. Рибосомы состоят из двух главных субъединиц *рибосомальной РНК (рРНК)*. Важнейшими участниками процесса трансляции являются молекулы *транспортной РНК (тРНК)*. Молекулы тРНК имеют форму кленового листа (рис. 20), и они способны образовывать комплекс с одной из аминокислот и транспортировать ее к рибосоме. Какую именно аминокислоту будет транспортировать тРНК, зависит от последовательности из трех нуклеотидов в очень важном функциональном участке тРНК, который называется *антикодоном*.

Рисунок 20. Транспортная РНК (тРНК)

В процессе трансляции три нуклеотида мРНК, которые называются *кодоном* или *кодирующим триплетом*, входят в рибосому. Это является сигналом приближения к рибосомальному комплексу той тРНК, у которой антикодон комплементарен этому кодону, и она доставляет свою аминокислоту. После этого происходит дальнейшее продвижение рибосомы по мРНК, и в неё включается следующий кодон. Это является сигналом приближения к рибосомальному комплексу другой тРНК, у которой антикодон комплементарен следующему кодону. И эта новая тРНК доставляет к рибосомальному комплексу следующую аминокислоту, которая

образует пептидные связи с предыдущей. Таким образом, происходит сшивка аминокислот на рибосоме с образованием полипептидной цепи.

Итак, полипептидная цепь – это последовательность аминокислот, соединенных между собой пептидными связями. Зрелый белок отличается от полипептидной цепи, прежде всего, наличием третичной пространственной структуры. В процессе созревания белка, то есть при белковом процессинге, на одной полипептидной цепи могут происходить десятки биохимических реакций. Белковый процессинг высоко специфичен для разных белков, и его изучение выходит за рамки нашего курса.

В основе перехода от последовательности нуклеотидов в мРНК к последовательности аминокислот в полипептидной цепи лежит *генетический код* (табл.3) или соответствие последовательности из трех нуклеотидов в мРНК определенной аминокислоте в белке.

Таблица 3. Генетический код

Физическим прообразом генетического кода служат молекулы транспортных РНК. Именно они обеспечивают соответствие между нуклеотидами в мРНК и аминокислотами в белке. Итак, генетический код триплетен и составлен из четырех нуклеотидов. Количество возможных сочетаний из четырех нуклеотидов по три в кодоне равно 4^3 или 64. Из этих 64 вариантов три являются сигналами прекращения процесса трансляции. Это *стоп-кодона* или *нонсенс-кодона*. Как только любой из этих вариантов включается в рибосому, трансляция прекращается. Остальные триплеты кодируют 20 аминокислот, причем все аминокислоты, за исключением метионина, кодируются не одним, а несколькими вариантами триплетов. Лейцин, например, кодируется шестью вариантами триплетов. Это свойство генетического кода называется *вырожденностью*. Вариация между триплетами, кодирующими одну и ту же аминокислоту и потому

получившими название кодонов-синонимов или *синономических триплетов*, как правило, идет по третьему нуклеотиду в кодоне.

Расшифровка генетического кода, которая ассоциируется с исследованиями М. Ниренберга, Х. Г. Корана и М. Мессельсона, выполненными в 1966 году, также относится к разряду величайших открытий в области молекулярной генетики, позволяющих перейти от анализа генов к анализу белков и изучения функционирования клетки, как целой взаимосвязанной системы. Действительно, знание нуклеотидной последовательности кодирующей ДНК позволяет однозначно прогнозировать аминокислотную последовательность кодируемого белка. В то же время знание аминокислотной последовательности полипептидной цепи не позволяет однозначно прогнозировать нуклеотидную последовательность мРНК или кодирующую область гена в силу вырожденности генетического кода. Например, стоит в белке лейцин, и Вы не можете сказать, какой из шести возможных синономических триплетов кодирует эту аминокислоту в гене. Вы можете только написать все шесть возможных вариантов триплетов.

А почему метионин кодируется одним вариантом триплетов? Потому что он кодируется АТG-кодоном, который, в свою очередь, является местом начала транскрипции или, как говорят, *сайтом инициации транскрипции*. А потому трансляция всех белков начинается с метионина. Это незначущая аминокислота, она затем отщепляется при процессинге белка. Таким образом, необходимо запомнить, что АТG – это начало транскрипции, а метионин – это начало трансляции.

Удивительным является то, что генетический код оказался одинаковым для всех живых существ от вирусов до человека. *Универсальность* генетического кода является бесспорным доказательством родственности всего живого на Земле. При этом наиболее правдоподобной гипотезой возникновения жизни кажется ее привнесение в форме взаимодействия нуклеиновых кислот и белков откуда-то извне. Правда, остается неразрешимым вопрос, а как жизнь образовалась там, откуда она пришла на

Землю? В этом месте уместнее всего произнести слово Бог и говорить о божественном характере возникновения жизни на Земле. Но это уже вопрос не науки, а убеждения. С другой стороны, еще 100 лет назад все описанные ранее и вполне материальные факты показались бы настолько фантастическими, что их объяснение могло быть произведено только с позиций божественного начала. Можно лишь надеется, что наши внуки или даже правнуки узнают, откуда пришла жизнь на Землю.

На универсальности генетического кода основана возможность проведения геноинженерных манипуляций с молекулами ДНК. Можно, например, выделить ген человека, включить его в состав ДНК вируса, ввести эту генетическую конструкцию в бактериальную клетку и быть уверенным в том, что бактериальная клетка прочтет информацию, записанную в гене человека, точно так же, как это сделала бы клетка человека. Почему? Потому что генетический код универсален! Одним из практических приложений этих биотехнологий является геноинженерное производство лекарственных препаратов, таких как инсулин, интерферон и многие другие.

Рассмотренные в данном разделе основные *информационные процессы*, такие как репликация, транскрипция и трансляция, обеспечивающие передачу генетической информации внутри или между клетками, основаны на *матричных процессах*, то есть таких процессах, когда одна из нитей ДНК или РНК служит матрицей для последующего синтеза. К матричным процессам относятся также *репарация*, то есть исправление дефектов, возникающих при репликации ДНК и *рекомбинация* - обмен между гомологичными (кроссинговер) или негомологичными участками ДНК. Молекулярные основы всех матричных процессов в настоящее время хорошо изучены.

Глава 1. 9. Структура и экспрессия генов эукариот

По мере развития генетики представления о гене постоянно совершенствовались. Напомним, что впервые термин ген был введен для обозначения дискретных наследственных факторов, существование которых

было постулировано Менделем. В процессе развития хромосомной теории наследственности было показано, что гены это хромосомные локусы, которые одновременно являются единицами мутации, рекомбинации и функции. С возникновением молекулярной генетики появилось представление о гене, как единице транскрипции. С этой точки зрения гены – это транскрибируемые участки молекулы ДНК. Какова же их структура?

Рисунок 21. Структура генов эукариот

Напомним, что многие гены эукариот, включая человека, имеют прерывистую структуру – рис. 21. Кодирующие участки гена - экзоны, соседствуют с протяженными некодирующими участками – интронами, которые вырезаются при процессинге преРНК и, таким образом, не участвуют в трансляции. Некоторые экзоны, локализованные на концах гена, транскрибируются, но также не транслируются. Экзоны относятся к числу *смысловых* последовательностей, так как в них, в отличие от интронов или каких-то других последовательностей ДНК, нет стоп-кодонов, то есть они составляют *открытые рамки считывания*. На границах между экзонами и интронами локализованы важные канонические последовательности, так называемые *сайты сплайсинга*, необходимые для правильного вырезания интронов.

Заметим, что открытие мозаичной структуры генов эукариот оказалось совершенно неожиданным и относится к разряду мини-революции в генетике. Термины экзон и интрон были введены Уолтером Гилбертом в 1978 году и сразу были приняты научным сообществом, хотя до сих пор нет удовлетворительных объяснений, зачем нужна прерывистость структуры генов, почему она появляется у высших организмов и какие преимущества она им дает. С другой стороны, очевидно, что эволюционный прогресс эукариот в значительной степени ассоциирован с появлением мозаичных генов. В отличие от белок-кодирующих последовательностей численность и

протяженность интронов прямо коррелируют со сложностью организации жизни. У одноклеточных эукариот, таких, например, как дрожжи, интроны занимают от 10 до 20% преРНК, их средняя длина менее 100 нуклеотидов и они распределены с плотностью 1-3 на 1000 нуклеотидов экзонов. В генах высших растений от 2 до 4 интронов, их длина составляет около 250 нуклеотидов и они занимают до 50% пре-РНК. У животных средняя длина интронов увеличивается до 500 пар оснований у дрозофилы или нематоды и до 3400 нуклеотидов у человека, в среднем, их 6-7 на ген, и они занимают более 95% от общей длины первичного РНК-транскрипта.

В понятие ген входят также 5'- и 3'-нетранслируемые области. В 5'-нетранслируемой области находится основной регулятор работы гена – *промотор*. Промотор – это место взаимодействия ДНК с ферментом РНК-полимеразой, осуществляющим комплементарный синтез РНК по матрице ДНК в процессе транскрипции. Промотор определяет правильное начало транскрипции с первого иницирующего АТГ-кодона и влияет на ее скорость. Промоторы, обеспечивающие высокую скорость синтеза преРНК, называются сильными, а низкую – слабыми. Есть промоторы, которые для своей работы требуют присутствия какой-то другой молекулы, они называются индуцибельными. Транскрипция заканчивается при достижении определенных терминирующих сигналов. В 3'-нетранслируемой области гена локализованы последовательности, участвующие в регуляции процессинга мРНК и трансляции.

Транскрипция и трансляция с образованием конечного продукта (белка или РНК) вместе называются *экспрессией* или работой гена. Все гены присутствуют в ядрах клеток разных специализированных тканей организма, так как в них содержится одинаковая молекула ДНК. Однако далеко не все гены экспрессируются в разных тканях. Существует определенный набор генов, которые экспрессируются в любых типах клеток. Эти гены, получившие название *генов домашнего хозяйства*, обеспечивают энергетику, дыхание и другие процессы, без которых клетки жить не могут. Но основная

масса генов – это *тканеспецифические* гены, которые работают только в определенных клетках и на определенных стадиях их развития. Нарушение экспрессии генов, как правило, ассоциировано с развитием патологических процессов, лежащих в основе развития многих наследственных заболеваний. Отклонением от нормы является не только снижение экспрессии какого-то гена или ее полное отсутствие, но и *гиперэкспрессия* – образование аномально большого количества продукта гена – а также *эктопическая экспрессия* – работа гена в несвойственном типе клеток или в несвойственный момент онтогенетического развития.

Считается, что, в среднем, в специализированных клетках одновременно работают не более 20% всех генов. Процесс дифференцировки непосредственно зависит от набора экспрессирующихся генов. Важную роль в этом играют *транскрипционные факторы* – регуляторные элементы, способные активировать или репрессировать целую группу других генов, так называемую «*генную сеть*». Многие гены транскрипционных факторов экспрессируются в раннем эмбриогенезе и активируют «генные сети», ответственные за морфогенез отдельных органов и тканей, формирование метаболических цепей и тому подобные процессы. Генную сеть составляют также группы генов, полиморфные функционально значимые аллели которых формируют наследственную предрасположенность к мультифакториальной патологии, такой, например, как атеросклероз, язвенная болезнь, бронхиальная астма, рак молочной железы или простаты и др. У высших кроме промотора имеются дополнительные системы регуляции, усиливающие или ослабляющие экспрессию генов и обеспечивающие ее тканеспецифичность. Эти регуляторные последовательности, так называемые *энхансеры* и *сайленсеры*, могут находиться как в самом гене, так и на значительном расстоянии от него.

Современным интегральным методом оценки молекулярно-генетических параметров различных типов тканей и культивируемых линий клеток, является анализ *экспрессионного профиля генов*, основанный на

биочиповой технологии. Подобная методология позволяет одновременно следить за работой тысяч, а иногда до десятка тысяч генов. В результате могут быть выявлены группы генов, характер экспрессии которых определяет тканеспецифичность – комплекс морфологических, гистологических и функциональных особенностей, специфичных для определенных тканей или клеток.

Большинство генов эукариот представлено одной или несколькими копиями. Наряду с этим, некоторые гены повторены в геноме от десятка и более раз, и образуют *мультигенные семейства*. Эти гены обычно сгруппированы в кластеры в определенных районах одной или нескольких хромосом и часто находятся под общим регуляторным контролем. Примерами мультигенных семейств могут служить гены рибосомальных и транспортных РНК, гены α - и β -глобинов, тубулина, миоглобина, интерферона и многих других. Особое место среди мультигенных семейств занимают *супергены* – очень большие кластеры из сотен функционально и структурно родственных генов. Классическим примером супергена служит HLA-комплекс, контролирующий главные антигены гистосовместимости. Он занимает район более 6000 тыс. п.о. на коротком плече хромосомы 6 и состоит из серии тесно сцепленных генов, ответственных за синтез множества белков, включающих клеточные поверхностные антигены, молекулы иммунного ответа и некоторые компоненты комплемента. К супергенам относятся три комплекса расположенных на разных хромосомах генов, контролирующих синтез тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов. Интересно, что в процессе дифференцировки В-лимфоцитов, продуцирующих иммуноглобулины, происходит структурная перестройка этих семейств. При этом отдельные последовательности ДНК элиминируются, тогда как другие сливаются. В итоге структура генов иммуноглобулинов в зрелых В-лимфоцитах значительно отличается от исходной, то есть той, которая наблюдается в зародышевых клетках.

Основными функциями мультигенных семейств является производство большого количества белков или РНК в ограниченный момент времени или обеспечение разнообразного ответа, как в случае HLA-комплексов или генов иммуноглобулинов. Полиморфные аллели этих генов часто являются генетическими факторами риска, предрасполагающими к широкому спектру мультифакториальных заболеваний, таких как сахарный диабет, анкилозирующий и псориатический спондилиты, псориаз, ревматоидный артрит, рассеянный склероз и др.

Завершая разговор, необходимо упомянуть, что в кодирующих областях разных генов эукариот наряду с уникальными последовательностями могут присутствовать высоко гомологичные фрагменты нуклеотидных последовательностей. Это значит, что в кодируемых такими генами белках присутствуют гомологичные фрагменты аминокислотных последовательностей, ассоциированные с определенными специализированными функциями. При этом в разных генах (а значит и в разных белках) эти гомологичные фрагменты могут встречаться в различных комбинациях.

Примером являются гены коллагенов, являющихся основными компонентами внеклеточного матрикса, на долю которых приходится более 30% общей массы белков млекопитающих. В настоящее время идентифицировано 27 типов коллагенов. Все они состоят из трех равномерно скрученных полипептидных α -цепей, в каждой из которых присутствует специфический коллагеновый домен. На всем протяжении этого домена каждая третья аминокислота является глицином. Этот домен совершенно необходим для правильной организации коллагеновых молекул и фибрилл коллагена. Наследственные дефекты, нарушающие структуру коллагена, приводят к широкому спектру заболеваний, получивших общее название наследственных коллагенопатий. В то же время и в других белках имеются коллагеновые домены, в частности, в сурфактант-ассоциированных белках, дефектная структура которых является причиной развития таких тяжелых

бронхолегочных заболеваний, как респираторный дистресс-синдром, врожденный альвеолярный протеиноз или интерстициальный альвеолит.

Другие примеры. Молекулы клеточной адгезии относятся к суперсемейству иммуноглобулинов и содержат в различных сочетаниях и количестве тандемно расположенные специфические последовательности, так называемые Ig-подобные повторы. Однако Ig-повторы выполняют функции связывания лигандов и присутствуют в экстраклеточных доменах многих других белков, таких, например, как рецепторы фибробластных факторов роста, протеогликаны, фибулины и др. Во многих белках присутствуют последовательности, впервые идентифицированные в эпидермальном факторе роста – EGF-подобные домены. В частности, самый крупный домен фибриллина, занимающий около 75% всего белка, состоит из 46 EGF-подобных повторов, формирующих последовательности для связывания кальция и осуществления белок-белковых взаимодействий. Напомним, что фибриллин является основным структурным компонентом эластических волокон внеклеточного матрикса, и мутации в гене фибриллина приводят к синдрому Марфана. EGF-подобные повторы присутствуют в рецепторе трансформирующего фактора роста β , тромбоспондинах – Ca^{2+} -связывающих гликопротеинах внеклеточного матрикса – и во многих других мультидоменных белках.

Подчеркнем еще раз, что в разных белках гомологичные домены встречаются в разных комбинациях. Так, в молекуле адгезии нейронов 5 тандемных Ig-повторов сочетаются с 6 повторами, подобными фибронектину. А фибулин – белок, располагающейся на поверхности эластических волокон – содержит 44 тандемных Ig-подобных повторов, 8 EGF-подобных повторов и 6 тромбоспондин-подобных модулей. В фибриллине, наряду с EGF-подобными повторами содержатся мотивы для связывания интегринов и трансформирующих факторов роста. Список подобных примеров может быть значительно расширен. Таким образом,

блочная или модульная структура характерна для очень многих белков человека, а значит и для кодирующих эти белки генов.

Модульный принцип организации регуляторных и кодирующих последовательностей, общих для всего генома, дает широкие возможности для регуляции ансамблей генов, организованных в иерархические структуры во главе с главным геном-переключателем. При этом соподчиненные гены функционируют в разные периоды развития и могут быть интегрированы в различные «генные сети». Этот же принцип значительно облегчает создание в процессе эволюции новых генетических конструкций. При этом важнейшими эволюционными инструментами являются дубликации, разделения, перемещения и слияния различных фрагментов ДНК с какими-то другими структурными и регуляторными элементами. Такая перетасовка кубиками! В результате этих перестановок может меняться не только структура отдельных генов и мультигенных семейств, но и характер регуляции их экспрессии, что, безусловно, является определяющим в процессе эволюционных преобразований.

Глава 1.10. Мутации генов

Итак, материальной субстанцией наследственности являются молекулы ДНК и, в частности гены – транскрибируемые фрагменты ДНК, кодирующие белки и разнообразные молекулы РНК (рРНК, тРНК, регуляторные и другие РНК). Изменчивость определяется существованием различных состояний генов или аллелей. При этом нормальная изменчивость связана с присутствием у разных индивидуумов нормальных вариантов гена, а патологическая изменчивость – с наличием множества мутантных аллелей или мутаций. Носители хромосомных аномалий, доминантных мутаций или гомозиготы по рецессивным мутациям называются *мутантными особями или мутантами*. Мутации называются *«легкими»* или *«тяжелыми»*, если они ассоциированы с мягким или тяжелым течением заболевания соответственно.

Мы уже говорили о том, что мутации бывают геномными, хромосомными или генными. В общем случае, геномные и хромосомные мутации приводят к тяжелым патологическим состояниям, часто несовместимым с жизнью. К *геномным* мутациям относятся увеличения полного набора хромосом – *полиплоидии*, или изменения количества хромосом одной пары – *анеуплоидии*. У человека описано два вида полиплоидий – триплоидии и тетраплоидии – трех- и четырехкратное увеличение числа гаплоидного набора. Подобные аномалии встречаются только у спонтанных абортусов или мертворожденных. Хромосомные мутации, в свою очередь, могут быть *числовыми* (анеуплоидии) или *структурными*, то есть затрагивать число хромосом или их структуру. Наиболее частыми числовыми аномалиями являются *моносомии* – отсутствие одной из гомологичных хромосом и *трисомии* – существование добавочной третьей копии одной из гомологичных хромосом, причем эта добавочная хромосома может быть как материнского, так и отцовского происхождения. Трисомии найдены не для всех хромосом, и наиболее частыми из них являются синдромы Дауна, Эдвардса и Патау – трисомии по 21, 18 и 13 хромосомам соответственно. Иногда количество добавочных хромосом может быть еще больше, эти аномалии называются *полисомиями*. Моносомии и полисомии описаны, главным образом, для половых хромосом. Другие геномные мутации несовместимы с жизнью и приводят к ранней эмбриональной гибели.

Структурные мутации затрагивают не целые хромосомы, а их фрагменты, и чаще они возникают в области гетерохроматина. К структурным перестройкам относятся *делеции*, *инсерции*, *дупликация*, *инверсии* – соответственно отсутствие, вставка, удвоение или перевертывание на 180° фрагмента одной из хромосом, а также *транслокации* – перенос фрагмента одной хромосомы на другую – рис. 22.

Среди структурных мутаций очень важно различать *сбалансированные* и несбалансированные хромосомные перестройки. При сбалансированных

перестройках не происходит утраты генетического материала, и носители подобных мутаций, как правило, клинически здоровы. Однако в их потомстве велика вероятность рождения ребенка с несбалансированной хромосомной перестройкой, а значит, с хромосомной болезнью. Поэтому для профилактики хромосомных болезней очень важно выявлять среди практически здоровых людей носителей сбалансированных хромосомных перестроек. Об этом более подробно мы будем говорить в дальнейшем. Типичным примером сбалансированных хромосомных перестроек являются *реципрокные* и *робертсоновские* транслокации. В первом случае взаимный обмен между участками двух хромосом происходит настолько точно, что весь генетический материал сохраняется, однако меняется расположение генов в хромосомах. В робертсоновских транслокациях участвуют только такие хромосомы, у которых центромеры локализованы на концах, так называемые акроцентрики, и именно в этих местах происходит слияние двух хромосом. В результате этого слияния в кариотипе носителя робертсоновской транслокации присутствует не 46, а 45 хромосом. Несмотря на это они здоровы. Однако у носителей как реципрокных, так и робертсоновских транслокаций повышена частота бесплодия, выкидышей и мертворождений, а также повышена вероятность рождения детей с хромосомными болезнями.

Далее речь пойдет об относительно небольших мутациях, локализованных внутри генов. Такие мутации могут быть *«легкими»* или *«тяжелыми»*, если они ассоциированы с мягким или тяжелым течением заболевания соответственно. К числу генных или, как еще говорят, *точковых мутаций* относятся, в частности небольшие структурные перестройки, затрагивающие от одного до несколько нуклеотидов или даже целых экзонов, такие как делеции, инсерции, дупликации и инверсии. Последствия таких внутригенных перестроек зависят от протяженности нарушения, но еще в большей степени от его кратности величине кодона, то есть трех нуклеотидам. Разберем эту ситуацию на примере делеции – рис. 23.

Рисунок 22. Нарушения трансляции при делециях, кратных и не кратных трем нуклеотидам

Предположим, что величина делеции равна двум нуклеотидом. Это приведет к тому, что, начиная с места локализации этой делеции, формирование кодонов, а значит и их трансляция в аминокислоты, будет проходить неправильно, то есть произойдет *сдвиг рамки считывания*. При сдвиге рамки считывания очень велика вероятность случайного формирования стоп-кодона, следствием чего будет преждевременное прекращение трансляции. Таким образом, при внутригенных структурных перестройках, не кратных трем нуклеотидам, нарушается синтез белка, очень часто происходит преждевременное прекращение трансляции, образуется укороченный белок, как правило, не защищенный от действия протеолитических ферментов, и возможна полная деградация этого белка в момент синтеза или вскоре после него. Мутации со сдвигом рамки считывания – это очень тяжелый тип нарушений, ассоциированный с серьезными патологическими последствиями. Делеции, кратные величине кодона, не приводят к сдвигу рамки считывания, и реализуются в виде локальных нарушений белка. Поэтому последствия таких мутаций оказываются менее серьезными.

Так, например, основным типом нарушений при мышечной дистрофии Дюшенна/Беккера являются протяженные внутригенные делеции, захватывающие один или несколько соседних экзонов. Подобные перестройки встречаются у 65-70% больных. Однако при тяжелой форме миодистрофии Дюшенна делеции, как правило, приводят к сдвигу рамки считывания, и у больных продукт соответствующего гена (белок дистрофин) полностью отсутствует. При гораздо более мягкой форме миодистрофии Беккера делеции чаще всего оказываются кратны трем нуклеотидам, и потому сдвига рамки считывания не происходит. В результате дистрофин у больных синтезируется, хотя его структура, конечно, нарушена.

К точковым мутациям относятся замены нуклеотидов, которые могут приводить к различным нарушениям белков, а могут и не иметь таких последствий – рис. 24. Представим себе, что произошла замена нуклеотида, которая в силу вырожденности генетического кода (то есть способности кодировать одну и ту же аминокислоту различными вариантами триплетов) не привела к изменению аминокислоты в соответствующем белке. Это значит, что и на уровне фенотипа никаких изменений не произошло. Такие *нейтральные замены* относятся к классу нормальных аллелей или полиморфизмов, и они могут с высокими частотами встречаться в разных популяциях. Практически в каждом гене можно найти полиморфные аллели. Поэтому после идентификации у больного замены какого-то нуклеотида в гене, ответственном за определенное наследственное заболевание, на следующем этапе необходимо исследовать, насколько эта замена функциональна, встречается ли и как часто у здоровых членов семьи и в общей популяции. Ответы на эти вопросы позволяют оценить, относится ли эта замена к классу полиморфизмов или мутаций.

Рассмотрим другую ситуацию. Произошла замена нуклеотида в кодирующей части гена, в результате которой образовался преждевременный стоп-кодон. Это *нонсенс-мутация*. Ее последствия сопоставимы с теми, которые происходят при мутациях со сдвигом рамки считывания – преждевременное прекращение синтеза белка и его деградация. В гене миодистрофии Дюшенна/Беккера нонсенс-мутации являются вторым по частоте после делеций типом генетических нарушений. Нонсенс-мутации и небольшие структурные перестройки, сопровождающиеся сдвигом рамки считывания являются основными молекулярно-генетическими нарушениями при синдроме Гурлера – мукополисахаридозе I типа, фукозидозе, аутосомно-рецессивных вариантах синдрома Альпорта (нефропатия в сочетании с дефектами слуха), атрофическом буллёзном эпидермолизе, синдроме Элерса-Данло VI и VIII типов, надклапанном стенозе аорты, ахондрогенезе

IV типа, аниридии (гипоплазия либо отсутствие радужки), брахидактилии C, а также при многих других заболеваниях.

Однако наиболее широкое распространение имеют *миссенс-мутации* – такие замены нуклеотидов в кодирующей части гена, которые сопровождаются заменой соответствующей аминокислоты в белке. Миссенс-мутации часто обнаруживаются при различных наследственных ферментопатиях. Их последствия могут быть очень разными, и это зависит от нескольких обстоятельств. Прежде всего, где расположена подобная замена, и насколько функционально значим этот участок белка, произошло ли изменение заряда при изменении аминокислоты, относится эта замена к классу доминантных или рецессивных мутаций? Около 1000 различных миссенс-мутаций идентифицировано в гене муковисцидоза, хотя в европейских и северо-американских популяциях у больных чаще всего обнаруживается специфическая мутация – делеция трех нуклеотидов в 10-ом экзоне гена, сопровождающаяся отсутствием одной аминокислоты – фенилаланина – в 508 положении соответствующего белка (delF508). Мутации, подобные delF508, встречающиеся с высокими частотами в определенных популяциях или этнических группах, называются *мажорными*.

Проявление мутации зависит также от того, в каком участке гена произошло нарушение. Мутации, расположенные в регуляторных областях гена, как правило, приводят к количественным нарушениям на уровне белка, но при этом структура самого белка сохраняется нормальной. Поэтому последствия *регуляторных мутаций* могут быть менее драматичными по сравнению со структурными мутациями. Регуляторные полиморфные замены чаще оказываются ассоциированы не с моногенной, а с мультифакториальной патологией и рассматриваются в качестве генетических факторов риска, предрасполагающих к ее развитию. Примерами могут служить полиморфизмы в промоторных областях генов

фибриногена и ингибитора активатора плазминогена, ассоциированные с определенными формами сердечно-сосудистой патологии.

Широкое распространение имеют, так называемые, *сплайсинговые мутации* – мутации, расположенные в сайтах сплайсинга или в интронах с формированием новых сайтов сплайсинга. Такие мутации в зависимости от их локализации могут приводить либо к ошибочному вырезанию экзона, либо к невырезанию интрона. В первом случае в белке будет отсутствовать достаточно протяженный участок, кодируемый ошибочно вырезанным экзоном. Во втором случае при трансляции невырезанного экзона обязательно встретится стоп-кодон, так как интроны не составляют открытых рамок считывания, и последствия будут такими же, как при мутациях со сдвигом рамки считывания. Таким образом, сплайсинговые мутации чаще всего приводят к тяжелым патологическим состояниям, хотя могут встречаться и при относительно легких вариантах заболевания. Синдром Шейе – более мягкая по сравнению с синдромом Гурлера клиническая форма упоминавшегося выше мукополисахаридоза I типа – обусловлен преимущественно сплайсинговыми мутациями, присутствующими в том же гене, что и мутации с преждевременной терминацией синтеза белка, выявляемые у больных синдромом Гурлера. Нарушения сплайсинга являются частым типом мутаций при различных генетических вариантах множественной эпифизарной дисплазии, классических формах синдрома Элерса-Данло I и II типов и синдактилии II типа, синдроме Шварца-Джампея – скелетной дисплазии, сочетающейся с миотонической миопатией и блефарофимозом, а также при ряде других наследственных заболеваний. Интересно отметить, что сплайсинговые мутации сгруппированы в определенном районе гене фибриллина, ответственного за синдром Марфана, и одна из них относится к числу немногих мутаций, встретившихся у нескольких неродственных больных. Упоминавшаяся выше мажорная мутация, являющаяся причиной развития диастрофической дисплазии более чем у 90% больных в Финляндии, также относится к разряду

сплайсинговых. Ранее мы уже упоминали, что при аниридии частыми являются нонсенс-мутации, выявляемые у 50% больных, и небольшие делеции и инсерции, присутствующие в 30% случаев. У остальных больных обнаруживаются сплайсинговые мутации.

К новому типу относятся *динамические мутации* – увеличение (или экспансия) выше допустимого предела числа повторов (чаще всего 3-нуклеотидных), расположенных в функционально значимых областях генов. Наследственные заболевания, обусловленные динамическими мутациями, получили название *болезней экспансии*. К ним относятся такие моногенные заболевания, как синдром Мартина-Белл (одна из наиболее частых форм олигофрении у мальчиков), миотоническая дистрофия, атаксия Фридрейха и целая серия спинальных атаксий, хорея Гентингтона, распространенная в Финляндии миоклонус-эпилепсия Унверихта-Лундборга и ряд других заболеваний, о которых более подробно мы будем говорить во второй части учебника.

Теперь рассмотрим вопрос о том, почему одни мутации ведут себя, как доминантные, то есть их патологические последствия проявляются уже в гетерозиготном состоянии, тогда как другие относятся к классу рецессивных мутаций. В зависимости от характера нарушения функций кодируемого геном белка мутации делят на группы: (1) мутации, сопровождающиеся полной или частичной потерей функции белка; (2) мутации, эффект которых обусловлен снижением содержания нормального белка, то есть *гаплонедостаточностью*; (3) мутации, приводящие к появлению у мутантного белка новой агрессивной патологической функции; (4) мутации, обладающие негативной функцией по отношению к нормальному продукту гена, то есть, такие мутации, при которых мутантный белок подавляет действие нормального. Очевидно, что патологический эффект мутаций первого типа будет проявляться только в гомозиготном состоянии, то есть это рецессивные мутации. Гаплонедостаточность может быть результатом как рецессивных, так и доминантных мутаций. Для фенотипического

проявляются мутаций *с доминантно-негативным эффектом*, входящих в третью и четвертую группы, достаточно их присутствия в гетерозиготном состоянии. Такие мутации относятся к классу доминантных.

Взаимоотношения между мутациями и их фенотипическими проявлениями, то есть признаками, достаточно сложные. Широко распространено в живой природе явление, которое получило название *генетическая гетерогенность*. Оно заключается в том, что мутации в разных генах могут приводить к сходным фенотипам. К такому характеру наследования могут привести разные причины. Чаще всего продукты подобных генов взаимодействуют между собой. Они могут быть (1) участниками единой метаболической цепи, (2) субединицами мультимерных белков, образующих надмолекулярные комплексы, а также (3) могут иметь взаимоперекрывающиеся функции. Клинических примеров генетической гетерогенности очень много. Первый тип взаимоотношений между первичными биохимическими дефектами характерен для различных генетических вариантов спастической параплегии, бокового амиотрофического склероза или полинейропатии Шарко-Мари-Тус. Клинически сходные наследственные коллагенопатии могут быть обусловлены мутациями в генах различных α -цепей, участвующих в образовании коллагена одного и того же типа. Это сходство обусловлено взаимодействием между субединицами мультимерных белков. И, наконец, примерами третьего типа взаимоотношений являются многочисленные клинически сходные генетические варианты краниосиностозов, обусловленные мутациями в генах различных рецепторов фибробластных факторов роста, функции которых в значительной степени перекрываются.

С другой стороны разные мутации в одном и том же гене могут приводить к различным фенотипам, составляющим *аллельные серии*, что и определяет *клинический полиморфизм*. Существование аллельных серий чаще всего объясняется многофункциональностью белка, лежащего в основе первичного биохимического нарушения. Подобные белки в разных тканях

организма могут осуществлять различные функции. Поэтому последствия мутаций, затрагивающих разные активности многофункциональных белков, могут в специфических тканях приводить к различным патологическим процессам. Таким образом, фенотипический полиморфизм аллельных серий объясняется не только тканеспецифическим характером экспрессии гена, но, главным образом, различиями в характере функций, выполняемых одним и тем же белком в разных тканях. Так, различные мутации в гене мажорного хрящевого коллагена могут приводить к 13 клинически различающимся вариантам хондродисплазий, в некоторых случаях сочетающихся с офтальмопатиями, и изолированных офтальмопатий. Разные мутации в гене рецептора 3 фибробластных факторов роста найдены у пациентов с ахондроплазией, гипохондроплазией, танатоформной дисплазией двух типов, платиспондилической летальной скелетной дисплазией, камптодактилией, сочетающаяся с высоким ростом и потерей слуха, а также у больных с четырьмя клиническими вариантами краниосиностозов. Не менее полифункциональным является структурный ядерной белок ламин A/C. Мутации в кодирующем этот белок гене приводят к широкому спектру заболеваний, получивших общее название ламинопатий. Среди них 12 аллельных заболеваний, включая клинически различающиеся варианты дилатационной кардиомиопатии, мышечной дистрофии, (конечностно-поясные и аутосомные миодистрофии с контрактурами Эмери-Дрейфуса), липодистрофии, полинейропатии, мандибулоакральной дисплазии и несколько прогерических синдромов.

С формально-генетической точки зрения заболевания, входящие в одну аллельную серию, следует трактовать, не как самостоятельные нозологии, а как клинические вариации одной и той же нозологической формы. С другой стороны, заболевания, обусловленные мутациями в разных генах, являются разными даже в том случае, если их клиническая дифференцировка невозможна. Однако с практической точки зрения нам представляется

удобным сохранение клинической классификации заболеваний с указанием их аллельной принадлежности.

В некоторых случаях фенотипическое выражение специфической мутации может меняться в зависимости от внешних условий или *средового фона*. На проявление мутации могут также оказывать влияние состояния каких-то других генов, модифицирующих развитие признаков, так называемых *генов-модификаторов*. В этом случае говорят о роли *генетического фона* в формировании признака. Характер взаимодействия между аллелями разных генов существенно отражается на особенностях фенотипа. Наиболее известными типами межгенных взаимодействий являются *комплементарность*, *эпистаз* и *полимерия*. Комплементарность это такой тип взаимодействия между генами, который приводит к образованию нового признака, отсутствующего у родителей. При эпистатическом взаимодействии наблюдается подавление фенотипического проявления одного гена действием другого. При полимерии несколько генов участвуют в формировании одного признака, причем их эффекты примерно одинаковы. Роль полимерии особенно велика при формировании количественных признаков.

И средовой, и генетический фон могут влиять как на проявление мутации, то есть ее *пенетрантность*, так и на степень выраженности признака, то есть его *экспрессивность*. Большой вклад в исследование этих явлений внесли работы отечественных генетиков, прежде всего Н. В. Тимофеева-Ресовского и Б. Л. Астаурова, а также многих других ученых. Неполная пенетрантность, при которой болезнь развивается лишь у части мутантных индивидуумов, характерна, в частности, для аутосомно-доминантного гипофосфатемического рахита, первичной легочной гипертензии, аритмогенной дисплазии правого желудочка, надклапанного стеноза аорты Эйзенберга и многих других наследственных заболеваний.

Варьирующая экспрессивность проявляется различной тяжестью клинических симптомов заболевания. У части больных, принадлежащих

одной семье, могут наблюдаться стертые и abortивные формы заболевания, которые могут быть обнаружены лишь с использованием специальных методов обследования, тогда как у других наблюдается развернутая картина заболевания. Например, различные мутации в гене коллагена 7 типа (*COL7A1*) приводят к девяти нозологически самостоятельным формам дистрофического буллёзного эпидермолиза, значительно различающимся между собой по дебюту, тяжести течения, прогнозу, локализации патологических очагов, площади поражения, присутствию сопутствующих клинических проявлений в виде дистрофии ногтей и несовершенного дентиногенеза. Каких-либо закономерностей в характере мутаций в гене *COL7A1*, ассоциированных с различными клиническими вариантами дистрофического буллёзного эпидермолиза, до сих пор не выявлено. Мутации одного и того же типа могут приводить к очень тяжелым сублетальным формам заболевания (Пасини или Барт-типа), более мягким локализованным вариантам (Коккейна–Турена, претибиальному или чешуйчатому буллёзному эпидермолизу), самоизлечивающейся неонатальной форме переходящего буллёзного дермолизиса. и даже к изолированной дистрофии ногтей на пальцах стоп без проявлений буллёзного эпидермолиза. Более того, в некоторых случаях у больных с различными клиническими вариантами дистрофического буллёзного эпидермолиза идентифицированы одинаковые мутации в гене *COL7A1*. Чрезвычайно вариабельны даже в пределах одной семьи клинические проявления полиморфной дистрофии роговицы глаза – редком аутосомно-доминантном заболевании, характеризующейся метаплазией и чрезмерно быстрым ростом эндотелия клеток роговичной оболочки – от тяжёлых форм с прогрессивным течением, до бессимптомных вариантов. Варьирующая экспрессивность характерна для аутосомно-доминантной несиндромальной гиподантии/олигодантии и многих других наследственных заболеваний.

Еще одним примером сложности взаимоотношений между геном и признаком является *плейотропия*, которая заключается в том, что мутация

может приводить к развитию патологических процессов одновременно в нескольких системах, органах и тканях. Полисистемность поражения характерна для очень многих наследственных заболеваний. Какие именно органы и ткани вовлекаются в патологический процесс, зависит, в первую очередь, от характера экспрессии мутантного гена и тканеспецифических функций кодируемого им белка.

Далеко не все, а только около 5% генов человека связаны с моногенными заболеваниями. Во-первых, функции некоторых генов настолько важны, что их нарушения в результате возникновения каких-то мутаций несовместимы с жизнью. Чаще всего, такие мутации приводят к ранней эмбриональной летальности. С другой стороны, последствия мутаций в некоторых генах могут быть компенсированы за счет продуктов других генов. Существует немало примеров дублирования определенных функций организма как на генном, так и на белковом уровнях.

Для практических целей важно знать, как записываются мутации. Разработана универсальная, стандартная система, рассчитанная как на запись аминокислотных замен в белках, так и на нуклеотидные замены и перестановки в ДНК. В первом случае при миссенс-мутации каждой аминокислоте соответствует одно- или трехбуквенный символ – табл. 4. Слева записывается нормальный вариант аминокислоты, справа – мутантный. Номер в центре соответствует месту замены в полипептидной цепи. Например, запись P252R или Pro252Arg означает замену пролина на аргинин в 252 положении белка. Такая мутация в гене Fgf-рецептора 2 является причиной развития многих наследственных вариантов краниосиностозов, причем, как правило, она возникает *de novo*.

Буквой X обозначается остановка синтеза при нонсенс-мутациях. Например, R1226X или Arg1226X означает замену аргинина на стоп-сигнал в 1226 кодоне. Это мажорная мутация в гене коллагена 17 типа, идентифицированная у больных атрофическим буллёзным эпидермолизом из Америки, Германии, Голландии и некоторых других стран. Делеции или

инсерции обозначают символами del (или Δ) и ins соответственно с указанием нуклеотидов, если их не более двух, или в противном случае - их числа. Вспомним мажорную мутацию в гене муковисцидоза – delF508.

Сплайсинговая мутация обозначается символом IVS. Например, сплайсинговая мутация IVS46+5 G-A в гене фибрина 1, сопровождающаяся ошибочным вырезанием экзона 51, встретилась у 9 неродственных больных синдромом Марфана. Это необычная ситуация, так как в гене фибриллина практически нет мажорных мутаций, и подавляющее большинство из 563 мутаций, представленных в базе данных, уникальны, то есть описаны только у одного больного или в одной семье. Полиморфизмы, связанные с равноценной по функциональной значимости заменой аминокислот, записывают через косую черту. Например, M/V470 означает метионин или валин в положении 470.

Таблица 4

Обозначение аминокислот

| 3-буквенное обозначение | Аминокислота | 1-буквенное обозначение | | 3-буквенное обозначение | Аминокислота | 1-буквенное обозначение |
|-------------------------|-----------------------|-------------------------|--|-------------------------|--------------|-------------------------|
| Ala | Аланин | A | | Leu | Лейцин | L |
| Arg | Аргинин | R | | Lys | Лизин | K |
| Asn | Аспарагин | N | | Met | Метионин | M |
| Asp | Аспарагиновая кислота | D | | Phe | Фенилаланин | F |
| Cys | Цистеин | C | | Pro | Пролин | P |
| Gln | Глутамин | Q | | Ser | Серин | S |
| Glu | Глутаминовая кислота | E | | Thr | Треонин | T |
| Gly | Глицин | G | | Trp | Триптофан | W |
| His | Гистидин | Y | | Tyr | Тирозин | Y |
| Ile | Изолейцин | I | | Val | Валин | V |

Глава 1.11. Обратная генетика, генная инженерия

Подчеркнем еще раз, что определение нуклеотидной последовательности кодирующей области гена означает расшифровку аминокислотной последовательности кодируемого белка. А знание аминокислотной последовательности белка, в свою очередь, позволяет реконструировать его третичную структуру и доменную организацию. Является этот белок секреторным или внутриклеточным, может быть это трансмембранный белок, возможно, он выполняет функции ионного канала или рецептора, или участвует во взаимодействии с другими белками, может быть он ассоциирован с ядром или митохондриями? Оказалось, что все эти и очень многие другие функции белков связаны с определенными, как говорят, конценсусными последовательностями аминокислот. И проводя сопоставительный компьютерный анализ, можно довольно точно реконструировать функции этого прогнозируемого белка. Вся эта дорога «от гена к белку» называется *обратной генетикой*.

Открытие любого гена всегда сопровождается изоляцией и клонированием его кодирующей области, так называемой молекулы *комплементарной ДНК – кДНК*. Для того чтобы определить, что такое кДНК, нужно вспомнить процесс транскрипции. Мы говорили, транскрипция это синтез молекулы РНК, комплементарной определенным участкам молекулы ДНК, то есть генам. А есть процесс *обратной транскрипции*, когда в качестве матрицы используется молекула РНК и с помощью определенного фермента, который так и называется – *обратная транскриптаза* – производится синтез молекул ДНК. Если взять какую-то специфическую молекулу мРНК и провести обратную транскрипцию, получится очень важный класс молекул – комплементарная ДНК. Вы помните, в мРНК уже нет интронов, поскольку сплайсинг уже прошел. Поэтому обратный синтез ДНК с использованием в качестве матрицы мРНК позволяет получить молекулу кДНК, составленную только из экзонов, то есть представляющую собой кодирующую область соответствующего этой мРНК гена.

Рисунок 25. Получение комплементарной ДНК

На следующем этапе молекулу кДНК клонируют. *Клонирование* это очень эффективный метод поддержания и размножения любых относительно небольших молекул ДНК путем их встраивания в *вектор* и введения этой конструкции в клетки-хозяина – рис. 26. Химерные молекулы, составленные из ДНК различного происхождения, называются *рекомбинантными ДНК*. Вектора обеспечивают проникновение чужеродных ДНК в клетки, и их конструируют на базе тех молекул, которым свойственно проникать в клетки, чаще всего вирусных или плазмидных ДНК. При этом стараются избавиться от собственных генов вирусов, чтобы вектор ни в коем случае не обладал инфицирующими свойствами. В качестве клеток-хозяина чаще всего используют бактериальные клетки.

Рисунок 26. Клонирование ДНК

Клонированную кДНК условно называют *«ген в пробирке»*. Эта система позволяет работать с геном как с веществом. Можно наращивать число копий гена путем размножения клеток-хозяина. Одновременно могут быть обеспечены условия для экспрессии введенной в бактериальную клетку кДНК. Так, например, при клонировании генов человека в бактериях можно добиться синтеза в них чужеродных для этих клеток белков человека. Такая возможность, как мы уже указывали, определяется универсальностью генетического кода, то есть одинаковым прочтением информации, записанной в молекулах ДНК, клетками любого видового происхождения. Клонирование лежит в основе всей *генной инженерии* и, в частности, геноинженерного производства лекарственных препаратов, таких как инсулин, интерферон и многие другие.

После получения «гена в пробирке» определяют нуклеотидную последовательность клонированной кДНК. Процесс определения нуклеотидных последовательностей ДНК называется *секвенированием*, а сами эти последовательности иногда называют *сиквенсами*. Методы

секвенирования впервые были разработаны Сенджером, Максамом и Гилбертом в 1977 году. В настоящее время они значительно усовершенствованы и носят характер рутинной процедуры. Переход от прогнозируемого или виртуального белка к реальному осуществляется путем получения антител либо к искусственно синтезируемым полипептидам, гомологичным прогнозируемой полипептидной последовательности, либо к продукту экспрессии кДНК в клетках-хозяина.

С помощью антител можно анализировать характер распределения этого белка *in vivo* в норме и при каких-то патологических состояниях, а также попытаться выделить его в количестве, достаточном для прямого биохимического анализа и выявления тех метаболитов, которые взаимодействуют с этим белком. Давайте задумаемся, что все это означает, если речь идет о заболевании, в этиологии которого есть генетическая составляющая? Идентификация подобного белка означает нахождение первичного биохимического дефекта при данном заболевании. Выделение этого белка и его биохимический анализ означает расшифровку первичной патологической метаболической цепи, то есть понимание молекулярных основ не только этиологии, но и начальных этапов патогенеза заболевания. А это, в свою очередь, создает базис для разработки не только симптоматических, но и патогенетических методов лечения заболевания – одно из главнейших направлений современной молекулярной медицины.

Подчеркнем еще раз, что самая простая дорога к пониманию того, как устроены белки, лежит через гены. Вспомним, какие грандиозные усилия тратили ученые всего мира еще 2-3 десятилетия тому назад на то, чтобы расшифровать аминокислотные последовательности наиболее просто устроенных белков или даже их фрагментов. Это методы физико-химического анализа, ядерно-магнитного резонанса, рентгено-структурного анализа, электронной микроскопии, масс-спектрологии и др. Лучшие умы занимались этими вопросами в самых передовых хорошо оснащенных лабораториях. И успехи были достаточно скромные! Сейчас дела обстоят

совершенно по-другому. Как только расшифровывается нуклеотидная последовательность кодирующей области гена, эта последовательность вводится в определенную компьютерную программу, которая вырисовывает соответствующий белок в объеме, в цвете, с указанием всех активных сайтов. Одновременно будет выписан список всех других белков по всему живому миру, которые имеют области гомологии с исследуемой аминокислотной последовательностью, и будет указано, какие функции эти белки выполняют. Таким образом, главным следствием открытия гена является возможность перехода на белковый уровень анализа. В частности, открытие генов наследственных болезней человека создает методические предпосылки для изучения биохимических основ первичных патологических нарушений и разработки методов адекватной метаболической коррекции.

От работы с рекомбинантными ДНК и изучения последствий их введения в культуры клеток, то есть в системы *in vitro*, генная инженерия перешла на уровень экспериментальных животных и растений, то есть на системы *in vivo*. Этому способствовали успехи в области экспериментальной эмбриологии. Были созданы предпосылки для целенаправленного конструирования генетических модельных линий путем *трансгеноза*, то есть искусственного введения чужеродного генетического материала в оплодотворенную яйцеклетку или ранние зародыши экспериментальных объектов. Получающиеся в результате подобных манипуляций *трансгенные линии* животных или растений являются идеальными экспериментальными системами для изучения функций отдельных генов и оценки их биологического действия на организм, исследования молекулярно-генетических основ онтогенеза, а также возможности работы со специфическими клонами клеток *in vivo*.

На первых этапах трансгенные модельные линии получали путем прямых микроинъекций рекомбинантных ДНК в ядра оплодотворенных яйцеклеток. Одновременно была разработана методика получения *зародышей-химер*, состоящих из клеточных клонов, полученных из разных

зигот. Если эти клетки различаются, например, по генам окраски шерсти, химерное животное будет иметь поперечную или пятнистую окрашенность. При этом животные, независимо полученные в результате объединения бластомеров двух разных линий, будут отличаться друг от друга по характеру пятнистости, так как процесс формирования клонов из разных клеток ранних зародышей носит случайный характер – рис. 27.

Рисунок 27. Химерные животные, различающиеся по гену окраски шерсти

Более прогрессивный способ создания трансгенных линий основан на использовании в качестве клеточных векторов *эмбриональных стволовых клеток (ЭСК)*. ЭСК получают из клеток бластоцисты (внутренней клеточной массы) или из первичных половых клеток ранних постимплантационных зародышей. Они обладают свойством *тотипатентности*, то есть способностью дифференцироваться в любые специализированные типы клеток. Генетическую модификацию ЭСК проводят в условиях культивирования, а затем их вводят в бластоцель, где они могут случайным образом участвовать в формировании эмбриональных зачатков и органов развивающегося зародыша – рис. 28.

Значительный прогресс в изучении молекулярной природы наследственных болезней человека связан с возможностью конструирования и генетического анализа трансгенных линий мышей с сайт специфической модификацией определенного гена. Техника трансгеноза позволяет направленно разрушать гены и получать так называемые *«нокаут»*-линии, вводить специфические мутации в определенный ген, получать линии животных с гиперэкспрессией, тканеспецифической или эктопической экспрессией дополнительной введенной генетической конструкции. Генетические манипуляции могут быть проведены только в одной или нескольких специфических тканях экспериментального животного и даже в определенный момент дифференцировки. Подобные модельные линии мышей сконструированы практически для всех известных генов,

ассоциированных с наследственными заболеваниями человека. Кроме того, подобные методические разработки заложили фундамент для развития *генной терапии* – лечения с использованием смысловых или регуляторных последовательностей ДНК.

Глава 1.12. Генетические основы развития

В настоящее время не подвергается сомнению тот факт, что индивидуальное развитие организма находится под генетическим контролем. В древности существовало представление о том, что в женских половых клетках уже присутствует сформированный зародыш, в яйцеклетках которого, в свою очередь, содержится еще более маленький зародыш и так далее. По подсчетам одного из основоположников сформулированной выше гипотезы А. Галлера в яичнике Евы должно было содержаться около 200 млрд. зародышей. Сейчас очевидна несостоятельность этой теории. В половых клетках содержится не сам зародыш, а инструкция в виде заключенной в молекуле ДНК генетической информации, которая во взаимодействии с внешними факторами управляет развитием организма.

Огромное количество исследований посвящено анализу молекулярно-генетических основ онтогенеза. Процесс дифференцировки детально изучен на морфологическом уровне. В последние десятилетия произошел огромный прогресс в понимании биохимических и молекулярных превращений, участвующих в контроле развития. Однако до сих пор нет удовлетворительного ответа на вопрос, как из одной оплодотворенной яйцеклетки образуется более 200 гистологических типов клеток, составляющих наш организм. В первую очередь, это связано с тем, что процесс онтогенеза отличается необычайной сложностью и удивительной организованностью.

Зигота и различные специализированные клетки содержат одинаковые наборы генов, и это значит, что дифференцировка не сопровождается утратой генетического материала. Меняется лишь характер экспрессии генов. Мы

уже говорили о том, что в специализированных клетках работают около 20% генов, причем наборы экспрессирующихся генов в разных типах клеток различны. Эти изменения, а также те, которые происходят в цитоплазме, в общем случае, носят необратимый характер. В первую очередь, это касается утраты специализированными клетками свойства тотипатентности, то есть способности давать начало другим типам клеток. Эта способность присуща только клеткам ранних зародышей, и она в определенной мере сохраняется за стволовыми клетками. Таким образом, механизм генетического контроля эмбрионального развития ассоциирован с дифференциальной экспрессией генов.

Ядра специализированных клеток, а значит и ДНК, не теряют тотипатентности, и будучи трансплантированы в безъядерную зиготу, способны инициировать развитие и дать начало жизнеспособному организму. Впервые это было показано во второй половине XX века Дж. Гердоном в опытах на амфибиях. Продолжение этих исследований привело к появлению знаменитой овечки Долли и рождению на стыке эмбриологии и генетики нового направления по *клонированию* животных и растений. Это направление имеет огромные перспективы, в частности в трансплантологии, так как позволяет выращивать из отдельных стволовых клеток специализированные ткани и даже органы. При этом может быть снята одна из самых серьезных проблем трансплантологии – отторжение пересаженных тканей. Исследования по клонированию перспективны также для развития сельского хозяйства, так как позволяют получать точные генотипические копии высокопродуктивных животных и растений. Однако работы в области клонирования человека, то есть получения нового организма из соматической клетки реципиента, в настоящее время считаются недопустимыми. Это связано не только с большим количеством этических и правовых проблем, но и с недостаточной изученностью биологических аспектов клонирования, в частности взаимоотношений между цитоплазматическим и ядерным контролем развития. Исследования по генетике развития у нас в стране

успешно проводились во многих научно-исследовательских центрах: в Москве под руководством Б. П. Астаурова, Б. В. Конюхова, Нейфаха, в Ленинграде – П. Г. Светлова и Н. П. Дыбана, в Новосибирске – Л. И. Корочкина.

Еще Т. Морган высказал предположение о том, что начало индивидуального развития дрозофилы относится к периоду созревания яйцеклетки. В опытах по клонированию была доказана ведущая роль цитоплазмы в детерминации развития. Подчеркнем еще раз, что развитие из ядра соматической клетки происходит только в том случае, если оно помещено в детерминированную к развитию ооплазму оплодотворенной яйцеклетки. Наш выдающийся соотечественник эмбриолог П. Г. Светлов предложил особо выделять проэмбриональный период, который начинается с формирования половых клеток и заканчивается оплодотворением. В процессе женского гаметогенеза (*оогенеза*) происходит детерминация морфологических осей, типа симметрии, обособление кортикального слоя цитоплазмы и участков, соответствующих будущим органам. По словам П. Г. Светлова «в *ооците* (предшественнике яйцеклетки) имеется как бы каркас, отражающий наиболее общие черты архитектоники строящегося организма».

В ооците экспрессируются практически все гены, и в ооплазме накапливается большое количество материнских белков и мРНК, которые и управляют первыми этапами дробления зародыша. Таким образом, генотип матери в большей степени влияет на формирование признаков у потомства, чем генотип отца. В этом и заключается так называемый *материнский эффект*. Кроме того, в период созревания ооцита происходит формирование строго упорядоченной гетерогенности цитоплазмы, так называемая *ооплазматическая сегрегация*, в ходе которой закладывается план строения будущего организма. Наблюдается постепенное падение концентрации белков и мРНК в направлении от анимального полюса к вегетативному. При механическом разрушении этого градиента развития зародыша не происходит. В зрелых ооцитах транскрипция не обнаруживается. Она

восстанавливается только на стадии поздней зиготы, когда наблюдается прогрессивная активация или *репрограммирование* эмбрионального генома.

Напомним, что у человека первичные половые клетки закладываются и вступают в мейоз уже в конце бластогенеза, то есть спустя две недели после оплодотворения, а их детерминация происходит еще раньше. Затем деление первичных половых клеток блокируется. Потенциальные яйцеклетки созревают в период половозрелости женщины до момента овуляции, когда снимается первый блок мейоза, причем мейоз заканчивается лишь с началом оплодотворения. Таким образом, одна оплодотворенная яйцеклетка физически связывает три поколения. И в некоторых случаях последствия неблагоприятных внешних воздействий в период детерминации и закладки первичных половых клеток плода беременной женщины могут проявиться в виде различных аномалий развития у ее внуков.

Ведущая роль в морфогенезе тканей принадлежит экспрессирующимся в раннем эмбриогенезе генам транскрипционных факторов - секреторных белков, служащих индуктивными сигналами для развития. Подобные белки способны взаимодействовать с регуляторными участками других генов и осуществлять активацию или репрессию так называемой «генной сети» - каскада генов, координированная экспрессия которых определяет специфические программы детерминации, дифференцировки и морфогенеза отдельных органов и тканей. Впервые система генетического контроля различных этапов онтогенеза эукариотических организмов была подробно изучена на дрозофиле. Гены транскрипционных факторов, участвующие в контроле онтогенеза, оказались наиболее консервативными в эволюции. Поэтому неудивительно, что подавляющее большинство таких генов у человека было открыто по гомологии с генами дрозофилы. Часто это находит отражение уже в самом обозначении гена.

Сегментация организма, включающая разделение на головной, грудной и брюшной отделы, также как генетический контроль пространственной организации градиентов морфогенетически активных белков, определяющих

сегментацию, универсальны в животном мире. Последовательные этапы активации участвующих в этом процессе морфогенетических транскрипционных факторов хорошо изучены. На рис. 29 представлена упрощенная схема активации генов в онтогенезе дрозофилы.

Рисунок 29. Последовательные этапы активации генов в онтогенезе дрозофилы

При взаимодействии перекрывающихся градиентов морфогенетически активных белков, являющихся на первых этапах продуктами материнских генов, таких, в частности как *bicoid*, активируются гены группы *gap*, которые в свою очередь запускают гены группы *pair*, *runt* и др., что, в конце концов, приводит к локальной экспрессии самой многочисленной группы генов *сегментной полярности*, в которую, в частности, входит ген *hedgehog*. После формирования границ каждого сегмента их специфические черты детерминируются *гомеозисными* генами. Эти гены содержат специфические *гомеобоксы* - *Нох*, *Рах* (*pair*-боксы), *Sox* (SRY-родственный HMG-боксы) и др., белковые продукты которых – *гомеодомены* - взаимодействуют с регуляторными участками ДНК, осуществляя активацию или репрессию соответствующей «генной сети».

У человека идентифицировано четыре кластера НОХ-генов (А, В, С, D), в каждом из которых от 9 до 11 генов. Большинство мутаций в этих генах приводят к эмбриональной летальности, и только две из них ассоциированы с аутомно-доминантными дефектами кистей и стоп. Мутации, связанные с наследственными болезнями человека, найдены в четырех из девяти РАХ-генов. Более 20 генов группы SOX характеризуются тканеспецифической экспрессией в раннем эмбриогенезе. Гетерозиготные мутации в гене SOX9 человека являются причиной развития одной из форм тяжелой скелетной дисплазии, сопровождающейся реверсией пола.

Органогенез регулируется последовательными индуктивно-тканевыми взаимодействиями, реализация которых осуществляется с участием многих

клеточных процессов, таких как пролиферация, адгезия, апоптоз, миграция и дифференцировка. В контроле ранних этапов органогенеза наряду с генами транскрипционных факторов ведущая роль принадлежит генам факторов роста и дифференцировки, их антогонистов и рецепторов.

Глава 1. 13. Структура генома прокариот и эукариот, мобильная генетика

Под *геномом* понимается полная генетическая система клетки, которая обеспечивает передачу в ряду поколений всех ее свойств, как структурных, так и функциональных. Впервые термин геном был введен ботаником Винклером для обозначения гаплоидного набора хромосом. В дальнейшем этот термин использовали для обозначения количества ДНК в гаплоидной или диплоидной клетке. В молекулярной генетике геном и ДНК часто используют как идентичные понятия.

У многих вирусов, которые называются *ретровирусами*, геном представлен молекулой РНК. Часто РНК заключена в белковую оболочку – *капсид*. РНК-содержащие вирусы вызывают у человека различные заболевания, такие как грипп, полиомелит, гепатит, краснуху, корь и многие другие. Геном РНК-вируса мал, и может состоять всего из трех генов, один из которых кодирует белок капсида, а другие необходимы для самовоспроизводства вируса. При проникновении вируса в клетку на первом этапе происходит синтез однонитевой кДНК по матрице РНК вируса с помощью фермента обратной транскриптазы. Часто ген этого фермента находится в геноме самого РНК-вируса. По матрице кДНК строится двунитевая ДНК и происходит ее встраивание или транспозиция в хромосомную ДНК клетки хозяина, а затем ее транскрипция и трансляция с образованием вирусных белков. Подобный механизм включения генома РНК-вируса в хромосомную ДНК называется *ретропозицией*.

Геномы прокариот и эукариот, хотя и имеют определенное сходство, но все же существенно различаются по своей структуре. Геномы прокариот

практически целиком состоят из генов и регуляторных последовательностей. В генах прокариот нет интронов. Часто функционально родственные гены прокариот находятся под единым транскрипционным контролем, то есть транскрибируются вместе, составляя *оперон*.

Геномы эукариот существенно больше геномов бактерий, у дрожжей примерно в 2 раза, а у человека – на три порядка, то есть в тысячу раз. Однако прямой зависимости между количеством ДНК и эволюционной сложностью видов не наблюдается. Достаточно сказать, что геномы некоторых видов амфибий или растений в десять или даже в сто раз превосходят по размеру геном человека. В некоторых случаях близкие виды организмов могут существенно различаться по количеству ДНК. Важным обстоятельством является то, что при переходе от прокариот к эукариотам увеличение генома происходит, главным образом, за счет появления огромного количества некодирующих последовательностей. Действительно, в геноме человека кодирующие области, то есть экзоны, суммарно занимают не более 3%, а по некоторым оценкам около 1% от общей длины ДНК.

Более 50% генома человека занято последовательностями, многократно повторяющимися в молекуле ДНК. Большинство из них не входят в состав кодирующих областей генов. Некоторые повторяющиеся последовательности выполняют структурную роль. Эта роль очевидна для *сателлитных* повторов, составленных из относительно коротких монотонных последовательностей, сгруппированных в протяженные тандемные кластеры. Такие последовательности способствуют повышенной спирализации ДНК и могут служить своеобразными опорными точками в каркасе хромосом. Поэтому неудивительно, что большое количество сателлитных повторов локализовано в области гетерохроматина, на концах и в прицентромерных районах хромосом, где гены практически отсутствуют. Локализация большого количества сателлитных повторов в этих районах необходима для правильной организации хромосом и поддержания их как целых интегральных структур. Но на этом функции сателлитных ДНК не

ограничиваются. Так, менее понятной остается роль многочисленного класса *микросателлитных* повторов, достаточно равномерно распределенных по всем хромосомам и составленных из 1-4 tandemно повторяющихся однотипных последовательностей нуклеотидов. Очень многие из них оказываются высоко полиморфными по числу повторяющихся элементов в кластере. Это значит, что в гомологичных местах локализации микросателлитов у разных индивидуумов может содержаться разное число повторяющихся элементов. Большая часть подобной изменчивости носит нейтральный характер, то есть не приводит к развитию каких-то патологических процессов. Однако в тех случаях, когда нестабильные микросателлитные повторы локализованы в генах, увеличение (экспансия) количества повторяющихся элементов выше допустимой нормы может существенно нарушать работу этих генов и реализоваться в виде наследственных заболеваний, получивших название болезней экспансии. Высокий уровень полиморфизма многих нейтральных микросателлитных повторов приводит к тому, что у большей части населения они находятся в гетерозиготном состоянии. Это свойство полиморфных микросателлитных последовательностей в сочетании с их повсеместным распространением делает их удобными молекулярными маркерами, доступными для анализа практически любого гена.

Другой тип уже не сгруппированных более протяженных повторяющихся элементов составляют комплементарные последовательности, ориентированные в противоположных направлениях по отношению друг к другу. Их называют *инвертированными или обращенными повторами*. Такие последовательности способны обеспечить приближение удаленных друг от друга участков молекулы ДНК, что может быть важно для выполнения многих ее нормальных физиологических функций.

Попутно отметим, что в геноме человека много регуляторных элементов, функции которых связаны с самовоспроизводством молекул ДНК,

координированной работой многих генов, составляющих «генные сети», и рядом других процессов. Регуляторные элементы, как правило, также многократно повторяются в молекулах ДНК. Гены эукариот не организованы в опероны, и потому каждый ген имеет собственную систему регуляции. Кроме того, у высших, в том числе и у человека, имеется дополнительная по сравнению с микроорганизмами система регуляции экспрессии генов. Это связано с необходимостью обеспечения избирательной работы разных генов в дифференцированных тканях многоклеточного организма.

И, наконец, наиболее многочисленными являются *диспергированные повторы*, более протяженные по сравнению с сателлитными ДНК и не сгруппированные, но в виде отдельных элементов разбросанные по геному. Количество таких повторов может достигать в молекулах ДНК человека десятков, а иногда и сотен тысяч копий. Их роль еще менее понятна, но очевидно, что они выполняют скорее регуляторные, чем структурные функции.

Некоторые виды этих повторов оказываются способны выстраиваться из ДНК, существовать автономно от хромосом в виде небольших кольцевых молекул, а затем встраиваться в те же самые или другие места хромосомной ДНК, меняя тем самым свою локализацию. Такие последовательности относятся к числу *мобильных элементов* генома. Способность к перемещению некоторых типов мобильных элементов иногда подчеркивается в их названиях, которые в переводе с английского звучат, как «бродяга» или «цыган». На концах мобильных элементов имеются определенные структурные особенности, обеспечивающие им возможность включаться в хромосомную ДНК. Кроме того, часто в самих этих элементах имеется генетическая информация о ферментах, катализирующих процесс встраивания. Перемещение мобильных элементов способствует структурным реорганизациям генома, межвидовому (горизонтальному) переносу генетического материала и мутационной нестабильности генов. К мобильным элементам можно отнести и последовательности некоторых

вирусов, которые могут встраиваться в молекулы ДНК человека и длительно присутствовать в таком скрытом литическом состоянии.

Мобильные элементы найдены у всех исследованных в этом отношении видов, при этом разные таксономические группы характеризуются специфическими классами мобильных элементов. У эукариот они составляют весьма значимый компонент генома. Около 40% генома мышей и более 45% генома человека занято подобными последовательностями. Таким образом, общая площадь, занимаемая в геноме человека мобильными элементами, значительно превосходит суммарную площадь генов. У прокариот и у низших эукариот передвижение мобильных элементов осуществляется, главным образом, за счет непосредственного встраивания или транспозиции ДНК мобильного элемента в хромосомную ДНК, то есть эти элементы относятся к классу *транспозонов*. В зависимости от типа мобильного элемента механизмы транспозиции могут быть различными.

подавляющее большинство мобильных элементов млекопитающих и в том числе человека поддерживаются в геноме посредством ретропозиции РНК, то есть являются *ретропозонами*. Ретропозиция включает в себя обратную транскрипцию РНК с образованием кДНК и ее транспозицию в хромосомную ДНК. Большая часть ретропозонов представлена либо длинными (LINE), либо короткими (SINE) диспергированными повторами. У человека наиболее многочисленным элементом типа SINE является *Alu-повтор*, представленный в геноме более чем миллионом копий. Примерно десятую часть составляют *LTR-элементы*, сходные с ретровирусами последовательности, имеющие длинные терминальные повторы, обеспечивающие им возможность встраивания в ДНК. Происхождение большинства умеренных диспергированных повторов, широко представленных в геноме позвоночных и человека, непосредственно связано с ретропозицией обратно-транскрибированных РНК.

В 80-е годы прошлого века в работах М. Д. Голубовского с соавторами было показано, что перемещение мобильных элементов является основной причиной возникновения спонтанных мутаций в природных популяциях дрозофилы. У человека это не так, хотя описаны мутации у пациентов с определенными наследственными заболеваниями, обусловленные внедрением в ген мобильных элементов. Так, например, у некоторых больных синдромом Апера идентифицирована инсерция Alu-повтора в 9 экзоне гена рецептора 2 фибробластных факторов роста (*FGFR2*). В некоторых случаях у больных миодистрофией Дюшенна удается проследить присутствие Alu-элемента в точке разрыва, образованного делецией в гене *DMD*. Напомним, что при этом заболевании протяженные внутригенные делеции обнаруживаются у более чем 60% больных. Показано, что один из концов делеций, локализованных в 43 интроне гена *DMD*, расположен внутри мобильного элемента, принадлежащего семейству ретротранспозонов. Однако подчеркнем еще раз, что в отличие от дрозофилы у человека перемещение мобильных элементов не является основной причиной спонтанного возникновения мутаций.

Обнаружение в геноме человека и других видов живых существ большого количества последовательностей, способных менять свою локализацию, явилось основой для развития нового направления в генетике, получившего название *мобильная генетика*. Существование мобильных элементов впервые было предсказано в 50-х годах прошлого века Барбарой МакКлинток, которая наблюдала в одной из генетических линий кукурузы возникновение нестабильных мутаций в области локализации точки разрыва одной из хромосом. При перемещении точки разрыва соответственно менялся спектр мутаций, которые всегда оказывались расположены вблизи от данного цитогенетического нарушения. Эти экспериментальные наблюдения позволили Барбаре МакКлинток высказать предположение о существовании особого класса генетических элементов, способных внедряться в разные локусы и влиять на темпы мутирования генов. Сначала

эта гипотеза не нашла поддержки среди научной общественности, но в дальнейшем она была непосредственно подтверждена на молекулярном уровне. Большой вклад в развитие мобильной генетики внесли работы отечественных исследователей Р. Б. Хесина, Г. П. Георгиева, В. А. Гвоздева, М. Д. Голубовского.

В соответствии с классическими представлениями все элементы генома имеют постоянную локализацию. Оказалось, что это положение справедливо только в отношении так называемых структурных элементов, прежде всего, генов. Стабильное расположение генов на хромосомах позволяет строить цитогенетические карты, то есть располагать гены относительно цитологически видимых маркеров хромосом. Но наряду с такими обязательными или, как говорят, *облигатными* элементами генома в молекулах ДНК человека имеется большое число *факультативных* элементов, присутствие которых не является строго обязательным, а их отсутствие не приводит к каким-то заболеваниям. Роль таких факультативных элементов особенно важна в эволюционных процессах. Изменения числа и топографии факультативных элементов М. Д. Голубовский предложил называть *вариациями* в отличие от мутаций генов. Вариации происходят в геноме закономерно и с высокой частотой. Факультативные элементы первыми воспринимают происходящие в окружающей среде изменения, причем даже такие, которые не обладают мутагенным эффектом. Под влиянием возникших вариаций могут происходить направленные массовые наследственные изменения или мутации, которые проявляются в виде вспышек мутабельности. Это явление впервые описано в работах ленинградских генетиков Р. Л. Берг, выполненных на природных популяциях дрозофилы, а затем в работах Л. З. Кайданова, проведенных на инбредных линиях дрозофилы, длительно селектировавшихся по неадаптивному признаку. Таким образом, факультативные элементы представляют своеобразную оперативную память генома, и их роль особенно важна в эволюции.

Наряду с генами и повторяющимися последовательностями в геноме человека присутствует много уникальных последовательностей, не связанных с кодирующими функциями. Среди них можно выделить класс *псевдогенов*, таких последовательностей, которые хотя и близки по своему нуклеотидному составу к определенным генам, но отличаются от них присутствием множества мутаций, не позволяющих им транскрибироваться или транслироваться.

Характер расположения генов по хромосомам и внутри хромосом очень неравномерен. В некоторых областях генома наблюдается высокая плотность генов, в то время как в других – генов вообще не обнаруживают. Как правило, гены эукариот разделены так называемыми *спейсерными* промежутками, в которых наряду с повторами локализованы и уникальные последовательности, не являющиеся генами. Назначение большинства уникальных некодирующих последовательностей остается неясным. Также непонятна роль интронов – протяженных некодирующих участков генов, которые переписываются в молекулы преРНК на начальном этапе экспрессии генов, а затем вырезаются из этих молекул в процессе образования мРНК.

В связи с обнаружением в геноме человека большого количества «избыточных» последовательностей, не связанных непосредственно с кодирующими, регуляторными, структурными или иными функциями, в 80-е годы прошлого века было высказано предположение о том, что они являются эгоистическими или даже паразитическими. В процессе эволюции эти последовательности каким-то образом внедрились в геном высших и сосуществуют вместе с ним, не выполняя никаких функций. Такие геномные паразиты! Нам это предположение кажется вероятным только в отношении очень ограниченного числа последовательностей. Не исключено, что в настоящий момент мы еще не понимаем назначение и функции *«эгоистических» ДНК*, и в последующем их роль станет более очевидной.

Наряду с существованием в геноме человека большого количества «избыточных» ДНК, имеется огромное количество примеров чрезвычайно компактной упаковки информации в областях локализации генов. Во-первых, внутри интронных областей одних генов могут располагаться другие гены, прочитывающиеся в противоположном направлении. Примером является ген гемофилии А – *F8C*, кодирующий фактор VIII свертывания крови. В 22-ом интроне этого гена были обнаружены 2 других гена *A* и *B*, которые прочитываются в противоположном направлении. Продукты этих генов никак не связаны с фактором VIII свертывания крови. Однако для одного из этих генов (*A*) был идентифицирован гомолог, расположенный в противоположной ориентации в непосредственной близости от 5'-конца гена *F8C*. Наличие двух так близко расположенных протяженных комплементарных последовательностей способствует структурным перестройкам в этой области генома и, в частности, инверсиям, то есть перевороту на 180° области ДНК, расположенной между двумя гомологичными копиями гена *A*. В результате этих инверсий происходит полная инактивация гена *F8C*. Такие инверсии обнаруживаются у 45% больных с тяжелыми формами гемофилии А.

Во-вторых, наряду с общим регулятором работы гена – промотором, в его интронных областях могут присутствовать дополнительные промоторы, каждый из которых способен запускать синтез преРНК с разных начальных точек. Это явление называется *альтернативной транскрипцией*. При этом с одного и того же гена могут образовываться белки разной длины, имеющие между собой сходство по конечным участкам, но различающиеся по начальным последовательностям. Удивительным примером регуляции на уровне транскрипции является ген миодистрофии Дюшенна (*DMD*). По крайней мере 8 независимых промоторов осуществляют альтернативную транскрипцию гена *DMD* в разных тканях и на разных стадиях эмбрионального развития. Продуктом гена *DMD* в сердечной и скелетных мышцах является стержневидный белок дистрофин, участвующий в

поддержании целостности мембраны мышечного волокна и в формировании нейромышечного синапса. Его экспрессия осуществляется с основного мышечного промотора, располагающегося в 5'-нетранслируемой области гена. В кортикальном отделе мозга и в клетках Пуркинье экспрессия гена *DMD* с образованием полноразмерных мозговых изоформ дистрофина осуществляется с двух альтернативных промоторов, расположенных в первом интроне гена. Полноразмерные изоформы дистрофина мышечного и мозгового типов имеют небольшие отличия в N-концевых областях. Начиная с середины гена, и ближе к его концу расположены 5 других промоторов, обеспечивающие экспрессию гена *DMD* в других тканях с образованием укороченных изоформ, так называемых аподистрофинов, не имеющих N-концевых участков дистрофина, но гомологичных его C-концевым областям.

Рассмотрим, к каким клиническим последствиям может приводить такая сложная организация работы гена? Мы уже писали о том, что основным типом мутаций при миодистрофии Дюшенна являются протяженные внутригенные делеции. В частности, были описаны пациенты с тяжелой дилатационной кардиомиопатией без проявлений скелетной мышечной слабости, у которых оказалась делетирована область локализации промотора мышечного типа гена *DMD*. У таких больных мышечный дистрофин полностью отсутствует. Однако в скелетных мышцах компенсаторно начинают работать промоторы мозгового типа, и образуются мозговые изоформы дистрофина, способные восполнить недостаточность мышечного дистрофина. При этом по неизвестным пока причинам подобной компенсации в сердечной мышце не происходит, и полноразмерные изоформы дистрофина в сердце больных полностью отсутствуют. Эта недостаточность и лежит в основе этиологии данной формы дилатационной кардиомиопатии. Не исключено, что делеции в гене *DMD*, разрушающие альтернативные промоторы, также могут приводить к другим наследственным сцепленным с полом заболеваниям, не сопровождающимся мышечной дистрофией.

И, наконец, одним из вариантов компактности упаковки информации в кодирующих областях генов является *альтернативный сплайсинг*. Это широко распространенное явление заключается в разном вырезании интронов из одной и той же молекулы преРНК. В результате образуются разные мРНК, отличающиеся друг от друга по набору экзонов. Этот процесс носит ярко выраженный тканеспецифический характер. То есть в разных тканях один и тот же ген может по-разному прочитываться, в результате образуются тканеспецифические изоформы белков, хотя и имеющие между собой определенную гомологию, но значительно различающиеся, как по своей структуре, так и по исполняемым функциям. В частности, высоко консервативные последовательности шести последних экзонов гена *DMD* альтернативно сплайсируются. В результате образуются структурно различающиеся изоформы дистрофина, осуществляющие различные функции. С учетом альтернативной транскрипции и сплайсинга количество продуктов, образующихся с одного только гена *DMD* достигает нескольких десятков. В настоящее время активно изучаются функции многочисленных изоформ дистрофина, обильно экспрессирующихся в различных специализированных тканях и способных взаимодействовать со множеством белков и не только мышечного или нейронального происхождения. Таким образом, в одном и том же гене может содержаться информация о структуре нескольких, а иногда даже нескольких десятков различных белков.

Не так как хромосомный геном устроен геном митохондрий. Мы уже упоминали о том, что около 5% ДНК человека находится в митохондриях - органеллах, ответственных за энергоснабжение клетки. *Митохондриальная ДНК* почти целиком состоит из генов и регуляторных элементов. В ней содержится гены транспортных и рибосомальной РНК, а также гены, кодирующие различные субъединицы пяти комплексов окислительного фосфорилирования. Мутации в генах митохондриальной ДНК также приводят к наследственным заболеваниям, о которых мы будем говорить в дальнейшем. В митохондриальной ДНК нет повторяющихся и уникальных

некодирующих последовательностей, так обильно представленных в хромосомной ДНК человека. Кроме того, гены митохондрий не содержат интронов. Подобным образом устроен геном бактерий. И это сходство позволяет предполагать бактериальное происхождение митохондрий. Конечно, митохондрии не существуют сейчас в виде отдельных организмов, и их ДНК полностью относится к элементам генома человека.

К подобным же элементам, играющим определенную роль в функционировании генома человека, относят чужеродные и экстрахромосомные ДНК – линейные и кольцевые плазмиды, а также ДНК вирусных и бактериальных цитосимбионтов. Конечно это факультативные элементы, и их присутствие в клетках человека не является строго обязательным.

Итак, два парадокса характерны для структуры генома эукариот: существование огромного количества «избыточных» некодирующих последовательностей ДНК, функции которых нам не всегда понятны, и чрезвычайно компактная упаковка информации в местах локализации генов. Подчеркнем еще раз, что структура генома также является видовым признаком. Различные индивидуумы, народы и расы не отличаются по набору и локализации не только генов, но и других элементов генома, таких как повторы, спейсерные промежутки, регуляторные последовательности, псевдогены. Да и множества мобильных элементов генома обладают высокой видовой специфичностью. Таким образом, наследственность в широком смысле этого слова определяется структурой генома различных видов организмов. В основе внутривидовой изменчивости лежат вариации, мутации и рекомбинации генов. Эволюционная межвидовая изменчивость сопровождается структурными изменениями, происходящими на геномном уровне. Эти положения имеют важнейшее значение, в частности, для понимания молекулярной природы наследственной патологии человека.

Глава 1.14. Эпигенетическая изменчивость

В последние десятилетия произошел огромный прогресс в изучении *эпигенетической изменчивости*, под которой понимают разнообразные наследуемые, хотя, возможно, и обратимые изменения экспрессии генов, не связанные с нарушением структуры генетического материала. Сейчас очевидно, что эпигенетические факторы играют значительную роль в онтогенетической дифференцировке, и нарушение этой системы ассоциировано со многими патологическими состояниями. В каждом эпигенетическом событии необходимо выделять три составляющих: (1) сигнал, который действует на ген-переключатель, (2) восприятие сигнала рецепторной областью гена с последующим выбором одного из альтернативных режимов функционирования и (3) поддержание выбранного состояния в ряду клеточных поколений с помощью генетических или внешних факторов, таких как температура, плотность популяции, наличие симбионтов и др.

Регуляция работы многих генов осуществляется путем ДНК-белковых взаимодействий. Это относится, в частности, к контролю экспрессии генов транскрипционными факторами, обратной регуляции работы гена его продуктом или продуктами других генов при достижении ими определенных концентраций. Если под влиянием каких-то внешних воздействий произойдут изменения в подобных белках-регуляторах, их последствия будут выражаться в виде нарушения экспрессии определенных генов.

Мы уже упоминали о ключевой роли в детерминации развития градиентов белков и мРНК в цитоплазме ооцитов. Механическое повреждение морфогенетических градиентов может привести к нарушению экспрессии сотен генов. Если, в частности, подобные нарушения коснутся первичных половых клеток плода беременной женщины, то их последствия могут проявиться у внуков. То есть, эпигенетические механизмы могут привести к такой ситуации, когда условия протекания беременности у бабушки будут ответственны за возникновение наследственных нарушений у внучатого потомства.

Эпигенетические изменения могут наследоваться не только на клеточном уровне, но и на уровне целого организма. Примером могут служить, в частности, результаты, полученные в опытах П. Г. Светлова (1965) по наследованию изменений в экспрессивности мутантных генов при однократном температурном воздействии на материнскую ооплазму. Под влиянием различных форм стресса происходят массовые перемещения мобильных элементов, следствием которых могут быть изменения в экспрессии генов, причем эти изменения часто носят наследственный характер.

На экспрессию генов влияет характер гетерохроматинизации хромосом, который зависит не только от эндогенных, но и от экзогенных факторов. Это феномен впервые был изучен А. А. Прокофьевой-Бельговской, которая в материалах своей докторской диссертации убедительно показала, что «развитие признака в организме не определяется только наличием на участке хромосомы определенного гена, а контролируется еще состоянием данного участка, обнаруживаемого на микроскопическом уровне, то есть находится ли этот участок хромосомы в интерфазе в деконденсированном состоянии или он конденсирован». Активность многих белков определяется их посттрансляционными модификациями – фосфорилированием, ацетилированием, метилированием. В частности, подобные модификации, касающиеся гистоновых белков или белков, участвующих в регуляции работы генов, могут существенно влиять на их транскрипцию. Важную роль в регуляции экспрессии генов играют пространственные взаимоотношения между генами и соответствующими регуляторными комплексами. Все эти особенности работы генов определяют хорошо известное генетикам явление, получившее название «*эффект положения*» - то есть разный характер фенотипического проявления гена в зависимости от его локализации в специфических районах генома. Список явлений, которые могут быть объяснены с позиций эпигенетической изменчивости, может быть продолжен.

Одним из наиболее хорошо изученных эпигенетических механизмов является *метилирование ДНК*, проходящее, чаще всего, по 5-му углероду цитозина. Эта модификация ДНК играет значительную роль в регуляции экспрессии генов эукариот. 5'-нетранслируемые области генов содержат последовательности, обогащенные CpG-парами, так называемые CpG-островки. Во многих случаях инактивация гена достигается за счет метилирования этих последовательностей, причем такое состояние может стабильно поддерживаться в течение многих поколений клеток. Метильные группы нарушают взаимодействия между ДНК и белками, препятствуя тем самым связыванию транскрипционных факторов. Кроме того, метилированные районы ДНК могут взаимодействовать с репрессорами транскрипции.

Напомним, что инактивация одной из X-хромосом в женских соматических клетках происходит за счет ее гетерохроматинизации. Метилирование цитозинов в гетерохроматинизированной X-хромосоме закрепляет это состояние, которое затем устойчиво передается дочерним клеткам во всех последующих поколениях. В инактивированной X-хромосоме подавляющее большинство генов находятся в состоянии метилирования. Различный характер метилирования аллелей некоторых генов в мужских и женских половых клетках объясняет феномен *геномного импринтинга*, который заключается в разном проявлении мутантного аллеля в зависимости от его прохождения через материнский или отцовский гаметогенез. В результате избирательного метилирования определенных районов хромосом в процессе сперматогенеза или оогенеза прекращается транскрипция расположенных в этих районах генов. Предполагается, что существует не менее 100 генов, подвергающихся импринтингу, причем эти гены сгруппированы в определенных районах хромосом. В настоящее время идентифицировано более 40 таких генов. Известно влияние некоторых отцовских и материнских генов на вес плода, степень развития плаценты и другие особенности внутриутробного развития. В медицинской генетике

выделяют группу болезней геномного импринтинга, к которым, в частности, относятся некоторые болезни экспансии. Однако обо всем этом мы будем говорить более подробно в следующих главах.

К разряду эпигенетических модификаций относится регуляция экспрессии генов молекулами РНК, которая может происходить на различных уровнях – транскрипции, процессинга преРНК, стабилизации мРНК и трансляции. К концу 90-х годов было накоплено много экспериментальных данных о присутствии в клетках различных типов РНК (не считая тРНК и рРНК), не обладающих белок-кодирующей способностью и не транслирующихся в полипептиды. Первые указания на существование таких РНК были получены еще до открытия интронов при обнаружении многочисленного класса гетерогенных ядерных РНК (hnRNA), в 10-30 раз превосходящих по кинетической сложности класс мРНК. Определенные типы РНК могут обладать каталитической активностью (*рибозимы*), связывать небольшие молекулы, такие как витамины, аминокислоты, азотистые основания, ионы металлов (*аптамеры*) или иметь обе эти активности (*аптазимы*). Множество стабильных мРНК-подобных, полиаденилированных и сплайсированных транскриптов не имеют открытых рамок считывания. Нельзя сбрасывать со счетов и самый многочисленный класс образующихся в процессе сплайсинга и, как оказалось, достаточно устойчивых интронных РНК, транскрибируемых синхронно с белок-кодирующими РНК. Оказалось, что нетранслируемые РНК принимают участие в разнообразных и очень важных генетических процессах, таких как регуляция транскрипции, процессинг и модификация преРНК, поддержание стабильности и трансляции мРНК, компенсация дозы гена, импринтинг, метилирование ДНК и ремоделирование хроматина. РНК размером от 100 до 200 нуклеотидов (sRNA) выполняют роль регуляторов трансляции в бактериальных клетках. Более протяженные РНК вовлечены в универсальную систему избирательной инактивации (silencing) генов высших.

Последнее явление, получившее название *РНК-интерференция (RNAi)*, было открыто случайно, когда было обнаружено, что двунитевые РНК, инъектируемые или скармливаемые взрослым особям *Caenorhabditis elegans*, действуют как триггеры, вызывая избирательную и часто наследуемую инактивацию гомологичных генов. В дальнейшем было показано, что РНК-интерференция характерна для очень многих видов растений и животных. По-видимому, этот общий механизм эволюционировал как система защиты от РНК-содержащих вирусов и, возможно, от мобилизации транспозонов. РНК-интерференция включает расщепление экзогенных или эндогенных триггерных двунитевых РНК на небольшие 21-23-нуклеотидные фрагменты (siRNA), которые в составе сложных РНК-нуклеазных комплексов действуют как каталитические кофакторы для избирательной деградации гомологичной мРНК – рис. 30.

Рисунок 30. Механизм РНК-интерференции

Сходный механизм может быть вовлечен в избирательное метилирование геномных последовательностей и ремоделирование хроматина. РНК-триггеры, гомологичные промоторным областям генов, могут инактивировать гены на транскрипционном уровне. Экзогенные шпилечные РНК также могут вызывать деградацию гомологичных мРНК с использованием механизма РНК-интерференции. Подобные шпилечные РНК могут естественным образом экспрессироваться с инвертированных повторов или с LTR-повторов расположенных в обратной ориентации на небольшом расстоянии друг от друга. По некоторым оценкам инвертированные повторы в интронах, гомологичные экзонам других генов, встречаются в геноме человека с достаточно высокой частотой. Таким образом, РНК-интерференцию можно рассматривать как универсальный широко распространенный механизм РНК-зависимого контроля экспрессии генов, действующий на самых разных уровнях.

Посттранскрипционная регуляция экспрессии многих генов осуществляется путем прямой несовершенной гибридизации мРНК с *микроРНК (miRNA)* – членами большого семейства некодирующих РНК размером от 19 до 25 нуклеотидов. Антисмысловые микроРНК идентифицированы у многих видов животных и растений и даже у вирусов. У человека клонировано более 500 различных типов микроРНК, однако, возможно, их реальное число вдвое больше. Обычно микроРНК вырезаются из более длинных предшествующих молекул со шпилечной структурой (pre-miRNA), которые на более раннем этапе образуются из первичных экпированных и полиаденилированных транскриптов (pri-miRNA). Поскольку гибридизация с 3'-нетранслируемыми районами мРНК не является совершенной, предполагается, что одна микроРНК может одновременно инактивировать более 200 различных транскриптов. Таким образом, множество микроРНК потенциально может участвовать в эпигенетическом контроле экспрессии около 30% генов человека. В настоящее время на примере многих онкологических заболеваний показано, что ключевая роль в индукции канцерогенеза принадлежит нарушениям в эпигенетической регуляции экспрессии онкогенов и генов супрессоров опухолей, осуществляемой микроРНК.

Таким образом, следует выделять три формы наследственной изменчивости: мутационную, вариационную и эпигенетическую, причем первые две обусловлены изменением структурных компонентов генома, тогда как последняя – нарушением регуляции экспрессии генов. Эпигенетическая регуляция резко увеличивает возможности взаимодействий между генами, их продуктами и факторами окружающей среды. Наряду с мутациями, вариациями и рекомбинацией, эпигенетическая изменчивость является важнейшей составляющей, обеспечивающей наследственную пластичность видов.

Глава 1.15. Геномика, проект «Геном человека»

В конце XX века молекулярные технологии развивались настолько интенсивно, что были созданы предпосылки для планомерного изучения структуры геномов разных видов живых существ, включая человека. Одной из наиболее значимых целей этих проектов является определение полной нуклеотидной последовательности геномных ДНК. Таким образом, родилась новая наука - *геномика*.

Начало нового тысячелетия ознаменовалось крупнейшим открытием в области геномики – расшифрована структура генома человека. Новость оказалась настолько значимой, что стала предметом обсуждения между президентами ведущих стран мира. Однако на многих людей это сообщение не произвело впечатления. В первую очередь это связано с недостаточным пониманием того, что такое геном, какова его структура и что значит ее расшифровка? Имеет ли эта новость отношение к медицине и может ли коснуться каждого из нас? Что такое молекулярная медицина и связана ли ее развитие с расшифровкой структуры генома? Более того, у некоторых людей возникли опасения, не грозит ли в очередной раз новое открытие ученых человечеству? Не будут ли использованы эти данные в военных целях? Не последует ли за этим всеобщее принудительное генетическое обследование - своеобразная генетическая паспортизация населения? Не явится ли наш геном предметом анализа и насколько конфиденциальна будет полученная информация? Все эти вопросы в настоящее время активно обсуждаются в научном сообществе.

Конечно, геномика начиналась не с человека, а с гораздо более просто организованных живых существ. В настоящее время расшифрована нуклеотидная последовательность геномной ДНК многих сотен видов микроорганизмов, большинство из которых являются болезнетворными. Для прокариот полнота анализа оказалась абсолютной, то есть не остается не расшифрованным ни одного нуклеотида! В результате идентифицируются не только все гены этих микроорганизмов, но и определяются аминокислотные последовательности кодируемых ими белков. Мы уже неоднократно

отмечали, что знание аминокислотной последовательности белка позволяет довольно точно прогнозировать его структуру и функции. Открывается возможность получения антител к этому прогнозируемому белку, его изоляции из микроорганизма и прямого биохимического анализа. Давайте задумаемся, что это означает для разработки принципиально новых методов борьбы с инфекциями, если врач не только знает, как устроены гены инфицирующего микроорганизма, но и какова структура и функции всех его белков? Сейчас в микробиологии происходят грандиозные изменения в связи с появлением огромного количества новых знаний, значение которых в настоящее время мы не до конца понимаем. По-видимому, понадобятся еще десятилетия, для того чтобы приспособить эту новую информацию к нуждам человечества, в первую очередь, в области медицины и сельского хозяйства.

Переход от прокариот к эукариотам в плане расшифровки структуры генома сопровождается большими трудностями и не только потому, что длина ДНК высших в тысячи, а иногда в сотни тысяч раз больше, но и структура ее становится более сложной. Вспомним, что в геноме высших появляется большое количество некодирующих ДНК, значительную часть которых составляют повторяющиеся последовательности. Они вносят значительную путаницу в правильную стыковку уже расшифрованных фрагментов ДНК. А, кроме того, тандемные повторы сами трудно поддаются подобной расшифровке. В области локализации таких повторов ДНК может иметь необычную конфигурацию, что затрудняет ее анализ. Поэтому в геноме одного из видов микроскопического круглого червя (нематоды) - первого многоклеточного организма, для которого удалось определить нуклеотидную последовательность ДНК, - уже осталось некоторое число неясных мест. Правда, их удельный вес составляет менее сотой процента от общей длины ДНК, и эти неясности не касаются генов или регуляторных элементов. Нуклеотидная же последовательность всех 19 099 генов этого червя, распределенных на площади в 97 миллионов пар оснований, была

определена полностью. Поэтому работу по расшифровке генома нематоды следует признать весьма успешной.

Еще больший успех связан с расшифровкой генома дрозофилы, лишь в 2 раза уступающего по размеру ДНК человека и в 20 раз превосходящего ДНК нематоды. Несмотря на высокую степень генетической изученности дрозофилы, около 10% ее генов были до этого момента неизвестны. Но самым парадоксальным является тот факт, что у гораздо более высоко организованной по сравнению с нематодой дрозофилы количество генов оказалось меньше, чем у микроскопического круглого червя! С современных биологических позиций это трудно объяснить. Больше генов, чем у дрозофилы, присутствует и в расшифрованном геноме растения из семейства крестоцветных - арабидопсиса, широко используемого генетиками в качестве классического экспериментального объекта.

Разработка геномных проектов сопровождалась интенсивным развитием многих областей науки и техники. Так, мощный импульс для своего развития получила *биоинформатика*. Был создан новый математический аппарат для хранения и обработки огромных массивов информации; сконструированы системы суперкомпьютеров, обладающие невиданной мощностью; написаны тысячи программ, позволяющих в считанные минуты проводить сопоставительный анализ различных блоков информации, ежедневно вводить в компьютерные базы новые данные, получаемые в различных лабораториях мира, и адаптировать новую информацию к той, которая была накоплена ранее. Одновременно были разработаны системы для эффективной изоляции различных элементов генома и автоматического секвенирования, то есть определения нуклеотидных последовательностей ДНК. На этой базе были сконструированы мощные роботы, значительно ускоряющие секвенирование и делающие его менее дорогостоящим.

Развитие геномики, в свою очередь, привело к открытию огромного количества новых фактов. Значение многих из них еще предстоит оценить в

будущем. Но и сейчас очевидно, что эти открытия приведут к переосмыслению многих теоретических положений, касающихся возникновения и эволюции различных форм жизни на Земле. Они будут способствовать лучшему пониманию молекулярных механизмов, лежащих в основе работы отдельных клеток и их взаимодействий; детальной расшифровке многих до сих пор неизвестных биохимических циклов; анализу их связи с фундаментальными физиологическими процессами. Таким образом, происходит переход от структурной геномики к функциональной, которая в свою очередь создает предпосылки для исследования молекулярных основ работы клетки и организма в целом. Накопленная уже сейчас информация будет предметом анализа в течение нескольких ближайших десятилетий. Но каждый следующий шаг в направлении расшифровки структуры геномов разных видов, порождает новые технологии, облегчающие процесс получения информации. Так, использование данных о структуре и функции генов более низко организованных видов живых существ может значительно ускорить поиск специфических генов высших. И уже сейчас методы компьютерного анализа, используемые для идентификации новых генов, зачастую вытесняют достаточно трудоемкие молекулярные методы поиска генов.

Наиболее важным следствием расшифровки структуры генома определенного вида является возможность идентификации всех его генов и, соответственно, идентификации и определения молекулярной природы транскрибируемых молекул РНК и всех его белков. По аналогии с геномом родились понятия *транскриптома*, объединяющего пул образовавшихся в результате транскрипции молекул РНК, и *протеома*, включающего множество кодируемых генами белков. Таким образом, геномика создает фундамент для интенсивного развития новых наук – *протеомики* и *транскриптомики*. Протеомика занимается изучением структуры и функции каждого белка; анализом белкового состава клетки; определением молекулярных основ функционирования отдельной клетки, являющегося

результатом координированной работы многих сотен белков, и исследованием формирования фенотипического признака организма, являющегося результатом координированной работы миллиардов клеток. Очень важные биологические процессы происходят и на уровне РНК. Их анализ является предметом транскриптомики.

Наибольшие усилия ученых многих стран мира, работающих в области геномики, были направлены на решение международного проекта «Геном человека». Значительный прогресс в этой области связан с реализацией идеи, предложенной Дж. С. Вентером, заняться поиском и анализом экспрессирующихся последовательностей ДНК, которые в дальнейшем могут быть использованы в качестве своеобразных «ярлыков» или маркеров определенных участков генома. Другой независимый и не менее плодотворный подход, был использован в работе группы, возглавляемой Фр. Коллинзом. Он основан на первоочередной идентификации генов наследственных болезней человека.

Расшифровка структуры генома человека привела к сенсационному открытию. Оказалось, что в геноме человека только 32 000 генов, что в несколько раз меньше количества белков. При этом белок-кодирующих генов только 24 000, продуктами остальных генов являются молекулы РНК. Процент сходства по нуклеотидным последовательностям ДНК между разными индивидуумами, этническими группами и расами составляет 99,9%. Это сходство и делает нас людьми – *Homo sapiens*! Вся наша изменчивость на нуклеотидном уровне укладывается в очень скромную цифру – 0,1%. Таким образом, генетика не оставляет места для идей национального или расового превосходства.

Но, посмотрим друг на друга – мы все разные. Еще более заметны национальные, а тем более, расовые различия. Так какое же количество мутаций определяют изменчивость человека не в процентном, а в абсолютном выражении? Для того чтобы получить эту оценку, нужно вспомнить, каков размер генома. Длина молекулы ДНК человека составляет

$3,2 \times 10^9$ пар оснований. 0,1% от этого – 3,2 миллиона нуклеотидов. Но вспомним, что кодирующая часть генома занимает менее 3% от общей длины молекулы ДНК, а мутации вне этой области, чаще всего, не оказывают никакого влияния на фенотипическую изменчивость. Таким образом, для получения интегральной оценки числа мутаций, оказывающих влияние на фенотип, нужно взять 3% от 3,2 миллионов нуклеотидов, что и даст нам цифру порядка 100 000. То есть, около 100 тысяч мутаций формируют нашу фенотипическую изменчивость. Если мы сопоставим эту цифру с общим числом генов, то получится, что в среднем на ген приходится 3-4 мутации.

Что это за мутации? Их подавляющее большинство (не менее 70%) определяет нашу индивидуальную непатологическую изменчивость, то, что нас отличает, но не делает хуже по отношению друг к другу. Сюда входят такие признаки, как цвет глаз, волос, кожи, характер телосложения, рост, вес, тип поведения, который тоже в значительной степени генетически детерминирован, и многое другое. Около 5% мутаций ассоциированы с моногенными заболеваниями. Около четверти оставшихся мутаций относятся к классу функциональных полиморфизмов. Они участвуют в формировании наследственной предрасположенности к широко распространенной мультифакториальной патологии. Конечно, эти оценки достаточно грубые, но они позволяют судить о структуре наследственной изменчивости человека.

Глава 1.16. Молекулярно-генетические основы эволюции

Произошедшая на рубеже тысячелетий революция в области молекулярной биологии, завершившаяся расшифровкой структуры геномов многих сотен видов микроорганизмов, а также некоторых видов простейших, дрожжей, растений, животных и человека, перевернула многие традиционные представления классической генетики и вплотную приблизила возможность исследования молекулярных механизмов эволюции и видообразования. Родилась новая наука - сравнительная геномика,

позволяющая регистрировать появление в различных филогенетических линиях эволюционно значимых событий, происходящих на уровне отдельных молекул. Оказалось, что в общем случае эволюционный прогресс ассоциируется не только, и не столько с увеличением числа, протяженности и даже сложности структурной организации генов, но в гораздо большей степени с изменением регуляции их работы, определяющей координацию и тканеспецифичность экспрессии десятков тысяч генов. Это, в конечном счете, и привело к появлению у высших организмов более сложных, высоко специфичных, многофункциональных комплексов взаимодействующих белков, способных выполнять принципиально новые задачи.

Рассмотрим характер изменений, происходящих в процессе эволюции на трех информационных уровнях: ДНК – РНК – белок или геном – транскриптом – протеом. В общем случае можно сказать, что по мере нарастания сложности организации жизни, происходит увеличение размера генома. Так, размер ДНК прокариот не превышает 8×10^6 п. о., он становится вдвое больше у дрожжей и простейших, в 10-15 раз больше у насекомых, а у млекопитающих увеличение достигает 3 порядков, то есть в тысячу раз (10^3). Однако эта зависимость не носит линейный характер. Так в пределах млекопитающих мы уже не наблюдаем существенного увеличения размера генома. Кроме того, не всегда удается наблюдать зависимость между величиной генома и сложностью организации жизни. Так, у некоторых растений величина генома на порядок или даже на два порядка больше, чем у человека. Напомним, что увеличение размера генома эукариот по сравнению с прокариотами происходит, главным образом, за счет появления некодирующих последовательностей, то есть факультативных элементов. Мы уже говорили о том, что в геноме человека экзоны суммарно составляют не более 1-3%. А это значит, что количество генов у высших может быть лишь в несколько раз больше, чем у микроорганизмов.

Увеличение сложности организации эукариот частично объясняется возникновением дополнительной системы регуляции, необходимой для

обеспечения тканеспецифичности экспрессии генов. Одним из последствий возникшей у эукариот прерывистой организации генов явилось широкое распространение альтернативного сплайсинга и альтернативной транскрипции. Это привело к появлению нового свойства у огромного числа генов - способности кодировать множественные функционально различающиеся изоформы белков. Таким образом, общее количество белков, то есть размер протеома, у высших может быть в несколько раз больше количества генов.

У прокариот допустима внутривидовая изменчивость по числу генов, и подобные различия между разными штаммами многих микроорганизмов, в том числе и патогенных, могут составлять десятки процентов. При этом сложность организации различных видов микроорганизмов прямо коррелирует с числом и протяженностью кодирующих последовательностей. Таким образом, фенотипическая внутри- и межвидовая изменчивость находится в строгой ассоциации с очень близкими по своим значениям размерами транскриптома и протеома. У эукариот число генов является жестко детерминированным видовым признаком, и в основе увеличения эволюционной сложности лежит иной принцип – дифференциальное многоуровневое использование различных компонентов ограниченного и достаточно стабильного протеома.

Секвенирование геномов нематоды и дрозофилы показало, что размеры протеомов у этих столь разных видов очень близки и лишь вдвое больше, чем у дрожжей и некоторых видов бактерий. Эта закономерность – значительное нарастание сложности организации различных форм жизни при сохранении или относительно небольшом увеличении размеров протеома – характерна для всей последующей эволюции вплоть до человека. Так, протеомы человека и мыши практически не различаются между собой и по своим размерам менее чем в 2 раза превосходят протеомы круглого микроскопического червя нематоды или плодовой мушки дрозофилы. Более того, идентичность нуклеотидных последовательностей ДНК человека и

больших африканских обезьян составляет 98,5%, а в кодирующих областях достигает 99%. Эти цифры мало отличаются от значения 99,9%, определяющего внутривидовое сходство по нуклеотидным последовательностям ДНК между различными индивидуумами, народами и расами, населяющими нашу планету. Так какие же изменения, составляющие не более 1,5% от всего генома, являются ключевыми для формирования человека? Ответ на этот вопрос, по-видимому, следует искать не только на геномном и протеомном уровнях.

Действительно, наряду с относительной стабильностью протеома, в процессе эволюции происходит резкое увеличение размеров и сложности организации транскриптома эукариот за счет появления в геноме огромного количества транскрибируемых и не кодирующих ДНК, а также значительного расширения класса РНК-кодирующих генов. РНК, не кодирующие белки, главным источником которых служат интроны, составляют подавляющую часть транскриптома высших организмов, достигая 97-98% всех транскрипционных единиц. В настоящее время интенсивно анализируются функции этих молекул.

Таким образом, ключевые эволюционные изменения происходят на фоне увеличения размера генома, достаточно стабильного протеома и резкого увеличения размера транскриптома – рис. 31.

Рисунок 31. Эволюционные изменения, происходящие на трех информационных уровнях

При этом переход от простых форм жизни к более сложным очевидно коррелирует с возникновением и широким распространением в геноме двух фундаментальных и в некоторой степени взаимосвязанных эволюционных приобретений: некодирующих ДНК и повторяющихся элементов. Прямым следствием этих изменений, происходящих на геномном уровне, является появление в процессе эволюции огромного количества не кодирующих белки РНК.

Какова же структурная основа этих эволюционных преобразований? Все крупные эволюционные переходы: от прокариот к эукариотам, от простейших к многоклеточным, от первых животных к билатеральным и от примитивных хордовых к позвоночным, сопровождались резким увеличением сложности генома. По-видимому, такие скачки в эволюции являются результатом редких случаев удачного слияния целых геномов различных видов, принадлежащих дивергировавшим на значительное расстояние друг от друга систематическим классам. Так, симбиоз Archaea и Bacteria положил начало переходу от прокариот к эукариотам. Очевидно, что митохондрии, хлоропласты и некоторые другие органеллы клеток также появились в результате эндосимбиоза. Фундаментальное свойство высших эукариот – диплоидия – возникла вследствие хорошо отрегулированной геномной дупликации, которая совершалась около 500 миллионов лет назад. Геномные дупликации в пределах вида происходили достаточно часто, и примерами тому служат многочисленные случаи полиплоидии у растений, грибов и даже иногда у животных. Однако потенциальными механизмами, ведущими к возникновению в процессе эволюции принципиально новых форм жизни, являются не аутополиплоидии, а гибридизация и горизонтальный перенос или слияние геномов. Примечательно, что наиболее значительные эволюционные преобразования, сопровождающиеся слиянием целых геномов, происходят в экстраординарных условиях, в периоды крупных геологических переходов, таких как изменение концентрации кислорода в атмосфере, оледенение Земли или Кембрийский взрыв.

В относительно спокойных геологических условиях более значимыми для эволюции оказываются дупликации отдельных генов или хромосомных сегментов с их последующей дивергенцией. Сравнение нуклеотидных последовательностей секвенированных геномов показывает, что частота дупликаций генов достаточно высока и, в среднем, составляет 0.01 на ген за миллион лет. Подавляющее большинство из них не проявляют себя на протяжении последующих нескольких миллионов лет, и лишь в редких

случаях дублицированные гены могут приобрести новые адаптивные функции. Тем не менее, многочисленный класс «молчащих» дубликаций генов служит своеобразным резервным фондом для рождения новых генов и образования новых видов. В геноме человека присутствует от 10 до 20 тысяч копий процессированных генов, возникших путем ретропозиции мРНК. Большинство из них относятся к классу псевдогенов, то есть они не экспрессируются либо из-за присутствия мутаций, либо из-за инсерции в транскрипционно неактивные районы генома. Однако часть таких генов активна, причем характер их экспрессии и даже функции могут быть иными, чем у генов-основателей.

Особую роль в эволюции приматов и человека играют *сегментные дубликации*, относящиеся к классу низкокопийных повторов (LCR) и возникшие менее 35 миллионов лет назад. Эти последовательности представляют собой высоко идентичные блоки ДНК, варьирующие по величине от одной до нескольких сотен килобаз. Чаще всего сегментные дубликации локализуются в перичентромерных или теломерных районах различных хромосом, и суммарно они занимают около 5% генома человека. В других секвенированных геномах сегментные дубликации не обнаружены. Минимальный модуль сегментной дубликации, получивший название дупликон, содержит фрагменты неродственных непроцессированных генов, и это отличает его от других известных типов повторяющихся последовательностей. При определенных условиях дупликаны могут служить источниками создания новых химерных транскрибируемых генов или семейств генов из различных комбинаций представленных в них кодирующих экзонов. По некоторым оценкам от 150 до 350 генов могут различать геномы шимпанзе и человека.

Не умаляя значения для видообразования фактов появления новых и исчезновения старых кодирующих последовательностей, следует подчеркнуть реальную возможность существования иных механизмов, играющих определяющую роль в эволюции эукариот.

Одним из движущих механизмов эволюции являются мобильные элементы, найденные у всех исследованных в этом отношении видов. Изменения генома, сопровождающие процесс видообразования, могут включать обширные реорганизации кариотипа, локальные хромосомные перестройки, дубликации семейств генов, модификации отдельных генов, сопровождающиеся их рождением или утратой, а также различия в экспрессии генов, регулируемые как на уровне транскрипции, так и на уровнях сплайсинга или трансляции. Мобильные элементы имеют непосредственное отношение ко всем этим процессам.

В некоторых случаях мобильные элементы сами несут последовательности, кодирующие ферменты, присутствие которых необходимо для осуществления транспозиции ДНК или ретропозиции РНК. Подобные последовательности присутствуют в геноме ретровирусов, LTR-элементов и транспозонов. К числу ретротранспозонов относится и наиболее многочисленный класс мобильных элементов – Alu-повторы. Впервые Alu-повторы появляются у приматов около 50-60 миллионов лет назад из небольшого РНК-кодирующего гена. В процессе дальнейшей эволюции происходит дивергенция и мощная амплификация этого семейства. Переход от приматов к человеку сопровождается взрывообразным нарастанием числа Alu-повторов, количество копий которого по некоторым оценкам достигает 1,1 миллиона. Alu-повторы занимают около 10% генома человека, но их распределение неравномерно, так как они в большей степени ассоциированы с генами. Эти элементы редко присутствуют в кодирующих экзонах и достаточно часто обнаруживаются в интронах и в не кодирующих районах мРНК, оказывая влияние на стабильность этих молекул и/или эффективность трансляции. Присутствие Alu-последовательностей в интронных областях генов может сопровождаться изменением характера процессинга преРНК, так как эти последовательности содержат районы, гомологичные *донорным* и *акцепторным* сайтам сплайсинга. При инсерции Alu-элементов в регуляторные районы гена может нарушаться транскрипция, следствием чего

может быть инактивация функции гена. Именно с этим, например, связано появление только у гоминидов тканеспецифического характера экспрессии АВН-антигенов в эритроцитах.

В общем случае перемещение мобильных элементов по геному носит случайный характер, хотя существует немало примеров сайт-специфического встраивания транспозонов. Иногда подобные инсерции могут приводить к резкому увеличению частоты возникновения множественных высоко специфичных нестабильных мутаций. Это явление получило название *инсерционный мутагенез*. Важно отметить, что массовые направленные перемещения мобильных элементов в популяциях и лабораторных линиях животных могут происходить под действием различных форм стресса, включая длительный инадаптивный отбор и жесткий инбридинг. Инсерционный мутагенез является одним из мощных механизмов быстрого создания материала для отбора при резком изменении внешних условий.

Оказалось, что не только последствия ретропозиции мобильных элементов, такие как структурные реорганизации генома, горизонтальный перенос генов, создание дубликаций или инсерционный мутагенез, но сами мобильные элементы способны играть значительную роль в эволюции генов. Сочетание мобильных элементов при их инсерции с регуляторными последовательностями, сайтами инициации транскрипции, сигналами полиаденилирования, сайтами сплайсинга и кодирующими участками может привести к образованию новых химерных генов. При компьютерном анализе базы данных UniGene (<http://www.ncbi.nlm.gov/UniGene/>), в которой представлены нуклеотидные последовательности более 14 тысяч генов человека, в 4% случаев было выявлено присутствие модифицированных мобильных элементов в белок-кодирующих районах. Подобная интеграция часто сопровождается изменением функций генов. Таким образом, эволюция структурной части ряда генов происходила при непосредственном участии мобильных элементов.

Еще больший вклад эти элементы вносят в эволюцию регуляторных последовательностей. При анализе соответствующих баз данных нуклеотидных последовательностей генов млекопитающих (<http://www.mgc.nci.nih.gov/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq>) присутствие мобильных элементов было обнаружено в 25% промоторных районов и cis-действующих элементов, участвующих в координированной регуляции экспрессии ансамблей генов – «генных сетей». Таким образом, мобильные элементы влияют на экспрессию множества генов, причем это влияние особенно велико для относительно недавно дивергировавших классов генов, таких как гены иммунитета, детоксикации или гены неспецифической умственной отсталости, ассоциированные с появлением функции сознания у человека. Если вспомнить, что многие классы мобильных элементов имеют выраженную таксоно-специфичность, их интеграция с кодирующими и/или регуляторными районами генов, безусловно, способствовала дивергенции видов.

Экспрессия определенных классов ретротранспозонов может играть определяющую роль в регуляции самых ранних стадий эмбриогенеза. При анализе секвенированной экспрессионной библиотеки кДНК растущих ооцитов (FGO) мыши было обнаружено, что значительная доля материнских мРНК содержит в своем составе определенные классы LTR-ретротранспозонов. Эти элементы составляют 13% от всех экспрессирующихся последовательностей. Напомним, что фаза роста в оогенезе млекопитающих характеризуется интенсивным синтезом мРНК, накоплением и сохранением этих мРНК и белков в ооплазме. В зрелых ооцитах транскрипция не обнаруживается. Она восстанавливается только на стадии поздней зиготы, когда наблюдается прогрессивная активация эмбрионального генома, продолжающаяся до стадии морулы. Таким образом, материнские мРНК и белки, накопленные в ходе роста ооцита, управляют такими важнейшими видоспецифическими процессами, как завершение мейоза, оплодотворение, репрограммирование ядер гамет и активация

эмбрионального генома. Экспрессия LTR-элементов, хотя и снижается на стадии 2-клеточного зародыша, но все же сохраняется на высоком уровне, хотя ее характер и набор экспрессирующихся мобильных элементов меняется. LTR-элементы действуют на стадиях растущих ооцитов и 2-клеточных зародышей либо как альтернативные промоторы для «ранних» генов мышцы, либо входят в состав химерных транскриптов в качестве первых экзонов генов хозяина. Таким образом, они принимают непосредственное участие в синхронной регуляции экспрессии множества генов на самых начальных определяющих стадиях эмбрионального развития мышцы. В дальнейшем экспрессия LTR-элементов прекращается.

Трудно переоценить значение для процессов видообразования последствий изменений в регуляции экспрессии генов, происходящих на начальных стадиях развития. Также как трудно переоценить значение мобильных элементов для эволюции, в целом.

Несмотря на это, скачкообразное нарастание сложности организации различных форм жизни, произошедшее в последние 500 миллионов лет в процессе эволюции эукариот, нельзя объяснить только мобильными элементами. Ведь присутствие подобных элементов у прокариот не привело к существенному увеличению сложности их организации за миллиарды лет эволюции. Целая серия фундаментальных открытий, касающихся участия мобильных элементов и не кодирующих белки РНК в регуляции экспрессии отдельных генов или целых «генных сетей», легли в основу новой концептуальной революции. Согласно современным представлениям ведущая роль в определении фенотипической изменчивости высших организмов принадлежит эпигенетическим модификациям генома, реализация которых осуществляется при участии мобильных элементов и под контролем множества нетранслируемых РНК.

В последнее время все более очевидной становится роль нетранслируемых РНК в эволюции эукариот. В отличие от белок-кодирующих последовательностей их численность и протяженность прямо

коррелируют со сложностью организации видов. Эволюция ядер и разделение транскрипции и трансляции у эукариот способствовали распространению интронов в генах, так как их присутствие не влияло на производство мРНК и белка в клетках. Дальнейшая эволюция cis-действующих каталитических РНК в транс-действующие сплайсеосомные РНК снизила негативный отбор по отношению к интронам и допустила их вариацию по нуклеотидным последовательностям. Эта изменчивость, обеспечившая высокую информационную сложность интронов, в сочетании с их огромной численностью и преимуществом одновременной, синхронной с белок-кодирующими последовательностями транскрипции позволили, по крайней мере, части интронов занять новое эволюционное пространство в качестве контролирующих молекул. По мере становления системы коммуникаций на уровне РНК давление положительного отбора могло привести к увеличению скорости эволюции функциональных интронов и других не кодирующих белки РНК. Возникновение и эволюция новой системы, действующей на уровне РНК и контролирующей основные информационные процессы, привели к экспоненциальному росту пластичности ДНК-РНК-белковых взаимодействий. Следствием этого явилась возможность образования множественных опосредованных РНК-сигналами контактов между разными генами, а также между генами и их продуктами, что и привело к появлению многофункциональных взаимоинтегрированных белковых комплексов и экспоненциальному росту сложности организации различных форм жизни.

Таким образом, геномные исследования выявили широкий спектр эволюционно значимых молекулярно-генетических изменений. Стало очевидно, что наряду с классическими мутациями генов и их рекомбинациями, ведущая роль в процессах эволюции эукариот принадлежит многоуровневым регуляторным системам, возникшим в результате симбиоза и опосредованного мобильными элементами обмена генетической информацией между дивергировавшими таксонами. Это позволяет иначе

подойти к самому определению биоценоза как основной эволюционирующей системы, рассматривать его не только как множество дискретных видов, взаимодействующих на уровне внешних связей, но скорее как единый организм, способный обмениваться информацией о состоянии своих элементов, а также принимать участие в их корректировке и совершенствовании.

Часть II. МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНЕТИКА

Глава 2.1. Наследственные болезни, общая характеристика

В настоящее время не существует единой классификации наследственных болезней, и часто их смешивают с *врожденными* и *семейными* болезнями. Причиной развития наследственных болезней являются присутствующие в половых клетках родителей мутаций в определенных генах. Эти мутации могут передаваться потомству в ряду поколений. Врожденные заболевания проявляются сразу после рождения, и они могут быть как наследственными, так и приобретенными, например, под действием тератогенных факторов или осложнений в родах. Приобретенные врожденные пороки развития не передаются по наследству. Семейными называются болезни, присутствующие у нескольких членов одной семьи. Они также могут быть наследственными или обуславливаться средовыми влияниями, например неправильным питанием, вредными привычками или присутствием токсических соединений в окружающей среде. В свою очередь, наследственные болезни не обязательно являются врожденными или семейными.

В соответствии с генетической обусловленностью наследственные болезни разделяют на две группы: хромосомные и генные, то есть связанные с «поломками» на уровне хромосом или индивидуальных генов. Среди генных заболеваний выделяют моногенные и мультифакториальные, которые, строго говоря, не относятся к наследственным заболеваниям, а являются болезнями с наследственной предрасположенностью. Суммарная частота наследственных заболеваний достигает 1,5%, из них на долю хромосомных болезней приходится 0,5% и на долю моногенных – до 1%. К мультифакториальным относятся большинство наиболее распространенных болезней человека.

2.1.1. Хромосомные болезни

Патологии, обусловленные аномалиями кариотипа, называются хромосомными болезнями. Одной из возможных причин хромосомных болезней может быть «перезревание» гамет в период копуляции. В некоторых случаях сперматозоид «встречается» с яйцеклеткой не в первые

часы после проникновения в матку, а через 24-72 часа. За это время происходит «перезревание» половых клеток (чаще яйцеклетки), что приводит к нарушению «программы встречи». Заметим, что оптимальным временем зачатия является середина, обычно, 13 - 15 дни между циклом месячных женщины.

Хромосомные болезни могут быть обусловлены нарушением числа хромосом или их структуры – числовые или структурные aberrации соответственно. Их диагностика проводится путем цитогенетического анализа кариотипа. Основная масса зародышей с дисбалансом хромосом погибает в ранний период развития плода. Часто женщина даже не замечает подобной беременности и расценивает свое состояние как задержку менструального цикла. Среди мертворожденных или погибших в возрасте до одного года частота больных с хромосомной патологией достигает 2,2%.

Общее представление о частоте и структуре аномалий хромосом, а также об их вкладе в преждевременное прерывание беременности и перинатальную смертность дают результаты совместных исследований, проведенных в 70-80е годы в Европе, Америке и Японии. Из миллиона зарегистрированных зачатий только 850 тысяч закончились родами. 2% новорожденных (1700) погибли в перинатальном периоде. 0,7% (5848) выживших детей имели различные хромосомные аномалии. В 34% случаев это были анеуплоидии по половым хромосомам, в 30% - трисомии, главным образом, по 13, 18 и 21 хромосомам и в 36% - сбалансированные перестройки, то есть эти дети были клинически здоровы. У 5% погибших детей также были хромосомные аномалии, в 75% случаев – трисомии, в 20% – несбалансированные структурные перестройки и в остальных случаях – полиплоидии. Иная картина наблюдается у спонтанных абортусов. У половины из них имеются аномалии кариотипа. Более чем в 50% случаев это трисомии, в 19% – числовые аномалии половых хромосом и в 22% – полиплоидии. Таким образом, только небольшой процент плодов с хромосомными аномалиями доживают до родов.

В настоящее время описано около 1000 нозологических форм хромосомных болезней. Все они характеризуются рядом общих признаков, таких как: маленькая масса и длина тела при рождении, пренатальная гипоплазия; отставание в умственном и физическом развитии с момента рождения, особенно выраженное при аутосомных аномалиях; задержка и аномалии полового развития: гипогонадизм, крипторхизм, аменорея, бесплодие и др., более выраженные при аномалиях половых хромосом; множественные ВПР в большей степени при аутосомных аномалиях; комплекс разнообразных по проявлениям и тяжести дизморфогенетических и диспластических признаков, одновременно затрагивающих многие системы и органы больного.

Хромосомные болезни редко наследуются, и более чем в 95% случаев риск повторного рождения в семье больного ребенка с хромосомной патологией не превышает общепопуляционного уровня. Исключение составляют те случаи, когда родители больного ребенка несут сбалансированные хромосомные перестройки, чаще всего транслокации, при которых не происходит утраты генетического материала. Носители сбалансированных транслокаций являются практически здоровыми людьми, но вероятность у них выкидышей, замерших беременностей или рождения детей с несбалансированными хромосомными перестройками, а значит с хромосомными болезнями, очень велика. Поэтому при бесплодии, мертворождениях, привычной невынашиваемости беременности, а также при наличии в семье ребенка с хромосомной патологией необходимо проводить анализ кариотипа каждого из родителей с целью диагностики сбалансированных хромосомных перестроек. Подобный анализ делается в медико-генетических консультациях и в некоторых специализированных лабораториях.

2.1.2. Моногенные болезни

В соответствии с современными представлениями разнообразие моногенных заболеваний достаточно велико и их количество по некоторым

оценкам достигает 5000. С клинической точки зрения это очень разные, в большинстве своем достаточно тяжелые неизлечимые болезни. Однако во многих случаях использование методов симптоматической коррекции позволяет в определенной степени облегчить страдания больных. Причиной каждого из этих заболеваний является повреждение или мутация одного гена. Следствием мутации может быть нарушение структуры или синтеза кодируемого геном белка, часто сопровождающееся изменением его количественного содержания вплоть до полного отсутствия. Мутации генов способствуют формированию нарушения обмена нередко целой метаболической системы, ведущего к необратимым патологическим состояниям. Степень влияния мутации на развитие заболевания зависит от очень многих факторов. Мутации могут передаваться из поколения в поколение, но порой могут возникать в половых клетках родителей спонтанно. Причина спонтанных мутаций в большинстве случаев остается неизвестной.

Среди моногенных болезней значительный процент составляют ферментопатии, различные формы умственной отсталости, дефекты органов слуха, зрения, скелетные дисплазии, врожденные пороки развития, болезни нервной, эндокринной, соединительно-тканной, иммунной и других систем. Моногенные варианты течения заболевания в редких случаях встречаются среди любых нозологических форм, которые в общем случае не являются наследственными. Так, например, описаны моногенные формы гипертензии, болезней Альцгеймера и Паркинсона, эпилепсии и других больших психозов, иммунодефицитов, различных онкологических заболеваний и многих других патологических состояний. Моногенные варианты заболевания, как правило, отличаются от спорадических форм более тяжелым течением и ранним дебютом. Большинство мутаций, ассоциированных с моногенными заболеваниями, жестко детерминируют развитие болезни, и факторы окружающей среды не оказывают или оказывают небольшое влияние на развитие заболевания. Поэтому они так трудно поддаются коррекции.

Однако немало примеров моногенных болезней с неполной пенетрантностью и варьирующей экспрессивностью, причины которых чаще всего остаются неизвестными.

Наследственные болезни классифицируют также по системному принципу: наследственные болезни нервной, сердечно-сосудистой, мочеполовой, эндокринной системы, органов зрения, слуха, кожи и т.д. Однако подобная классификация не всегда может быть проведена однозначно, так как для многих наследственных заболеваний характерна плейотропия, то есть одновременное вовлечение в патологический процесс нескольких систем, органов и тканей больного.

К счастью, моногенные заболевания встречаются достаточно редко. Это объясняется двумя обстоятельствами. Далеко не все гены человека, а только около 5% связаны с моногенными заболеваниями. Кроме того, частоты распространения среди населения мутаций, ассоциированных с моногенными заболеваниями, достаточно низки. К числу наиболее известных моногенных болезней относятся фенилкетонурия, муковисцидоз, галактоземия, адреногенитальный синдром, гемофилия А и В, миодистрофия Дюшенна/Беккера, проксимальная спинальная мышечная атрофия, гепатолентикулярная дегенерация и многие другие болезни. Их частоты варьируют в пределах от 1 на 2-3 до 1 на 10-20 тысяч новорожденных. Другие моногенные заболевания встречаются с еще более низкими частотами – 1 на 100-300 тысяч или 1 на миллион. Однако, поскольку таких заболеваний достаточно много, суммарно они составляют значительный процент в перинатальной и детской смертности, и большой процент педиатрических коек занят такими больными.

Несмотря на клиническое многообразие моногенных болезней, можно выделить некоторые общие черты, касающиеся возраста начала заболевания, характера его течения, вовлеченности в патологический процесс различных органов и систем, семейного анамнеза, наличия редких специфических симптомов и ответа на предлагаемую терапию. Большинство моногенных

болезней распознаются в перинатальном или раннем детском возрасте. Около 25% этих болезней развиваются в эмбриональном периоде, и еще около 50% проявляются к 3 годам. К концу пубертантного периода диагностируются примерно 90% всех моногенных болезней. Наряду с этим известны наследственные болезни с поздними сроками проявления, такие как спинно-мозжечковые атаксии, хорея Гентингтона, моногенные формы болезней Паркинсона и Альцгеймера и другие. Типичными чертами многих наследственных заболеваний являются хронический характер и прогрессирующая течения, то есть постепенное ухудшение общего состояния с нарастанием негативных симптомов. Множественность поражения, обусловленная плеiotропным действием гена, типична для большинства наследственных заболеваний. В некоторых случаях удается проследить семейный характер заболевания. Однако отсутствие повторных случаев болезни у членов одной и той же семьи не исключает того, что заболевание является наследственным. Необходимо помнить, что наследуются не заболевания, а гены, точнее их аллельные состояния. Поэтому очень часто в семье может быть только один больной с наследственным заболеванием.

При некоторых моногенных заболеваниях выявляются редкие специфические симптомы или даже сочетания этих симптомов. Иногда их проявления не имеют клинического значения, но являются ключевыми при постановке диагноза. Например, наличие симметричных ямок или фистул на слизистой нижней губы в сочетании с расщелиной неба при синдроме Ван дер Вуда, присутствие насечек на мочке уха у ребенка с макроглоссией и расхождением прямых мышц живота при синдроме Беквита-Видемана, широкий первый палец на кистях и стопах в сочетании с прогрессирующей умственной отсталостью при синдроме Рубинштейна-Тейби и т. д. Многие моногенные заболевания относятся к классу неизлечимых или трудно поддающихся лечению заболеваний. Для них характерна «резистентность» специфических клинических проявлений к наиболее распространенным

методам терапии. Это объясняется тем, что в основе своей лечение направлено на устранение какого-то определенного симптома, но не причины заболевания. Каждая из перечисленных выше черт в отдельности может быть недостаточна для предположения о наследственном характере заболевания, но различные их сочетания часто позволяют заподозрить подобную патологию у обследуемого пациента.

Моногенные болезни можно разделить на две группы. Первая группа – менделирующие заболевания. Их наследование соответствует законам Менделя о рецессивности и доминантности гена и пребывании его в гомо- или гетерозиготном состоянии. В зависимости от локализации мутантного гена и характера доминирования выделяют аутосомно-доминантные, аутосомно-рецессивные и сцепленные с полом заболевания, которые также могут быть доминантными или рецессивными. Наследование некоторых моногенных заболеваний не подчиняется законам Менделя. Они составляют группу болезней с нетрадиционными типами наследования. Это митохондриальные заболевания, болезни экспансии, обусловленные динамическими мутациями, болезни геномного импринтинга и болезни, обусловленные другими нарушениями эпигенетической регуляции работы генов.

Большое разнообразие и редкость моногенных болезней делают дорогостоящей разработку специфических методов их диагностики и терапии. В разных странах эта проблема решается по-разному. Но наиболее эффективная помощь пациентам с моногенными заболеваниями оказывается там, где развиты родительские общества, привлекающие внимание общественности к таким больным и добивающиеся спонсорской и государственной поддержки соответствующих программ. Профилактика моногенных заболеваний проводится на базе пренатальной диагностики. Заметим сразу, такой подход применим только в случае тяжелых неизлечимых болезней. К сожалению, пренатальная диагностика практически проводится только в тех семьях, где уже имеется больной

ребенок. Целью ее является предотвращение повторного рождения в семье больного. Напомним, что у гетерозиготных родителей при каждой беременности сохраняется высокий риск рождения больного ребенка, независимо от того, кто родился перед этим - больной или здоровый. Кроме того, этот риск может быть повышен и у других родственников больного. Поэтому так важно проводить молекулярную диагностику не только самому больному, но и его родственникам, особенно тем, которые хотят иметь детей.

2.1.3. Мультифакториальные болезни

Мультифакториальные заболевания обусловлены комбинированным действием неблагоприятных внешних и генетических факторов риска, формирующих наследственную предрасположенность к заболеванию. К мультифакториальным заболеваниям относятся подавляющее большинство хронических болезней человека, включая сердечно-сосудистые, эндокринные, иммунные, нервно-психические, онкологические и др. Генетические составляющие могут присутствовать в этиологии даже тех заболеваний, развитие которых целиком индуцируется внешними воздействиями и невозможно без их присутствия, таких, например, как инфекционные болезни. Однако и в этих случаях индивидуальная чувствительность к подобным внешним неблагоприятным воздействиям может быть генетически детерминирована.

В настоящее время в качестве генетических факторов риска рассматривают широко распространенные среди населения полиморфные аллели, обладающие относительно небольшим повреждающим эффектом на функцию гена. Те гены, полиморфные аллели которых участвуют в формировании наследственной предрасположенности к определенной патологии, иногда называют *генами предрасположенности* или *генами-кандидатами*. Для разных мультифакториальных заболеваний число генов-кандидатов может достигать десятков или даже сотен. Поиск таких генов осуществляется с учетом знаний об основах этиологии и патогенеза заболевания. Какие метаболические циклы дефектны при тех или иных

заболеваниях? Какие белки оперируют в этих патологических метаболических циклах и как устроены гены, кодирующие эти белки? Имеются ли там полиморфные аллели, ухудшающие работу всей метаболической системы в целом, и не являются ли они генетическими факторами риска развития определенной патологии? Для ответа на этот последний вопрос проводят сравнение частот полиморфных аллелей в выборках больных и здоровых людей. Считается, что полиморфный аллель участвует в формировании наследственной предрасположенности к заболеванию в том случае, если его частота у больных достоверно превышает контрольный уровень. Например: существует повышенная вероятность возникновения у пациента инфаркта миокарда или развития атеросклероза при наличии полиморфных аллелей в генах, ответственных за оптимальную работу сердечно-сосудистой системы. Это могут быть гены, участвующие в контроле липидного метаболизма, ренин-ангиотензин-альдостероновой системы или системы свертывания крови и фибринолиза. С развитием медицинской генетики ученые открывают все большее число генов-кандидатов, от состояния которых зависит происхождение и тяжесть течения заболевания у конкретного пациента.

В последнее время в отдельную группу выделяют заболевания, обусловленные мутациями, возникающими в соматических клетках пациента. Иногда их называют болезнями нуклеиновых кислот. Прежде всего, это онкологические и, возможно, некоторые аутоиммунные заболевания.

Глава 2.2. Методы медицинской генетики

Существуют различные методы изучения наследственных болезней, главными из них являются клинико-генеалогический, близнецовый, популяционный, цитогенетический, биохимический и молекулярно-генетический.

2.2.1. Клинико-генеалогический метод

Клинико-генеалогический метод включает клиническое обследование членов семьи пациента, обратившегося за консультацией, составление ее родословной и проведение генеалогического анализа. Генеалогический анализ является самым распространенным, наиболее простым и одновременно высоко информативным методом, доступным каждому, кто интересуется своей родословной и историей своей семьи. Он не требует никаких материальных затрат и аппаратуры. Убеждены, что со временем в каждой истории болезни будет представлена родословная пациента, как обязательная часть анамнеза жизни.

Один из основателей клинической генетики и медико-генетического консультирования в России С.Н. Давиденков (1960) писал: «В постановке клинического диагноза, то есть в непосредственной практической работе врача генеалогическое исследование относится к чрезвычайно важным, а нередко и к решающим моментам распознавания; привычка пользоваться для диагностики методом генеалогии и личного обследования родственников оказывается настолько сильным подспорьем в ежедневной работе, что всякому имеющему в этом хотя бы небольшой опыт, кажется странным, как можно было довольствоваться рассмотрением одних голых фенотипов, совершенно игнорируя наследственные особенности, которые были свойственны этим людям (семье) еще задолго до заболевания».

Родословная раскрывает медико-патологический фон семьи, по ней можно с определенной точностью судить о типе наследования патологии, о членах семьи, нуждающихся в обследовании и наблюдении врача. Во время составления родословной возникает значительно более теплый и доверительный контакт с больным и его родными, чем просто разговор о болезнях близких. Хорошо составленная родословная помогает прогнозировать состояние здоровья родственников больного, их детей и будущего потомства.

Основателем генеалогического метода изучения наследственности считается немецкий историк О. Лоренц, опубликовавший в 1898 году

учебник генеалогии, в котором рассматриваются закономерности происхождения различных семейных заболеваний. В этом учебнике генеалогия рассматривается не как отрасль исторических знаний, а как самостоятельная наука, доставляющая обильный материал для биологии, психологии, психиатрии и др., и имеющая свои задачи по установлению закономерностей в смене поколений. В 1912 году американский евгенический институт выпустил образцы прямолинейных родословных таблиц, которые применяются до настоящего времени, не претерпев практически никаких изменений. Символы, применяемые при составлении родословной, отражены на рис.1, принцип составления родословной представлен на рис. 2. Лицо, с которого начинается исследование родословной называется *пробанд*, и далеко не во всех случаях это бывает больной, особенно в детской практике. Родословную лучше всего рисовать на большом листе бумаги, разлинованном по горизонтали. На одной линии должны быть размещены все родственники, относящиеся к одному поколению. Поколения обозначают римскими цифрами, а отдельных членов каждого поколения – арабскими. В этом случае каждый член семьи будет иметь свой индивидуальный номер из одной римской и одной арабской цифры. Необходимо указывать возраст всех членов родословной, так как разные заболевания проявляются в разные возрастные периоды жизни, и отмечать лично обследованных знаком «!». Более подробные объяснения к родословной называют легендой, их обычно записывают на отдельных карточках.

По хорошо составленной родословной можно получить ответы на многие вопросы. В частности, по ней можно увидеть, какие заболевания наиболее распространены в семье, и кого из ее членов нужно обследовать на генетическую предрасположенность к определенной патологии. По родословной можно определить тип наследования заболевания и выяснить, кто из членов семьи имеет высокий риск заболеть или родить подобного больного. Из этих данных вытекает выбор метода диагностики и проведения

профилактических мероприятий, оказание своевременной медицинской помощи.

Использование клинико-генеалогического метода предполагает тщательное клиническое обследование максимального количества членов родословной с целью выявления стертых и атипичных признаков заболевания. Сбор анамнестических данных проводят по определенной схеме. Сведения о пробанде, данные о сибсах и родителях пробанда, сведения о родственниках со стороны матери и со стороны отца записываются в медико-генетическую карту. Очень важен при этом акушерский анамнез женщин – как протекала и на каком фоне наступила беременность, подробности о спонтанных абортах, мертворождениях, наличии бесплодных браков и ранней детской смертности. Необходимо учитывать также наличие и характер профессиональных вредностей, факторов, влияющих на патологию плода (прием лекарственных препаратов, заболевания матери и т.д.).

Родословная семьи может быть хорошим подспорьем для молодых ее членов в решении социально-профессиональных вопросов. «Создание и накопление «историй жизни» и «семейных хроник» есть задача не только гуманитарно-научная, но и общекультурная», - считает петербургский социолог А.Н.Алексеев. Причем, добавляет ученый: «Всякая «история жизни», для какой бы цели она ни создавалась, должна включать генеалогическую информацию – столь подробную, насколько это под силу автору данной истории. Семейные хроники строятся на четком определении степеней родства, желателен построение генеалогического древа, что требует минимального обучения».

Владимир Набоков в автобиографическом романе «Другие берега» пишет: «Восемнадцать лет покинув Петербург, был слишком молод в России, чтобы проявить какое-либо любопытство к моей родословной; теперь я жалею об этом – из соображений технических: при отчетливой личной памяти неотчетливость семейной отражается на равновесии слов».

2.2.2. Близнецовый метод

Близнецовый метод основан на клиническом обследовании и сравнении моно- и дизиготных близнецов, воспитывающихся в одинаковых или различных условиях окружающей среды. Монозиготные близнецы развиваются из одной оплодотворенной яйцеклетки и имеют одинаковую наследственную конституцию. Таким образом, выявляемые между ними различия не связаны с наследственными факторами. Дизиготные близнецы развиваются из разных яйцеклеток, оплодотворенных различными сперматозоидами. Степень их генетического сходства такая же, как у обычных сибсов, но благодаря одновременному рождению и совместному воспитанию они имеют больше общих средовых факторов. Особую ценность при изучении наследственных факторов, влияющих на тип поведения, психологические или интеллектуальные особенности, представляют монозиготные близнецы, разделенные в младенческом или раннем детском возрасте и воспитывающиеся в разных условиях. С помощью близнецового метода удалось доказывать значение генетической предрасположенности ко многим широко распространенным заболеваниям.

Результатом сравнения двух групп близнецов является расчет процента идентичности или *конкордантности* различных признаков или болезней, проявляющихся у каждого из пары близнецов. Чем больше наследственная составляющая признака или заболевания, тем выше значения конкордантности, но самое главное – больше уровень расхождения между моно- и дизиготными близнецами. Количественной оценкой доли наследственной обусловленности признака является коэффициент наследуемости (Н), рассчитываемый по следующей формуле, предложенной Хольцингером:

$$H = (КМБ - КДБ) / (100 - КДБ),$$

где КМБ и КДБ – выраженная в процентах конкордантность признака для моно- и дизиготных близнецов соответственно. Если $H > 70\%$, решающая роль в проявлении признака принадлежит наследственным факторам. При $H < 30\%$

– средовые факторы являются основными в формировании признака. При промежуточных значениях H предполагается примерно равное участие в контроле признака как генетических, так и средовых факторов.

Например, при заболевании корью или коклюшем одного из партнеров близнецовой пары вероятность заболевания второго (конкордантность пары) в группах моно и дизиготных близнецов практически одинаковая: 98% и 94% и 97% и 93%, соответственно. Преобладающая роль инфекционного фактора в данном случае очевидна. При туберкулезе вероятность заболевания второго близнеца в монозиготной паре почти в 3 раза больше, чем в дизиготной – 67% и 23 %. То есть при идентичном генотипе сходная реакция на туберкулезную инфекцию наступает чаще, чем при разных генотипах. Этот факт показывает значительную роль наследственной предрасположенности ребенка к туберкулезу, что в настоящее время очень важно иметь в виду в связи с данными об увеличении распространенности туберкулеза.

2.2.3. Популяционный метод

Популяционный метод направлен на изучение частот аллелей и генотипов в различных популяциях, а также факторов, влияющих на их динамику. Этот метод особенно важен при проведении эпидемиологических исследований. Генетическое изучение популяций человека невозможно без учета географических и климатических условий. Но особенно важны демографические характеристики популяции, такие как численность, рождаемость, смертность, возрастная и социальная структура, национальный состав, религиозная принадлежность, образ жизни, особенности питания, наличие вредных привычек и др. Наследственные заболевания в разных популяциях, этнических группах и расах встречаются с разными частотами, и это обусловлено различиями в частотах и спектрах мутаций.

Анализ соответствия распределения частот аллелей и генотипов в различных популяциях закону Харди-Вайнберга позволяет судить о том, является ли популяция панмиктической, то есть соблюдается ли в ней принцип случайности скрещивания вне зависимости от генотипов особей.

Важными практическими задачами являются анализ спектров и частот распределения в отдельных популяциях мутантных аллелей, ассоциированных с определенными наследственными заболеваниями, и выявление среди них мажорных мутаций.

2.2.4. Цитогенетический метод

Цитогенетический метод применяется для анализа кариотипа и его аномалий у отдельных индивидуумов. Для проведения исследования достаточно получить образец периферической крови пациента объемом 1-2 мл. Анализ кариотипа проводят в три этапа: культивирование лимфоцитов крови, окраска препарата и его микроскопический анализ. Культивирование проводят для того, чтобы стимулировать деление лимфоцитов, так как успех цитогенетического исследования зависит от количества клеток, находящихся на стадии метафазы, когда хромосомы находятся в наиболее компактной форме. Продолжительность культивирования обычно составляет 72 часа. Для увеличения количества метафазных клеток в конце культивирования в среду вводят колхицин, который приостанавливает деление на стадии метафазы, разрушает веретено деления и увеличивает конденсацию хромосом. Далее клетки помещают в гипотонический раствор, который приводит к разрыву ядерной оболочки и свободному перемещению хромосом в цитоплазме. На следующем этапе клетки фиксируют смесью этанола и уксусной кислоты в соотношении 3:1, их суспензию раскапывают на предметные стекла и высушивают. В зависимости от целей кариотипирования используют различные методы дифференциального окрашивания хромосом (G-, R-, C-, Q-методы). Процедура окрашивания занимает несколько минут и приводит к появлению рисунка поперечной исчерченности, специфичного для каждой хромосомы. Световое микроскопирование окрашенных препаратов является самым трудоемким этапом всего исследования, требующим высокой квалификации. Для выявления хромосомных аномалий необходимо проанализировать не менее 30 метафазных пластинок. Большой эффективностью обладают методы компьютерного анализа хромосом.

Внедрение молекулярных технологий в сочетании с использованием флюоресцентных окрасок резко увеличивает разрешающую способность цитогенетического анализа. При этом отдельные сегменты хромосом могут быть окрашены в разные цвета, а кариотипы в целом выглядят как фантастические удивительно красочные картины. Разработаны также методы окрашивания хромосом в клетках, находящихся в состоянии покоя, когда хромосомы максимально растянуты. С их помощью могут быть идентифицированы сегменты хромосом размером около 50 килобаз.

2.2.5. Биохимический, иммунологический и микробиологический методы

Биохимический и иммунологический методы основаны на анализе различных классов органических и неорганических соединений, дефектных при разных наследственных заболеваниях, в первую очередь, при наследственных болезнях обмена. Биохимические нарушения, как правило, предшествуют появлению клинических симптомов заболевания и являются по сравнению с ними более константными. Предметом биохимической диагностики могут быть белки, аминокислоты, углеводы, липиды, ионы металлов и др., а также их метаболиты. При этом исследовать можно разные ткани и секреты организма (кровь, моча, слюна, пот, ликвор, амниотическая жидкость, биоптаты мышц, кожи, печени и других специализированных тканей). Биохимические методы играют первостепенную роль в диагностике наследственных нарушений обмена веществ. В некоторых случаях они позволяют выявлять гетерозиготных носителей мутаций. Очень важна роль биохимических методов анализа при проведении массовых скринингов беременных или новорожденных с целью более раннего выявления наследственных заболеваний.

Ключевая роль в патогенезе любого моногенного заболевания принадлежит *первичному биохимическому дефекту* – тому белку, который кодируется мутантным геном. Идентификация и анализ первичного биохимического дефекта, определение первичной патологической метаболической цепи – вот главные цели биохимической генетики, решение

которых является основой для разработки патогенетических методов профилактики и терапии наследственных заболеваний.

Не менее важна роль биохимических методов при диагностике вторичных нарушений. Например, первичным биохимическим дефектом при мышечной дистрофии Дюшенна/Беккера является недостаточность дистрофина – белка, соединяющего цитоскелет мышечной клетки с внеклеточным матриксом. В результате этого нарушения в крови больных повышается уровень одного из мышечных ферментов креатинфосфокиназы, как в начале заболевания, так и в его развернутой стадии. Более того, содержание этого фермента повышено у 30% гетерозиготных носительниц мутации. Хотя это нарушение является вторичным, но простота тестирования креатинфосфокиназы и стойкость его повышения у больных делают его удобным диагностическим маркером заболевания.

Разнообразие биохимических методов огромно, и они постоянно совершенствуются. Их подразделяют на качественные, количественные и полуколичественные. Качественные реакции позволяют обнаруживать избыточное количество промежуточных метаболитов, накапливающихся при наследственных болезнях обмена в результате блока ферментативной реакции. Они просты, недороги и достаточно чувствительны. Часто в качестве субстрата для качественной реакции используется моча. Полуколичественные и количественные тесты проводятся как с мочей, так и с кровью. Наиболее простые из них измерение пирувата, лактата, ионов аммония, измерение кислотно-щелочного баланса. Ведущая роль в диагностике наследственных болезней обмена принадлежит высокоточным количественным тестам, использующим методы флуориметрии, спектрофотометрии, хроматографии, электрофореза, масс-спектрометрии. Некоторые методы позволяют одновременно проводить количественную оценку нескольких тысяч метаболических маркеров. Однако эти методы требуют использования достаточно дорогого оборудования и расходных материалов.

В некоторых случаях иммунологические методы анализа белков оказываются более эффективными по сравнению с биохимическими. Среди них следует упомянуть иммуногистохимический метод, позволяющий проводить анализ белков и определять их локализацию в специализированных клетках и тканях организма. Иммунологические методы применяют при обследовании больных с иммунодефицитными состояниями (агаммаглобулинемия, атаксия-телеангиэктазия-синдром Луи-Бар и др.), при подозрении на антигенную несовместимость крови матери и плода, при установлении отцовства.

Микробиологические методы используются для анализа присутствия в биологическом образце определенных веществ – аминокислот, сахаров и др., необходимых для роста определенных штаммов микроорганизмов. Этот метод лежит в основе известного теста Гатри, применяемого при диагностике фенилкетонурии, гистидинемии, галактоземии и лейциноза.

2.2.6. Молекулярно-генетический метод

Молекулярно-генетический метод основан на анализе нуклеиновых кислот, в первую очередь, молекул ДНК. Основной целью этих методов является диагностика мутаций, исследование их ассоциации с наследственными заболеваниями, а также выявление гетерозиготных и гомозиготных носителей мутации. По-существу, молекулярная диагностика является наиболее объективным методом верификации наследственных заболеваний. Важно подчеркнуть, что нахождение мутаций в гомозиготном или гетерозиготном состояниях соответственно при рецессивных или доминантных заболеваниях является бесспорным подтверждением диагноза. Однако в тех случаях, когда мутации не удается обнаружить, решающее заключение при постановке диагноза сохраняется за клиницистом, так как используемые на практике методы молекулярной диагностики чаще всего не позволяют идентифицировать все возможные мутации в исследуемом гене.

Внедрению молекулярно-генетической методологии в клиническую практику способствовала разработка метода *полимеразной цепной реакции*

(ПЦР) или *специфической амплификации ДНК*, произошедшая более 20 лет назад. Первооткрыватель этого метода Керри Мулис за свое изобретение был удостоен Нобелевской премии в 1993 году. Метод ПЦР позволяет тестировать состояния генов у отдельных индивидуумов. Его суть заключается в избирательном копировании *in vitro* небольшого фрагмента гена, в котором предположительно может быть локализована мутация, с использованием в качестве матрицы *геномной* ДНК обследуемого. Небольшие размеры копируемого (или амплифицируемого) фрагмента гена в сочетании с их огромным числом позволяют в дальнейшем использовать очень простые методы для анализа этого участка ДНК, выявления его особенностей у обследуемого пациента. Главными из этих методов являются электрофорез *амплифицированной ДНК*, ее окрашивание, разрезание специфическими ферментами – *рестриктазами*, и определение нуклеотидной последовательности этого фрагмента - секвенирование.

ПЦР лежит в основе ДНК-диагностики любых наследственных заболеваний. Данный подход широко используется и для анализа генетических факторов риска, предрасполагающих к развитию широко распространенных мультифакториальных заболеваний. В случае молекулярной диагностики инфекций амплифицируется фрагмент ДНК, специфичный для определенного возбудителя, а затем с помощью электрофореза и окрашивания на ДНК тестируется наличие этого фрагмента, а значит и самого возбудителя, в том биологическом образце, который был взят для анализа. Использование ПЦР в судебной медицине основано на амплификации высоко изменчивых областей генома, позволяющих проводить идентификацию личности – метод *геномной дактилоскопии*.

Преимуществом ДНК-диагностики по сравнению с биохимической или иммунологической диагностикой является использование унифицированного набора методов, практически не зависящего от целей проводимого исследования. Это методы выделения ДНК, ПЦР, электрофорез, рестрикция ДНК, гибридизация со специфическими *ДНК-зондами* и секвенирование.

Таким образом, в пределах одной лаборатории можно заниматься ДНК-диагностикой широкого спектра заболеваний. Остановимся более подробно на ключевых методах молекулярной диагностики.

Выделение ДНК. Прежде всего, необходимо помнить, что основная масса ДНК находится в ядрах в составе хромосом в суперскрученном состоянии за счет взаимодействия с определенными белками. Таким образом, ДНК можно выделять из любого типа тканей или клеток, в которых содержатся ядра. Существует много модификаций методов выделения ДНК. Мы разберем только принципиальные основы одного из этих методов. У человека ДНК чаще всего выделяют из лейкоцитов крови, для чего производят забор из вены от 1 до 5 мл крови. Кровь нужно собирать в присутствии антикоагулянтов. После отстаивания крови отбирают слой, обогащенный лейкоцитами, и добавляют детергенты для разрушения мембраны клеток. С помощью мягкого центрифугирования осаждают ядра на дно пробирки. Сливают надосадочную жидкость, и к суспензии ядер добавляют детергенты, разрушающие их мембраны, а также протеолитические ферменты, разрушающие белки. Чаще всего используют протеиназу К. Таким образом ДНК выходит в раствор. На следующем этапе необходимо отделить фракцию высокомолекулярных ДНК от низкомолекулярных соединений, таких как фрагменты белков, липиды, углеводы и т.п. Одним из способов такого разделения является экстракция фенолом. При добавлении фенола и тщательном перемешивании низкомолекулярные соединения перейдут в фенол, который окрасится при этом в бурый цвет за счет присутствия фрагментов гемоглобина, а молекулы ДНК останутся на поверхности фенола, так как не смогут войти в этот плотный раствор. Светлый раствор над фенолом, содержащий ДНК, отбирают и проводят несколько раундов повторных очисток фенолом с добавлением на последних этапах хлороформа. Затем можно осадить ДНК из раствора, добавляя этанол. При 70⁰ спирта ДНК выпадает в осадок в виде

аморфного образования. В таком состоянии ее можно длительно хранить при низких температурах.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) или специфическая амплификация ДНК это избирательный синтез *in vitro* большого количества копий (порядка миллиона) небольшого фрагмента ДНК размером, обычно, в сотни нуклеотидов по матричной молекуле ДНК. Для проведения ПЦР необходимо искусственно синтезировать небольшие однонитевые молекулы ДНК размером от 15 до 30 нуклеотидов, комплементарные концам амплифицируемого фрагмента ДНК. Эти молекулы носят название *праймеры*. Они служат «затравкой» для синтеза ДНК и потому определяют его специфичность. ПЦР проводится в специальных одноразовых пробирках в очень небольшом объеме, не превышающем, обычно, 50 мкл. В этот объем определенного буфера добавляют матричную ДНК (ДНК обследуемого), два типа искусственно синтезированных на коммерческой основе праймеров, фермент комплементарного синтеза ДНК – термофильную ДНК-полимеразу, выделенную из термофильных бактерий и потому способную выдерживать высокие температуры, и 4 типа дезокситрифосфатов (dNTP), которые служат в качестве строительного материала для синтеза ДНК. Схема ПЦР представлена на рис. 32.

Рисунок 32. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) или специфическая амплификация ДНК

На первом этапе матричную ДНК переводят в однонитевую форму путем нагревания раствора выше 95⁰ в течение нескольких минут. Затем начинают циклически чередовать три кратковременные процедуры, длящиеся несколько десятков секунд: (1) отжиг или посадка праймеров - это происходит при охлаждении раствора до температуры, оптимальной для образования двунитевой структуры матричной ДНК с праймерами; (2) синтез ДНК, начиная с праймера – это происходит при повышении температуры раствора до значений, оптимальных для работы термофильной ДНК-

полимеразы и (3) денатурация синтезированной ДНК – достигается повышением температуры раствора свыше 90° для перехода ДНК в однонитевую форму. Затем все повторяют, начиная с процедуры (1). Таким образом, при каждом цикле смены температур, происходит удвоение участка ДНК, расположенного между праймерами, причем длина этого участка в точности соответствует расстоянию между внешними концами праймеров. После проведения 25-30 подобных циклов количество вновь синтезированных фрагментов ДНК достигает или даже превышает миллион копий. Выбор программы смены температур и длительности каждой из процедур цикла, наряду с выбором праймеров и буфера, зависят от длины и специфики амплифицируемого фрагмента ДНК. Эти параметры и определяют искусство проведения ПЦР, и очень часто они подбираются эмпирически. Циклическая смена температур производится автоматически в приборе, который называется *амплификатор ДНК* или *термоциклер*. Таким образом, ПЦР простой в исполнении, не дорогостоящий, высокоточный и современный метод молекулярной диагностики.

Электрофорез ДНК принципиально не отличается от белкового электрофореза. Амплифицированную ДНК наносят на полиакриломидный или агарозный гель и включают ток. При этом начинается продвижение ДНК в геле от минуса к плюсу, и скорость этого продвижения зависит от длины молекулы и ее конфигурации. Через определенное время молекулы ДНК одинаковой длины сконцентрируются в узких зонах. Количество копий синтезированных в процессе проведения ПЦР ДНК, обычно, бывает достаточным для ее визуализации при использовании рутинного метода окрашивания ДНК этидиумом бромидом. При добавлении этого красителя к гелю полосы ДНК высвечиваются красным цветом при просмотре геля под ультрафиолетовой лампой.

Существует много модификаций ПЦР, удобных для проведения специфических исследований. Так, одновременно можно амплифицировать не один, а несколько фрагментов ДНК – *мультиплексная* или множественная

ПЦР. *Асимметричная* ПЦР позволяет вести преимущественный синтез одной цепи ДНК. Вводя специфические красители в праймеры можно оценивать количество копий амплифицированных фрагментов ДНК на автоматическом сканере – *количественная* ПЦР. Очень мощным является метод ПЦР *в реальном времени*. На базе ПЦР разрабатываются методы молекулярной цитогенетики – *PRINS*, *количественная флуоресцентная* ПЦР. Последний метод, основанный на мультиплексной амплификации повторяющихся хромосом-специфических полиморфных последовательностей ДНК, позволяет оценить количество копий специфических хромосом или их фрагментов, и он очень удобен для проведения пренатальной диагностики анеуплоидий у плода, таких как синдром Дауна, Эдвардса, Патау и др.

Молекулярная диагностика мутаций или ДНК-диагностика. Клинические методы молекулярной диагностики зависят от характера повреждения гена, то есть от типа мутации. Наиболее просто диагностируются структурные внутригенные мутации – делеции и инсерции, так как они изменяют длину, а значит, и электрофоретическую подвижность амплифицируемого фрагмента ДНК. Для диагностики таких мутаций достаточно провести ПЦР с использованием специфических праймеров и электрофорез, а затем сопоставить длину амплифицированного фрагмента ДНК в норме и у больного. У гомозигот по делеции размер амплифицированного фрагмента будет короче на величину делеции, а значит, этот фрагмент при электрофорезе будет двигаться быстрее и расположится ниже нормального. У гетерозигот на электрофореграмме будут два фрагмента – один нормальной величины и другой более короткий. Аналогично диагностируются инсерции, только длина амплифицированного фрагмента у мутантных гомозигот будет больше, а сам фрагмент на электрофореграмме будет располагаться выше нормального. У гетерозигот на электрофореграмме также будут два фрагмента – нормальной величины и длинный, то есть расположенный выше нормального. На рис.33

представлены результаты диагностики мажорной мутации в гене муковисцидоза – delF508 – делеции 3 нуклеотидов в 10-ом экзоне гена *CFTR*.

Рисунок 33. Диагностика делеции delF508 в гене муковисцидоза (*CFTR*)

Для диагностики более протяженных внутригенных делеций удобным является метод мультиплексной ПЦР с последующим электрофоретическим разделением амплифицированных фрагментов ДНК. На рис. 34 представлены результаты диагностики делеций в гене миодистрофии Дюшенна методом мультиплексной ПЦР.

Рисунок 34. Диагностика делеций в гене миодистрофии Дюшенна (*DMD*) методом мультиплексной ПЦР

Молекулярная диагностика точковых мутаций миссенс- или нонсенс-типа более сложна, так как длина амплифицированного фрагмента при этом не меняется. Наиболее распространенным методом диагностики таких мутаций является метод *рестрикционного анализа*. Этот метод может быть использован только в тех случаях, когда мутации случайным образом изменяют последовательности, специфичные для узнавания рестриктазами - эндонуклеазами, катализирующими разрезание двунитевых последовательностей ДНК в местах локализации этих специфических сайтов. Для диагностики таких мутаций достаточно провести ПЦР, рестрикцию амплифицированного фрагмента ДНК с использованием специфической эндонуклеазы и электрофорез. При наличии в норме сайта рестрикции произойдет разрезание амплифицированного фрагмента и на электрофореграмме будет две полосы, соответствующие фрагментам ДНК, суммарная длина которых равна величине исходного амплифицированного фрагмента. Исчезновение сайта рестрикции в результате мутации приведет к тому, что у мутантных гомозигот разрезания амплифицированного фрагмента не произойдет и на электрофореграмме будет одна полоса, причем характер ее расположения будет аналогичен тому, который можно наблюдать

после электрофореза до рестрикции. У гетерозигот выявятся все три полосы, одна из которых соответствует неразрезанному амплифицированному фрагменту, а две – продуктам рестрикции. В настоящее время идентифицировано более 500 различных рестриктаз, и для каждого из этих ферментов существует свой сайт узнавания. Поэтому, как только описывается какая-то новая мутация, сразу же с помощью определенной компьютерной технологии производится анализ окружающей ее нуклеотидной последовательности на предмет выявления сайтов рестрикции. Если этот поиск оказывается успешным, клиническая диагностика подобной мутации проводится методом рестрикционного анализа с использованием специфичной для данного сайта эндонуклеазы. Поскольку метод рестрикционного анализа очень прост и удобен в исполнении, существует много модификаций этого метода, направленных на искусственное введение сайтов рестрикции и т.п. Однако на них мы останавливаться не будем. На рис. 35 представлены результаты диагностики мутации R408W в гене фенилкетонурии методом рестрикционного анализа.

Рисунок 35. Диагностика мутации R408W в гене фенилкетонурии (PAH) методом рестрикционного анализа

Универсальным методом диагностики точковых мутаций является метод *аллель-специфических олигонуклеотидов (АСО)*. Этот метод основан на гибридизации амплифицированных ДНК со специфическими *олигонуклеотидными* ДНК-зондами. Он более трудоемок, так как требует синтеза и специфического мечения ДНК-зондов. Однако этот метод поддается автоматизации, и на его базе разрабатываются технологии, позволяющие одновременно тестировать десятки или даже сотни мутаций. При этом используются микрочиповые технологии, то есть меченные олигонуклеотиды в микроколичестве наносятся на твердые носители (чипы), а затем проводится их гибридизация с исследуемыми образцами ДНК.

Сходная технология – *«микроэrray»* – используется для анализа *экспрессионного профиля генов*, то есть множества генов, избирательно экспрессирующихся в специфических тканях или клетках, у пациентов с определенными патологическими состояниями, различающихся по возрасту, этнической принадлежности и другим параметрам. Техника *«микроэrray»* позволяет одновременно анализировать экспрессию десятков тысяч генов.

Секвенирование ДНК является самым объективным методом регистрации мутаций, при котором точно идентифицируется молекулярный характер повреждения. Однако в клинической практике этот метод используются редко в виду его трудоемкости и высокой стоимости.

Глава 2.3. Хромосомные болезни

Аутосомные синдромы разделяют на три группы: полные трисомии, частичные анеуплоидии и микроцитогенетические аномалии. Достаточно широко распространены числовые аномалии половых хромосом, включая полиплоидии и моносомии. Аутосомные полиплоидии и моносомии всегда летальны, и они обнаруживаются только в материале абортусов.

2.3.1. Трисомии

Трисомии среди живорожденных описаны лишь для 8, 9, 13, 18, 21 и 22 хромосом, по остальным хромосомам они летальны. Из них наиболее частым и клинически значимым является синдром Дауна. С меньшими частотами встречаются синдромы Эдвардса (трисомия 18) и Патау (трисомия 13), причем продолжительность жизни таких больных, обычно, не превышает года. Остальные аутосомные трисомии являются еще более редкими, и их носители погибают в раннем неонатальном возрасте.

Наиболее частой причиной трисомии является нерасхождение хромосом в гаметогенезе родителей. Нерасхождение хромосом в мейозе резко возрастает с возрастом матери, при этом возраст отца практически не имеет значения. Это связано с особенностями мейоза у женщин. Женские половые клетки – предшественники яйцеклетки (ооциты) – образуются на третьем

месяце эмбриогенеза, когда происходит первое деление мейоза. Затем мейоз блокируется и завершается только после оплодотворения. С возрастом происходит угасание овуляторной репродуктивной функции, способствующее перезреванию фолликул. Одним из следствий этого перезревания является нарушение равномерного распределения хромосом во время деления. У мужчин обе фазы сперматогенеза происходят каждые 70-72 дня.

2.3.1.1. Синдром Дауна

К наиболее известным числовым аномалиям хромосом относится *синдром Дауна*, одна из форм умственной отсталости, обусловленная присутствием дополнительной 21 хромосомы – трисомия по 21 хромосоме. Впервые это заболевание в 1866 году описал врач психиатрической больницы в г. Эрлсвиде (Англия, графство Сурей) Джон Даун. Частота патологии в среднем равна 1:700 новорожденных, в популяции – 1: 4000. Среди больных олигофренией синдром Дауна является самой распространенной формой и составляет около 10%.

Критическим сегментом для клинических проявлений синдрома Дауна является дистальный отдел длинного плеча хромосомы 21 – 21q22, в котором локализован ген ключевого фермента антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы. При трисомии происходит гиперэкспрессия этого фермента с последующим нарушением регуляции активных форм кислорода. Гиперпродукция свободных радикалов приводит к нейродегенеративным процессам в ЦНС, преждевременному старению и другим клиническим проявлениям синдрома Дауна.

Диагноз синдрома Дауна должен быть предположен неонатологом сразу после рождения больного ребенка, а затем это предположение должно быть подтверждено анализом кариотипа. Больные синдромом Дауна отличаются своеобразными фенотипическими особенностями, прежде всего лицевыми аномалиями, хорошо известными любому медицинскому работнику: косой, идущий снаружи и сверху внутрь и вниз разрез глаз,

нередко эпикант (вертикальная кожная складка, прикрывающая медиальный угол глазной щели), короткий нос с широкой переносицей, маленькие деформированные уши, часто полуоткрытый рот с высунутым языком и с выступающей нижней челюстью, сухие в трещинах губы, проблемы с сосанием из-за гиперглоссии, «карпьевого рта», общей гипотонии и адинамии. Фигура больного расслаблена, походка и движения неловкие, голос грубый, речь односложная, косноязычная. Кроме того, в 60% случаев у больных наблюдается одна большая поперечная борозда на ладони, нередко на двух. Отметим, что в 3% случаев такая борозда присутствует и у здоровых людей, причем иногда она наследуется по аутосомно-доминантному типу. Поэтому только на основании этого признака нельзя предполагать синдром Дауна у новорожденного, тем более сообщать о своем предположении матери без получения данных кариотипа. К сожалению, мы встречали подобные казусы в практике начинающих неопытных врачей, что кончалось прекращением лактации у матери. Нередко у больных синдромом Дауна наблюдаются врожденные пороки сердца, желчно-выделительной системы, лейкоз. У всех больных наблюдается врожденное слабоумие. В младенческом возрасте больные синдромом Дауна апатичны и аномально спокойны, никогда не плачут, у них резко понижен мышечный тонус. Известный специалист по хромосомным болезням И.И. Штильбанс (1965) писал: «Дети с синдромом Дауна ласковы, послушны, но временами упрямы, они пугливы и любят подражать окружающим, благодаря чему их можно приучить помогать окружающим по хозяйству, одеваться, однако к систематическому труду они не способны. Несложные житейские навыки обычно усваиваются многими из них». Однако повторим еще раз, что даже при наличии самых ярких проявлений болезни для окончательного диагноза необходимо исследование кариотипа больного. В 96% случаев кариотип у мальчика с синдромом Дауна составляет 47, XY (+21) и у девочки – 47, XX (+21).

В 3-4% наблюдений регистрируется *транслокационный* вариант синдрома Дауна. При этом у одного из родителей при наличии полного набора из 46 хромосом имеется транслокация между сегментами 21 хромосомы и одной из других хромосом. Чаще всего наблюдается транслокация 3-го сегмента хромосомы 21 на 13-ю или 15-ю хромосомы – транслокационные варианты 21/13 или 21/15. Обмен сегментами может произойти на самой 21-й хромосоме – транслокационный вариант 21/21. При транслокации 21/21, независимо от того имеется она у матери или отца, риск рождения больного ребенка равен 100%, при других транслокациях у женщины или у мужчины этот риск значительно меньше и составляет 10% и 2-3% соответственно. В случае беременности наличие подобных транслокаций в семье является строгим показанием для проведения инвазивной пренатальной диагностики синдрома Дауна у плода. Такая диагностика в плановом порядке проводится в первом триместре беременности, обычно на сроке 9-10 недель.

Третий вариант синдрома Дауна – *мозаичный*, когда добавочная 21 хромосома присутствует лишь в части клеток больного. Частота этого варианта – 1-2% . «Мозаики» имеют более стертые проявления синдрома, часто их интеллект сохранен, но внешние проявления заболевания остаются. Для диагностики мозаицизма бывает необходимо кариотипирование не только клеток крови, но и других тканей больного (культивируемых фибробластов, биоптатов различных органов).

2.3.1.2. Синдром Патау

Трисомия по 13 хромосоме или *синдром Патау* был описан в 1960 году у детей с множественными врожденными пороками развития. Частота заболевания – 1:5000 – 1:7000 новорожденных. Клинические проявления синдрома достаточно специфичны и позволяют ставить диагноз уже в периоде новорожденности. К ним относятся черепнолицевые аномалии - микроцефалия, тригоноцефалия, расщелина губы и неба, микрофтальмия, узкие глазные щели, западающая переносица и др., часто сопровождающиеся

выраженными дефектами развития мозга и сочетающиеся с поли- и синдактилией кистей и/или стоп. Больные имеют дерматоглифические особенности в виде петель и дуг в пальцевых узорах, дистального ладонного трирадиуса. Часто у больных выявляются пороки развития других органов – сердца, почек, гениталий, кишечника. Наблюдаются глухота, гипотония мышц, судороги, задержка психического развития. Все это приводит к раннему летальному исходу, и продолжительность жизни таких детей редко превышает 1 год.

2.3.1.3. Синдром Эдвардса

Еще одним примером числовой aberrации хромосом является трисомия 18 или синдром Эдвардса, описанная английским педиатром и генетиком Эдвардсом в 1960 году. Частота заболевания среди новорожденных, в среднем, составляет 1:7000. Для этой болезни характерны следующие симптомы: резкое отставание психического развития, микроцефалия, череп долихоцефалической формы со ступенеобразным западением лобных костей в области родничка, ушные раковины расположены низко, нижняя челюсть уменьшена в размерах (микрогения), наружное отверстие рта маленькое (микростомия), расщелина верхней губы и неба, глазные щели узкие и короткие, спинномозговая грыжа, крипторхизм и гипоспадия у мальчиков и гипертрофия клитора у девочек, врожденный порок сердца. Продолжительность жизни не более года. При мозаичных формах описаны больные в возрасте 19 лет и старше.

В пренатальном периоде болезнь может быть выявлена при проведении биохимического скрининга беременных по резкому снижению в сыворотке крови уровня хорионического гонадотропина, что является косвенным признаком наличия синдрома Эдвардса у плода. В этом случае беременная женщина должна быть направлена на ультразвуковое сканирование 2-го уровня, так как при синдроме Эдвардса почти в 100% наблюдений выявляются УЗИ-маркеры хромосомных болезней. Для подтверждения диагноза и дальнейшего медико-генетического прогнозирования состояния

будущего потомства родителей показано пренатальное кариотипирование плода.

2.3.2. Аномалии половых хромосом

Довольно часто числовые аномалии затрагивают половые хромосомы. Так присутствие дополнительной X-хромосомы у мужчин приводит к синдрому Клайнфельтера, а отсутствие одной из X-хромосом у женщин – к синдрому Шерешевского-Тернера. Оба эти заболевания характеризуются бесплодием и различными отклонениями от нормального развития.

2.3.2.1. Синдром Клейнфельтера

Синдром Клейнфельтера описан американским врачом Н.Ф. Klinefelter в 1942 году. Характерными симптомами при этом заболевании являются бесплодие, атрофия яичек, выявляемые при исследовании спермограммы олигоспермия (маленький объем эякулята) и азооспермия (отсутствие сперматозоидов в сперме), гинекомастия и нередко умственная отсталость. Клиническая симптоматика болезни наиболее выражена в препубертатном и пубертатном возрасте. Чаще такие больные выявляются медицинской комиссией в военкомате при осмотре допризывников. Юноши с синдромом Клейнфельтера отличаются от сверстников высоким ростом и несоответствием роста и размера размаха рук, который иногда превышает рост не менее чем на 10 см, евнухоидным телосложением (длинные ноги, высокая талия, относительно широкий таз) со склонностью к ожирению. Половой член нормальных размеров, яички опущены в мошонку, но мягкие на ощупь и очень маленькие. Диаметр яичек редко превышает 1,5 см, в то время как у здорового юноши эта величина равна 5 см. Частота синдрома среди новорожденных мальчиков составляет 1:850, в популяции равна 1:18000 здоровых мужчин, среди мальчиков, у которых наблюдается отставание психического развития, – 1:100 и с такой же частотой среди мужчин, страдающих бесплодием.

При лечении больных синдромом Клейнфельтера применяются мужские половые гормоны (тестостерон пропионат и его аналоги). При гинекомастии

– хирургическое вмешательство. По показаниям могут быть рекомендованы психостимуляторы и нейрометаболические препараты, как это общепринято при других формах олигофрении. При создании семьи показано применение вспомогательных репродуктивных технологий с использованием донорской спермы.

В 1958 году в работе П. Е. Полани с соавторами впервые при цитогенетическом исследовании больных синдромом Клайнфелтера были выявлены две X-хромосомы наряду с Y-хромосомой. В дальнейшем оказалось, что самым распространенным вариантом кариотипа при синдроме Клайнфелтера является 47, XXY, но встречаются больные, у которых число X-хромосом доходит до 4-х и более. Таким образом, указанные выше симптомы являются основанием для исследования кариотипа пациента.

Интересно отметить, что полисомия по X-хромосоме у женщин (трисомия – 47,XXX, тетраомия – 47,XXXX и пентосомия – 47,XXXXX) чаще всего не приводит к каким-либо патологическим процессам, так как добавочные хромосомы инактивируются, и при кариотипировании таких женщин выглядят как дополнительные тельца Барра. У большинства носителей подобных аномалий сохраняется нормальный фенотип. Однако в некоторых случаях полной инактивации добавочных X-хромосом не происходит. Это может приводить к нарушениям менструального цикла, невынашиванию беременности, ранней менопаузе. У некоторых женщин отклонения выражаются в снижении интеллекта, агрессивном поведении, иногда бесплодии, наличии признаков дизморфогенеза. Частота встречаемости трипло-Х (47,XXX) и квадри-Х (48,XXXX) составляет 1:800.

2.3.2.2. Полисомии по Y-хромосоме у мужчин

Появление добавочной Y-хромосомы в кариотипе мужчин (47,XY₂), как правило, не приводит к каким-либо половым аномалиям. Такие мужчины плодовиты, и вероятность рождения у них ребенка с хромосомными нарушениями не превышает нормы. Однако такие мужчины имеют высокий рост, прогнатию нижней челюсти, повышенную агрессивность и склонны к

асоциальному поведению. Впервые синдром был описан при обследовании заключенных в тюрьмах США. Предполагается, что такие больные могут иметь криминогенные наклонности.

2.3.2.3. Болезнь Шерешевского-Тернера

Болезнь Шерешевского-Тернера или моносомия по X-хромосоме наблюдается только у женщин. Первым описал это заболевание наш соотечественник Н. А. Шерешевский в 1925 году, затем в 1938 году американский эндокринолог Х. Тернер. Наличие моносомии-X можно предположить у новорожденных девочек с массой тела не более 2500 г., с крыловидными складками кожи на шее сзади и лимфатическим отеком кистей и стоп. Подобные клинические проявления наблюдается у половины новорожденных с синдромом Шерешевского-Тернера. Происхождение лимфатического отека объясняется сердечно-сосудистой недостаточностью, развивающейся вследствие врожденного порока сердца, нередко наблюдаемого у этих больных. Примерно у четверти больных диагностируются пороки развития внутренних органов, чаще всего сердца и почек.

До 9-10 лет больные девочки развиваются без особенностей. Затем у них отмечается отставание в росте и легкая степень задержки психического развития. Малыми признаками дизэмбриогенеза при этом заболевании является эпикант, реже птоз (опущение верхнего века), косоглазие, помутнение хрусталика и/или роговицы глаз. Ведущим симптомом болезни Шерешевского-Тернера является половой инфантилизм, связанный с дисгенезией гонад, что в полной мере раскрывается в пубертатном периоде и старше. Гениталии имеют женское строение со значительной степенью недоразвития. Половой инфантилизм, первичная аменорея и бесплодие являются следствием изменений в гонадах, которые вызваны отсутствием одной X-хромосомы. У больных не происходит нормального образования примордиальных фолликул. Герминальные и фолликулярные клетки дегенерируют и почти не вырабатывают эстрогены. Следствием этого

является первичная аменорея, недоразвитость молочных желез, скудное оволосение на лобке и в подмышечных впадинах. У больных наблюдается гормонозависимое снижение роста. В возрасте 16-23 лет рост больных равен в среднем 135 см (у здоровых сверстниц 158 см). Маленький рост девушки в сочетании с первичной аменореей является обязательным показанием к ее кариотипированию, при котором наблюдается отсутствие одной X-хромосомы – 45,XO. Частота заболевания равна 1:2000 – 1:5000 новорожденных, а при росте взрослых женщин 130 – 145 см эта частота возрастает до 1:14.

Течение заболевания в значительной степени зависит от того, какая именно X-хромосома утрачена – материнская или отцовская. При потере материнской X-хромосомы может происходить прекращение развития зародыша и его спонтанная элиминация уже на стадии эмбриогенеза. Если этого не происходит, у плода развиваются тяжелые нарушения сердечно-сосудистой системы. В случае потери отцовской X-хромосомы врожденные пороки, как правило, отсутствуют и умственное развитие больных девочек более сохранное, чем в первом случае. Отметим, что специальные исследования позволяют определить принадлежность X-хромосомы. Это важно при медико-генетическом прогнозе состояния будущего ребенка и решении родителей в отношении пролонгирования беременности с плодом, у которого при пренатальном кариотипировании выявлена болезнь Шерешевского-Тернера.

У части девушек, которым клинически поставлен диагноз этой хромосомной болезни, может наблюдаться мозаичный вариант заболевания. В этом случае у больных наряду с клетками, имеющими нормальный кариотип, наблюдаются клетки с патологическим кариотипом, то есть без одной X-хромосомы. Кариотип в этих случаях выглядит так: 46,XX/45,XO. Причем, указывается соотношение между числом клеток с нормальным и патологическим кариотипом. Соотношение клеток с нормальным и патологическим кариотипом коррелирует с состоянием пациентки. У

некоторых женщин с мозаичным вариантом болезни Шерешевского-Тернера наблюдается нормальное развитие вторичных половых признаков, включая гениталии. Более того, такие женщины способны в отдельных случаях беременеть традиционным способом. Некоторым из них применяются методы экстракорпорального оплодотворения. Конечно, таким беременным нужно проводить пренатальное кариотипирование.

2.3.3. Структурные аномалии хромосом

К структурным нарушениям хромосом относятся различные варианты делеций, инсерций, дупликаций, инверсий и транслокаций, то есть утраты сегментов хромосом, вставки, дублирования, переворота на 180° или слияния с другими хромосомами. Размеры этих аномалий могут варьировать в значительных пределах от целых хромосом, и в этом случае они приводят к числовым aberrациям, до микроскопических сегментов, диагностика которых может осуществляться только с использованием методов молекулярной цитогенетики. Внутригенные перестройки рассматриваются как мутации генов, и часто они являются причиной развития моногенных заболеваний. Разнообразие болезней, обусловленных структурными нарушениями хромосом, очень велико. Их клинические проявления зависят от специфики и размера участвующего в перестройке хромосомного сегмента. Однако для всех этих заболеваний характерен тяжелый синдромальный характер поражения. Как правило, это неизлечимые болезни, единственным методом профилактики которых является пренатальная диагностика.

В настоящее время описано более 100 нозологически оформленных частичных анеуплоидий. В качестве примера рассмотрим *синдром «кошачьего крика»*, обусловленный делециями короткого плеча хромосомы 5. Частота заболевания 1:50 тысяч новорожденных. Характерными признаками заболевания являются черепно-лицевые аномалии, микроцефалия, лунообразная форма лица, деформированные низко расположенные ушные раковины, гипертелоризм, антимонголоидный разрез

глаз, эпикант, микрогнатия. Одним из диагностических признаков является плач новорожденного, напоминающий кошачье мяуканье, связанный с недоразвитием гортани. В дальнейшем развивается глубокая умственная отсталость, имбецильность или идиотия. Витальный прогноз относительно благоприятный.

Глава 2.4. Моногенные признаки человека

Напомним, что анализ наследования различных признаков человека чаще всего осуществляется с использованием клинико-генеалогического метода. Первое описание аутосомно-доминантного наследования у человека было представлено в 1905 году Фараби. Оно было выполнено на основе анализа обширной родословной семьи, в которой на протяжении 7 поколений наблюдали больных брахидактилией – короткопалостью, обусловленной частичной редукцией фаланг пальцев кистей и стоп. В дальнейшем было показано, что по доминантному типу наследуется темный цвет глаз, вьющиеся волосы, ямочка на подбородке, близорукость, раннее облысение у мужчин, праворукость, способность свертывать язык в трубочку, белый локон надо лбом и многие другие признаки. По аутосомно-рецессивному признаку наследуются такие признаки, как мягкие прямые волосы, курносый нос, светлые глаза, тонкая кожа, раннее облысение у женщин, леворукость.

2.4.1. Наследование групп крови (системы АВ0, MN, Rh)

Рассмотрим более подробно типы наследования и характер межallelных взаимодействий на примере групп крови. Всего описано 15 антигенных систем эритроцитов, каждая из которых включает от двух до нескольких десятков антигенов, контролируемых генов с множественными аллелями. Мы опишем только наиболее известные из них - АВ0, MN и Rh.

Система АВ0. Впервые антигенные различия эритроцитов человека были выявлены в 1900 г. К. Ландштейнером. Группы крови системы АВ0 («а», «б», «ноль») контролируются одним аутосомным геном I (от слова изогемагглютиноген) или АВ0, расположенным в длинном плече хромосомы

9. В этом гене идентифицировано 3 аллеля I^A , I^B и I^O . Аллели I^A и I^B кодоминантны по отношению друг к другу, и оба они доминантны по отношению к аллелю I^O . Таким образом, при сочетании различных аллелей могут образовываться 4 группы крови: 0 или I при генотипе $I^O I^O$, A или II при генотипах $I^A I^A$ и $I^A I^O$, B или III при генотипах $I^B I^B$ и $I^B I^O$ и AB или IV при генотипе $I^A I^B$ в соотношении 1:3:3:2 – табл. 5.

Таблица 5.

Решетка Пеннета для групп крови системы АВ0

| Аллели | I^A | I^B | I^O |
|--------|--------------------|--------------------|--------------------|
| I^A | $I^A I^A$ – A(II) | $I^A I^B$ – AB(IV) | $I^A I^O$ – A(II) |
| I^B | $I^A I^B$ – AB(IV) | $I^B I^B$ – B(III) | $I^B I^O$ – B(III) |
| I^O | $I^A I^O$ – A(II) | $I^B I^O$ – B(III) | $I^O I^O$ – 0(I) |

Группы крови определяют иммунологические свойства антигена агглютиногена, локализованного на поверхности эритроцитов, и взаимодействующего с ними антитела агглютинина, растворенного в сыворотке крови. Эти взаимодействия представлены в таблице 6.

Таблица 6.

Взаимодействия между генотипами и фенотипами по системе групп крови АВ0

| Группа крови | Генотип | Антигены эритроцитов | Антитела сыворотки |
|--------------|-----------------------|----------------------|---------------------------------|
| 0(I) | $I^O I^O$ | 0 | $\alpha\beta$ – анти-A и анти-B |
| A(II) | $I^A I^A$ и $I^A I^O$ | A | β – анти-B |
| B(III) | $I^B I^B$ и $I^B I^O$ | B | α – анти-A |
| AB(IV) | $I^A I^B$ | AB | 0 |

При самой редкой группе крови 0(I), которая в популяции встречается с частотой 11% (1:9), в сыворотке крови вырабатываются антитела против антигенов A и B. Если человеку с группой крови 0(I) добавить кровь любой

другой группы произойдет агглютинация (слипание) эритроцитов и разовьется гемолитический шок. В тоже время кровь группы 0(I) не содержит эритроцитарных антигенов, и ее можно переливать любым реципиентам вне зависимости от их группы крови. Поэтому люди с группой крови 0(I) являются «универсальными донорами». При группах крови А(II) и В(III), каждая из которых встречается примерно у трети населения, в сыворотке крови присутствуют антитела соответственно либо против антигена В, либо против антигена А. Поэтому людям с этими группами крови можно переливать либо кровь той же самой группы, либо кровь группы 0(I). При четвертой группе крови АВ(IV) антитела против эритроцитарных антигенов в сыворотке крови не вырабатываются. Этим людям можно переливать кровь любой группы, таким образом, они являются «универсальными реципиентами». Однако их кровь можно переливать людям только с той же самой четвертой группой крови АВ(IV). Поскольку знание групповой принадлежности крови человека по системе АВ0 необходимое условие для безопасного переливания крови, мы еще раз в табличной форме представим описанные выше закономерности –табл. 7.

Таблица 7.

Совместимость (+) групп крови по системе АВ0

| Группа крови реципиента | Группа крови донора | | | |
|-------------------------|---------------------|-------|--------|--------|
| | 0(I) | А(II) | В(III) | АВ(IV) |
| 0(I) | + | – | – | – |
| А(II) | + | + | – | – |
| В(III) | + | – | + | – |
| АВ(IV) | + | + | + | + |

Группы крови системы MN. Первый случай кодоминантного взаимодействия аллелей у человека был описан для групп крови системы MN. В этой системе существует три группы М, N и MN. В ходе обширного исследования было показано, что у родителей с одинаковой группой крови М

или N рождаются дети, с таким же фенотипом, как и у родителей. Это значит, что обладатели группы крови М или N могут быть только гомозиготами MM или NN соответственно. Дети с группой MN появляются тогда, когда один из родителей имеет группу крови М, а другой N. В этом случае оба аллеля функционируют вместе, и это проявляется в формировании особого фенотипа MN.

Группы крови системы Rh. Другая система групповых антигенов, названная системой резус-фактора (Rh), находится под более сложным генетическим контролем. Эта система включает три пары антигенов (*D*, *C/c*, *E/e*), кодируемые двумя тесно сцепленными высоко гомологичными генами, локализованными в коротком плече хромосомы 1 – *RHD* и *RHCE*. По-видимому, эти два гена произошли в процессе эволюции в результате дупликации от общего предкового гена. Основная роль в Rh-системе принадлежит антигену *D*, продукту гена *RHD*. При его наличии на поверхности эритроцитов кровь является резус-положительной. Антигены *C/c* и *E/e* кодируются геном *RHCE*, и они образуются в результате альтернативного сплайсинга. Резус-отрицательный фенотип формируется при отсутствии антигена *D*, возникающем при делеции гена *RHD*. От 0,2% до 1% людей имеют особый «слабый» вариант антигена *D*, обозначаемый *D^u*. Причиной появления этого фенотипа являются мутации в гене *RHD*. Носители *D^u*-фенотипа также являются резус-отрицательными и им можно переливать только резус-отрицательную кровь. На самом деле генетический контроль групп крови АВ0 и Rh более сложный, так как существует большое число генов, оказывающих модифицирующее влияние на эти системы. Достаточно сказать, что в настоящее время идентифицировано более 46 Rh-антигенов. Однако, независимо от подробностей взаимоотношений между этими антигенами, основное правило сохраняется неизменным: резус-отрицательная принадлежность крови определяется отсутствием или недостаточностью антигена *D*.

Знание групповой принадлежности по Rh-системе имеет огромное значение для предотвращения резус-конфликта между матерью и плодом, который может возникнуть во время беременности. Частота людей с резус-положительной принадлежностью – Rh(+), составляет 85%, остальные 15% являются резус-отрицательными – Rh(-). Если у резус-отрицательной женщины муж имеет резус-положительную принадлежность, то с высокой вероятностью ребенок окажется резус-положительный, и тогда может возникнуть резус-конфликт между плодом и матерью. В 15% подобных случаев после 7 недели, когда в крови плода появляются зрелые эритроциты, в крови беременных с Rh(-) могут начать вырабатываться специфические противорезусные антитела. Через плаценту они попадают в кровь плода и в отдельных случаях могут там накапливаться в большом количестве, вызывая агглютинацию эритроцитов и их разрушение. Как правило, первая беременность заканчивается благополучно, мертворождения и выкидыши встречаются редко. Особенно велика вероятность возникновения резус-конфликта при повторных беременностях Rh(-)-женщины. Во время родов около 1 мл крови плода может попадать в кровоток матери, и после первых родов резус-отрицательная мать будет sensibilizirovanna к резус-положительным антигенам ребенка. Подобная sensibilizatsiya может происходить и при абортax, хотя и с меньшей вероятностью. При последующих беременностях резус-несовместимым плодом титр анти-Rh-антител в крови женщины может резко возрасти. Следствием этого процесса может быть разрушение красных кровяных телец плода и формирование у него гемолитической болезни, проявляющейся анемией, желтухой, отеками и обуславливающей сложные интеллектуальные дефекты, нарушения слуха и речи, двигательные расстройства. Нередко у новорожденных с гемолитической болезнью, вызванной резус-конфликтом, развивается тяжелый детский церебральный паралич с эпилептической болезнью и значительным отставанием психического развития.

Степень поражения центральной нервной системы и других органов зависит от уровня непрямого билирубина, поступающего в кровь из разрушенных эритроцитов, и длительности гипербилирубинемии. Этот процесс приводит к токсико-аноксическому поражению мозга – билирубиновой энцефалопатии. Наиболее эффективным средством лечения гемолитической болезни новорожденных является обменное переливание крови в первые сутки жизни (а иногда и внутриутробно), способствующее удалению продуктов гемолиза и антител матери из крови больного ребенка.

Для профилактики резус-конфликта и гемолитической болезни у плода женщине с отрицательной резус-принадлежностью при любом внутриматочном вмешательстве во время первой беременности (медицинский аборт, самопроизвольный выкидыш с последующим выскабливанием, роды) показано введение анти-Д-иммуноглобулина. Этот препарат снижает резус-сенсibilизацию беременной, то есть её чувствительность к резус-фактору и соответственно формированию резусных антител. Введение анти-Д-иммуноглобулина при повторных беременностях не показано, так как женщина уже сенсibilизирована, то есть чувствительна к резус-фактору, и имеет резусные антитела. Женщина с Rh(-) непременно должна обсудить с врачом-генетиком проблемы профилактики рождения ребенка с последствиями билирубиновой энцефалопатии в виде тяжелого детского церебрального паралича.

В редких случаях конфликт возникает и по АВ0 системе, но протекает он в значительно более легкой форме, чем при резус-конflikте. Поэтому будущие родители должны знать свою группу крови не только по Rh, но и по АВ0 системе.

Глава 2.5. Аутосомно-доминантные заболевания

При аутосомно-доминантном наследовании гетерозиготное носительство мутации оказывается достаточным для проявления заболевания. При этом мальчики и девочки болеют с одинаковой частотой. В

количественном отношении доминантных заболеваний больше, чем рецессивных. В отличие от рецессивных доминантные мутации не приводят к полной инактивации функции кодируемого белка. Их эффект обусловлен либо снижением его количества (так называемая *гаплонедостаточность*), либо появлением у мутантного белка нового агрессивного свойства. Вероятность рождения больных детей в браке гетерозиготного носителя доминантной мутации со здоровым супругом составляет 50%. Поэтому аутосомно-доминантные заболевания могут носить семейный характер и передаваться из поколения в поколение, причем среди родственников только со стороны одного из родителей больного. Такой тип передачи заболевания иногда называют наследование «по вертикали». Больные и его родители непременно должны быть проконсультированы врачом-генетиком для уточнения диагноза, выявления членов семьи с риском рождения подобного больного и выработки тактики обследования консультируемых при планировании семьи. Если оба родителя ребенка с доминантным заболеванием оказываются здоровыми, можно предположить, что болезнь развилась вследствие возникновения новой мутации в половых клетках одного из супругов. Отмечено, что около 90% синдромов с аутосомно-доминантным типом наследования являются следствием мутаций *de novo* в половых клетках отцов. В этом случае риск повторного рождения больного ребенка такой же, как в любых других семьях. Исключением из этого правила являются доминантные заболевания с неполным проявлением или неполной пенетрантностью, когда на развитие заболевания дополнительно оказывают влияния какие-то внешние факторы или чаще состояния каких-то других генов. В этих случаях носители доминантной мутации могут быть здоровы, а их дети больны или наоборот. Пенетрантность выше 60% является высокой степенью повторяемости заболевания в поколениях. Доминантный ген может обладать разной экспрессивностью, то есть внутри одной семьи картина заболевания может варьировать по степени тяжести и клиническим проявлениям. Напомним, что термины пенетрантность и

экспрессивность в генетическую практику были введены известным отечественным генетиком Н. В.Тимофеевым-Ресовским. Об этом крупном ученом генетике и интереснейшем человеке петербургский писатель Даниил Гранин написал повесть «Зубр».

Доминантные мутации в гомозиготном состоянии у больных встречаются редко, и, как правило, они ассоциированы с более тяжелой клиникой. Так, при гетерозиготном носительстве доминантной мутации в гене рецептора липопротеинов низкой плотности у больных семейной гиперхолестеринемией ишемическая болезнь сердца и инфаркт миокарда развиваются в возрасте 30-40 лет, тогда как при гомозиготном носительстве – в первой декаде жизни. Другим примером являются доминантные мутации в гене спектрина В, которые в гетерозиготном состоянии проявляются в виде относительно доброкачественного эллиптоцитоза, тогда как в гомозиготном состоянии идентифицированы у больных с тяжелой неонатальной формой гемолитической анемии. При доминантном типе наследования не происходит накопления мутаций в популяции, так как больные часто не оставляют потомства в силу тяжести своего состояния. Многие доминантные заболевания проявляются в достаточно позднем возрасте.

В конце прошлого века было показано, что самыми распространёнными аутосомно-доминантными заболеваниями являются *наследственные опухолевые синдромы*, о которых более подробно мы будем говорить в дальнейшем. Отметим только, что их суммарная частота в различных популяциях достигает 1%, причем чаще всего обуславливающие их мутации передаются из поколения в поколение, а не возникают de novo.

2.5.1. Наследственные дисплазии соединительной ткани

Наследственные дисплазии соединительной ткани – это гетерогенная группа моногенных болезней, обусловленных присутствием мутаций в генах белков внеклеточного матрикса или ферментов их биосинтеза, а также в генах, участвующих в регуляции морфогенеза соединительной ткани.

Многие из этих заболеваний наследуются по аутосомно-доминантному типу. Для большинства из них характерен выраженный плейотропизм, то есть вовлечение в патологический процесс нескольких систем, тканей или органов.

Ведущая роль в поддержании структурной целостности различных соединительных тканей человека принадлежит коллагенам, мажорному семейству близкородственных внеклеточных матриксных белков. Коллагены составляют более 30% общей массы белков тела млекопитающих, причём около 40% находится в коже, примерно 50% - в тканях скелета и 10% - в строме внутренних органов. Открытие около 40 коллагеновых генов и расшифровка их молекулярной природы создали предпосылки для изучения молекулярных основ этиологии и патогенеза наследственных коллагенопатий – гетерогенной группы из более чем 70 моногенных заболеваний, обусловленных генетическими нарушениями структуры коллагенов. Наиболее известным генетическим вариантом наследственной дисплазии соединительной ткани является синдром Марфана. Долгое время предполагали, что это заболевание обусловлено мутациями в одном из коллагеновых генов. Однако оказалось, что при синдроме Марфана первичным биохимическим дефектом является нарушение структуры фибриллина 1 – белка микрофибриллярных волокон внеклеточного матрикса, выполняющего в большинстве соединительных тканей архитектурные функции. Главными регуляторами морфогенеза многих тканей являются трансформирующие (Tgf β) и фибробластные (Fgf) факторы роста, их антогонисты и рецепторы, а также транскрипционные факторы. Мутации в генах, кодирующих эти группы белков и специфически экспрессирующихся в соединительной ткани, также приводят к различным вариантам наследственной дисплазии соединительной ткани. Остановимся более подробно на перечисленных выше группах болезней.

2.5.1.1. Наследственные коллагенопатии

В настоящее время известно 27 различных типов коллагеновых белков. Каждый из них состоит из трех равномерно скрученных полипептидных альфа-цепей, образующих структуру, подобную трехгранному шнуру. Разные типы коллагенов могут быть образованы либо тремя одинаковыми альфа-цепями, либо двумя или тремя различными полипептидами в соотношении 2:1 или 1:1:1 соответственно. Каждая альфа-цепь кодируется собственным геном, так что разнообразие коллагеновых генов больше, чем разнообразие соответствующих белков. Биосинтез зрелых коллагенов сопровождается необычно большим числом посттрансляционных модификаций, так что на одной молекуле проколлагеновой полипептидной цепи осуществляется более 120 реакций. В этих превращениях принимают участие более 14 различных ферментов. Все зрелые коллагеновые белки способны к образованию крупных супрамолекулярных агрегатов. На рис. 36. показаны основные этапы биосинтеза коллагена.

Рисунок 36. Этапы биосинтеза коллагена

Любая альфа-цепь содержит коллагеновый домен, на всем протяжении которого за исключением короткого С-терминального участка каждая третья аминокислота является глицином. Таким образом, молекулярная формула коллагенового домена может быть записана как $(\text{Gly-X-Y})_n$, где X и Y - аминокислоты не-Gly типа. Различные коллагеновые альфа цепи различаются по количеству и протяженности (Gly-X-Y) -мотивов в коллагеновом домене и по конкретному содержанию аминокислот в X и Y положениях. Присутствие глицина, самой маленькой из аминокислот, в каждом третьем положении коллагеновых полипептидных цепей существенно для их правильного скручивания в тройную спираль, так как глицин при этом занимает ограниченное пространство в центре триплекса. Поэтому любые мутации, приводящие к замене глицина на другую аминокислоту, будут сопровождаться локальными нарушениями структуры

тройной спирали и дезорганизацией более крупных агрегатов коллагена. К тяжелым последствиям также приводят мутации, нарушающие структуру С-концевого участка альфа-цепи, так как образование триплекса по типу «застежки-молнии» начинается именно с этого участка молекулы. Кроме того, именно в этой области локализованы сайты взаимодействия коллагена более чем с 50 другими белками. Патологический процесс оказывается менее тяжелым, если в результате мутации альфа-цепь полностью утрачивает способность участвовать в формировании зрелых коллагеновых молекул. Это мутации, сопровождающиеся преждевременной терминацией трансляции или затрагивающие N-концевые районы альфа-цепи коллагена. При этом в образовании триплексной структуры принимают участие только нормальные полипептиды, мутантные альфа-цепи в нее не входят и вскоре после синтеза подвергаются внутриклеточному протеолизу. В результате снижается скорость синтеза зрелых коллагеновых молекул, но их структура сохраняется нормальной, и они не утрачивают способность к образованию упорядоченных супрамолекулярных агрегатов. Однако это происходит с более низкой скоростью, что и может привести к количественным нарушениям на уровне коллагеновых структур. Доминантный характер заболеваний, обусловленных нарушением структуры коллагеновых молекул, объясняется тем, что присутствие, наряду с мутантными, нормальных альфа-цепей не предотвращает образования дефектов в фибриллах или других надмолекулярных комплексах коллагена. В этой связи можно подчеркнуть, что заболевания, вызванные нарушением биосинтеза коллагеновых молекул и связанные с присутствием мутаций в генах соответствующих ферментов, наследуются по рецессивному типу.

Коллагены I, II и III типов являются мажорными и составляют более 90% всех коллагеновых белков. Они способны формировать крупные высоко организованные фибриллы, в которых отдельные молекулы коллагена располагаются четырехступенчатыми уступами. Остальные коллагеновые белки относятся к классу нефибриллярных коллагенов,

формирующих мелкие фибриллы, либо листовидные мембранные образования.

Коллаген I типа экспрессируется повсеместно, но особенно обильно представлен в костной системе, сухожилиях и коже. Коллаген II типа является мажорным хрящевым коллагеном. Он также составляет основу стекловидного тела. Кроме того, в хрящевой ткани экспрессируются минорные коллагены IX, X, XI и XII типов. Эмбриональный мажорный коллаген III типа является основным компонентом стенок сосудов и кишечника. В базальных мембранах присутствует коллаген IV типа. V коллаген образует каркас внутри фибрилл мажорных коллагенов. Коллаген VI типа участвует во взаимодействии между фибриллами мажорных коллагенов и другими структурными компонентами внеклеточного матрикса. Коллагены VII и XVII типов присутствуют в эпидермальных кератиноцитах и являются компонентами кожных опорных фибрилл. Коллагены VIII и XVIII типов найдены в эндотелии сосудов и роговице, они участвуют в регуляции неоваскуляризации и образовании мембраны Десцемета. Остальные коллагены ассоциируются с мажорными коллагенами I и II типов, способствуя их взаимодействию с другими белками внеклеточного матрикса.

Очевидно, что структурные дефекты коллагенов могут сопровождаться тяжелыми повреждениями соединительной ткани. В настоящее время мутации, ассоциированные с различными нозологическими формами наследственных коллагенопатий, найдены в 25 коллагеновых генах, участвующих в синтезе 13 различных типов коллагенов. Клинические проявления этих заболеваний хорошо коррелируют с характером экспрессии различных типов коллагенов и с исполняемыми ими функциями.

Так, доминантные мутации в двух генах мажорного фибриллярного коллагена I типа (*COL1A1* и *COL1A2*) найдены у больных с различными формами несовершенного остеогенеза – наиболее распространенного наследственного заболевания соединительной ткани. Частота этого заболевания составляет 1:10000 новорожденных и 1:1000 среди

ортопедических больных. Клиническая картина несовершенного остеогенеза характеризуется повышенной ломкостью костей и патологическими изменениями ряда других тканей, богатых коллагеном I типа, таких как кожа, связки, хрящи, фасции, склеры, зубы, ткани среднего и внутреннего уха. При несовершенном остеогенезе наблюдается чрезвычайно высокий клинический полиморфизм. В соответствии с современной классификацией выделяют четыре клинические формы заболевания, наиболее тяжелая из которых форма II заканчивается летальным исходом в период внутриутробного развития плода или вскоре после рождения. Более мягко протекает форма I, при которой множественные переломы костей дебютируют в 4-6 декаде жизни, хотя в 50% случаев они сопровождаются потерей слуха. Оказалось, что при тяжелой форме несовершенного остеогенеза II типа преобладающими являются миссенс-мутации Gly-типа и C-концевые мутации, в то время как при относительно легкой форме заболевания I типа таких мутаций практически не обнаруживается, а присутствуют миссенс-мутации неGly-типа и N-концевые мутации.

Совершенно иная клиническая картина наблюдается при мутациях в генах хрящевых коллагенов. Мы уже писали о том, что различные мутации в гене мажорного коллагена II типа (*COL2A1*) могут приводить к 13 нозологически самостоятельным аллельным вариантам заболеваний – табл. 8. Среди них ведущее место занимают тяжелые хондродисплазии (7 вариантов), а также слабо выраженные хондродисплазии (2 варианта), при которых основным симптомом заболевания может быть остеоартроз или аваскулярный некроз головки бедра. Некоторые мутации в гене *COL2A1* приводят к клинике эпифизарных дисплазий (3 варианта), которые могут сочетаться с офтальмопатией, дефектами органа слуха, черепно-лицевыми и другими аномалиями. Среди них синдром Стиклера 1 типа. Мутации в гене *COL2A1* найдены также у больных с одним из генетических вариантов изолированной офтальмопатии. Таким образом, для заболеваний,

обусловленных мутациями в гене мажорного хрящевого коллагена II типа, характерен огромный клинический полиморфизм. Частично это объясняется типом мутации, и тяжелые варианты заболевания в большей степени ассоциированы с заменами глицина или С-концевыми мутациями. Однако различия в клинических проявлениях мутаций зависят также и от того, какая функция коллагена при этом нарушена и в каких хрящевых тканях эта функция наиболее значима.

Таблица 8.

Краткая характеристика заболеваний, обусловленных мутациями в гене *COL2A1* мажорного хрящевого коллагена II типа

| Нозологическая форма | Основные клинические критерии диагностики |
|--|---|
| Спондилоэпифизарная дисплазия | нанизм, укорочение туловища, расширение зон эпифизов, задержка окостенения тел позвонков, бедренных костей, <i>soxa vara</i> . |
| Спондилометафизарная дисплазия Струдвика | нанизм, укорочение туловища, расширение зон эпифизов, метафизов, сколиоз, килевидная деформация грудины |
| Танатоформная дисплазия | карликовость за счёт укорочения конечностей, микромелия, узкая грудная клетка, короткие рёбра, широкие кости таза и длинные трубчатые кости |
| Ахондрогенез, II; гипохондрогенез | укорочение конечностей, туловища, шеи, макроцефалия, внутриутробная гибель плода |
| Дисплазия Книста, метатропная карликовость, тип II | выраженный нанизм, короткое туловище, ризомелия, тугоподвижность суставов, расширение и остеопороз метафизов, миопия, плоское лицо |
| Платиспондилическая скелетная дисплазия | |
| Спондилопериферическая дисплазия | |
| Остеоартроз | остеоартроз, невыраженная хондродисплазия или спондилоэпифизарная дисплазия |
| Аваскулярный некроз головки бедра | аваскулярный некроз головки бедра |
| Эпифизарная дисплазия, | нанизм, расширение эпифизов, миопия, |

| | |
|---|--|
| множественная, с миопией и кондуктивной тугоухостью | кондуктивная тугоухость |
| Синдром Стиклера, тип 1, артроофтальмопатия | дегенеративные изменения в суставах, прогрессирующая миопия, пролапс митрального клапана, черепно-лицевые аномалии |
| Витреоретинопатия с эпифизарной дисплазией фаланг | дегенерация стекловидного тела и сетчатки, эпифизарная дисплазия фаланг |
| Витреоретинальная дегенерация, Вагнера синдром | дегенерация стекловидного тела, решётчатая дегенерация сетчатки, ранняя катаракта |

Сходный спектр клинических проявлений характерен для наследственных коллагенопатий, обусловленных присутствием доминантных мутаций в генах минорных хрящевых коллагенов – табл. 9. Так, мутации в любом из трех генов коллагена IX типа найдены у больных с различными формами множественной эпифизарной дисплазии, хотя некоторые из них вызывают болезнь межпозвоночных дисков, характеризующуюся присутствием множественных межпозвоночных грыж поясничного отдела позвоночника. Мутации в генах коллагена X типа приводят к клинике двух тяжелых метафизарных дисплазий. А мутации в генах коллагена XI типа обнаруживаются у таких пациентов, у которых тяжелые хондродисплазии или артропатии сочетаются с выраженными дефектами слуха и другими врожденными пороками развития. Среди них синдромы Стиклера 2 и 3 типов. Коллаген XI типа играет важную роль в формировании и передаче слухового сигнала, поэтому неудивительно, что нарушения слуха присутствуют при всех формах этих заболеваний, и некоторые мутации в гене COL11A2 найдены у больных с одной из доминантных форм несиндромальной нейросенсорной тугоухости.

Таблица 9.

Краткая характеристика заболеваний, обусловленных мутациями в генах минорных хрящевых коллагенов IX, X и XI типов

| | |
|-----------------------|-------------------------------|
| Нозологическая форма, | Основные клинические критерии |
|-----------------------|-------------------------------|

| ген | диагностики |
|---|--|
| Эпифизарная дисплазия, множественная, доминантная, COL9A1 | переразгибание, остеоартриты коленных суставов, нарушение походки, грыжи Шморля, остеофиты груднопоясничной области позвоночника |
| Эпифизарная дисплазия, множественная, тип 2, COL9A2 | переразгибание коленных суставов с развитием хронической артропатии, задержка роста, X-образная деформация нижних конечностей, множественная эпифизарная дисплазия |
| Эпифизарная дисплазия, множественная, тип 3, COL9A3 | ранние артропатии коленных суставов, нарушение походки, миотонический синдром |
| Болезнь межпозвоночных дисков, COL9A2, COL9A3 | множественные межпозвоночные грыжи поясничного отдела позвоночника |
| Метафизарная хондродисплазия Шмида, COL10A1 | метафизарный дизостоз, искривление конечностей, <i>coxa vara</i> |
| Спондилометафизарная дисплазия, COL10A1 | укорочение туловища, расширение метафизов |
| Отоспондилометаэпифизарная дисплазия, COL11A2 | гипоплазия средней части лица, расщелина нёба, микрогнатия, сенсоневральная тугоухость, и спондилоэпиметафизарная дисплазия; прогрессирующий остеоартроз |
| Синдром Вейсенбахера-Цвеймюллера, COL11A2 | микрогения, глоссоптоз, расщелена нёба, фетальная хондродисплазия, сенсоневральная тугоухость, глазные аномалии, тенденция к снижению роста |
| Синдром Стиклера, тип 2, артроофтальмопатия, COL11A1 | неспецифическая артропатия, марфаноидный фенотип, миопия, гипоплазия средней части лица, расщелина нёба |
| Синдром Маршалла, COL11A1 | окулярный гипертелоризм, седловидный нос, дефекты слуха, тяжёлая миопия, врождённая катаракта, эктодермальная дисплазия, задержка речевого развития |
| Синдром Стиклера, тип 3, артроофтальмопатия, COL11A2 | «мягкая» артропатия, нарушение слуха, тяжёлая миопия, дегенерация сетчатки, гипоплазия средней части лица, расщелина нёба |

Мутации в гене *COL3A1* эмбрионального коллагена III типа, обильно представленного в стенках сосудов и кишечника, присутствуют у больных с IV-м «артериальным» типом синдрома Элерса-Данло. Классические варианты этого синдрома I и II типа обусловлены генетическими дефектами коллагена V. Основными клиническими проявлениями синдрома Элерса-Данло являются гиперрастяжимость кожи, гипермобильность и вывихи суставов, скелетные деформации, варикозное расширение вен, пролабирование клапанов сердца. «Артериальный» тип заболевания является наиболее тяжелым, так как сопровождается геморрагическим синдромом, при котором возможны разрывы артерий и перфорации внутренних органов. При VII типе синдрома Элерса-Данло, характеризующимся сверх гиперрастяжимостью и лёгкой ранимостью кожи, выраженной гипермобильностью суставов, нанизмом и скелетными дисплазиями, найдены специфические мутации в генах *COL1A1* и *COL1A2* коллагена I типа. Все идентифицированные у больных мутации затрагивают сайт узнавания для одной из протеаз, участвующих в процессинга коллагена I, а именно в удалении N-концевого пропептида. Остальные варианты синдрома Элерса-Данло наследуются по аутосомно-рецессивному типу, так как большинство из них обусловлено мутациями в генах ферментов биосинтеза коллагена.

Генетические дефекты базального коллагена IV типа приводят к синдрому Альпорта, для которого характерно сочетание нефропатии с дефектами слуха. Однако различные варианты этого синдрома наследуются по X-сцепленному или аутосомно-рецессивному типу, поэтому мы не будем на них подробно останавливаться..

Доминантные мутации в трех генах коллагена VI типа приводят к развитию двух нозологически самостоятельных аллельных форм врожденной миопатии, сочетающейся с контрактурами суставов. Это миопатия Бетлема и миодистрофия Ульриха. Клиническими проявлениями первого заболевания являются врожденная мышечная гипотония, медленно

прогрессирующая атрофия мышц, множественные контрактуры суставов. При миодистрофии Ульриха дополнительно наблюдаются кривошея, дисплазия тазобедренных суставов.

Мутации в генах коллагенов VII и XVII типов, присутствующих в эпидермальных кератиноцитах и кожных опорных фибриллах, найдены у больных с различными формами буллезного эпидермолиза. В настоящее время описано 8 аллельных вариантов заболеваний, вызванных мутациями в гене COL7A1. 7 из них – это тяжелые дистрофические формы буллезного эпидермолиза. Они могут проявляться с рождения или в первые недели жизни в виде субэпидермальных отслаивающихся пузырей или высыпаний на туловище, лице, конечностях, слизистых полости рта, бронхиолах, конъюнктиве и роговице. В некоторых случаях возможна ранняя гибели ребёнка. В то же время описан относительно доброкачественный вариант переходящего буллезного дермолизиса новорожденных, также обусловленный мутациями в гене COL7A1. Различные аллельные варианты буллезного эпидермолиза могут наследоваться как по аутосомно-доминантному, так и по аутосомно-рецессивному типу. Мутации в гене COL17A1 приводят к двум аллельным более доброкачественным вариантам атрофического буллезного эпидермолиза, один из которых наследуется по аутосомно-доминантному, а другой – по аутосомно-рецессивному типу.

Мы уже писали об офтальмопатиях, обусловленных мутациями в генах хрящевых коллагенов. Два аллельных варианта дистрофии роговицы глаза, одна из которых с прогрессирующим течением сопровождается эндотелиальным отёком, а другая носит название полиморфной задней, ассоциированы с мутациями в гене COL8A1 коллагена VIII типа. Рecessивные мутации в гене коллагена XVIII типа найдены у пациентов с синдромом Кноблоха – витреоретинальной дегенерацией с отслоением сетчатки.

Тугоухость часто входит в структуру наследственных коллагенопатий, обусловленных мутациями в генах коллагенов I, II, IV и XI типов,

участвующих в передаче слухового сигнала. Вообще разнообразие наследственных форм тугоухости очень велико. В настоящее время идентифицировано более 30 генов, мутации в которых приводят к различным дефектам слуха. При этом кондуктивная тугоухость чаще наследуется по аутосомно-доминантному типу, в то время как сенсоневральная – по аутосомно-рецессивному. Описаны также X-сцепленные и митохондриальные формы наследственной тугоухости.

Сопутствующими симптомами многих вариантов наследственных коллагенопатий и в первую очередь синдрома Элерса-Данло, а также буллёзного эпидермолиза являются дистрофия ногтей, несовершенный дентиногенез, парадонтоз. Один из генетических вариантов изолированной дистрофии ногтей обусловлен мутациями в гене коллагена VII типа. Пролапс митрального и других клапанов сердца – входит в структуру синдрома Стиклера и классических форм синдрома Элерса-Данло. Все перечисленные выше заболевания, за исключением некоторых форм буллёзного эпидермолиза наследуются по аутосомно-доминантному типу.

2.5.1.2. Синдром Марфана

Синдром Марфана впервые был описан в 1896 году французским педиатром А. Б. Марфаном. Поэтому мы остановимся на нем более подробно. Синдром Марфана относится к наследственным дисплазиям соединительной ткани. При этом наблюдается одновременное поражение трех систем: опорно-двигательной, сердечно-сосудистой и органа зрения. Характерными клиническими проявлениями синдрома Марфана являются высокий рост, арахнодактилия (длинные, тонкие, «паукообразные» пальцы рук), гиперподвижность суставов, подвывих хрусталика и миопия, поражение крупных сосудов (аневризма аорты), порок сердца (пролапс митрального клапана). Каждый из этих симптомов может отличаться по степени тяжести и сочетаемости друг с другом у отдельных членов семьи. Для болезни Марфана характерны выраженный плейотропизм, варьирующая экспрессивность и высокая пенетрантность. Диагноз синдрома Марфана,

ставится при наличии минимум пяти симптомов – аневризма аорты, вывих хрусталика, арахнодактилия, деформация грудины, кифосколиоз. При этом имеет место увеличение (в два раза и более) выведения с мочой глюкозаминогликанов и их фракций. Особенно резко возрастает почечная экскреция хондроитин-4-6-сульфатов и в меньшей степени – гиалуроновой кислоты и гепаран-сульфата. В моче больных определяется также повышенное содержание (в два и более раз) аминокислоты оксипролина.

Популяционная частота составляет 1:25000. Причиной развития заболевания являются гетерозиготные мутации в гене фибриллина 1 – белка внеклеточного матрикса, выполняющего в большинстве соединительных тканей архитектурные функции. Ген фибриллина картирован в области 15q21.1, и в настоящее время в нем идентифицировано более 550 мутаций. Эти мутации обладают широким спектром клинических проявлений от изолированной эктопии хрусталика с мягкими скелетными проявлениями марфаноидного типа до тяжелых неонатальных форм синдрома Марфана, заканчивающихся летальным исходом в течение первых двух лет жизни. Подавляющее большинство мутаций в гене фибриллина 1 диагностировано у больных с классическим вариантом синдрома Марфана. Молекулярно-генетическая диагностика болезни Марфана как в пренатальном, так и в постнатальном периоде, хотя принципиально возможна, но осложняется тем обстоятельством, что подавляющее большинство мутаций в гене фибриллина уникальны, то есть описаны только у одного больного или в одной семье.

По утверждению американских врачей президент США Авраам Линкольн (1809-1865) и некоторые его родственники страдали болезнью Марфана. На рис. 36 представлена родословная президента, составленная по публикации В. П. Еркова «Знаменитый случай синдрома Марфана у Линкольна».

Рисунок 36. Знаменитый случай синдрома Марфана в семье А. Линкольна

Описание родословной: I-1-больная болезнью Марфана (бМ); II-1-Ненси Хенке, бМ ?; III-1-А.Линкольн (1809-1865), бМ, III-2 и III-3-бМ ?; IV-1-бМ, умер от воспаления легких; IV-2-Тэдд, бМ ?; IV-4-Роберт; V-1-Авраам П. бМ.

Марфаноподобный фенотип наблюдался у великого скрипача Николо Паганини и сказочника Ганса Христиана Андерсена.

2.5.1.3. Наследственные нарушения морфогенеза соединительной ткани

По аутосомно-доминантному типу наследуются многие заболевания, обусловленные мутациями в генах, участвующих в морфогенезе соединительной ткани. Регуляция морфогенеза тканей осуществляется под контролем небольших пептидных молекул внеклеточного матрикса, относящихся к семейству факторов роста. Эти молекулы передают свои сигналы посредством образования гетеромерных комплексов со специфическими тирозин- или серин/треонин-киназными трансмембранными рецепторами. Ингибирование факторов роста происходит при их взаимодействии с молекулами другого класса, получившими название антагонистов факторов роста.

Определяющая роль в морфогенезе хрящевой и костной тканей принадлежит суперсемейству трансформирующих факторов роста β (Tgf β), к числу которых относятся, в частности, костные морфогенетические белки. Tgf β являются мультифункциональными цитокинами и они участвуют в регуляции пролиферации и дифференцировки множества типов клеток. Одной из функций этих белков является регуляция экспрессии коллагенов. Существуют различные тканеспецифические изоформы Tgf β . Высокий уровень экспрессии Tgf β 1 наблюдается в развивающемся хряще, костной ткани и коже, что указывает на важную роль этого полипептидного регулятора в росте и дифференцировке соединительной ткани.

Гетерозиготные миссенс-мутации в гене *TGFB1* идентифицированы у больных с аутосомно-доминантной прогрессирующей диафизарной дисплазией 1 типа или болезнью Камурати-Энгельманна. Заболевание,

впервые описанное в 1922 году, характеризуется гиперостозом и склерозом диафизов длинных костей, марфаноидным фенотипом с долихостеномелией, множественной склеротической остеопатией и деформацией позвоночника. Патологический процесс обычно начинается в головке бедра или голени во второй декаде жизни, а иногда до 10 лет или даже в период новорожденности. Некоторым пациентам ошибочно ставится диагноз полиомиелита. Ряд авторов наблюдали положительный эффект в виде уменьшения болевого синдрома и улучшения данных рентгенографического исследования от применения кортикостероидных препаратов. В разных популяциях мажорными в гене *TGFBI* являются мутации R218C, R218H и C225R. Все они сопровождаются повышением транскрипционной активности гена *TGFBI*, с последующим увеличением скорости пролиферации остеобластов.

Однако чаще мутации, ассоциированные с наследственными дисплазиями соединительной ткани, нарушают структуру не самих факторов роста, а их рецепторов. В настоящее время идентифицировано два типа рецепторов Tgf β – I и II. Рецепторы II типа способны связывать лиганды, но передавать сигнал они могут только в присутствии рецепторов I типа. С другой стороны, связывание лиганда рецепторами I типа может происходить только в присутствии рецепторов II типа. В генах каждого из этих двух рецепторов – *TGFBR1* и *TGFBR2* – найдены доминантные мутации у больных с марфаноподобным фенотипом. Гетерозиготные миссенс-мутации в гене *TGFBR1* найдены у больных синдромом Фурлонга – марфаноидной болезнью II типа, сочетающейся с краниосиностозом, гипертелоризмом и в некоторых случаях с птозом и расщелиной неба. При этом эктопии хрусталика не наблюдается и рост больных, как правило, сохраняется нормальным. Мутации в гене *TGFBR2* идентифицированы у больных с аутосомно-доминантным синдромом Марфана II типа. При этом варианте у больных наблюдаются скелетные и кардиоваскулярные проявления синдрома Марфана при отсутствии или слабой выраженности глазной патологии.

Аллельным вариантом каждого из этих двух заболеваний является синдром аневризмы аорты Лоеса-Диетза – расслаивающаяся аневризма восходящего или грудного отдела аорты, которая может сочетаться с врождёнными пороками сердца или пролапсом митрального клапана, черепно-лицевыми дисморфиями, задержкой умственного развития.

Особенностью скелетных дисплазий, связанных с мутациями в генах морфогенетических белков, является большое количество заболеваний, патогенетическую основу которых составляют синостозы. Это множественный синостоз, гиперостоз и склеростеоз, входящие в структуру аутосомно-доминантных костно-суставных дисплазий, обусловленных мутациями в генах антагонистов костных морфогенетических белков, таких как ноггин или склеростин. Специфические мутации в генах рецепторов фибробластных факторов роста и некоторых транскрипционных факторов часто обнаруживаются при различных наследственных вариантах краниосиностозов, во многих случаях сочетающихся со слиянием/укорочением/удлинением метакарпальных фаланг кистей и стоп. Это акроцефалосиндактилии, а также изолированные брахидактилии и синдактилии. Остановимся более подробно на заболеваниях, обусловленных мутациями в генах рецепторов фибробластных факторов роста.

Фибробластные факторы роста (Fgf) относятся к семейству родственных полипептидов с широким спектром митогенной, ангиогенной, нейротропной и других вариантов активности, связанных с клеточной поверхностью. Свое действие они осуществляют посредством активации трансмембранных тирозинкиназных рецепторов. В настоящее время идентифицированы четыре типа Fgf-рецепторов, кодируемых соответственно генами *FGFR1* – *FGFR4*. Более 20 нозологически самостоятельных форм аутосомно-доминантных скелетных дисплазий обусловлены мутациями в трех генах рецепторов фибробластных факторов роста – *FGFR1*, *FGFR2* и *FGFR3*. Подавляющее большинство этих мутаций возникает *de novo*. Мутации в генах *FGFR1* и *FGFR2* чаще выявляются у больных с черепно-

лицевыми дисплазиями, сочетающимися с дефектами конечностей, в то время как нарушения работы гена *FGFR3*, наряду с этим, чаще приводят к различным вариантам хондродисплазии и нанизма.

Впервые мутации в гене *FGFR1* были идентифицированы у больного с акроцефалосиндактилией 5 типа или синдромом Пфайффера 1 типа. Ведущими клиническими проявлениями этого синдрома являются акроцефалия, глазной гипетелоризм, синдактилия II - III пальцев кистей и II - IV пальцев стоп, широкие дистальные фаланги I пальцев, в некоторых случаях полидактилия. В дальнейшем мутации в гене *FGFR1* были идентифицированы у больных с другими клиническими формами черепно-лицевой дисплазии, сочетающейся в ряде случаев с синдактилией и аномалиями конечностей. В эту группу вошли 3 заболевания: синдром Джексона-Вейса, при котором краниосиностоз сочетается с гипоплазией средней части лица и аномалиями нижних конечностей; синдром Антлея-Бикслера, характеризующийся трапецевидной формой черепа, гипоплазией средней части лица, плечелучевым синостозом, искривлением и неонатальными переломами бёдер, несиндромальная тригоноцефалия или метопический краниосиностоз. Кроме того, мутации в гене *FGFR1* найдены у больных остеоглофонической дисплазией, сочетающей в себе черты краниосиностоза и нанизма.

При всех формах перечисленных выше заболеваний идентифицированы гетерозиготные миссенс-мутации в гене *FGFR1*, обладающие доминантно-негативным эффектом. Наиболее частой из них является замена пролинового остатка на аргинин в 252 позиции рецептора. Мутация идентифицирована у больных с синдромами Пфайффера и Джексона-Вейса. Положение пролина в этой позиции высоко консервативно, и оно одинаково во всех четырех Fgf-рецепторах. Мутация P252R увеличивает аффинитет мутантного рецептора по отношению к лигандам за счет образования ряда дополнительных водородных связей. Этим и объясняется ее доминантно-негативный эффект. Гомологичные мутации у

больных с другими формами краниосиностозов идентифицированы в гене *FGFR2* – при синдромах Апера и Пфайффера 2 типа, а в гене *FGFR3* – при синдромах Муенке и Сэтре-Чотзена (см. ниже).

Причиной развития остеоглофонической дисплазии является замена высоко консервативных аминокислотных остатков в узкой области, соединяющей сайт связывания лиганда и трансмембранный домен Fgf-рецептора 1 типа. Показано, что одна из этих мутаций (Y372C) также увеличивает активность рецептора, то есть обладает доминантно-негативным эффектом. Интересно, что гомологичные замены триптофана в Fgf-рецепторах 2 и 3 типов приводят к синдрому Беаре-Стевенсона и танатоформной дисплазии I типа соответственно (см. ниже).

Гораздо большее разнообразие краниосиностозов ассоциировано с мутациями в гене *FGFR2*. Оказалось, что многие варианты синдромов Пфайффера, Джексона-Вейса и Антлея-Бикслера также связаны с нарушением работы Fgf-рецептора 2-го типа. Таким образом, каждое из этих заболеваний является генетически гетерогенным. Чаще всего, гетерозиготные миссенс-мутации в гене *FGFR2* обнаруживаются у больных с тремя формами синдромальных краниосиностозов - Апера, Крузона и Пфайффера. Кроме того, подобные мутации найдены у больных синдромом Беаре-Стевенсона, скафоцефалическим синдромом, синдромом Сэтре-Чотзена и несиндромальным уникоронарным краниосиностозом. Синдром Крузона характеризуется краниальным синостозом, глазным гипертелоризмом, экзофтальмом, наружным косоглазием, клювовидной формой носа, короткой верхней губой, гипоплазией верхней челюсти и относительной прогнатией. Синдром Апера проявляется краниосиностозом, гипоплазией средней части лица, кожной и костной синдактилией пальцев кистей и стоп. Синдром морщинистой кожи Беаре-Стевенсона – это выраженная морщинистость кожи, чёрный акантоз, краниосиностоз, черепно-лицевые дисморфии, аномалии пальцев, пуповины, гениталий и ранняя смерть. Синдром Сэтре-Чотзена характеризуется венечным синостозом, брахицефалией, низким

ростом волос на лбу, лицевой асимметрией,птозом, глазным гипертелоризмом, широкими большими пальцами и клинодактилией пальцев стопы; расщелиной нёба, нанизмом и иногда задержкой интеллектуального развития. Типичными проявлениями скафоцефалического синдрома являются скафоцефалия, макроцефалия, глазной гипертлоризм, мелкие орбиты,птоз, смещение верхней челюсти и умеренная задержка умственного развития. Таким образом, 9 клинических вариантов краниосиностозов составляют единую аллельную серию. Это еще один пример удивительного клинического полиморфизма.

Распределение мутаций в гене *FGFR2* и их связь с различными клиническими вариантами краниосиностозов носит неслучайный характер. Как правило, при каждой нозологической форме этих заболеваний мутации преимущественно располагаются в узкой области гена *FGFR2*, связанной с определенной функцией соответствующего рецептора. Однако, несмотря на очевидную связь специфических мутаций в гене *FGFR2* с клиническими особенностями синдромальных краниосиностозов, в некоторых случаях их проявления зависят от каких-то других дополнительных факторов.

Три генетических варианта краниосиностозов – синдромы Муенке, Крузона, сочетающегося с чёрным акантозом (специфическим кожным гиперкератозом с гиперпигментацией) и Сэтре-Чотзена – связаны с мутациями в гене *FGFR3*. Отличительными особенностями коронарного краниосиностоза Муенке являются расширенные, конусовидные эпифизы, изменения формы средней фаланги, синостоз костей запястья и предплёсны. До сих пор непонятно, почему одни и те же мутации в генах *FGFR1*, *FGFR2* и *FGFR3* приводят к разным, хотя и перекрывающимся фенотипическим проявлениям краниосиностозов.

Однако, как мы уже упоминали ранее, гораздо чаще гетерозиготные мутации в гене *FGFR3* обнаруживаются у больных с различными наследственными вариантами хондродисплазий и нанизма, тяжесть клинических проявлений которых варьирует от мягких форм –

гипохондроплазии, более тяжелых – ахондроплазии, до летальной неонатальной карликовости – танатоформной дисплазии.

Ахондроплазия - наиболее частая генетическая форма карликовости, в 30-40% случаев сопровождающаяся гидроцефалией, характеризуется укорочением проксимальных отделов конечностей, макроцефалией с нависающим лбом, гипоплазией средней части лица, изменением конфигурации пальцев кистей рук по типу трезубца. У больных выявляется гипермобильность большинства суставов, особенно коленных, в сочетании с ограничением сгибания и ротации локтевых суставов. Кифоз грудопоясничного отдела наблюдается уже с рождения, однако после того, как ребёнок начинает ходить, на первый план начинает выступать поясничный лордоз. Характерна умеренная мышечная гипотония, тенденция к задержке моторного развития. Интеллект, при отсутствии гидроцефалии или других поражений центральной нервной системы, нормальный. Основной причиной развития ахондроплазии является замена глицина на аргинин в трансмембранном домене Fgf-рецептора 3 – G380R.

Совершенно иной спектр мутаций в гене *FGFR3* выявляется у больных с гипохондроплазией – более распространенной хондродистрофией, клинически напоминающей ахондроплазию. Заболевание характеризуется нанизмом, нормальными размерами головы, брахидактилией с отсутствием типичного для ахондроплазии трезубца. Дополнительными критериями дифференциальной диагностики является отсутствие искривления большеберцовых костей, расширения проксимальных отделов малоберцовых костей и изменения формы таза. Гетерозиготные миссенс-мутации у больных с гипохондроплазией затрагивают, главным образом, две аминокислоты, локализованные в тирозинкиназном домене Fgf-рецептора 3. Это замены аспарагина в 540 положении на лизин - N540K, и лизина в 650 положении на аспарагин - K650N, глутамин - K650Q или метионин - K650M.

Танатоформная дисплазия, тип I – микромелическая хондродистрофия с деформацией рёбер и резким укорочением костей конечностей. Характерна

выраженная платиспондилия, увеличение межпозвоночного расстояния, отсутствие сужения каудального отдела спинномозгового канала. Рентгенографически тела позвонков имеют Н-образную форму, а головки бедренных костей - шаровидную форму. При танатоформной дисплазии, тип II – дополнительно выявляется деформация черепа по типу трилистника. Три гетерозиготные миссенс-мутации - R248C, S249C и Y373C объясняют более 70% случаев заболевания, причем наиболее частой мутацией, встречающейся почти у половины больных во всех исследованных популяциях является R248C Гетерозиготная мутация K650M найдена у всех обследованных больных с танатоформной дисплазией 2 типа.

На этом клинический полиморфизм аллельных вариантов хондродисплазий, обусловленных мутациями в гене *FGFR3*, не ограничивается. Известно, по крайней мере, еще три варианта этих заболеваний, среди них скелетная дисплазия Сан Диего, характеризующаяся тяжёлым постнатальным нанизмом, умеренной задержкой умственного развития, укорочением туловища, черепно-лицевыми аномалиями и специфическими рентгенографическими изменениями.

Таким образом, мутации в каждом из трех генов рецепторов фибробластных факторов роста, приводят к различным нозологически самостоятельным заболеваниям, составляющим единые аллельные серии. И это является основой наблюдаемого клинического полиморфизма. С другой стороны, некоторые клинически сходные состояния могут быть обусловлены мутациями в любом из генов этих рецепторов, что позволяет говорить об их генетической гетерогенности. Такой сложный характер наследования затрудняют дифференциальную диагностику заболеваний, которая во многих случаях становится возможной только с привлечением данных молекулярно-генетического обследования.

Большая группа заболеваний, ассоциированных с мутациями в генах морфогенетических белков, относится к группе офтальмопатий. Шесть аллельных вариантов дистрофии роговицы глаза обусловлены доминантными

мутациями в гене *TGFBI*, индуцируемом Tgf β 1. Это дистрофии роговицы глаза Гренува, Рейса-Буклерса, Тила-Бенке, Авеллино, решётчатые I и III типов. Продуктом гена *TGFBI* является белок кератоэпителин, участвующий в модуляции клеточной адгезии и взаимодействующий с белками внеклеточного матрикса, включая коллаген I, ламинин и фибронектин.

Многие аутосомно-доминантные офтальмопатии обусловлены мутациями в генах транскрипционных факторов, избирательно экспрессирующихся в тканях глаза. Так, например, различные мутации в гене транскрипционного фактора Pax6 могут приводить к девяти клинически самостоятельным наследственным болезням глаз, клинические проявления которых варьируют от аниридии до врожденной колобомы или катаракты. Но в отличие от заболеваний, обусловленных нарушением работы рецепторов трансформирующих или фибробластных факторов роста, генетические дефекты транскрипционных факторов чаще наблюдаются у больных с изолированной, а не синдромальной патологией.

2.5.2. Аутосомно-доминантные болезни нервной системы

В качестве примера рассмотрим три группы аутосомно-доминантных болезней нервной системы: моторно-сенсорные полинейропатии, боковой амиотрофический склероз и некоторые формы наследственных факоматозов.

2.5.2.1. Моторно-сенсорные полинейропатии

Моторно-сенсорные полинейропатии, включают различные формы болезни Шарко-Мари-Тута, впервые описанной в 1886 году, и синдрома Дежерин-Сотта. Чаще всего они наследуются по аутосомно-доминантному типу, хотя описаны редкие аутосомно-рецессивные и X-сцепленные формы. В настоящее время идентифицировано более 20 генетических вариантов наследственных полинейропатий. Все эти заболевания представляют собой удивительный пример огромной генетической гетерогенности на фоне относительно однородной клинической картины. Моторно-сенсорные нейропатии делятся на три типа демиелинизирующие (1 тип), аксональные

(2 тип) и промежуточные. Каждый из типов разделяется на подтипы, обозначаемые большими латинскими буквами.

Наиболее распространенными являются демиелинизирующие формы с аутосомно-доминантным характером наследования. Клинически болезнь проявляется в виде слабости и атрофии мышц дистальных отделов верхних конечностей с их последующей деформацией. Часто наблюдаются расстройства чувствительности и координации, сухожильная гипо- или арефлексия. Снижена скорость проведения импульса по периферическим нервам. В основе патогенеза этой группы заболеваний лежит поражение миелиновой оболочки или осевых цилиндров периферических нервов.

В настоящее время известны 4 генетических варианта этих заболеваний – типы 1A-1D. Три из них, очевидно, связаны с нарушением синтеза миелина периферических нервов. Это наиболее частая форма 1A, обусловленная гиперпродукцией интегрального белка компактного миелина периферической нервной системы – pmp22. Гиперпродукция миелинового белка возникает за счет тандемной дупликации гена *PMP22*. Подобная дупликация выявляется у 70-80% больных с демиелинизирующими моторно-сенсорными нейропатиями.

При другой относительно частой демиелинизирующей болезни Шарко-Мари-Тута типа 1B дефектным также оказывается структурный белок периферического миелина P(0). P(0) составляет более 50% всего белка, присутствующего в миелиновых оболочках периферических нервов. В более редких случаях причиной развития демиелинизирующей моторно-сенсорной нейропатии может быть нарушение регуляции экспрессии генов, участвующих в биогенезе миелина – вариант заболевания 1D. Аутосомно-доминантный синдром Дежерин-Сотта не является генетически самостоятельной нозологической формой, а представляет собой аллельные варианты болезни Шарко-Мари-Тута типа 1A, 1B и 1D. Относительно редкие аксональные формы аутосомно-доминантной болезни Шарко-Мари-

Тута, промежуточные и аутосомно-рецессивные формы еще более гетерогенны как по количеству вариантов, так и по типам дефектных белков.

2.5.2.2. Боковой амиотрофический склероз

Большая генетическая гетерогенность характерна и для наследственных форм бокового амиотрофического склероза. Для этого заболевания характерно сочетание поражения периферического и центрального двигательного нейронов. Клиническая картина складывается из системных мышечных атрофий при наличии высоких сухожильных и периостальных рефлексов, а также патологических стопных знаков. Болезнь дебютирует в среднем возрасте и носит прогрессирующий характер. Патологоморфологические исследования свидетельствуют об изменениях крупных моторных клеток спинного мозга и их аналогов, расположенных в стволе мозга. Больные погибают от расстройств дыхания спинального характера. В 10% случаев заболевание носит семейный характер с чертами аутосомно-доминантного наследования.

Боковой амиотрофический склероз относится к *конформационным болезням* мозга. Фундаментальная роль в патогенезе многих нейродегенеративных и некоторых нервно-мышечных болезней принадлежит конформационным изменениям физико-химических свойств ряда нейрональных и мышечных белков. Патогенетический механизм этих болезней объясняется тем, что мутантный белок меняет свою конформацию таким образом, что у него появляется способность к преципитации. В конечном итоге, это приводит к образованию внутри клеток нерастворимых белковых агрегатов, по мере накопления которых происходит гибель специфических классов нейронов. Это и служит основой для развития нейродегенеративного процесса.

Заболевания, обусловленные нарушением клеточных механизмов пространственной укладки определенных белков, имеют очень широкое распространение и не только в неврологии. Достаточно сказать, что конформационные нарушения многих белков, сопровождающиеся

образованием патологических белковых агрегатов, являются характерной чертой естественного процесса старения. К конформационным болезням мозга относятся такие нейродегенеративные заболевания как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, прионные болезни, нейродегенеративные болезни экспансии, о которых более подробно мы будем говорить позднее, целая серия наследственных синдромов паркинсонизма, связанных с появлением нейрофибриллярных клубков из агрегатов белка тау (таупатии), амилоидные нейропатии. Хотя причины формирования цитотоксических белковых агрегатов при конформационных болезнях мозга разные, набор белков, способных к подобной модификации достаточно ограничен. В их числе β -амилоид, обнаруживаемый в патологических внутриклеточных образованиях при многих формах амилоидоза, в том числе при болезни Альцгеймера, затем α -синуклеин – при болезни Паркинсона, прионный белок, нейросерпин при семейной энцефалопатии, филаментные белки. Формирование патологических белковых агрегатов может происходить на фоне недостаточности системы убиквитин-протеасомной деградации белков. Поэтому неудивительно присутствие убиквитина в составе многих подобных цитотоксических образований.

У 20% больных с аутосомно-доминантной формой бокового амиотрофического склероза обнаруживаются мутации в гене фермента Cu/Zn-супероксиддисмутазы. Показано, что мутации в гене *SOD1* приводят к дестабилизации конформационной структуры фермента, сопровождающейся его агрегацией и преципитацией в мотонейронах. Обнаруживаемые у больных цитоплазматические включения в дегенерирующих нейронах наряду с супероксиддисмутазой содержат также нейрофиламентные белки, убиквитин, α -синуклеин и др. Причем такие включения наблюдаются не только при наследственных, но при спорадических формах бокового амиотрофического склероза. При двух других аутосомно-доминантных вариантах этого заболевания дефектными оказываются нейрофиламентные

белки. Разнообразие генетических вариантов бокового амиотрофического склероза достаточно велико.

2.5.2.3. Наследственные факоматозы

Говоря об аутосомно-доминантных болезнях нервной системы, необходимо упомянуть о *наследственных факоматозах*, относящихся к группе эктомезодермальных дисплазий. Факоматозы характеризуются сочетанным поражением нервной системы, кожных покровов и внутренних органов. Это название впервые предложил в 1923 году голландский офтальмолог J. van der Hoeve, описавший опухолевидные невоидные образования на сетчатке глаза при туберозном склерозе. Термин происходит от греческого слова “факон” – невуc. Для многих факоматозов характерна варьирующая экспрессивность. Наряду с тяжелыми клиническими формами, отличающимися крайне неблагоприятным прогнозом, существуют стертые и олигосимптомные варианты. Наследуются факоматозы преимущественно по аутосомно-доминантному типу с неполной пенетрантностью, достигающей во многих случаях 75-90%. Факоматозы подразделяются на две большие группы: бластоматозы (нейрофиброматоз, туберозный склероз) и ангиоматозы (цереброретинальный ангиоматоз (Гиппеля–Линдау синдром), атаксия-телеангиэктазия, энцефалотригеминальный ангиоматоз и др.). Все факоматозы обусловлены мутациями в генах, относящихся к классу супрессоров опухолей.

Нейрофиброматоз I типа или *болезнь Реклингхаузена-Уотсона* - наиболее распространенная форма факоматоза с частотой среди населения 1:2500-3000. Клинически нейрофиброматоз I типа характеризуется тетрадой симптомов, описанных еще в 1930 F. J. Darier: а) наличием на коже туловища и конечностей разнокалиберных “кофейных” пятен, в динамике имеющих тенденцию к нарастанию по количеству и размеру. Кожные изменения могут также проявляться в виде участков депигментации, телеангиэктазий, гипертрихоза; б) доброкачественными опухолями кожи и подкожной клетчатки – нейрофибромами, состоящими из смеси клеток Шванна и

фибробластов; в) опухолями нервных стволов и окончаний, значительно варьирующими по форме, величине, количеству и не связанными с другими тканями; г) отставанием в физическом и умственном развитии различной степени выраженности.

Ген *NF1* характеризуется необычайно высокой частотой возникновения мутаций. Более 50% пациентов имеют вновь возникшие мутации, причем в подавляющем проценте спорадических случаев (90%) мутации имеют отцовское происхождение. Наиболее вероятным механизмом этой мутационной нестабильности, выражающейся в форме геномного импринтинга, является нарушения процесса метилирования гена *NF1*. Белок, дефектный при нейрофиброматозе I типа получил название нейрофибромин. Он активно экспрессируется в эндотелии сосудов и в гладко-мышечных клетках. В 80% случаев мутации в гене *NF1* приводят к преждевременному окончанию синтеза белка. Большая часть из них представлена протяженными внутригенными перестройками. Соматические мутации в гене *NF1* идентифицированы в опухолевых клетках злокачественных меланом, нейробластом, анапластических астроцитом, спорадических карцином кишечника и других тканей.

Нейрофиброматоз II типа встречается с частотой 1 на 33-40 тысяч новорожденных. Болезнь дебютирует, в среднем, в возрасте 21-22 лет. Выделяют центральную и спинальную формы заболевания. Клиническая картина определяется локализацией опухолей в веществе головного и спинного мозга. Опухоли мозга могут сопровождаться повышением внутричерепного давления, в результате которого появляется головная боль, рвота. Очаговая симптоматика зависит от места расположения опухоли и вовлечения в процесс черепно-мозговых нервов. Наиболее часто поражается слуховой нерв: невринома слухового нерва может быть одно- или двусторонней, причем в последнем случае может отмечаться грубая деформация продолговатого мозга. У больных с центральным нейрофиброматозом II типа, наряду с типичными двусторонними

мультифокальными акустическими невриномами (опухольями восьмого краниального нерва, производными от клеток Шванна), могут развиваться менингиомы, билатеральные вестибулярные шваниомы, шваниомы дорзальных корешков спинного мозга и presenile lens opacities. Также как и при нейрофиброматозе I типа частыми являются изменения со стороны костной системы (задержка роста, сколиоз, кифоз, псевдоартроз, локальный гигантизм). У большинства пациентов с нейрофиброматозом II типа кофейные пятна и периферические нейрофибромы либо полностью отсутствуют, либо их число не превышает шести.

Наследование нейрофиброматоза II типа имеет те же особенности, что и при заболевании I типа, хотя и менее выраженные. Геномный импринтинг выражается в более раннем дебюте и тяжелом течении заболевания при получении мутантного аллеля от матери, по сравнению с теми пациентами, которые унаследовали свою мутацию от отца. Потеря и/или aberrантное состояние локуса *NF2* является важным элементом развития не связанных с нейрофиброматозом II спорадических шваниом и менингиом, которые вместе составляют около 30% всех первичных опухолей мозга. Так что продукт гена *NF2* также относится к супрессорам опухолей.

Туберозный склероз, описанный французским неврологом Bourneville D.-M. (1880) и английским дерматологом J. J. Pringle (1890), представляет собой гетерогенную группу аутосомно-доминантных заболеваний с неполной пенетрантностью и варьирующей экспрессивностью. Популяционная частота заболевания различна в разных возрастных группах – 1 на 30 000 среди взрослых и вдвое больше – 1 на 15 000 – среди детей в возрасте до 5 лет.

Туберозный склероз или эпилотия (эпилепсия плюс анойя - умственная отсталость) характеризуется триадой симптомов: а) кожными изменениями б) судорожными припадками; в) психическими расстройствами со значительным снижением интеллекта. Клинические проявления заболевания складываются в зависимости от преимущественного поражения головного мозга (в виде разрастания глии и появления атипичных мультиполярных

клеток в области бугорков), либо кожных покровов. Для последних характерно сочетание пигментированных пятен с участками депигментации в различных отделах туловища и конечностей. Специфичны изменения кожи, часто наблюдаемые в поясничной области в виде "шагреновой кожи". Возможно проявление фиброзного ангиоматоза в области крыльев носа и подбородка. Типичны ахромичные листовидные пятна, околоногтевые фибромы, аденоматозные разрастания сальных желез в виде "adenoma sebaceum" на спинке носа и в виде бабочки на щеках. У большинства больных уже в детском возрасте имеется та или иная степень снижения интеллекта, нарастающая в процессе жизни больного. Умственная отсталость встречается примерно у 70% больных и усугубляется вследствие деструкции мозга. Возможны изменения со стороны глаз в виде застойных сосков или атрофии зрительных нервов, эндокринные нарушения, пороки развития внутренних органов.

Первыми признаками заболевания у детей в возрасте 3-4-х месяцев могут явиться судорожные припадки тонического характера, затем они становятся полиморфными, плохо поддаются лечению. Иногда на глазном дне в области диска зрительного нерва обнаруживаются специфические разрастания, носящие название "тутовая ягода". Для младенческой формы заболевания характерны кардиальные и глазные гамартомы. Неврологические и психические нарушения являются результатом гамартомных туберозных образований по ходу мозговых оболочек, извилин коры головного мозга. Чаще они появляются в области базальных ганглиев, стенок желудочков мозга, реже в области мозжечка, продолговатого мозга. Гамартомы представляют собой скопления атипичных гигантских ганглиозных клеток, а в стенках желудочков содержат, кроме того, ангиоматозную ткань. Возможно вовлечение в опухолевый процесс других органов - почек, печени, сердца с последующей склонностью к малигнизации.

Туберозный склероз представляет собой генетически гетерогенную группу аутосомно-доминантных заболеваний со сходной клинической картиной. Примерно 40% семей с туберозным склерозом имеют I тип заболевания, обусловленный мутациями в гене *TSC1*, локализованном в области 9q32-34. В подавляющем большинстве оставшихся семей болезнь обусловлена мутациями в гене *TSC2*, расположенным в области 16p13.3. Это II тип туберозного склероза. Белки, кодируемые генами *TSC1* и *TSC2*, были названы гамартином и туберином соответственно. Эти два белка взаимодействуют друг с другом с образованием туберин-гамартинового комплекса, участвующего в негативной регуляции инсулинового сигнального пути. Гиперэкспрессия в системе *in vitro* каждого из генов *TSC* подавляет рост и пролиферацию клеток, а также изменяет их морфологию.

В гене *TSC2* обнаружено несколько сотен различных мутаций, значительная часть которых составляют протяженные внутригенные делеции. Подавляющее большинство мутаций в гене *TSC1* приводит к образованию укороченных форм белка - это небольшие делеции, инсерции и нонсенс мутации. Для туберозного склероза характерна высокая частота возникновения новых мутаций, достигающая по разным оценкам 60-65%. В целом, мутации в генах *TSC1* и *TSC2* объясняют подавляющее большинство семейных и примерно половину спорадических вариантов туберозного склероза с превалирующим вкладом гена *TSC2* во втором случае. Клиническая диагностика двух генетических форм заболевания, обусловленных мутациями в генах *TSC1* и *TSC2*, практически невозможна, хотя очевидно, что умственная отсталость значительно чаще встречается у носителей мутаций в гене *TSC2*. Молекулярная диагностика туберозного склероза достаточно трудоемка из-за генетической гетерогенности заболевания, большого количества экзонов и разнообразия мутаций в каждом из двух генов.

Список аутосомно-доминантных заболеваний может быть значительно расширен.

Глава 2.6. Аутосомно-рецессивные заболевания

Аутосомно-рецессивные заболевания проявляются только при гомозиготном носительстве мутантных аллелей. При этом происходит частичная или полная инактивация функции мутантного гена. Одну из мутаций больной ребенок наследует от матери, другую – от отца. В общем случае родители больного, будучи сами здоровы, являются гетерозиготными носителями мутации. Вероятность рождения больного ребенка в такой семье в соответствии с законом Менделя составляет 25%. Девочки и мальчики болеют с одинаковой частотой, при этом рождение больного ребенка совершенно не зависит от возраста родителей, очередности беременности и родов. Часто в одной семье может наблюдаться несколько больных sibсов.

При многих формах аутосомно-рецессивных заболеваний больные в силу тяжести своего состояния не оставляют потомства. Чаще всего больные дети рождаются в браке здоровых родителей, каждый из которых несет мутацию в гетерозиготном состоянии. Таким образом, при анализе родословной прослеживается «горизонтальный» характер наследственной передачи заболевания. Две трети здоровых детей в браке гетерозиготных родителей также оказываются гетерозиготными носителями мутации. В браке гетерозиготного носителя рецессивной мутации с супругом, не имеющим мутантного аллеля, все дети будут здоровы, но половина из них окажутся гетерозиготными носителями мутации. Анализ родословных больных с аутосомно-рецессивными заболеваниями показывает, что часто (примерно в 60%) родители таких больных являются родственниками или их предки происходят родом из одного села или района, что так же является косвенным признаком инбридинга.

2.6.1. Муковисцидоз

Самым распространенным аутосомно-рецессивным заболеванием детского возраста среди представителей белой расы является муковисцидоз или кистозный фиброз поджелудочной железы. Впервые заболевание описано в 1938 году американским патологоанатомом Д. Андерсоном.

Согласно зарубежной статистике частота муковисцидоза у жителей Западной Европы, в среднем, составляет 1 на 2-3 тысячи новорожденных, в России она меньше – 1 на 3-5 тысяч. Наблюдаются значительные географические и этнические различия по частоте муковисцидоза. В странах Африки и Азии муковисцидоз почти не встречается, тогда как каждый 20-й (5%) житель Западной Европы является гетерозиготным носителем мутации в гене муковисцидоза (*CFTR*). Такую высокую распространенность мутантных аллелей в гене *CFTR* связывают как с «эффектом основателя», так и селективным преимуществом гетерозигот, обусловленным устойчивостью к холере, туберкулезу, токсическим формам гриппа. С другой стороны, у гетерозигот вдвое выше частота хронического панкреатита.

Основной патогенетический механизм заболевания – увеличение вязкости секрета, выделяемого слизеобразующими железами бронхов, кишечника, поджелудочной железы, семявыводящих канальцев, сопровождающееся закрытием многих протоков в этих органах. В частности нарушается естественный процесс очищения бронхов, что приводит к их воспалению. Воспаление сопровождается отеком легких, и увеличением продукции аномально вязкого секрета. Повышенная вязкость секрета в желудочно-кишечном тракте сопровождается изменением водно-электролитного компонента панкреатического сока, его сгущением и затруднением выделения в просвет кишечника. В результате нарушается формирование каловых масс с последующей кишечной непроходимостью и происходит фиброзно-кистозное изменение ткани поджелудочной железы.

Минимальными диагностическими симптомами муковисцидоза являются рецидивирующие легочные, чаще всего синегнойные инфекции, нарушение функции кишечника и поджелудочной железы, отставание в физическом развитии. Характерными признаками заболевания считаются большое количество неперевариваемого жира в копрограмме больного и повышение концентрации ионов натрия и хлора при проведении потовой

пробы. У некоторых больных уже при рождении наблюдается кишечная непроходимость, обусловленная присутствием мекониального илеуса. Такие больные требуют срочного оперативного вмешательства. Иногда мекониальный илеус у плода с муковисцидозом можно обнаружить при ультразвуковом исследовании уже во 2-3-м триместрах беременности. Выделяют три клинические формы муковисцидоза: легочную (15-20% случаев), кишечную (10%) и смешанную. Большинство детей, страдающих муковисцидозом, в условиях нашей страны погибают в детском возрасте, но описаны также стертые формы заболевания, выявляющиеся у взрослых.

Обследованию на наличие муковисцидоза подлежат следующие группы лиц: (1) больные с рецидивирующими бронхолегочными заболеваниями, синегнойной инфекцией, астмой, аллергозами; (2) лица с заболеваниями желудочно-кишечного тракта (склонные к запорам, колитам, хроническому панкреатиту, рецидивирующей кишечной непроходимости; новорожденные с мекониальным илеусом, перитонитом; дети с большим животом и низкой массой тела (при нормальном аппетите); больные циррозом печени неясного генеза; (3) мужчины с бесплодием после исключения других причин (у 98% мужчин больных муковисцидозом имеется сужение семявыводящего протока).

Ген муковисцидоза был картирован в 1985 году в длинном плече хромосомы 7 в области 7q31.2. В 1989 году он был идентифицирован, и это открытие сопровождалось одновременной публикацией в одном из самых престижных журналов мира («Science» - Наука) трех статей. Первая статья была посвящена самому гену муковисцидоза. Группе канадских исследователей под руководством Л. Ч. Тсуи удалось выделить и проклонировать кДНК гена муковисцидоза (*CFTR*), были определена ее нуклеотидная последовательность, экзон-интронные границы и регуляторные области гена. Вторая статья была посвящена белку, кодируемому геном *CFTR* и являющимся первичным биохимическим дефектом у больных муковисцидозом. Оказалось, что это белок-регулятор

трансмембранной проводимости ионов хлора, локализованный на апикальных мембранах экзокринных желез эпителия и выполняющий функции хлорного канала. В третьей статье был проведен анализ мутаций в гене *CFTR*. Как только становится известна нуклеотидная последовательность кодирующей области гена, сразу же можно задать вопрос, а что случилось у больного, чем ген больного человека отличается от нормального гена? Используя нормальную кДНК гена *CFTR* в качестве зонда удалось выделить и просеквенировать мутантную кДНК из эпителия бронхов одной девочки, больной муковисцидозом. Оказалось, что эта пациентка гомозиготна по специфической мутации - делеции трех нуклеотидов в 10-м экзоне гена, сопровождающейся отсутствием фенилаланина в 508 положении белка – delF508. Частота этой мутации у больных муковисцидозом в Канаде, Северной Америке и Северной Европе достигает 80%.

В настоящее время у больных муковисцидозом идентифицировано более 1000 разных мутаций в гене *CFTR*, главным образом, миссенс-типа. Однако самой распространенной остается delF508. Ее частота у больных муковисцидозом в разных популяциях варьирует от 30% до 80%. В Европе наблюдается определенный градиент распространения этой мутации с севера на юг: в Дании ее частота достигает 85%, в Италии снижается до 50% и в Турции – до 20-30%. В славянских популяциях частота delF508 среди больных муковисцидозом составляет около 50%. К мажорным мутациям относятся миссенс-мутации W1272X (встречается более чем в 30% случаев у больных муковисцидозом, принадлежащих этнической группе евреев ашкенази), G542X, G551D, R117H, R334W и др. Таким образом, в 70-80% случаев молекулярная диагностика мутаций в гене *CFTR* оказывается успешной. Это позволяет уже в первом триместре беременности проводить пренатальную диагностику муковисцидоза с целью предупреждения повторного рождения больного ребенка в семье высокого риска.

В тех случаях, когда не удастся провести молекулярную идентификацию мутаций в гене *CFTR* у больного или у его гетерозиготных родителей, пренатальная диагностика муковисцидоза может проводиться при сроке беременности 17-18 недель по анализу активности в амниотической жидкости ряда ферментов кишечного происхождения – гаммаглутамилтранспептидазы, аминопептидазы и кишечной формы щелочной фосфатазы. Присутствие на этом сроке слизистых пробок в кишечнике плода больного муковисцидозом приводит к снижению содержания этих ферментов в амниотической жидкости беременной женщины.

В настоящее время проводятся интенсивные исследования, направленные на выявление связей между типами мутаций в гене *CFTR* и клиническим полиморфизмом заболевания. Выявлены мутации, ассоциированные с тяжелыми и мягкими формами заболевания. Было установлено, что некоторые мутации, в том числе delF508, нарушают процессинг белка, в результате чего он не достигает апикальной мембраны и хлорный канал не формируется. Этим объясняется тяжелая клиника муковисцидоза при подобных нарушениях. Другие мутации (R117H, R334W, R347P), выявленные при более мягких формах муковисцидоза, не затрагивают процессинг белка, хлорный канал формируется, но работает менее интенсивно. Так, например миссенс-мутация R117H обнаружена у мужчин, страдающих бесплодием в силу закупорки семявыводящих канальцев. При этом клиника муковисцидоза у таких пациентов, как правило, отсутствует или очень стерта. То есть, у носителей мутации R117H вязкость аномального секрета, выделяемого экзокринными железами эпителия, повышена настолько незначительно, что это не приводит к аномальным процессам в легких, поджелудочной железе или в кишечнике, но это повышение достаточно для формирования непроходимости *vas deferens*.

С использованием техники трансгеноза в различных лабораториях США и Великобритании были сконструированы модельные линии мышей с мутациями в гене муковисцидоза, в том числе и такими, которые были идентифицированы у больных. Показано, что различные мутации по-разному влияют на фенотип животных. У мышей некоторых трансгенных линий отмечено преимущественное поражение легких, тогда как в других линиях – поджелудочной железы и кишечника. В одной линии наблюдали гибель большого числа зародышей от причин, сходных с мекониальным илеусом. Таким образом, эти линии представляют собой идеальные модели не только для изучения молекулярных основ патогенеза муковисцидоза, но и испытания различных программ терапии этого тяжелого заболевания.

В настоящее время разработаны эффективные методы этиопатогенетического лечения, позволяющие значительно увеличить продолжительность жизни больных муковисцидозом. Лечение больных муковисцидозом показано проводить в специализированных региональных центрах. Общая схема лечения включает применение муколитических средств, антимикробных препаратов, ферментов поджелудочной железы, витаминов, непременно применение кинезо- и физиотерапии. Ведение больных муковисцидозом проводится согласно национальным рекомендациям.

2.6.2. Проксимальная спинальная амиотрофия

Вторым по частоте аутосомно-рецессивным заболеванием является спинальная мышечная атрофия (СМА). Основной патогенетический механизм СМА заключается в разрушении моторных клеток передних рогов спинного мозга с последующей денервацией мышц. Частота заболевания 1 на 6-10 тысяч новорожденных. Потеря периферических двигательных нейронов приводит к выраженной гипотонии и слабости мышц. В зависимости от начала и течения заболевания СМА делят на 3 детских и взрослый типы. Все клинические формы СМА обусловлены мутациями в гене выживания мотонейронов – *SMN1*, локализованном в длинном плече хромосомы 5 в

области 5q12.2-q13.3. Белок выживания периферических двигательных нейронов (Smpn-белок) участвует в процессинге мРНК. В результате мутаций в гене *SMN1* периферические двигательные нейроны теряют способность контролировать переход от преРНК к мРНК и производить белки, необходимые для их выживания и функционирования.

Первый детский тип заболевания известен как болезнь Верднига-Гоффмана или острая форма СМА I. Впервые заболевание было описано Г. Верднигом в 1891 году. В некоторых случаях болезнь может проявить себя во внутриутробном периоде недостаточно активным шевелением плода. В этом случае у детей уже при рождении наблюдаются контрактуры суставов, диплегия нижних конечностей и респираторная недостаточность. Некоторые авторы выделяют эту форму заболевания как самостоятельный тип СМА 0. При СМА I болезнь проявляется в первом полугодии жизни ребенка слабостью и гипотонией мышц. Неврологический статус не ограничивается спинальной амиотрофией, а укладывается в понятие «вялый ребенок». Наблюдаются вялые симметричные парезы конечностей, снижающие их физиологическую гипертонию и угнетающие рефлексы новорожденного. Своеобразна поза больного – поза «лягушки». Лежа на спине, больной ребенок не может поднимать и удерживать нижние конечности в верхнем положении. Грудная клетка деформирована и имеет вид «колокола». Глубокие рефлексы – коленные и ахилловы, как правило, отсутствуют. Моторное развитие резко отстает от нормальных темпов. Дети плохо удерживают голову, не переворачиваются со спины на живот, не садятся и не встают на ноги. Течение болезни неуклонно прогрессирующее. Продолжительность жизни больных невелика. Обычно они погибают в первый год жизни от дыхательной недостаточности на фоне рецидивирующих пневмоний и ателектазов.

Второй детский тип СМА II – хронический или промежуточный – был выделен как самостоятельная нозологическая форма Дубовицем. Первые признаки болезни появляются в 6-12 месяцев после рождения. Сначала

парезы развиваются в проксимальных отделах нижних конечностей, а затем в процесс вовлекаются верхние конечности, мускулатура шеи и туловища. На первый план выступают мышечная слабость и гипотония. Ребенок утрачивает те движения, которыми он овладел ранее. В тех случаях, когда ходьба возможна, походка раскачивающаяся, с опорой на внутренние поверхности стоп. В дальнейшем развиваются типичные X-образные искривления нижних конечностей, деформации грудной клетки и позвоночника по типу кифосколиоза. Часто наблюдается тремор верхних конечностей, особенно пальцев, усиливающийся при активных движениях. В этом периоде болезни опора на ноги отсутствует, дети не способны ходить. Мышечные атрофии охватывают мускулатуру нижних и верхних конечностей, грудной клетки и живота. Утрачиваются все глубокие рефлексы. Функциональная недостаточность дыхательной мускулатуры, способствует развитию пневмоний, которые ребенок переносит на протяжении всей жизни. Любая интеркуррентная инфекция утяжеляет течение болезни и может приводить к летальному исходу. Продолжительность жизни больных может достигать 25 лет и более.

Третий более мягкий детский тип СМА III известен как болезнь Кугельберга-Веландер по имени двух докторов, описавших эту форму в 1956 году. Начальные проявления мышечной слабости отмечаются на втором году жизни или даже несколько позднее. При физической нагрузке обнаруживаются периферические парезы нижних конечностей. Изменяется походка больного ребенка в сторону, типичную для СМА II. Утрачивается способность бегать и прыгать. Опора при ходьбе осуществляется на выпрямленные в коленных суставах конечности. При сгибании ног и даже легком приседании ребенок падает, при вставании – использует вспомогательные движения. К особенностям телосложения относятся широкое межлопаточное пространство, которое дополняется крыловидными лопатками, лордоз, уплощение грудной клетки в передне-заднем направлении, плосковальгусная деформация стоп. Контрактуры в

конечностях появляются только на поздних стадиях заболевания, когда самостоятельное передвижение больных становится невозможным. Заболеванию сопутствуют частые респираторные инфекции.

Взрослая форма СМА IV обычно дебютирует после 30 лет мышечной слабостью и тремором. В дальнейшем болезнь медленно прогрессирует по типу СМА III. Подтверждением диагноза при всех формах СМА служат показатели электрофизиологического и морфологического исследования мышц, возможна ДНК-диагностика.

Область локализации гена *SMN1* отличается нестабильностью и наличием большого числа повторов и псевдогенов. В частности, в непосредственной близости от гена *SMN1* был идентифицирован его гомолог, получивший название *SMN2*. У разных индивидуумов ген *SMN2* может присутствовать в различном числе копий, варьирующем от 0 до 5 на диплоидный геном. Ген *SMN2* отличается от гена *SMN1* всего восьмью нуклеотидными заменами. Ни одна из них не приводит к замене какой-либо аминокислоты в Smp-белке, однако эти мутации нарушают процесс сплайсинга и приводят к ошибочному вырезанию экзона 7. Таким образом, хотя характер экспрессии двух гомологичных генов *SMN1* и *SMN2* в специализированных тканях организма одинаков, но их продукты различаются. Белок, кодируемый геном *SMN2*, оказывается короче и менее стабильным по сравнению с полноразмерной формой, кодируемой геном *SMN1*. Необходимо подчеркнуть, что небольшое количество полноразмерного Smp-белка все же образуется при экспрессии гена *SMN2*.

От 95% до 98% больных с любыми типами СМА имеют гомозиготные делеции различной протяженности, затрагивающие экзоны 7 и 8 гена *SMN1*. Остальные 2-5% несут подобные делеции в гетерозиготном состоянии, но при этом в гомологичной копии гена *SMN1* у них имеются небольшие инактивирующие мутации. Таким образом, именно ген *SMN1* ответственен за развитие СМА. Однако присутствие у больных СМА трех и более дополнительных копий гена *SMN2* достоверно коррелирует с более мягким

течением заболевания. Более того, присутствие 5 копий гена *SMN2* способно практически полностью компенсировать отсутствие гена *SMN1*.

Иммунологические исследования показали, что по сравнению с нормой доля полноразмерного Snn-белка у больных СМА I составляет 9%, у больных СМА II – 14%, у больных СМА III – около 18% и у клинически здоровых гетерозиготных носителей делеции гена *SMN1* – 45%-55%. Предполагается, что уже 23% полноразмерного Snn-белка достаточно для выживания и сохранения оптимальных функций периферических двигательных нейронов.

Одна из главных стратегий лечения СМА, основанная на молекулярных основах этиологии и патогенеза заболевания, направлена на повышение активности гена *SMN2* и исправление ошибки сплайсинга, в результате которой вырезается экзон 7. Более 2000 препаратов были исследованы с этой целью, и в ряде работ, выполненных, главным образом, на культурах клеток, получены убедительные результаты, доказывающие возможность экспериментального повышения транскрипционной активности гена *SMN2* и увеличения продукции полноразмерного Snn-белка.

В первых подобных исследованиях было показано, что при обработке культуры фибробластов больных СМА терапевтическими дозами вальпроевой кислоты количество полноразмерного продукта гена *SMN2* увеличивается в 2-4 раза, причем это увеличение происходит и на уровне мРНК. Одновременно возрастает уровень экспрессии некоторых других белков серин-аргининового семейства. Под действием вальпроевой кислоты происходит активация транскрипции гена *SMN2* в гиппокампе мозга крыс. Авторы предполагают, что этот препарат может быть перспективен для лечения СМА и ряда других наследственных заболеваний, в этиологии которых ведущая роль принадлежит дефектам альтернативного сплайсинга. Первые результаты применения вальпроевой кислоты для лечения больных СМА, полученные в нашей стране доктором В. Г. Вахарловским, внушают определенный оптимизм.

2.6.3. Наследственные болезни обмена

По аутосомно-рецессивному типу наследуются болезни обмена – одна из наиболее многочисленных и хорошо изученных групп моногенных заболеваний человека. Наследственные болезни обмена обусловлены нарушением каталитической функции ферментов, участвующих в утилизации или транспорте соответствующих субстратов или выполняющих роль клеточных рецепторов. Подобные нарушения часто сопровождаются накоплением веществ, предшествующих ферментативному блоку, и дефицитом конечных продуктов реакции. Частоты наследственных болезней обмена колеблются в очень широких пределах от 1:2-3 тысячи новорожденных до 1: 10⁵-10⁶, причем для многих подобных заболеваний характерны выраженные различия по частотам встречаемости в разных этнических группах и популяциях. Как правило, наследственные болезни обмена это тяжелые состояния, клинические проявления которых очень разнообразны. Часто они включают задержку психомоторного развития, судорожный синдром, миопатию, скелетные аномалии, рецидивирующие каматозные состояния, кетоацидоз, гепатоспленомегалию, мальабсорбцию, атаксию, синдром внезапной смерти.

Выделяют следующие группы наследственных болезней обмена: нарушения обмена аминокислот – аминоацидопатии (альбинизм, фенилкетонурия, тирозинемия, алкаптонурия, гомоцистинурия, гистидинемия, гипервалинемия, гиперлизинемия, тирозиноз и др.); углеводов – глюкозурии (галактоземия, гликогенозы, фруктозурия и др.); липидов (гиперхолестеринемия, гиперлипидемия, ганглиозидозы, сфинголипидозы, лейкодистрофии и др.); гликозаминогликанов (мукополисахаридозы); стероидных и глюкокортикоидных гормонов (адреногенитальный синдром); пуринов и пиримидинов (ксантинурия, синдром Леша-Нихана и др.); билирубина (синдром Криглера-Найяра); металлов (гемахроматоз, болезни Менкеса, Вильсона-Коновалова);

порфирина (эритропоэтическая и другие порфирии); ферментов желудочно-кишечного тракта (целиакия, синдром мальабсорбции и др.).

Представляем более подробное описание наиболее известных наследственных болезней обмена, с которыми врач может встретиться в своей повседневной практике. Знакомство с наследственными болезнями обмена необходимо еще и потому, что для некоторых из этих заболеваний проводятся биохимические скрининги среди новорожденных с целью их ранней диагностики и профилактики.

2.6.3.1. Фенилкетонурия

Общими нарушениями при наследственных дефектах обмена аминокислот являются аминоацидурия (выделение аминокислот с мочей) и ацидоз тканей. Наиболее распространенные аминоацидопатии обусловлены дефектами метаболизма двух аминокислот – фенилаланина и тирозина. На рис. изображены биохимические превращения фенилаланина и тирозина и основные метаболические блоки на их пути (стр. 506, Иванов).

Рисунок 37. Биохимические превращения фенилаланина и тирозина

Гиперфенилаланинемии – это группа генетически гетерогенных аутосомно-рецессивных заболеваний, обусловленных нарушением метаболизма фенилаланина. В основе патогенеза гиперфенилаланинемии лежит накопление в крови фенилаланина и продуктов его утилизации: фенилпировиноградной, фенилмолочной и фенилуксусной кислот, оказывающих токсический эффект на различные органы и ткани, в первую очередь, ЦНС.

Фенилаланин – незаменимая аминокислота, которая не синтезируется в организме, а поступает с пищей. С помощью фермента фенилаланин-гидроксилазы, экспрессирующегося в печени, фенилаланин превращается в тирозин. Фенилкетонурия, наиболее частая и злокачественная форма гиперфенилаланинемии. Заболевание, впервые описанное Феллингом в 1934 году, обусловлено наследственной

недостаточностью фенилаланингидроксилазы. В нашей стране исследования по фенилкетонурии впервые были проведены московским генетиком и психиатром М. Г. Блюминой в 1970-е годы. Частота фенилкетонурии составляет 1 на 8-10 тысяч новорожденных, частота гетерозиготного носительства – 1 : 50-100 человек. В настоящее время описано еще семь более редких наследственных гиперфенилаланинемий, обусловленных мутациями в генах, кодирующих другие ферменты метаболизма фенилаланина.

В основе патогенеза фенилкетонурии лежит накопление фенилаланина и его побочных продуктов, оказывающих токсичное действие на мозг и другие органы больного. Ферментативный блок превращения фенилаланина сопровождается уменьшением синтеза медиаторов ЦНС – дофамина и диоксифенилаланина, а также дефицитом конечного продукта реакции – меланина. Ведущим симптомом болезни является слабоумие, достигающее у большей части больных степени имбецильности или идиотии. При рождении ребенок внешне нормален, но уже с первых недель жизни у него наблюдаются повышенная возбудимость, усиление сухожильных рефлексов, мышечная ригидность и судорожный синдром. Первым неспецифическим проявлением заболевания может быть повторяющаяся рвота. В 80-90% наблюдений у детей выражен дефект пигментации, обусловленный дефицитом меланина. Большинство из них блондины с голубыми глазами и светлой кожей. Нередки мокнущие экземы и дерматиты. Отметим, что если в городе, области, республике хорошо налажена медико-генетическая служба, то всем новорожденным на 3-7-м дне жизни проводится обязательное централизованное специальное скринирующее исследование для выявления среди них больных фенилкетонурией. Ранее в период новорожденности широко использовался микробиологический тест Гатри и селективный мочевой скрининг на фенилкетонурию (тест Феллинга). Для определения количества фенилаланина и тирозина в крови используют хроматографический и флюорометрический методы.

Налаженный скрининг совсем не исключает проведение диагностических мероприятий по выявлению фенилкетонурии среди групп детей повышенного риска. Таковыми являются умственно неполноценные дети, находящиеся в специализированных учреждениях; дети, отстающие в умственном развитии, с поражениями кожных покровов; а также братья и сестры больных фенилкетонурией.

Больные фенилкетонурией являются гомозиготными носителями мутаций в гене *PAH*, ответственном за синтез фенилаланингидроксилазы. При нарушении активности указанного фермента концентрация фенилаланина в крови и во многих органах больного резко повышена. В частности, накопление этой аминокислоты в головном мозге вызывает интоксикацию и гибель нервных клеток с соответствующими для этого заболевания клиническими проявлениями.

Ген *PAH* идентифицирован, и он находится на 12 хромосоме (12q22-24). Определены спектры наиболее частых мутаций в гене *PAH*, которые оказались разными для разных этнических групп. В странах Восточной Европы (Польше, Белоруссии, России), где фенилкетонурия встречается с высокой частотой, мажорными являются мутации R408W (ее частота у больных достигает 60%), R158Q и др. Наличие мажорных мутаций значительно облегчает молекулярную диагностику заболевания и выявление гетерозиготных носителей мутантных аллелей. Это крайне важно для медико-генетического консультирования членов семьи больного и прогнозирования фенилкетонурии у их потомства.

Причем диагностика может быть проведена по высушенному пятну крови на фильтровальной бумаге, присланной по почте из любого пункта страны. На чистый листок размером 8 на 5 см следует нанести и пропитать 1-2 пятна крови диаметром не более 0,5 см², полученной из пальца больного после прокалывания кожи. Высушить полученный образец крови на воздухе, вложить в конверт, не забывая на фильтровальной бумаге с образцом высушенной крови надписать фамилию, имя, отчество и возраст

обследуемого, дату взятия крови, цель обследования и обратный адрес. Для предотвращения контаминации материала больного работать необходимо в перчатках и не накладывать один листок на другой, а разъединять их прокладкой при посылке нескольких образцов. Молекулярная диагностика мутации у больного и его родителей позволяет проводить пренатальную диагностику фенилкетонурии при последующей беременности матери уже на сроке 9/10 недель.

Лечение больных заключается в исключении из питания фенилаланина путем применения специфической безфенилаланиновой диеты. Это малобелковые продукты под названием амилофены и лечебные продукты: тетрафен (Россия), лофенак и фенил-фри (США). Не можем не отметить, что одними из первых в нашей стране диетическое лечение больных фенилкетонурией предложили и разработали в 60-е годы прошлого столетия отечественные ученые Института экспериментальной медицины РАМН в Санкт-Петербурге член-корр. АМН СССР, профессор С. А. Нейфах (1909-1998) и доктор медицинских наук А. М. Шапошников. Предпочтительно на специализированной диете больному фенилкетонурией находится в течение всей жизни. После второй декады и стабилизации состояния и содержания фенилаланина в крови возможно расширение диеты.

Особую проблему представляют беременные женщины, ранее находившиеся на безфенилаланиновой диете, так называемая «материнская фенилкетонурия». Их плоду угрожает фенилаланиновая эмбриопатия, которая проявляется микроцефалией, пороками сердца, пренатальной гипоплазией и умственной отсталостью. У таких женщин беременность должна планироваться, и с первых дней ей необходимо соблюдать безфенилаланиновую диету.

2.6.3.2. Галактоземия

Наиболее известной наследственной болезнью углеводного обмена являются галактоземия. Заболевание впервые описано А. Ресом в 1908 году. Галактоземия 1 типа (классическая галактоземия) встречается с

частотой 1 на 15000-20000 новорожденных, частота гетерозиготного носительства мутаций в гене галактоземии (*GALT*) – 1:270. Болезнь обусловлена недостаточностью или отсутствием ферментов, участвующих в метаболизме галактозы. Ведущим из них является галактозо-1-фосфатуридилтрансфера (Г1ФУТ). В основе патогенеза заболевания лежит избыточное накопление в результате метаболического блока галактозы и галактозо-1-фосфата. При избыточной концентрации эти метаболиты оказывают токсическое действие на ткани мозга, печени, почек и кишечника. Оно заключается в ингибировании бактерицидной активности лейкоцитов и развитии септических осложнений. При очень высоком содержании галактозы она начинает метаболизироваться по побочному пути с образованием сахарного спирта – галактиола. Увеличение содержания галактиола может приводить к разрыву зонулярных волокон хрусталика и возникновению катаракт.

Клинически галактоземия проявляется в следующем: через несколько дней после первого приема молочной пищи появляются рвота, диарея, желтуха (увеличение уровня прямого билирубина), гепатомегалия, диспепсия, асцит, гипотрофия, гемолитические проявления. У большинства больных в первые месяцы жизни формируется катаракта, а также наблюдается отставание психического развития. У больных в моче выявляются галактозурия, протеинурия и аминокацидурия. Все эти симптомы прогрессируют на фоне получения ребенком женского и/или коровьего молока, содержащего галактозу.

Биохимическая диагностика заболевания базируется на измерении активности Г1ФУТ в эритроцитах. ДНК диагностика основана на определении мутаций в гене Г1ФУТ (*GALT*), локализованном в длинном плече хромосомы 9 (9q13). В европейской популяции наиболее частой является мутация Q188R, диагностируемая у 70% больных. Диагностику галактемии можно проводить на доклинической стадии при биохимическом скрининге новорожденных.

При установлении диагноза галактоземии ребенка необходимо переводить на безлактозную диету – соевое молоко в сочетании с безгалактозными белковыми гидролизатами, в частности, гидролизатом казеина. Однако, в отличие от фенилкетонурии, это не всегда приводит к полному исчезновению симптомов.

2.6.3.3. Ганглиозидозы и сфинголипидозы

Наследственные болезни обмена липидов развиваются в результате нарушения одной из стадий синтеза, транспорта и деградации липопротеинов, в состав которых входят все основные плазменные липиды – триглицериды, фосфолипиды, холестерин и свободные жирные кислоты. К болезням накопления липидов относятся, в частности, *ганглиозидозы* и *сфинголипидозы*. Сфинголипидозы – группа наследственных болезней, обусловленных снижением активности ферментов, обеспечивающих деградацию сфингомиелинов – галактозидов и цереброзидов. Сфингомиелины – сложные липиды, основным структурным элементом которых является церамид. Ганглиозиды GM2 и GA2 являются составляющими гликосфинголипидов, расположенных на внешней поверхности большинства клеточных мембран. Они особенно обильны в клетках нервной системы, где выполняют много функций, участвуя в регуляции прорастания нервных клеток, формирования межклеточных контактов и нейрональной трансмиссии. Катаболизм ганглиозидов происходит в лизосомах, где гликогидролазы деградируют их путем последовательного отделения терминальных сахаров до корового церамида. Наследственные дефекты гидролитических ферментов являются причиной лизосомных болезней накопления, при которых промежуточные гликолипиды накапливаются в лизосомах.

Три нозологические формы болезней накопления ганглиозида GM2 связаны с дисфункцией гексозаминидазной активности - *болезнь Тея-Сакса (амавротическая идиотия)*, *болезнь Зандхоффа* и *ювенильный ганглиозидоз GM2 AB типа*. Два фермента непосредственно участвуют в реализации этой

активности - гексозаминидаза А и В. Кроме того, для взаимодействия липидных субстратов и водорастворимой гидролазы необходимо присутствие активирующего фактора. Таким образом, для стимуляции гексозаминидазной активности по отношению к GM2- и GA2-ганглиозидам требуется, по крайней мере, еще один активирующий белок. Каждый из компонентов гексозаминидазы является гетеро- или гомополимером, состоящим из одной или двух полипептидных субъединиц - альфа и бета, кодируемых двумя разными генами - *HEXA* и *HEXB*, локализованными в хромосомах 15 и 5, соответственно. Альфа и бета цепи гексозаминидазы имеют сходную структуру. Гексозаминидаза А имеет структуру (альфа-бета)₂, гексозаминидаза В является гомополимером, состоящим только из бета-цепей. При отсутствии бета-субъединиц увеличивается полимеризация альфа-цепей с образованием гексозаминидазы S, в норме также присутствующей в плазме крови и имеющей, по-видимому, структуру (альфа)₆. При болезни Тея-Сакса отсутствует или резко снижен компонент А гексозаминидазы, и это снижение обусловлено мутациями в гене альфа цепи – *HEXA*. При этом компонент В присутствует. Поэтому данную форму ганглиозидоза GM2 обозначают, как вариант В. Болезнь Зандхоффа связана с мутациями в гене бета цепи гексозаминидазы – *HEXB*, и в этих случаях, как правило, отсутствует или снижена активность обоих компонентов фермента – А и В, так называемый, нулевой вариант ганглиозидоза GM2. При варианте АВ - ювенильном ганглиозидозе GM2, все компоненты гексозаминидазы присутствуют, но отсутствует или дефектен активирующий фактор вследствие мутаций в соответствующем гене – *GM2A*.

GM-2-ганглиозидоз I-го типа или болезнь Тея-Сакса – прогрессирующее нейродегенеративное аутосомно-рецессивное заболевание, в большинстве случаев заканчивающееся летальным исходом в возрасте от 2 до 3 лет. Заболевание дебютирует, как правило, в конце первого полугодия жизни. Ребенок, ранее развивавшийся нормально, утрачивает приобретенные навыки, интерес к окружающему, контакт с близкими, не может

фиксировать взгляд, следить за предметами. На глазном дне довольно рано обнаруживается симптом "вишневой косточки" за счет отложения ганглиозидов в макулярной области сетчатки глаза с последующим развитием атрофии зрительных нервов и слепоты. Параллельно развиваются парезы и параличи, грубо нарушается психическое развитие ребенка. Для больных характерна повышенная реакция на звуковые раздражения, отмечаются судороги, преимущественно тонического характера. Витальный прогноз крайне неблагоприятен. Смерть наступает обычно через 1,5-2 года после начала заболевания на фоне кахексии и децеребрационной ригидности. В тканях мозга и внутренних органах отмечается накопление Gm2-ганглиозидов.

Наряду с классическим младенческим вариантом болезни Тея-Сакса, GM-2-ганглиозидоз I-го типа включает ювенильные формы, при которых болезнь дебютирует в возрасте 5 лет, а смерть наступает до 15 лет. Среди ювенильных форм выделяют вариант В1. Описаны более редкие взрослые формы GM-2-ганглиозидоза I-го типа с поздней фенотипической манифестацией и медленным течением, а также очень мягкий, так называемый псевдо АВ вариант заболевания. Все формы ганглиозидоза GM2 первого типа обусловлены наследственной недостаточностью альфа цепи гексозаминидазы А. При этом тяжесть течения заболевания коррелирует с уровнем остаточной активности гексозаминидазы А. При классической болезни Тея-Сакса эта активность составляет 0.1% по отношению к норме, при более поздних ювенильных формах - 0.5%, взрослые формы ганглиозидоза GM2 характеризуются 2-4% остаточной активности гексозаминидазы А, и при достижении этого показателя 11-20% клинические симптомы заболевания отсутствуют или очень стерты – псевдо АВ вариант. Вариант В1 характеризуется нормальной каталитической активностью гексозаминидазы А по отношению к некоторым искусственным субстратам и дефектной активностью по отношению к естественным субстратам.

Наибольшая частота болезни Тея-Сакса – 1 на 3000 рождений – наблюдается среди евреев восточно-европейского происхождения. В других этнических группах и популяциях распространенность заболевания на два порядка ниже и обычно не превышает 1 на 300 000. Такие значительные различия по частоте заболевания не могут быть связаны только с «эффектом основателя». Для объяснения наблюдаемой популяционной изменчивости привлекаются такие факторы, как генетический дрейф, селективное преимущество гетерозигот, характер миграции, социальные и религиозные особенности евреев ашкенази, обуславливающие неслучайный характер образования супружеских пар.

В основе патогенеза болезни Зандхоффа лежит дефицит бета-гексозаминидазы А и В. Клинически заболевание протекает сходно с амавротической идиотией Тея-Сакса. Заболевание дебютирует в первом полугодии жизни. В клинической картине доминирует регресс моторных навыков и психических функций. У больных отмечается вторичная микроцефалия, мышечная гипотония. При осмотре глазного дна выявляется симптом "вишневой косточки". Заболевание протекает прогрессирующе.

Больные погибают, как правило, в возрасте до 3 лет. В тканях мозга и внутренних органах отмечается накопление Gm2-ганглиозидов. Все варианты ганглиозидоза GM2 второго типа обусловлены наследственной недостаточностью бета цепи гексозаминидазы. При этом у больных остаточная активность фермента в сыворотке крови, как правило, не превышает 5%. Наряду с классическим вариантом болезни Зандхоффа, описаны редкие ювенильные и даже взрослые формы заболевания, при которых активность гексозаминидазы достигает 20-40% по сравнению с нормой. Несмотря на большое сходство между ганглиозидозом GM2 первого и второго типа по общей клинической и патологической картине, болезнь Зандхоффа хорошо диагностируется по особенностям каталитической гексозаминидазной активности и по наличию у больных гепатоспленомегалии. Болезнь Зандхоффа относится к числу редких

аутосомно-рецессивных заболеваний. Частота больных среди новорожденных, обычно, не превышает 1:300 000 и евреи-ашкенази не являются в этом смысле исключением.

К сфинголипидозам относятся болезни Ниманна-Пика и Гоше. Болезнь Ниманна-Пика или сфингомиелиновый липидоз относится к числу редких аутосомно-рецессивных заболеваний. Однако, в некоторых этнических группах и генетических изолятах частота этого заболевания достаточно велика. Так, 40% всех случаев заболевания встречается среди евреев-ашкенази. Некоторые формы заболевания специфическим образом распространены на севере Африки, во Франции, в Шотландии и в Канаде. Основным диагностическим признаком болезни является накопление липидов, главным образом, сфингомиелина в ретикулоэндотелиальных и других типах клеток по всему телу. Часто накопление сфингомиелина ведет к избирательной гибели клеток, особенно чувствительны к этому дефекту клетки центральной нервной системы. Характерными симптомами являются гепатоспленомегалия, задержка физического и умственного развития и серьезные неврологические расстройства. Различают 5 форм болезни. Детские формы: классическая острая нейропатия – тип А, и хроническая висцеральная – тип В; ювенильные: хроническая нейропатия – тип С, и Нова-Шотландский вариант – тип D; взрослая не нейропатическая форма – тип Е.

Первичный биохимический дефект при детской форме болезни Ниманна-Пика (типы А и В) – отсутствие активности лизосомной сфингомиелиназы, катализирующей расщепление сфингомиелина до фосфорилхолина и церамида. У 85% пациентов типа А симптомы развиваются к 6 месяцам, смерть наступает в возрасте до 3 лет. У пациентов типа В, как правило, отсутствует неврологическая симптоматика, несмотря на массивные висцеральные включения. У пациентов группы С первые неврологические симптомы развиваются между 2 и 4 годами, болезнь прогрессирует медленнее. Типичными являются спастичность и параличи,

особенно миоклонические конвульсии. Первичный биохимический дефект при типе С болезни Ниманна-Пика связан с клеточным транспортом и/или процессингом свободного холестерина, следствием чего является нарушение его эстерификации и внутриклеточное накопление неэстерифицированного холестерина.

В основе *болезни Гоше* или гликофинголипидоза лежит нарушение катаболизма глюкоцереброзидов, вследствие дефицита глюкоцереброзидазы. С клинической точки зрения, в зависимости от дебюта и преобладания той или иной симптоматики выделяют три формы глюкоцереброзидного липидоза - I, II и III.

Хроническая взрослая форма I-го типа, составляющая 80% от всех форм заболевания характеризуется гепатоспленомегалией, анемией, тромбоцитопенией, асептическими некрозами костей, переломами, аномальной пигментацией лица, шеи, рук. Описаны случаи первичной диагностики болезни Гоше III-го типа в старческом возрасте. Эта форма заболевания особенно часто встречается среди евреев-ашкенази. В США две трети всех больных приходится на евреев восточно-европейского происхождения. Считается, что болезнь Гоше наиболее частое моногенное заболевание среди представителей данной этнической группы. Частота гетерозигот среди американских евреев достигает 1:13 (7.7%) и несколько ниже в Израиле – по оценкам разных авторов от 4% до 4.6%. Все типы болезни Гоше характеризуется варьирующим дебютом. Гепатоспленомегалия, обычно, предшествует неврологическим нарушениям, причем в некоторых случаях селезенка достигает гигантских размеров. Затем развиваются атаксия, спастическая параплегия, большие и/или психомоторные припадки и умственная отсталость.

Ведущими чертами II-го ювенильного типа, встречающегося с частотой 5%, являются гематологические аномалии с гиперспленизмом, ломкостью костей и пигментацией кожи. В ряде случаев диагноз может быть поставлен в первую неделю жизни. Наблюдаются также неврологические расстройства:

экстрапирамидные нарушения, судороги, изменение поведения, прогрессирующая деменция. При микроскопическом исследовании костного мозга, паренхиматозных органов (селезенка, печень, легкие, почки) обнаруживаются клетки Гоше: крупные, лишенные вакуолей клетки с накопленным цереброзидом. Указанные изменения обнаруживаются и в нейронах мозга.

Характерными чертами острой детской церебральной болезни Гоше III типа (15%) с дебютом заболевания в первом полугодии жизни являются увеличенный живот вследствие гепатоспленомегалии в сочетании с неврологическими нарушениями. Смерть, обычно, наступает в возрасте до одного года от дыхательных расстройств в результате аспирационных бронхопневмоний.

Все типы болезни Гоше обусловлены наследственной недостаточностью глюкоцереброзидазы – фермента, участвующего в расщеплении глобозида, важного липидного компонента красных кровяных клеток. При всех типах болезни Гоше содержание иммунологически идентичных форм глюкоцереброзидазы в селезенке, примерно, одинаково, в то время как каталитическая активность фермента при взрослых нецеребральных формах составляет около 15%, а при неврологических формах типа II и III - только 2-3% от нормального уровня.

Для лечения больных с болезнью Гоше применяется препарат церизим. Чем раньше начато лечение, тем с большей вероятностью можно предотвратить развитие заболевания и инвалидизацию больных.

2.6.3.4. Мукополисахаридозы

Другим примером лизосомных болезней накопления являются мукополисахаридозы – обширная группа аутосомно-рецессивных болезней, обусловленных мутациями в генах лизосомных ферментов, участвующих в деградации гликозаминогликанов (или мукополисахаридов). Впервые заболевание этой группы было описано в 1917 году Гурлером. Вследствие недостаточности этих лизосомных ферментов во многих органах и системах

больных происходит накопление избыточного количества частично деградированных гликозаминогликанов. Гликозаминогликаны это углеводные структуры, ковалентно связанные с протеогликанами – основными после коллагенов белковыми компонентами соединительной ткани, на долю которых приходится до 30% ее сухой массы. Гликозаминогликаны различаются по типам и протяженности, их количество также различно в разных протеогликанах.

В качестве примера, более подробно остановимся на мукополисахаридозе I типа, включающем *синдромы Гурлера, Шейе и Гурлера/Шейе*. Все три заболевания обусловлены мутациями в гене альфа-L-идуронидазы (IDUA), гидролизующей терминальные остатки альфа-L-идуроновой кислоты дерматан- и гепаран-сульфата. Синдром Гурлера является наиболее тяжелой формой мукополисахаридоза I. Типичны гротескные черты лица, помутнение роговицы, умственная отсталость, грыжи, множественный дизостоз, тугоподвижность суставов и гепатоспленомегалия. Характерные клинические проявления дебютируют уже в первые месяцы жизни пациента.

Синдром Шейе характеризуется тугоподвижностью суставов, помутнением роговицы, наиболее выраженным в периферических отделах, аномалией развития аортального клапана и практически сохранным интеллектом. Клинические проявления синдрома Шейе настолько умеренны, что, порой, диагноз выставляется достаточно поздно, в большинстве случаев между 10 и 20 годами. Типичный фенотип формируется, обычно, после 5-летнего возраста. Прогноз для жизни благоприятный.

Клинические особенности синдрома Гурлера-Шейе включают нанизм, помутнение роговицы, тугоподвижность суставов, пупочную грыжу, множественный скелетный дизостоз, гепатоспленомегалию и умеренную олигофрению. Полные фенотипические проявления формируются от 3 до 8 лет. Прогноз для жизни удовлетворительный, больные доживают до взрослого возраста.

Спектр мутаций в гене альфа-L-идуронидазы у больных синдромами Гурлера и Шейе существенно различается. В первом случае чаще всего идентифицируют нонсенс-мутации, две из которых - W402X и Q70X, являются мажорными. Частота первой среди больных превышает 30%, частота второй мутации достигает 15%. Вместе эти две мутации составляют около половины всех известных мутантных аллелей гена IDUA. Кроме того, при этом заболевании зарегистрированы другие нонсенс-мутации и делеции со сдвигом рамки считывания. В гомозиготном состоянии эти мутации встречаются у пациентов с самыми тяжелыми клиническими формами заболевания и, как правило, они приводят к полному отсутствию активности альфа-L-идуронидазы. Тяжелые мутации, сопровождающиеся преждевременной терминацией трансляции, в компаунде с мутациями других типов могут присутствовать у пациентов с самыми различными формами мукополисахаридоза I. Первой специфической мутацией, идентифицированной у пациента с типичной клиникой синдрома Шейе, является G-T-замена в интроне 5 гена IDUA, создающая дополнительный сайт сплайсинга, в результате чего происходит инсерция дополнительных пяти нуклеотидов в специфическую мРНК. Подобное нарушение совместимо с образованием небольшого числа функционально активных мРНК, при этом полного блока синтеза альфа-L-идуронидазы не происходит. Поэтому даже в компаунде с мутациями нонсенс-типа этот дефект сплайсинга реализуется в виде синдрома Шейе. Кроме этого мутантного аллеля у пациентов с синдромом Шейе идентифицировано несколько миссенс-мутаций в гене IDUA. Таким образом, синдромы Гурлера и Шейе представляют собой классический пример фенотипического разнообразия, обусловленного существованием аллельных серий.

2.6.3.5. Аденогенитальный синдром

Примером наследственного нарушения обмена стероидных и глюкокортикоидных гормонов является аденогенитальный синдром или врожденная гиперлазия надпочечников. Заболевание впервые описано в 1886

году J. Phillips. Частота адреногенитального синдрома по данным разных авторов составляет 1 на 5000 – 15000 новорожденных, частота гетерозиготного носительства 1 на 20-50 человек. Только в середине прошлого века были раскрыты патогенез и характер гормональных нарушений при этом заболевании. При адреногенитальном синдроме наблюдается гиперплазия коры надпочечников, что ведет к патологической концентрации кортизола в ответ на стимуляцию адренокортикотропного гормона. Это связано с уменьшением или отсутствием ферментативной активности на некоторых стадиях синтеза стероидов. За дефицитом каждого из ферментов следует специфическая для данного нарушения клиническая картина заболевания. В настоящее время описано 5 клинических вариантов адреногенитального синдрома – рис. 38.

Рисунок 38. Метаболизм стероидов и генетические варианты адреногенитального синдрома

Около 90% всех случаев заболевания относится к дефициту ключевого фермента биосинтеза гормонов коры надпочечников – 21-гидроксилазы, обусловленному мутациями в гене *CYP21A2* (так называемый синдром дефицита 21-гидроксилазы – СД21-Г). В редких случаях у больных идентифицированы мутации в генах, кодирующих другие ферменты биосинтеза глюкокортикоидов и минералокортикоидов. При этом варианте наблюдается уменьшение уровня кортизола в плазме крови, вызванное нарушением превращения 17-гидрооксипролина в 11-дезоксикортизол (11-ДОК). Это в свою очередь вызывает избыточную секрецию адренокортикотропного гормона (АКТГ) и далее повышение продукции предшественников кортизола, андрогенов и половых стероидов.

Подобные дефекты гормонального метаболизма приводят, прежде всего, к нарушениям развития в области половой сферы. Заболевание характеризуется значительной клинической гетерогенностью. Классические варианты делятся на тяжелую сольтерющую и более легкую простую

вирильную формы. В первом случае у больных наблюдаются выраженные нарушения солевого обмена в виде гипонатриемии и гиперкалиемии, которые у новорожденных или в раннем неонатальном периоде могут приводить к летальным сольтеряющим кризам. Нарушения солевого метаболизма сопровождаются различными пороками развития наружных половых органов, выраженность которых зависит от степени остаточной активности дефектного фермента. При простой форме заболевания, которая клинически проявляется в виде изолированной вирилизации наружных половых органов, не наблюдается грубых нарушений гормонального метаболизма, так как происходит компенсация частичной недостаточности 21-гидроксилазы. Неклассические или взрослые варианты включают различные нарушения полового созревания в подростковом или пубертатном возрасте в виде гирсутизма, акне, аменореи, бесплодия. В некоторых случаях подобные патологические состояния у больных женщин развиваются после рождения ребенка. Выделяют также позднюю неклассическую и латентную бессимптомную формы заболевания.

Первая форма составляет 1/3 всех случаев заболевания. У девочек с рождения наблюдаются признаки маскулинизации вплоть до трудности определения пола ребенка, что диктует немедленное исследование кариотипа или хотя бы полового хроматина. У мальчиков вирильная форма диагностируется с 5 лет и старше при появлении признаков преждевременного полового развития. Опережение физического и полового развития может быть причиной неадекватного поведения, психических нарушений, преимущественно эмоционально-волевой сферы. У взрослых больных наблюдается олигоспермия (пониженный объем эякулята) и бесплодие. У девочек – гиперпигментация в области гениталий и грудных желез.

При сольтеряющей форме кроме вышеуказанных симптомов уже в периоде новорожденности ребенка наблюдаются срыгивания, упорная рвота, потеря веса, признаки эксикоза; характерно развитие коллаптоидных кризов

с цианозом и бледностью, потливостью, потеря сознания, иногда судороги. Характерна внезапность возникновения кризов, длительность которых может варьировать от нескольких минут до получаса. Необходимо отметить, что данные кризы, протекающие с недостаточностью кровообращения, могут приводить к гибели больного. В крови отмечается гиперкалиемия, метаболический ацидоз, может быть гипогликемия.

При третьей поздней неклинической форме у новорожденных девочек отсутствуют признаки вирилизации. Первые проявления патологии манифестируют в подростковом возрасте. Для девочек характерно раннее менархе (возраст наступления первой менструации), до развития молочных желез, гирсутизм, маскулинное телосложение. Для мальчиков - ускорение костного возраста с ранним закрытием ростовых зон, преждевременное оволосение лобковой области. Клинические проявления четвертой латентной формы заболевания отсутствуют, хотя, как и при других формах, в сыворотке крови наблюдается умеренное повышение предшественников кортизола, включая 17-гидрооксипролин.

Ген *CYP21A2* расположен в коротком плече хромосомы 6 (6p21.3) в области локализации HLA-генов класса III. Эта область отличается высокими рекомбиногенной и мутагенной активностями. В частности, в непосредственной близости от гена *CYP21A2* расположен псевдоген *CYP21A1P*, неактивный вследствие наличия целой серии мутаций. Спектр мутаций в гене *CYP21A2* у больных адрено-генитальным синдромом хорошо изучен. Широкое распространение в разных популяциях имеют крупные делеции, включающие весь ген *CYP21A2*, мутации, гомологичные тем, которые присутствуют в псевдогене *CYP21A1P* и «химерные» конструкции, состоящие из фрагментов гена *CYP21A2* и псевдогена *CYP21A1P*. При различных классических вариантах адреногенитального синдрома – сольтеряющей и простой – выявляются разные мажорные мутации. В первом случае самой частой является делеция всего гена (*delA2*), присутствующая почти у половины отечественных больных, в то время как во втором случае

на первое место выступает сплайсинговая мутация (28%). Среди пациентов с подозрением на неклассический вариант врожденной гиперплазии коры надпочечников мутации идентифицируются примерно в 10% хромосом больных. Интересно отметить, что у больных адреногенитальным синдромом идентифицированы два типа химерных конструкций между геном *CYP21A2* и псевдогеном *CYP21A1P*, причем одна из них является полиморфной, так как ее частота в отечественной популяции достигает 6%. Но еще выше – около 15% – эта частота оказывается среди больных с неклассической формой врожденной гиперплазии коры надпочечников, подтвержденной биохимическим тестированием. При этом общая частота двух «химерных» конструкций в хромосомах этой группы больных составляет 25%.

Еще более высокая частота полиморфной «химерной» конструкции обнаруживается в хромосомах женщин с идиопатической андрогенизацией – 28,5%, а суммарная частота обеих «химерных» конструкций в хромосомах этих больных составляет 38%, что, безусловно, указывает на ассоциацию этого состояния с присутствием гетерозиготных «химерных» конструкций между геном *CYP21A2* и псевдогеном *CYP21A1P*.

Во многих медико-генетических центрах страны проводится скрининг среди новорожденных для раннего выявления больных адреногенитальным синдромом (глава 2.9.3). При всех формах адреногенитального синдрома применяется заместительная терапия минерало-, глюкокортикоидными препаратами, в зависимости от формы заболевания – симптоматическая терапия.

2.6.3.6. Гепатолентикулярная дегенерация

Гепатолентикулярная дегенерация (гепатоцеребральная дистрофия, болезнь Вильсона-Коновалова) относится к классу аутосомно-рецессивных болезней обмена металлов. Впервые болезнь была описана в 1912 году английским невропатологом С. А. К. Вильсоном. Распространенность заболевания по данным разных авторов составляет от 0,6 до 3 больных на 100000 населения, частота гетерозиготного носительства равна 1:200.

Болезнь обусловлена наследственным дефектом одной из медь-транспортирующих АТФаз Р-типа – Atp7b. Таким образом, в основе патогенеза гепатолентикулярной дегенерации лежит нарушение транспорта и метаболизма меди, которая не утилизируется тканями организма, а накапливается в токсических концентрациях, главным образом, в печени, головном мозге, почках. Специфическая окислительная способность меди используется при нормальном функционировании около 30 различных белков, включая электрон-транспортирующие ферменты. Вследствие нарушения гомеостаза меди эта же окислительная способность может индуцировать продукцию высоко активных свободных радикалов, представляющих большую угрозу для клеток.

Наиболее медетропными органами являются печень и подкорковые экстрапирамидные структуры головного мозга. Поэтому ведущими клиническими проявлениями гепатолентикулярной дегенерации являются нарушения функциональной способности печени (вильсоновский хронический гепатит) и экстрапирамидная подкорковая недостаточность, что выражается в варьирующих по степени тяжести гиперкинезах и мышечной экстрапирамидной ригидности. Характер соматических и неврологических клинических проявлений и последовательность их развития обуславливают форму гепатолентикулярной дегенерации, тяжесть и прогноз течения болезни. По стадиям гепатолентикулярную дегенерацию можно разделить на преклиническую и клиническую: печеночную и/или преневрологическую и неврологическую. При гепатолентикулярной дегенерации первично в различной степени поражается функция печени. Н. В. Коновалов (1960) выделил 5 форм заболевания: абдоминальную (печеночную), ригидно-аритмогиперкинетическую (раннюю), дрожательно-ригидную, дрожательную и экстрапирамидно-корковую. При последних 4-х формах вильсоновский гепатит может протекать латентно, то есть без видимых клинических признаков поражения печени. Манифестация висцеральных проявлений гепатолентикулярной дегенерации наблюдается у больных в

возрасте 12 +/- 8 лет и неврологических – в возрасте 23 +/- 6 лет. Характерным только для гепатолентикулярной дегенерации является сочетание наличия медных роговичных колец Кайзера-Флейшера с резким снижением уровня в сыворотке крови церулоплазмينا (ЦП) – основного медьсодержащего альфа₂-гликопротеина, синтезируемого, главным образом, в печени. У позвоночных от 90% до 95% плазменной меди связано именно с этим белком. Кроме медь-транспортирующих функций церулоплазмин обладает оксидазной активностью по отношению к железу и ароматическим аминам, а также супероксиддизмутазной активностью.

По нашему опыту кольца Кайзера-Флейшера формируются у больных, в среднем, к 18-20 годам. У детей в периоде преклинической стадии вокруг радужки глаз при осмотре ее через щелевую лампу или еще нет никаких пигментных элементов или регистрируются отдельные пигментные вкрапления. Уровень ЦП в крови в норме равен 300-400 мг/л, что устанавливается примерно к 2-х летнему возрасту. До этого времени уровень ЦП низкий, и это необходимо учитывать при диагностике гепатолентикулярной дегенерации у детей. В детском возрасте диагноз гепатолентикулярной дегенерации можно ставить по высокому содержанию меди в образце печени, полученном методом биопсии. В любом возрасте возможна молекулярно-генетическая диагностика гепатолентикулярной дегенерации. Идентификация мутаций в семье больного позволяет проводить пренатальную диагностику гепатолентикулярной дегенерации при последующих беременностях.

Гепатолентикулярную дегенерацию необходимо выявлять в преклинической и/или преневрологической стадии среди sibсов больного, среди больных юношеского возраста с диагнозом хронический гепатит при отрицательных вирусологических тестах, у больных до 35-40 лет с диагнозом гиперкинетическая форма рассеянного склероза и постэнцефалитический паркинсонизм, а также среди пациентов с различными формами экстрапирамидной подкорковой недостаточности.

Ген *ATP7B*, мутантный при гепатолентикулярной дегенерации, был независимо открыт в 1993 г. сразу в нескольких лабораториях США. Предполагается, что основные функции продукта гена *ATP7B* (*Atp7b*) ассоциированы с инкорпорацией меди в апо-церулоплазмин и выведением ее избытка в желчные пути. Различные мутации в гене *ATP7B* могут в разной степени затрагивать каждую из этих функций, и это в определенной степени объясняет наблюдаемый клинический полиморфизм заболевания. Однако и другие неизвестные пока факторы могут влиять на характер течения гепатолентикулярной дегенерации, так как описаны семьи, в которых больные, имеющие одинаковые мутации, отличались как по дебюту заболевания, так и по его клиническим проявлениям. В настоящее время идентифицировано более 200 мутаций в гене *ATP7B*, причем различные этнические группы и популяции существенно различаются по спектру этих мутаций. Чаще всего встречаются миссенс-мутации, среди которых мутация His1069Gln – замещение гистидина на глутамин в 1069 положении белка – является наиболее распространенной. Частота этой мутации в центральной Европе составляет 30-40%, в то время как в странах Восточной Европы она достигает 40-60%. Более чем у 60% больных славянского происхождения эта мутация присутствует либо в гомозиготном, либо в гетерозиготном состоянии. Таким образом, высокая диагностическая значимость мутации His1069Gln для отечественных больных гепатолентикулярной дегенерацией совершенно очевидна.

Лечение больных комплексное и состоит из двух компонентов. Первый – применение препаратов, способствующих нормальному обмену меди; второй – проведение мероприятий по стабилизации функциональной способности печени, симптоматическая терапия поражения головного мозга. Первая задача выполняется с помощью пенициллина и его аналогов (купренил, металкаптаза и др.), обладающих хелатным (связывающим) действием по отношению к солям меди. Препарат снижает уровень пиридоксина, вызывая дефицит этого витамина. Побочным действием этого

дефицита может быть появление экстрапирамидной симптоматики. Поэтому при назначении пеницилламина непременно рекомендуется назначение пиридоксина. У отдельных больных пеницилламин вызывает лейкопению и тромбоцитопению, кровоизлияние в легкие и почки, аллергодерматит. Протектором поступления солей меди через кишечник с пищей являются соли цинка, которые применяются у больных гепатолентикулярной дегенерацией, как с профилактической, так и с лечебной целью (порошок сульфата цинка по 150 мг по 2-3 раза в день, обязательно запивать молоком). Мы убеждены, что больные гепатолентикулярной дегенерацией должны наблюдаться невропатологом совместно с гепатологом, так как второй компонент заключается в применении всего арсенала средств, направленных на осуществление оптимальной функциональной способности печени. При выполнении адекватной терапии в 85% случаев можно достигнуть положительных результатов. Больные из состояния соответствующего I-II групп инвалидности переводятся на III группу. При лечении больных в преклинической стадии можно предотвратить манифестацию гепатолентикулярной дегенерации.

На рис. представлена родословная семьи с гепатолентикулярной дегенерацией.

Мутации в гене *ATP7A*, кодирующем другую родственную медь-транспортирующую АТФазу Р-типа – *Atp7a*, являются причиной развития редкого X-сцепленного рецессивного заболевания, также обусловленного нарушением транспорта меди – *болезни Менкеса*. Клинические особенности болезни Менкеса определяются дефицитом меди, возникающим вследствие ее аномального транспорта из клеток тонкого кишечника в клетки, вовлеченные в синтез медь-зависимых белков. Первые симптомы заболевания появляются уже в периоде новорожденности в виде нарушения терморегуляции – гипотермии, транзиторной желтухи, плохой прибавки массы тела. В последующем быстро появляются приступы судорог, устойчивых к антиконвульсантной терапии. Изменения со стороны

центральной нервной системы характеризуются прогрессирующей деменцией в сочетании со спастическими параличами. Витальный прогноз крайне неблагоприятен: дети погибают, как правило, в возрасте до 3 лет. При патологоанатомических исследованиях обнаруживают атрофию тканей мозга, расширение желудочков, очаги дегенерации, деструкцию паренхимы, глиоз. Высокоинформативным клиническим симптомом, позволяющим заподозрить болезнь Менкеса, является состояние волосистой части головы. Волосы в типичном случае редкие, ломкие, скрученные (закрученные вдоль продольной оси), нередко светлые. Аллельным вариантом болезни Менкеса является X-сцепленная форма *cutis laxa*, называемая также *синдромом затылочного рога*.

Долгое время обсуждалась гипотеза о причастности к болезни Вильсона-Коновалова мутаций в гене церулоплазмينا – *СР*. Однако оказалось, что мутации в гене *СР*, сопровождающиеся полной или частичной ацерулоплазминемией, связаны с другим аутосомно-рецессивным заболеванием – *системным гемосидерозом*. Болезнь характеризуется острой прогрессирующей деменцией, дебютирующей в среднем или пожилом возрасте, в сочетании с диабетом, экстрапирамидными нарушениями и пигментной дегенерацией сетчатки. Патология развивается вследствие накопления высоких концентраций железа во многих органах, но больше всего в тканях мозга, печени, поджелудочной железы. При этом концентрация свободной меди в сыворотке крови и в других органах сохраняется в пределах нормы. Таким образом, ацерулоплазминемия относится к классу наследственных болезней метаболизма железа.

Не все наследственные болезни обмена наследуются по аутосомно-рецессивному типу. Мутантные гены некоторых из них локализованы в X-хромосоме, и они наследуются по X-сцепленному рецессивному типу.

Глава 2.7. Сцепленные с полом заболевания

При X-сцепленном типе наследования мутантный ген расположен в X-хромосоме. Если при этом мутация обладает доминантным эффектом, то больными могут быть как мужчины, так и женщины. Однако от больного отца заболевание с вероятностью 100% передается только девочкам, но не мальчикам, получающим от отца Y-хромосому. Вероятность передачи доминантной X-сцепленной мутации от больной матери детям составляет 50%, причем болезнь с равной вероятностью может быть унаследована как дочерью, так и сыном.

Гораздо чаще X-сцепленные заболевания наследуются по рецессивному типу. Отличительным свойством рецессивных X-сцепленных заболеваний является то, что в семье болеют мужчины, а мутантный аллель они наследуют от своей здоровой гетерозиготной матери. Такие матери могут иметь больных братьев. Больные мужчины могут передавать свое заболевание только через поколение и только внукам (но не внучкам) через свою здоровую, но гетерозиготную дочь. Таким образом, если проследить в родословной наследование по мужской линии рецессивного X-сцепленного заболевания, то получится что-то вроде «хода шахматного коня».

Высока вероятность присутствия X-сцепленного рецессивного заболевания у женщин с синдромом Шерешевского-Тернера (45,X0). Так как они имеют только одну X-хромосому, то вероятность этого события равна частоте гетерозиготного носительства соответствующей мутации в популяции. Очень редко больными могут быть гомозиготные женщины, унаследовавшие одну из гомологичных мутаций от матери, а вторую либо от больного отца, либо от здорового отца, у которого мутация возникла *de novo*. Не менее экзотической является ситуация, когда больными оказываются гетерозиготные женщины, у которых второй гомолог мутантного гена разрушен в результате транслокации или иной хромосомной перестройки, точка разрыва которой в X-хромосоме локализована в области мутантного гена. Но подчеркнем еще раз, при X-сцепленном рецессивном наследовании в подавляющем большинстве случаев болеют только мужчины.

2.7.1. Фосфатдибет

К доминантному, сцепленному с X-хромосомой, типу наследования относится витамин Д-резистентный рахит (синонимы: гипофосфатемия, семейная-X-сцепленная гипофосфатемия, фосфатдибет, синдром Олбрайта-Баттлера-Блюмберга), частота которого в среднем составляет 1 : 20 000 детского населения.

Ген фосфатдиабета PEX-ген локализован в X-хромосоме (Xp22.2). В результате мутаций в этом гене возникает дефицит белков, регулирующих транспорт кальция и фосфора в почечных канальцах и, возможно, в кишечнике с развитием гипофосфатемии и в части случаев гиперфосфатурии. Нарушение фосфорно-кальциевого обмена приводит к деминерализации костей, развитию рахитоподобных деформаций скелета и задержке роста.

Болезнь чаще всего дебютирует на 2-3-м году жизни, однако, в некоторых случаях первые ее симптомы могут манифестировать как на 1-м году жизни ребенка, так и в возрасте 7-8 лет. Основными клиническими симптомами фосфатдиабета являются непропорционально маленький рост, деформации нижних конечностей, гипофосфатемия, повышение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови, гипофосфатурия при нормальном выделении кальция в моче. Для диагностики заболевания очень важное значение имеют данные родословной: наличие фосфатдиабета у кого-либо из родителей больного или родственников по отцовской или материнской линии. При рентгенографии трубчатых костей конечностей наиболее выраженные изменения наблюдаются в эпифизах нижних конечностей, концы костей расширены, слабо очерчены, часто имеют бокаловидные углубления, в грубо искривленных диафизах зоны остеопороза чередуются с зонами остеосклероза, ядра окостенения эпифизов развиваются нормально. Для лечения больных применяются высокие дозы витамина Д и его синтетические аналоги.

2.7.2. Гемофилия А и В

Наиболее известными X-сцепленными рецессивными заболеваниями являются гемофилии А и В. В основе развития гемофилии А лежат наследственные дефекты, затрагивающие фактор VIII свертывания крови, а при гемофилии В дефектным оказывается IX фактор. Оба гена, кодирующие факторы VIII и IX (F8C и F9), локализованы в длинном плече X-хромосомы в областях Xq28 и Xq27.1-2 соответственно. Известно, что при гемофилии наблюдается нарушение свертывания крови, и самые незначительные порезы могут привести больного без специальной гематологической помощи к летальному исходу. Отметим, что у женщин – носителей мутаций в одном из генов гемофилии (так называемых «кондукторов») в отдельных случаях также наблюдается склонность к кровотечениям, что выражается в обильных месячных, длительных кровотечениях во время родов. Это обстоятельство необходимо учитывать акушерам-гинекологам при работе с женщинами-носителями мутантных аллелей в любом из генов гемофилии А или В.

У девочки заболевание с обсуждаемым типом наследования может быть в двух случаях. Первый – в том случае, если она имеет кариотип 45,X, что бывает при синдроме Шерешевского-Тернера, и эта единственная половая хромосома может оказаться мутантной по одному из генов гемофилии. Не менее экзотической является вторая ситуация, когда мать больной девочки является носителем гена гемофилии, отец же – болен гемофилией. Подобные случаи описаны в литературе, хотя на практике они встречаются крайне редко.

Чаще всего больные мальчики с вероятностью 50% рождаются у женщины, несущей мутацию в любом из генов гемофилии в гетерозиготном состоянии. Дочери такой женщины при здоровом муже всегда здоровы, но с вероятностью 25% могут оказаться, подобно матери, носителями патологической мутации.

Частота гемофилии А составляет 1 : 2500 новорожденных мальчиков, гемофилия В встречается в 10 раз реже гемофилии А. Изолированные случаи

гемофилии А составляют 30%, остальные 70% это семейные варианты. Показано, что мутации в гене *F8C* возникают в сперматогенезе в 3-5 раз чаще, чем в оогенезе. Это значит, что более чем в 80% спорадических случаев мать больного ребенка является носителем мутации, возникшей *de novo* в зародышевых клетках ее отца. Кроме того, около 14% матерей, не являющихся носителями мутации, могут быть соматическими или гонадными мозаиками, и вероятность повторного рождения больного ребенка у них также повышена. В настоящее время возможна пренатальная диагностика гемофилии А и В.

Около 10% всех идентифицированных мутаций в гене *F8C* – делеции одного или нескольких смежных нуклеотидов. Остальные мутации точковые – миссенс- или нонсенс-типа. В гене *F8C* зарегистрировано несколько случаев инсерционного мутагенеза, связанных с перемещением одного из мобильных элементов. Ранее мы уже писали о том, что в 22 интроне гена *F8C* локализованы два других гена *F8A* и *F8B* («ген в гене»), продукты которых функционально не связаны с фактором VIII свертывания крови. Для одного из этих генов – *F8A* – имеется копия, расположенная в противоположной ориентации недалеко от 5'-конца гена *F8C*. Такая организация этого района генома является причиной повышенной частоты возникновения хромосомных перестроек и, в частности, инверсий, которые полностью инактивируют ген *F8C*. Подобные инверсии обнаруживаются у 45% больных с тяжелыми формами гемофилии А.

Гемофилия В обусловлена наследственным дефектным IX фактора – компонента средней фазы внутреннего каскада свертывания крови. В плазме крови фактор IX находится в виде гетеродимера, состоящего из двух полипептидных цепей (легкой и тяжелой), ковалентно связанных между собой одним дисульфидным мостиком. Фактор IX циркулирует в виде неактивной формы до тех пор, пока не произойдет протеолитическое высвобождение его активирующего пептида. После этого фактор IX принимает конформацию активной сериновой протеазы. Его роль в

свертывании крови связана с активацией фактора X посредством взаимодействия с ионами кальция, фосфолипидами мембраны и фактором VIII.

Для гена *F9* также характерна высокая частота возникновения мутаций (4×10^{-6} за поколение), причем мутации значительно чаще возникают в мужских половых клетках, чем женских. Считается, что вероятность получения больным ребенком мутации, возникшей *de novo*, от отца в 11 раз выше, чем от матери. При этом с возрастом вероятность возникновения новой мутаций в гене *F9* у отца повышается. По разным оценкам считается, что в спорадических случаях вероятность гетерозиготного носительства мутации у матери составляет 80%. В 40% случаев при тяжелых формах гемофилии В у больных обнаруживаются делеции в гене *F9* различной протяженности. Точковые мутации в промоторной области гена связаны с более легкими формами заболевания, такими, например, как Лейдоновская гемофилия, при которой у больных к возрасту половой зрелости наступает улучшение многих клинических показателей, и, в частности, исчезает кровотокающий диатез.

2.7.3. Миодистрофия Дюшенна/Беккера

Другим известным примером X-сцепленного рецессивного заболевания является прогрессирующая псевдогипертрофическая мышечная дистрофия Дюшенна/Беккера. Первый вариант заболевания, подробно описанный Г. Дюшенном в 1868 году, представляет собой одну из наиболее частых и злокачественных форм нервно-мышечной патологии детского возраста. Частота заболевания составляет 1 на 3-5 тысяч новорожденных мальчиков. В 1955 году П. Беккер описал более мягкий вариант X-сцепленной прогрессирующей мышечной дистрофии, встречающийся с частотой 1 на 20-25 тысяч лиц мужского пола. В течение долгого времени шли дискуссии о том, являются эти заболевания одной или разными нозологическими формами. В настоящее время убедительно доказано, что это одно

заболевание, обусловленное разными мутациями в одном и том же гене миодистрофии Дюшенна – *DMD*.

Первые признаки миодистрофии Дюшенна появляются в возрасте 2 – 7 лет. Для большинства больных характерна задержка раннего моторного развития. При начале ходьбы (в возрасте 14 месяцев и старше) отмечаются частые падения, неловкость в движениях, быстрая утомляемость. Рано развивается рестракция ахилловых сухожилий – ходьба на носках. Постепенно походка становится переваливающейся, затем появляются затруднения при подъеме по лестнице, вставании из положения на корточках, ходьбе. Развивается псевдогипертрофия преимущественно икроножных и дельтовидных мышц, создающая ложное впечатление атлетического телосложения. Затем псевдогипертрофия трансформируется в гипотрофию. Патологический процесс носит восходящий характер. Первыми поражаются мышцы тазового пояса и проксимальных отделов нижних конечностей, затем мышцы плечевого пояса, спины и проксимальных отделов верхних конечностей. По мере развития заболевания возникают вторичные деформации позвоночника (поясничный гиперлордоз, кифоз, сколиоз), грудной клетки, которая становится седловидной или килевидной, стоп. Формируются «осиная талия», крыловидные лопатки, симптом «свободных надплечий». Постепенно развиваются обездвиженность, рестракции сухожилий, контрактуры суставов. Вместе с уменьшением массы мышц угнетаются рефлексы. Сопутствующим признаком заболевания является кардиомиопатия, которая проявляется в виде гипертрофии левого желудочка и аритмии. Примерно у четверти больных диагностируется олигофрения в степени дебильности. Больные сохраняют способность к ходьбе до 10-12-летнего возраста, после чего передвигаются только с помощью инвалидной коляски. Основной причиной летального исхода в возрасте до 20-25 лет являются интеркуррентные инфекции, которые больной не в силах перенести из-за включения в патологический процесс дыхательной мускулатуры.

Прогрессирующая мышечная дистрофия Беккера дебютирует обычно во второй декаде жизни с появления слабости и утомляемости мышц тазового пояса и ног. Одним из ранних симптомов, проявляющихся у значительного числа больных, являются болезненные мышечные спазмы. Симптомы мышечной дистрофии при двух формах заболевания носят сходный характер, но при форме Беккера выражены значительно слабее. Гипертрофическая или дилатационная кардиомиопатия диагностируется у 50-60% больных. Болезнь носит медленно прогрессирующий характер, инвалидизация наступает чаще всего после 40 лет. При этом интеллект, как правило, сохранен. Больные вступают в брак, имеют здоровых детей, работоспособны.

Картированию гена *DMD* в области Xp21.2, а затем и его и идентификации способствовало описание единичных случаев миодистрофии Дюшенна у девочек. Эти девочки оказались носителями редких транслокаций между X-хромосомой и одной из аутосом, причем таких, которые разрушали ген миодистрофии Дюшенна. Основным продуктом гена *DMD* в мышцах является структурный стержневидный белок дистрофин, принадлежащий к спектрин/ α -актининовому суперсемейству белков цитоскелета. Это полифункциональный белок, обеспечивающий поддержание целостности мембраны мышечного волокна при раундах сокращения-расслабления, а также участвующий в формировании нейромышечного синапса. Дистрофин состоит из четырех доменов и располагается на цитоплазматической поверхности мышечной сарколеммы – рис.

Рисунок . Структура дистрофина и дистрофин-ассоциированного комплекса белков

N-концевой домен дистрофина связан с цитоскелетом мышечного волокна. Затем идет самый крупный домен, обеспечивающий гибкость молекулы. Он имеет структуру трехгранного стержня и образован 24 слегка

повторяющимися мотивами. За стержневым доменом следуют два очень важные в функциональном отношении домена – цистеин-богатый и С-концевой. В области цистеин-богатого домена формируются кальциевые каналы и осуществляется связь дистрофина, а значит и цитоскелета мышечного волокна с внеклеточным матриксом через трансмембранный комплекс дистрофин-ассоциированных белков, которые, в свою очередь, разделяют на два субкомплекса – саркогликановый и дистрогликановый. В области С-концевого домена располагается синтрофиновый комплекс дистрофин-ассоциированных белков, функции которого особенно важны для формирования нейромышечного синапса.

В 65-70% случаев у больных миодистрофией Дюшенна/Беккера диагностируются протяженные внутригенные делеции, затрагивающие несколько соседних экзонов, причем эти делеции характерны для обеих форм заболевания. Различия в их характере заключаются в том, что при миодистрофии Дюшенна делеции сопровождаются сдвигом рамки считывания. В этих случаях дистрофин у больных вообще не образуется. При форме Беккера делеции не нарушают рамку считывания, и дистрофин у больных синтезируется, хотя конечно, он имеет аномалии. Клинические проявления подобных делеций зависят от их протяженности и локализации. Так, например, описан больной с очень мягкой формой миодистрофии Беккера, диагностированной в среднем возрасте (после 40 лет), у которого при молекулярном анализе была выявлена протяженная делеция, затрагивающая более 40% гена. Однако эта делеция была так удачно расположена, что в мутантном дистрофине отсутствовал внутренний участок стержневого домена, в то время как функционально значимые домены 1, 3 и 4 оказались совершенно сохранными. Это и обеспечило такое мягкое течение заболевания. С другой стороны гораздо меньшие по размеру делеции и даже точковые мутации, затрагивающие цистеин-богатый и С-концевые домены дистрофина, могут быть ассоциированы с тяжелой клиникой миодистрофии Дюшенна. В гене *DMD* идентифицированы также другие внутригенные

перестройки (дупликации, микроделеции), а также много нонсенс-мутаций, сопровождающихся преждевременным прекращением синтеза белка. Миссенс-мутации в гене *DMD* встречаются редко. Все идентифицированные у больных мутации приводят к разрушению дистрофин-ассоциированного комплекса белков, что и служит патогенетической основой для развития мышечной дистрофии при этом заболевании.

Молекулярная диагностика делеций в гене *DMD* проводится с использованием мультиплексной (множественной) ПЦР, что позволяет во многих семьях высокого риска проводить профилактику заболевания на базе пренатальной диагностики. В 30% семей мать больного миодистрофией мальчика не является носителем мутации, а болезнь у ее сына развивается в результате спонтанного возникновения мутации *de novo* в процессе оогенеза. Такую ситуацию очень важно диагностировать, так как в этом случае риск повторного рождения больного ребенка может быть значительно меньше и в некоторых случаях не превышает общепопуляционного. Разработаны специальные методы для выявления гетерозиготного носительства мутаций в гене *DMD*, в частности, иммуногистохимический анализ дистрофина в биоптате мышц. Возможна иммунологическая диагностика заболевания с использованием специфических антител на дистрофин.

Серьезную проблему для медико-генетического консультирования представляют случаи гонадного мозаицизма, обусловленного возникновением мутации в первичных половых клетках, то есть на ранних стадиях внутриутробного развития будущей матери. Считается, что 6-7% всех спорадических случаев являются следствием гонадного мозаицизма у матери. При этом оценить величину аберрантного клона ооцитов не представляется возможным. Эмпирический риск повторного рождения больного ребенка в спорадических случаях миодистрофии Дюшенна и при отсутствии доказательств гетерозиготного носительства мутации у матери достигает 14%, и это делает обоснованной пренатальную диагностику заболевания не только в семейных, но и в спорадических случаях. На рис. 6

представлена родословная пробанда М-й, 26 лет, являющейся носителем мутации в гене миодистрофии Дюшенна. Прослежена мутантная хромосома (X-1) у женщин носителей мутации и больных миодистрофией Дюшенна мужчин.

2.7.4. Отцовский или голандрический тип наследования

В редких случаях наблюдается отцовский или голандрический тип наследования, обусловленный присутствием мутаций в генах Y-хромосомы. При этом болеют и передают через Y-хромосому свое заболевание сыновьям только мужчины. В отличие от аутосом и X-хромосомы Y-хромосома несет сравнительно мало генов, немногим менее 100. Большинство из них обуславливают развитие организма по мужскому типу, участвуют в контроле сперматогенеза, роста тела и зубов. В Y-хромосоме есть псевдоаутосомные области, гены в которых имеют гомологов в X-хромосоме. Мутации в этих генах нарушают конъюгацию половых хромосом в мужском мейозе и приводят к бесплодию. Остальные гены, присутствующие только у мужчин, участвуют в контроле детерминации пола и сперматогенеза. Так, на Y-хромосоме находятся гены SRY (sex determining region – определяющий пол участок) и AZF (азоспермии фактор), ответственные за программу половой дифференцировки и сперматогенез. Мутации в любом из этих генов приводят к нарушениям развития яичек и блоку сперматогенеза, что выражается в азоспермии. Такие мужчины страдают бесплодием, и потому их заболевание не наследуется. Y-сцепленные заболевания, как правило, являются результатом мутаций, возникших de novo. Мутациями в одном из генов, расположенных в Y-хромосоме, обусловлены некоторые формы ихтиоза (рыбья кожа) с совершенно безобидным признаком – оволосением ушной раковины.

Глава 2.8. Нетрадиционные типы наследования

В последние десятилетия накопилось много фактов, свидетельствующих о наличии большого числа отклонений от менделеевских типов наследования. В частности, доказано, что имеется

группа наследственных заболеваний, причина которых лежит в неблагоприятии наследственного аппарата половой клетки или поломок в периоде зиготообразования. Эти нарушения не подчиняется законам Менделя. К заболеваниям с нетрадиционным типом наследования, относятся митохондриальные болезни, однородительские дисомии и болезни геномного импринтинга, болезни экспансии, обусловленные присутствием динамических мутаций, а также болезни, вызванные нарушением эпигенетической регуляции генной экспрессии.

2.8.1. Митохондриальный или цитоплазматический тип наследования

Этот тип наследования называют материнским. Известно, что около 5% ДНК находятся в митохондриях - важнейших органеллах клетки, являющихся своего рода энергетической системой и центром клеточного дыхания. Мужские половые клетки, хотя и содержат очень небольшое количество митохондрий, обеспечивающие их подвижность, но не передают их потомству. Поэтому все митохондрии плода, независимо от его пола имеют материнское происхождение. Таким образом, женщина передает свой генетический материал не только через хромосомы, но и с митохондриальной ДНК (мтДНК), причем с равной вероятностью как мальчикам, так и девочкам.

В мтДНК, состоящей из 16569 нуклеотидов, содержится 22 гена тРНК, 2 гена рРНК и 13 генов, кодирующих различные субъединицы комплексов окислительного фосфорилирования. Заметим, что 56 субъединиц этих комплексов кодируются ядерными генами. 7 субъединиц NADH-дегидрогеназного комплекса I дыхательной цепи кодируется митохондриальными генами и около 35 – ядерными. Три субъединицы цитохромоксидазы С кодируется мтДНК и 10 – ядерной. На рис. представлена организация митохондриального генома и указаны мутации, идентифицированные у пациентов с различными типами митохондриальных болезней.

Рисунок . Организация митохондриального генома

Мутации в мтохондриальных генах также могут явиться причиной наследственных заболеваний, которые в большинстве своем носят синдромальный характер, причем мышечная слабость часто занимает ведущее место в структуре синдромального поражения. В значительном проценте случаев при подобных заболеваниях наблюдается гетероплазмия, то есть существование в клетках в различных пропорциях мутантных и нормальных митохондрий. Это связано с особенностями репликации и сегрегации мтДНК. Клиническая картина митохондриальных миопатий складывается из слабости мышц, начинающейся с мышц тазового пояса, и постепенной их атрофии. У больных может наблюдаться гипотония, гипорефлексия, задержка моторного развития, гепатомегалия, макроглоссия. Течение заболевания медленно прогрессирующее.

Мутации в одном из 7 генов NADH-дегидрогеназы комплекса I дыхательной цепи митохондрий являются причиной развития *синдрома Лебера* – наследственной атрофии зрительного нерва, часто сочетающейся с неврологической симптоматикой в виде ранней дистонии, периферической полиневропатии, тремора, атаксии. Заболеванию могут сопутствовать головные боли и сердечная аритмия. Наиболее частыми при синдроме Лебера являются нуклеотидные замены в положениях 11778, 3460, 15257 и 14484 мтДНК.

Другие мутации в мтДНК являются причиной развития *митохондриальных энцефаломиопатий* – мультисистемных заболеваний с преимущественным вовлечением в патологический процесс высокоаэробных постмитотических тканей, таких как сердечная и скелетные мышцы, а также ЦНС. Описаны мутации и в митохондриальных генах тРНК, в частности, при MELAS-синдроме (лактоацидоз в сочетании с инсульт-подобными эпизодами), MERF-синдроме (миоклонус-эпилепсия с «рваными» красными волокнами мышц, образование которых обусловлено скоплением аномальных митохондрий по краю мышечного волокна), CPEO-синдроме

(прогрессирующая офтальмоплегия). Другие мутации в митохондриальных генах тРНК приводят к изолированным миопатиям, кардиомиопатиям или мультисистемным заболеваниям. Некоторые специфические мутации связаны с определенным клиническим фенотипом, тогда как другие мутации в разных семьях могут выражаться по-разному. Подобные мутации часто возникают в гене *MTTL1*, кодирующем лейциновую тРНК. Мутации в этом гене идентифицированы у пациентов с MELAS-синдромом, прогрессирующей офтальмоплегией, миопатией, кардиомиопатией и диабетом в сочетании с глухотой. Примером может служить мутация A3243G в гене *MTTL1*, которая встречается у 80% больных MELAS-синдромом. При этом доля мутантных митохондриальных геномов у больных варьирует от 56% до 95% и значительно выше, чем у их здоровых родственников. Тяжесть течения митохондриальных болезней существенно зависит от уровня гетероплазии. В значительно более редких случаях у больных MELAS-синдромом обнаруживаются мутации в 3271 положении того же гена. С другой стороны, мутации в гене *MTTL1* найдены и при ряде других митохондриальных заболеваний, таких как MERRF-синдром (C3256T), кардиомиопатия с или без мышечной слабости (A3260G, C3303T), энцефаломиопатия (C3252C) и диабет II типа в сочетании с сенсоневральной тугоухостью.

Мутации в митохондриальном гене треониновой тРНК в положении 15924 и 15923 обнаружены у новорожденных, умерших в первые дни жизни от тяжелой дыхательной недостаточности, обусловленной лактоацидозом с выраженными дефектами митохондрий в сердечной и скелетных мышцах. В то же время мутация в положении 15924 выявлена у 11% доноров, а в положении 15923 – не найдена ни в одной из исследованных популяций.

В настоящее время разработаны высокоэффективные методы, позволяющие одновременно сканировать мутации во многих генах мтДНК, а также обнаруживать гетероплазию. С использованием этих методов

показано, что основной причиной митохондриальных энцефаломиопатий являются мутации в генах тРНК.

Вероятность наследственной передачи митохондриальных болезней от больной матери детям зависит от уровня гетероплазмии и при гомоплазмии она достигает 100%.

2.8.2. Однородительские дисомии и геномный импринтинг

Однородительские дисомии обусловлены «ошибочным» получением ребенком двух гомологичных хромосом от одного из родителей. При этом кариотип больного состоит из 46 хромосом или 23 пар, но в одной из них обе гомологичные хромосомы либо материнского, либо отцовского происхождения. Однородительские дисомии могут возникать в результате нарушения процесса расхождения любой из 23 пар хромосом в мейозе в ходе образования мужских и женских половых клеток, а также в митотически делящихся клетках на ранних этапах развития зародыша. В основе патологических процессов, обусловленных однородительскими дисомиями, лежит геномный импринтинг, следствием которого является различное течение заболевания в зависимости от прохождения мутантного аллеля через мужской или женский гаметогенез. Феномен импринтинга обусловлен различной экспрессией в потомстве гомологичных генов, полученных от отца или матери. При локализации генов в так называемых импринтированных участках генома экспрессируется только один аллель – отцовский или материнский, а другой оказывается функционально неактивен. Такая избирательная супрессия активности импринтированных генов происходит при их прохождении через половые клетки. Основную роль в возникновении геномного импринтинга играет избирательное метилирование регуляторных участков генов в процессе сперматогенеза или оогенеза. В настоящее время идентифицировано более 40 генов, подвергающихся импринтингу. Многие из них локализованы в хромосомах 7, 11 и 15. К заболеваниям, обусловленным геномным импринтингом, могут приводить не только однородительские дисомии, но и хромосомные

перестройки в импринтированных участках генома, чаще всего делеции, а также мутации в генах, подвергающихся импринтингу, и в областях генома, контролирующих процессы метилирования хромосом. Итак, для болезней геномного импринтинга характерным является разное клиническое проявление генетических нарушений, затрагивающих один и тот же район генома, в зависимости от того, имеют они материнское или отцовское происхождение.

Удивительными примерами, иллюстрирующими эти положения, являются хромосомные *синдромы Прадера-Вилли и Энгельмана*, обусловленные микроделециями в области 15q11-13.

Синдром Прадера-Вилли впервые описан в 1956 году. Частота заболевания 1:85 тысяч новорожденных. При рождении дети малоподвижны, имеют выраженную мышечную гипотонию, у них снижены сухожильные рефлексы, а также сосательный и глотательный, что затрудняет кормление. Характерными признаками является лицевая дизморфия, малый вес, задержка психомоторного развития. После 6-месячного возраста развивается полифагия (дети постоянно испытывают голод), ожирение (жир откладывается преимущественно на туловище и в проксимальных отделах конечностей), обращают на себя внимание непропорционально маленькие кисти и стопы. В пубертатном периоде отмечается проявление гонадотропного гипогонадизма, снижение когнитивных функций и мягкая олигофрения различной степени выраженности. Больные доброжелательны и безинициативны.

Синдром Энгельмана или «синдром счастливой куклы», описанный впервые в 1965 году, проявляется грубой задержкой психомоторного развития, выраженной олигофренией с недоразвитием речи, судорожными приступами и приступами насильственного смеха. Больные поздно начинают ходить, и их походка напоминает движения куклы. Типичным являются астенический тип телосложения и дизморфические признаки: «птичий нос», микрогнатия.

Долгое время причины столь разного течения заболеваний, обусловленных микроделециями в одной и той же цитогенетической области, оставались неизвестными. С использованием методов молекулярной цитогенетики было показано, что при наследовании больным ребенком микроделеции от матери развивается синдром Энгельмана, а при ее отцовском происхождении – синдром Прадера-Вилли.

У больных синдромом Прадера-Вилли в 70% случаев идентифицируются микроделеции области 15q11-13 отцовского происхождения, а в остальных 25% наблюдаются однородительские дисомии материнского происхождения. И в том и другом случае инактивированными оказываются гены отцовского происхождения, локализованные в области q11-13.

Причиной развития синдрома Энгельмана в 68% является 3-5 Мб делеции в области 15q11-13 материнского происхождения, в 7% - однородительские дисомии отцовского происхождения, в 11% - мутации гена *UBE3A*, локализованного в том же цитогенетическом районе, в 3% - инактивация импринтингового центра и в остальных случаях причины не установлены. Но во всех случаях, когда причины известны, они связаны с инактивацией генов материнского происхождения, локализованных в импринтинговой области.

Таким образом, оба описанных выше хромосомных синдрома обусловлены нарушением эпигенетического контроля экспрессии генов, локализованных в цитогенетической области, подвергающейся геномному импринтингу

2.8.3. Болезни экспансии

К болезням экспансии относятся наследственные заболевания, обусловленные динамическими мутациями. В основе динамических мутаций лежит нестабильность микро- и минисателлитных повторов ДНК, локализованных в значимых областях генов. При болезнях экспансии наблюдается превышение (экспансия) определенного порогового уровня

числа повторяющихся элементов в месте локализации динамической мутации. Подобные экспансии сопровождаются нарушениями работы гена, причем конкретные механизмы этих нарушений различны для разных типов динамических мутаций. Различия определяются, главным образом, двумя факторами: функциональной значимостью того участка гена, где расположен нестабильный повтор, а также характером и функциями самого повтора.

В настоящее время насчитывается более 20 болезней экспансии, подавляющее большинство из них связаны с экспансией тринуклеотидных повторов. Это синдром Мартина-Белл (синдром хрупкой или ломкой X-хромосомы), миотоническая дистрофия, атаксия Фридрейха, целая серия спиноцереbellарных атаксий, хорея Гентингтона и ряд других. Болезни экспансии могут быть аутосомными или X-сцепленными в зависимости от локализации мутантного гена. Механизмы патогенетического действия динамических мутаций зависят от расположения и специфики экспансированного повтора, а тяжесть течения заболевания определяется длиной экспансии. При тяжелых формах заболевания идентифицируются более длинные повторы.

Практически для всех заболеваний, обусловленных динамическими мутациями, характерно поражение головного мозга и особенно подкорковых структур. Поэтому болезни экспансии представляют особую значимость для неврологии. Однако клиническая картина при различных болезнях экспансии достаточно разнообразна. Болезни экспансии имеют много общих особенностей, касающихся не только клинической картины поражения, но механизмов возникновения динамических мутаций, а также молекулярных и биохимических основ патогенеза этих заболеваний. Методология, разрабатываемая для поиска динамических мутаций в геноме человека и идентификации локусов, в которых расположены такие мутации, также, практически, не зависит от типа мутаций и их фенотипического проявления. Единая стратегия используется также при конструировании трансгенных линий животных, моделирующих различные болезни экспансии. Анализ

таких линий обнаруживает общие закономерности и различия в молекулярных механизмах патогенного действия разных типов динамических мутаций.

Впервые подобный тип генетической изменчивости был обнаружен при синдроме Мартина-Белл, называемом синдромом ломкой или фрагильной X-хромосомы. Оказалось, что в 5'-нетранслируемой области соответствующего гена локализован нестабильный микросателлитный CGG-повтор, значительные экспансии которого сопровождается гиперметилированием промоторной области и частичной или полной инактивацией регулируемого гена. Вскоре вслед за этим была обнаружена динамическая мутация при миотонической дистрофии. При этом заболевании огромные CTG-повторы локализованы в 3'-нетранслируемой области мутантного гена. Наиболее вероятный механизм действия этой мутации связан с нарушением структуры хроматина в области удлиненного CTG-повтора. Блокирование работы гена, ответственного за развитие спинальной атаксии Фридрейха, обусловлено значительной экспансией GAA-повтора, расположенного в первом интроне гена. Влияние на функцию гена динамической мутации, расположенной в интронной области, может быть связано с необычным характером регуляции его транскрипции или сплайсинга.

Умеренные экспансии нестабильных CAG-повторов, расположенные в кодирующих областях генов, связаны с группой нейродегенеративных болезней, характеризующихся поздним началом и прогрессирующим течением. В эту группу входят спиноцеребеллярные атаксии, хорей Гентингтона и ряд других заболеваний. Экспансии CAG-повтора значительно меньше, чем экспансии CGG-, CTG- и GAA-триплетов, повторяющихся в мутантных аллелях сотни и тысячи раз. Кроме того, удлинение области локализации CAG-повтора не затрагивает транскрипции. Эти повторы транслируются в протяженные полиглутаминовые треки. Нейродегенеративным процессам при болезнях, вызванных экспансией CAG

повтора, предшествует накопление в ядрах клеток, являющихся первичными сайтами нейропатологии, определенных нерастворимых ядерных и/или цитоплазматических включений, устойчивых к убикитин-опосредованному протеолизу. В дальнейшем клетки с подобными включениями подвергаются апоптозу. Таким образом, болезни экспансии, обусловленные удлинением полиглутаминовых треков, относятся к группе конформационных болезней мозга, о которых мы говорили ранее.

Экспансия минисателлитного 12-нуклеотидного повтора, локализованного в 5'-нетранслируемой области гена *CSTB*, является основной причиной редкой аутосомно-рецессивной прогрессирующей миоклонус-эпилепсии I типа, известной также как болезнь Унферрихта-Лундборга. И наконец, доминантно наследуемая форма прионовой болезни в 50% случаев обусловлена экспансией минисателлитного 24-нуклеотидного повтора, расположенного в кодирующей части гена прионового белка – *PRNP*.

Для многих болезней экспансии характерны следующие особенности наследования (1) доминантный или полудоминантный характер, (2) антиципация – нарастание тяжести течения заболевания в ряду поколений и (3) геномный импринтинг. По аутосомно-рецессивному типу наследуются только атаксия Фридрейха и миоклонус-эпилепсия I типа. Именно при этих двух заболеваниях антиципация не обнаружена. Дифференциальный характер поражения при разных болезнях экспансии, в первую очередь, определяется функциями белков, являющихся первичными биохимическими дефектами, а также различиями в тканеспецифической экспрессии соответствующих генов. Остановимся более подробно на некоторых из этих заболеваний.

2.8.3.1. Синдром Мартина-Белл

Как мы уже писали, впервые динамические мутации были идентифицированы в гене *FRAXA*, мутантном при синдроме Мартина-Белл или синдроме ломкой (фрагильной) X-хромосомы. В клинической картине

этого сцепленного с полом заболевания ведущим симптомом является интеллектуальный дефект различной степени выраженности (IQ 13-75) в сочетании с поведенческими, лицевыми и соматическими аномалиями. У большинства больных встречаются психопатические и речевые нарушения в виде двигательной расторможенности, признаков аутизма, персевераций, эхολалии. В 10-15% случаев наблюдается судорожный синдром. В соматическом статусе пациентов с синдромом Мартина-Белл нередко отмечаются долихоцефалия, макроцефалия, выступающий лоб, удлиненное лицо, крупные, выступающие ("оттопыренные") ушные раковины, эпикант, светлые радужки, нос с клювовидным кончиком, массивный подбородок, крупные кисти и стопы, гипермобильность суставов, макроорхизм. Последний признак, особенно четко выявляемый в постпубертатном периоде, является высокоинформативным симптомом и наряду с умственной отсталостью входит в "фенотипическое ядро" синдрома.

Синдром описан в 1943 году Martin J. и Bell J., его детальная характеристика дана J. Cantu и соавт. в 1976 г. Наиболее существенным в изучении данной проблемы явилось цитогенетическое исследование. При культивировании лимфоцитов больных мужчин в среде, лишенной фолата, в них обнаруживаются цитогенетические изменения в виде перетяжек района 27-28 длинного плеча X-хромосомы. Данный цитогенетический феномен получил название фрагильности (ломкости) X-хромосомы и он служит цитогенетическим маркером заболевания – marXq28. Эта аномалия, хотя и в меньшей степени, выявляется также у женщин – носительниц мутантного аллеля. Распространенность синдрома Мартина-Белл в общей популяции составляет 1:2000 среди лиц мужского пола, то есть это вторая по встречаемости форма умственной отсталости после синдрома Дауна.

Для синдрома Мартина-Белл характерны варьирующая экспрессивность, неполная пенетрантность и полудоминантный характер наследования. Наследственная передача заболевания не подчиняется обычным менделевским законам, что необходимо учитывать при

генетическом консультировании семей. Во-первых, в ряде родословных прослежена передача мутантного аллеля через мужчин, не имеющих выраженных клинических признаков болезни или имеющих очень стертые формы неспецифической умственной отсталости, так называемых, нормальных трансмиттеров. Они составляют 20% среди мужчин, несущих мутантный аллель в гене *FRAXA* (иногда его обозначают как *FMRI*). Во-вторых, у значительного процента гетерозиготных женщин наблюдается варьирующая степень проявления некоторых симптомов заболевания. Так, у 85% матерей больных детей IQ не превышает 85, причем уровень снижения интеллекта коррелирует с экспрессией цитогенетического маркера заболевания (*marXq28*). У 40% облигатных гетерозигот наблюдаются типичные лицевые особенности, более выраженные у взрослых, чем у детей, а также неровные зубы и гипермобильность суставов пальцев. При этом гетерозиготные женщины, получившие мутантный аллель от фенотипически нормального отца-трансмиттера, всегда интеллектуально сохранны. В первичных культурах лимфоцитов таких женщин отсутствуют клетки с фрагильными сайтами или имеется очень небольшой их процент. В отличие от этого, у больных мальчиков следующего поколения интеллект значительно снижен, и количество лимфоцитов с перетяжками в области Xq27-28, в среднем, составляет 29%. Третья особенность наследования синдрома Мартина-Белл заключается в геномном импринтинге, следствием которого является антиципация заболевания при прохождении мутантного аллеля через женский гаметогенез. Эти особенности наследования заболевания получили название парадокса Шермана.

Открытие в начале 90-х годов гена, ответственного за синдрома Мартина-Белл (*FRAAX*), и расшифровка молекулярной природы идентифицированных у больных мутаций позволили полностью объяснить парадокс Шермана. Оказалось, что в промоторной области гена *FRAAX* расположен нестабильный тринуклеотидный повтор CGG. В норме количество этих CGG-триплетов не превышает 40. У больных это число

может увеличиваться до 1000, причем, как правило, увеличение происходит в два этапа. Сначала появляется аллель с числом повторов в диапазоне от 40 до 50 – премутация, который чаще всего и присутствует у нормальных трансмиттеров. При прохождении этого нестабильного повтора через оогенез может происходить дальнейшее достаточно резкое нарастание числа CGG копий с образованием мутации.

При экспансии CGG-повтора наблюдается различная степень метилирования промотора гена *FRAX*, что и приводит к снижению уровня его транскрипции. У пациентов с мягкими формами заболевания наблюдается мозаицизм по метилированию промоторной области гена. Мутантный аллель, по-видимому, неметилирован у нормальных мужчин-трансмиттеров, метилирован только в неактивной X-хромосоме у их дочерей и полностью метилирован у большинства больных сыновей этих дочерей. У некоторых из них наблюдается мозаичная картина по характеру метилирования.

2.8.3.2. Миотоническая дистрофия

Вскоре вслед за тем, как была расшифрована природа молекулярного дефекта при синдроме Мартина-Белл, было показано, что в основе развития миотонической дистрофии лежит другая динамическая мутация – экспансия CTG-повтора, локализованного в 3'-нетранслируемой области гена *DM*. Клиническая картина миотонической дистрофии представляет собой сочетание миотонии, миопатии, сердечно-сосудистых нарушений и эндокринно-вегетативных расстройств. Болезнь дебютирует иногда в детском возрасте, но чаще во втором-третьем десятилетии жизни признаками миотонического спазма и затруднений в разгибании пальцев рук при резких движениях. Течение болезни неуклонно прогрессирующее. На фоне усиливающегося миотонического синдрома развивается мышечная слабость и атрофические проявления, сходные с миопатиями. Первыми слабеют мышцы лица, особенно круговая мышца глаз, века, жевательные мышцы. А также сгибатели шеи и некоторые мышцы конечностей. Слабость и атрофии

мышц возникают одновременно. На ладонях они приводят к своеобразной «обезьянней лапе». Глубокие рефлексy постепенно снижаются и в дальнейшем угасают. Типичны наличие катаракты и различная степень интеллектуальной недостаточности. В разных популяциях заболевание встречается с частотой 1 на 8-40 тысяч, наследуется по аутосомно-доминантному типу. Во многих семьях наблюдается антиципация как по дебюту, так и по тяжести течения. Мужчины болеют в 3 раза чаще, чем женщины.

Ген *DM* расположен в области 19q13.2-3. CTG-повтор в 3'-нетранслируемой области гена *DM* отличается крайней нестабильностью. В норме число триплетов варьирует в пределах от 5 до 30-37. У больных миотонической дистрофией количество CTG-триплетов значительно больше и составляет не менее 50 при наиболее мягких формах болезни, от 100 до 1000 у пациентов с классическим течением и дебютом во взрослом возрасте, в то время как при врожденных формах заболевания оно может достигать 3000. Начальным шагом, предрасполагающим к мутационному событию, по-видимому, является увеличение числа CTG-повторов от 5 до 19-30. Частота этого гетерогенного класса повторов в популяции достигает 10%, и, по-видимому, эти аллели составляют резерв для повторного мутирования. Аллели, связанные с относительно небольшими экспансиями обладают высокой мейотической нестабильностью, что и объясняет наблюдаемую антиципацию в семьях. Наиболее вероятным патогенетическим механизмом миотонической дистрофии является локальное нарушение структуры хроматина в области локализации удлинённого CTG-повтора, которое может приводить к инактивации не только гена *DM*, но и, возможно нескольких других соседних генов. Не исключено, что именно с этим связан высокий плейотропизм заболевания – одновременное вовлечение в патологический процесс нескольких систем.

2.8.3.3. Хорея Гентингтона

Совершенно иной механизм патогенетического действия динамических мутаций лежит в основе развития тяжелых нейродегенеративных заболеваний, таких как *хорея Гентингтона* или спиноцеребеллярные атаксии. В этих случаях причиной заболевания являются относительно небольшие экспансии CAG-повторов, локализованных в кодирующих областях соответствующих генов. Если в норме количество копий CAG-повтора в зависимости от заболевания не превышает 20, максимум 40, то у больных оно может достигать от 40 до 60, максимум 80 триплетов.

Впервые хорея Гентингтона была описана Гентингтоном в 1872 году, причем уже тогда было отмечено, что болезнь носит семейный характер и встречается исключительно на восточном побережье одного из британских островов. Наследуется заболевание по аутосомно-доминантному типу.

Клиника хорей Гентингтона определяется патологическим процессом избирательно поражающим нейроны полосатого тела, обуславливающие двигательные, познавательные и эмоциональные функции. Однако эти структуры не являются единственными, подверженными дегенерации. В процессе многолетнего прогрессирования заболевания в патологический процесс вовлекается паллидарный отдел экстрапирамидной системы, мелкие клетки коры головного мозга и другие структуры. Первые признаки хорей Гентингтона, возникающие в 30-40-летнем возрасте (возможен и более ранний дебют в ювенильном возрасте), проявляются эмоциональной неустойчивостью, раздражительностью, неспособностью длительно сосредоточиться на выполняемой работе. Гиперкинезы, составляющие основное "ядро" клинических проявлений, сначала отмечаются в виде пароксизмов. В развернутой стадии болезни становятся постоянными и исчезают только во время сна. Гиперкинез носит характер хорейческого. Насильственные движения напоминают вначале произвольные сокращения мимической мускулатуры в виде "вскидывания" бровей, зажмуривания глаз, улыбки. Однако они совершаются без желания больного и постепенно принимают характер внезапных размахистых высокоамплитудных

насильственных движений. Гиперкинез артикуляционной мускулатуры приводит к нарушению речи, которая становится невнятной, отрывистой, толчкообразной. Гиперкинезы, начинаясь с лица, шеи, верхней части туловища, верхних конечностей постепенно захватывают нижние конечности. В этот период затрудняется передвижение больного. Походка становится танцующей, появляются лишние движения, затрудняющие ходьбу. В гиперкинез вовлекается вся произвольная мускулатура. Мышечный тонус изменяется, чаще в сторону гипотонии, хотя может оставаться нормальным. Клиническая картина заболевания обязательно включает в себя нарушения со стороны высшей нервной деятельности. Если в начале болезни наблюдаются эмоциональные нарушения, то в дальнейшем появляются признаки нарастающей деменции. Больные становятся легко возбудимыми, раздражительными, а в дальнейшем – агрессивными. Диагностическое значение имеют данные КТ-исследования, обнаруживающие атрофические изменения головного мозга, приводящие к развитию заместительной гидроцефалии. Расширяется субарахноидальное пространство, желудочки мозга. МРТ позволяет обнаружить локальные изменения подкорковых структур мозга, а именно атрофию головки хвостатого ядра, которое страдает наиболее значительно при хорее Гентингтона. Постепенно утрачивается интерес к окружающему. Менее злокачественно протекают формы с поздним дебютом (после 60-70 лет). Наряду с гиперкинетическими проявлениями хорей, описаны акинетико-ригидные формы. Продолжительность жизни больных с начала заболевания составляет 10-20 лет.

Наибольшая распространенность заболевания - 1:10 000, наблюдается в Восточной Англии, где заболевание было впервые описано. Встречаемость заболевания в большинстве европейских стран составляет 4-7 на 100 000, частота гетерозиготного носительства – 1:5000. Различия в частотах заболевания объясняются «эффектом основателя». Реконструирована 12-коленная родословная первой семьи, в которой были описаны больные

хореей Гентингтона. Она насчитывает около 1000 родственников. Примеры подобных семей не являются исключением. Так, в Тасмании наследование болезни Гентингтона прослежено на протяжении 9 поколений. Реконструированы родословные двух очень больших американских семей, одна из них негритянского происхождения, предки другой – выходцы из Германии. Отмечаются значительные межсемейные различия по дебюту и тяжести течения заболевания, хотя и внутри семей наблюдается четко выраженный клинический полиморфизм. Пациенты с ювенильными формами чаще наследуют свое заболевание от отца, чем от матери. Показано, что при наследовании по отцовской линии болезнь дебютирует в более раннем возрасте, протекает тяжелее, в семьях наблюдается антиципация по дебюту и значительно чаще болезнь носит "ригидный", а не "хореический" характер.

Ген хорей Гентингтона – *HD* – расположен в области 4p16.3. Полиморфный тринуклеотидный CAG-повтор локализован в первом экзоне гена недалеко от стартового кодона. В таблице представлены значения CAG-триплетов в гене хорей Гентингтона в норме, у носителей премутации и у больных.

Таблица. 9.
Число CAG повторов в гене *HD* и риск развития хорей Гентингтона

| Число повторов | Риск развития заболевания у обследуемого и его детей |
|----------------|---|
| Менее 28 | Норма |
| 29 -34 | Для обследуемого риска нет, но возможно увеличение числа повторов у детей и возникновение болезни |
| 35 - 39 | Возможно позднее развитие болезни |
| Более 40 | Болезнь |

Мы уже писали, что CAG-триплет кодирует глютамин, поэтому в белке, кодируемом геном *HD*, имеется цепочка из последовательно расположенных глютаминов. Болезнь развивается тогда, когда длина этого полиглютаминового трека становится больше допустимой нормы. Удлиненные полиглютаминовые треки сами по себе или в составе полипептидных цепей способствуют агрегации белков в нейрональных клетках с образованием нерастворимых комплексов. По мере накопления этих белковых агрегатов происходит гибель нейронов по типу апоптоза. Этот процесс носит медленно прогрессирующий характер. Клинически нейродеградация проявляется тогда, когда погибает около 70% нейронов определенного типа. Дальнейшее развитие заболевания идет очень быстро, так как в оставшихся 30% нейронах также произошло накопление нерастворимых белковых комплексов, что и приводит к их резкой деградации. Поэтому для всех нейродегенеративных заболеваний, обусловленных удлинением полиглютаминовых треков, характерны поздний дебют и тяжелое течение, достаточно быстро приводящее к летальному исходу.

Заметим, кстати, что хорея Гентингтона может манифестировать не в 40-50 лет, как это считалось ранее, а уже на 2-3-м десятилетии жизни, а в отдельных случаях намного раньше. Приводим следующее наблюдение, связанное с хореей Гентингтона. Пробанд Б-на С. (родословная на рис.5), 27 лет, обратилась в Лабораторию пренатальной диагностики наследственных заболеваний ИАГ им. Д. О. Отта РАМН (г. Санкт-Петербург) для уточнения диагноза хорей Гентингтона у своего мужа (Ш-2) 29 лет и прогноза состояния дочери (1У-!) 9 лет. Мать (11-3) отца девочки и бабушка (1-!) по отцовской линии страдают хореей Гентингтона. У мужа пробанда с 25 лет наблюдаются гипкеркинезы дрожательного типа и отставание психического развития. При молекулярно-генетическом исследовании выяснилось, что муж пробанда от здорового отца получил 16 CAG-повторов, а от больной матери - 50. Эти данные четко подтверждают наличие хорей Гентингтона у

мужа пробанда (см. табл. 9). Девочка (1У-1) унаследовала от отца нормальное число САG- повторов - 16, но от матери она получила 33 САG-повтора, то есть премутацию. Последнее, к сожалению, не исключает развития заболевания у ее будущих детей, и поэтому при вступлении в брак и беременности ей в обязательном порядке показана пренатальная диагностика хореи Гентингтона. Отметим, что в детском возрасте хорея Гентингтона может протекать в виде эпилептиформноподобных пароксизмов, отставания психического развития и различного типа гиперкинезов. Таким образом, еще совсем недавно считавшаяся геронтологической патологией, хорея Гентингтона может привлекать внимание педиатров. Как мы уже отмечали, заболевание диагностируется пренатально.

2.8.4. Миодистрофия Ландузи-Дежерина как пример заболевания, обусловленного нарушением эпигенетической регуляции экспрессии генов

Лице-лопаточно-плечевая мышечная дистрофия Ландузи-Дежерина – третье по частоте наследственное заболевание мышц после миодистрофии Дюшенна и миотонической дистрофии. Его распространенность составляет примерно 2:100000 населения. Тип наследования – аутосомно-доминантный с пенетрантностью, составляющей около 95%. Мутантный локус *FSHD1* расположен в дистальном конце длинного плеча хромосомы 4 в области 4q35-qter.

Довольно часто болезнь развивается вследствие возникновения мутации *de novo*. Примерно в половине этих случаев наблюдается соматический мозаицизм либо у самих больных, либо у их бессимптомных родителей. Причем, среди больных мозаицизм чаще встречается у мужчин, чем у женщин, однако степень мозаицизма у больных женщин-мозаиков, как правило, оказывается выше, чем у больных мужчин-мозаиков. Риск рождения больных детей у соматических мозаиков, хотя и меньше, чем у гетерозиготных больных, но также повышен. При этом само заболевание у их больных потомков может протекать значительно тяжелее, то есть в этом

случае может наблюдаться антиципация как по дебюту, так и по клиническим проявлениям болезни.

Первые признаки заболевания обычно появляются во второй декаде жизни, хотя возможен и более ранний дебют. Преимущественно поражается мускулатура лица, плечевого пояса и проксимальных отделов верхних конечностей. Характерной чертой является асимметричность поражения. Слабость мускулатуры лица проявляется неполным смыканием век, которое в начале болезни можно увидеть во время сна. Мимика лица становится бедной. Больной испытывает затруднения при наморщивании лба, зажмуривании глаз. Слабеет круговая мышца рта. Особый порядок вовлечения мускулатуры плечевого пояса приводит к формированию симптома «крыловидных» лопаток. Раньше других поражаются трапециевидные, ромбовидные и грудные мышцы. Спустя 15-20 лет после дебюта заболевания может развиваться слабость мускулатуры тазового пояса и проксимальных отделов нижних конечностей. Течение заболевания относительно благоприятное. Больные в течение долгого времени сохраняют способность к самообслуживанию и трудовой деятельности.

В области 4q35 локализован макросателлитный тандемный высоко полиморфный повтор D4Z4. Каждая копия этого повтора размером в 3.3 кб содержит две гомеобоксные последовательности с внутренними стоп-кодонами и два известных повторяющихся элемента, часто вовлеченных в контроль «эффекта положения» (см. 1.14). В норме количество копий этого повтора варьирует от 11 до 100 элементов. D4Z4-повтор обладает высокой рекомбиногенностью, и у 3% населения наблюдается соматический мозаицизм по реорганизациям этой области.

У больных лице-лопаточно-плечевой миодистрофией наблюдаются гетерозиготные делеции в области D4Z4-повтора, сокращающие число его копий до 1 - 10, причем размер этих делеций прямо коррелирует с тяжестью заболевания. Дистальнее D4Z4-повтора найден полиморфный сегмент размером около 10 кб, присутствующий в различных популяциях примерно в

равном соотношении в двух состояниях, обозначаемых 4qA и 4qB. Однако у больных всегда обнаруживается только сегмент 4qA. Таким образом, сокращения D4Z4-повтора, происходящие на фоне 4qA-полиморфизма, и являются причиной развития заболевания. Это уникальный пример влияния полиморфного элемента, локализованного в теломерной области хромосомы, на развитие наследственного заболевания. Интересно подчеркнуть, что в теломерной области длинного плеча хромосомы 10 (10q26) локализован гомологичный D4Z4-повтор, однако его сокращения не являются патогенными.

Область локализации D4Z4-повтора в хромосоме 4 у больных миодистрофией Ландузи-Дежерина оказывается достоверно менее метилирована по сравнению с нормой. По-видимому, гипометилирование D4Z4 является одним из ключевых событий в каскаде эпигенетических нарушений, ведущих к развитию заболевания. Однако прямой зависимости между степенью гипометилирования D4Z4-области и характером течения заболевания не наблюдается.

В D4Z4 найден элемент, специфически взаимодействующий с ДНК-связывающим мультибелковым комплексом. Этот комплекс опосредует транскрипционную репрессию генов, локализованных в области 4q35. По данным некоторых авторов в мышцах больных миодистрофией Ландузи-Дежерина наблюдается гиперэкспрессия нескольких ближайших генов (*FRG1*, *FRG2* и *ANT*), расположенных на расстоянии 100 кб и более от D4Z4-повтора. По-видимому, сокращенный D4Z4-повтор теряет способность взаимодействовать с мультибелковым комплексом, и это приводит к снижению его репрессорной функции по отношению к перечисленным выше генам. Однако результаты исследований экспрессии генов *FRG1*, *FRG2* и *ANT* у больных носят противоречивый характер.

Так, при изучении экспрессионного профиля генов показано, что в мышцах больных достоверно изменен характер экспрессии генов, вовлеченных в миогенную дифференцировку. Многие из них являются

прямыми мишенями транскрипционного фактора MYOD1, участвующего в развитии миофибрилл. Вторая группа генов, аномальная работа которых наблюдается в мышцах больных, связана с регуляцией реакции организма на оксидативный стресс. При этом значимых изменений в экспрессии генов, локализованных в непосредственной близости от цитогенетической области 4q35, не обнаружено, что находится в противоречии с выдвинутой ранее гипотезой о ведущей роли «эффекта положения» в этиологии заболевания.

С использованием современных иммунофлюоресцентных технологий в сочетании с гибридизацией *in situ* показано, что как в нормальных, так и в мутантных клетках на протяжении всего клеточного цикла район хроматина, содержащий локус *FSHD* цитогенетической области 4q35, располагается на периферии ядер. Это наблюдение позволило высказать предположение, что лице-лопаточно-плечевая миодистрофия развивается вследствие нарушения взаимодействий с транскрипционными факторами или модификаторами хроматина, происходящих на ядерных мембранах.

В области D4Z4-повтора найдены два петлевых домена, обеспечивающие прикрепление хроматина к ядерному матриксу. В миобластах больных эта связь значительно ослаблена. В нормальных миобластах D4Z4-повтор и гены *FRG1* и *FRG2* локализованы в разных петлевых доменах, в то время как сокращение D4Z4-повтора у больных приводит к тому, что сам повтор и оба гена оказываются в одном домене. Это означает, что у больных может быть одновременно нарушена локальная структура хроматина и экспрессия генов *FRG1* и *FRG2*.

Чтобы идентифицировать гены, вовлеченные в патогенез лице-лопаточно-плечевой миодистрофии, были сконструированы трансгенные линии мышей с гиперэкспрессией в скелетных мышцах одного из генов *FRG1*, *FRG2* или *ANT*. Только у мышей с гиперэкспрессией *FRG1* развивалась мышечная дистрофия с чертами, характерными для миодистрофии Ландузи-Дежерина. Трансгенные мыши с измененным характером экспрессии генов *FRG2* или *ANT* оказались совершенно

нормальными. Продукт гена *FRG1* является ядерным белком, вовлеченным в сплайсинг преРНК. В мышцах мышей модельной линии с гиперэкспрессией *FRG1*, также как в мышцах больных миодистрофией Ландузи-Дежерина изменен характер альтернативного сплайсинга, по крайней мере, двух генов, вовлеченных в патогенез некоторых наследственных болезней мышц. Это *TNNT3* и *MTMRI*

Таким образом, в отличие от большинства моногенных болезней мутации, вызывающие лице-лопаточно-плечевую миодистрофию, нарушают не структуру или функцию какого-то специфического гена, но транскрипционный контроль одного или нескольких генов. Сложный эпигенетический механизм вовлечен в реализацию этого нарушения. Он включает локальные изменения структуры хроматина и потерю репрессивных комплексов, опосредованные сокращением D4Z4-повтора. Эти нарушения приводят к гиперэкспрессии гена *FRG1* с последующим нарушением сплайсинга преРНК специфических генов, избирательно экспрессирующихся в скелетных мышцах.

Молекулярная диагностика заболевания основана на определении величины D4Z4-повтора и 4A/4B-полиморфизма, локализованных в теломерной области 4q35.

Глава 2.9. Примеры биохимической классификации моногенных заболеваний

Конец XX века и начало нового тысячелетия ознаменовались бурным развитием молекулярной генетики человека, важнейшие достижения которой нашли практическое воплощение во многих областях медицины. Были созданы предпосылки для перехода от классической систематизации наследственных болезней, основанной, главным образом, на клинико-патологических критериях, к молекулярно-генетической, а точнее, биохимической классификации.

В это время были открыты сотни новых генетических вариантов наследственных заболеваний и выявлен огромный клинический

полиморфизм. Достаточно сказать, что для более чем половины моногенных заболеваний найдены аллельные варианты, которые ранее по своим клиническим проявлениям трактовались как самостоятельные нозологические формы. При этом количество болезней, составляющих единую аллельную серию, может колебаться в диапазоне от 2 до 10 и более. С другой стороны, не редкими являются примеры удивительной генетической гетерогенности, когда клинически однородное заболевание на самом деле представляет собой группу генетически гетерогенных болезней, обусловленных мутациями в разных генах, причем количество этих генов в некоторых случаях может достигать одного или даже двух десятков. Диагностика таких заболеваний возможна только на молекулярной основе.

Чаще всего моногенные болезни делят по типам наследования, как это сделано в настоящем издании. Но с клинической точки зрения такое деление мало информативно. Более удобной представляется классификация болезней по системам, несмотря на то, что для многих моногенных болезней характерен плейотропизм, не позволяющий отнести их к какой-то одной системе. Дальнейшее деление болезней, принадлежащих к одной системе, проводят в соответствии с их ведущими клиническими проявлениями. Однако очевидно, что наиболее полезной для понимания молекулярных основ этиологии и патогенеза заболевания является биохимическая классификация, основанная на знании первичных биохимических дефектов. Идентификация огромного числа генов, ассоциированных с наследственными заболеваниями, позволяет уже сейчас проводить подобную классификацию в пределах определенных четко очерченных клинических групп болезней. Мы приведем лишь два примера подобной систематизации: для наследственных болезней мышц и кардиомиопатий, часто ассоциированных с высоким риском внезапной смерти. Общим свойством генов, дефектных при мышечных дистрофиях и кардиомиопатиях, является их экспрессия в скелетных и сердечной мышцах соответственно. Поскольку многие из них экспрессируются в каждой из этих тканей, наборы генов,

мутантных при различных наследственных вариантах кардиомиопатии и скелетной миопатии, в значительной степени перекрываются. Кроме того, многие формы наследственной кардиомиопатии сопровождаются слабостью скелетных мышц, и, наоборот, многие наследственные варианты миодистрофии и миопатии сопровождаются кардиомиопатиями.

2.9.1. Наследственные болезни мышц

Ведущими клиническими проявлениями наследственных болезней мышц – миодистрофий и миопатий – являются атрофия мышц, мышечная слабость, снижение глубоких рефлексов. Вовлечение в патологический процесс мышц тазового и плечевого пояса, проксимальных отделов конечностей, туловища определяет сходство клинических проявлений миопатий, касающееся особенностей передвижения больных, их походки, моторики верхних конечностей. Типичны системность поражения поперечно-полосатых мышц и прогрессирующий характер течения заболеваний. Особенно опасны для жизни больного поражения сердечной мышцы и мускулатуры, участвующей в процессе дыхания. При этом каждое из нозологически самостоятельных заболеваний имеет клинические особенности, позволяющие с достаточной точностью установить диагноз.

Сарколеммные миопатии. Белковые продукты многих генов, связанных с наследственными болезнями мышц, ассоциированы с мембранами мышечных волокон. Основными функциями подобных белков является стабилизация сарколеммы мышечного волокна за счет связывания цитоскелета с внеклеточным матриксом, обеспечение трансмембранного информационного потока, формирование нейромышечного синапса. Подобными функциями обладает располагающийся под сарколеммой мышечного волокна стрежневидный белок дистрофин, дефектный при аллельных миодистрофиях Дюшенна и Беккера, получивших общее название - *дистрофинопатии*. Связь дистрофина с внеклеточным матриксом осуществляется через трансмембранный комплекс дистрофин-ассоциированных белков (рис.). Мы уже писали, что в основе патогенеза

миодистрофии Дюшенна/Беккера лежит разрушение дистрофин-ассоциированного комплекса белков.

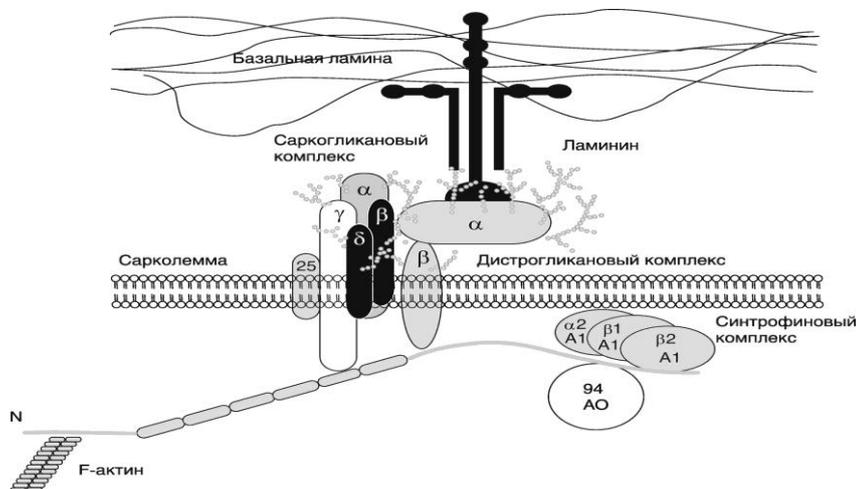


Рис. 1. Дистрофин-ассоциированный комплекс белков

Однако сходный патогенетический механизм лежит в основе аутосомно-рецессивных дюшенно-подобных и некоторых конечностно-поясных миодистрофий. В этих случаях мутантными оказываются гены саркогликанового субкомплекса. В настоящее время гомозиготные инактивирующие мутации у больных с различными формами аутосомно-рецессивных конечностно-поясных миодистрофий – 2С, 2D, 2Е и 2F – найдены в каждом из генов γ -, α -, β - и δ -саркогликанов соответственно.

Конечностно-поясные миодистрофии – это гетерогенная группа заболеваний с преимущественной локализацией дистрофического процесса в мышцах плечевого и тазового пояса. Заболевание обычно начинается в подростковом или юношеском возрасте. Мышечная слабость и утомляемость в сочетании с симметричными атрофиями мышц тазового пояса развиваются постепенно. Больные начинают испытывать затруднения при беге, быстрой ходьбе, прыжках. Затем мышечная слабость распространяется на плечевой пояс и туловище. Меняется осанка, опускаются надплечья,

появляются «крыловидные» лопатки, усиливается поясничный лордоз. Больной ходит, раскачиваясь, с трудом отрывая стопы от пола. Течение заболевания медленно прогрессирующее. Генетическое разнообразие наследственных конечностно-поясных миодистрофий очень велико. В настоящее время идентифицированы мутантные гены для трех аутосомно-доминантных и десяти аутосомно-рецессивных вариантов этих заболеваний. Больные с аутосомно-рецессивными формами имеют более мягкий фенотип и клинически могут быть отнесены к типу Эрба.

Две тяжелые формы конечностно-поясных миодистрофий – 1С и 2В – обусловлены наследственными дефектами связанных с дистрофином белков – кавеолина 3 и взаимодействующего с ним дисферлина. Эти мембранные белки участвуют в сигнальной трансдукции. Каждое из заболеваний представлено в нескольких аллельных вариантах. В частности, аллельным вариантом формы 2В является *дистальная миопатия Миоши*.

Первичным звеном в патогенезе тяжелой врожденной аутосомно-рецессивной *миодистрофии Фукуяма* с прогрессирующей умственной отсталостью также является частичное или полное разрушение дистрофин-ассоциированного комплекса белков. В данном случае причиной для этого служат мутации в гене фермента, участвующего в гликозилировании α -дистрогликана – центрального белка, осуществляющего через β -дистрогликан связь дистрофина с внеклеточным матриксом. Дистрогликаны служат коровыми белками для всего дистрофинового комплекса. Большой экстраклеточный белок α -дистрогликан непосредственно связан с компонентом базальной мембраны ламинином 2 (или мерозином). Взаимодействующий с α -дистрогликаном β -дистрогликан является трансмембранным белком, обеспечивающим закоревание дистрофина на внутренней поверхности сарколеммы. α - и β -дистрогликаны являются продуктами альтернативного сплайсинга одного гена (*DGG*), и их функции настолько важны, что в самом гене *DGG* мутаций не обнаружено. По-видимому, такие мутации не совместимы с жизнью.

По крайней мере, еще три миодистрофии обусловлены мутациями в генах, участвующих в регуляции посттрансляционной модификации дистрогликанов. Это конечностно-поясная миодистрофия 2I, аллельный ей вариант врожденной миодистрофии с неврологическими аномалиями 1C, и врожденная миодистрофия, сочетающаяся с умственной отсталостью 1D. В первых двух случаях дефектным является фукутин-родственная гликозилтрансфераза, а во втором - ацетилглюкозаминилтрансфераза-подобный белок. При этих миодистрофиях также как при миодистрофии Фукуяма, наблюдается вторичное снижение экспрессии α -дисрогликана и частичное или полное разрушение дистрофин-ассоциированного комплекса белков. По этому признаку заболевания могут быть объединены в группу *дисрогликанопатий*.

В скелетных мышцах и в кератиноцитах в реализации связи цитоскелета с мембраной участвует большой структурный якорный белок плектин. Инактивирующие мутации в гене плектина приводят к необычной форме миодистрофии, сочетающейся с буллезным эпидермолизом.

Все перечисленные выше болезни мышц, обусловленные дефектами белков, непосредственно связанных с сарколеммой мышечного волокна, могут быть объединены в одну группу сарколеммных миопатий. В табл. 10 представлена их биохимическая классификация.

Таблица 10.
Биохимическая классификация сарколеммных миопатий

| Классификация | Нозологическая форма, ген, белок | Биохимический дефект |
|-------------------|---|--|
| Дистрофинопатии | Миодистрофия Дюшенна, X-сцепленная; <i>DMD</i> ; дистрофин | дистрофин – ассоциированный с сарколеммой белок цитоскелета |
| | Миодистрофия Беккера; <i>DMD</i> ; дистрофин | |
| Саркогликанопатии | Миодистрофия конечностно-поясная, аутосомно-рецессивная, 2C; <i>SGG</i> ; γ -саркогликан | γ -, α -, β - и δ -саркогликаны – трансмембранные дистрофин-ассоциированные |
| | Миодистрофия конечностно-поясная, аутосомно-рецессивная, 2D; | |

| | | |
|----------------------------------|---|--|
| | <i>SGA</i> ; α -саркогликан | белки |
| | Миодистрофия конечностно-поясная, аутомно-рецессивная, 2E; <i>SGB</i> ; β -саркогликан | |
| | Миодистрофия конечностно-поясная, аутомно-рецессивная, 2F; <i>SGD</i> ; δ -саркогликан | |
| Дистрогликанопатии | Миодистрофия врождённая, прогрессирующая с умственной отсталостью, тип Фукуяма, аутомно-рецессивная; <i>FCMD</i> ; фукутин – гликозилтрансфераза | ферменты посттрансляционного процессинга дисрогликанов – коровых белков дистрофин-ассоциированного комплекса |
| | Уолкера-Варбурга синдром; <i>FCMD</i> ; фукутин – гликозилтрансфераза | |
| | Миодистрофия конечностно-поясная, аутомно-рецессивная, 2I; <i>FKRP</i> ; фукутин-родственный белок | |
| | Миодистрофия врождённая, 1C, с неврологическими аномалиями; <i>FKRP</i> ; фукутин-родственный белок | |
| | Миодистрофия врождённая, 1D; <i>LARGE</i> ; ацетилглюкозаминилтрансфераза | |
| Кавеолинопатии и дисферлинопатии | Миодистрофия конечностно-поясная, аутомно-доминантная, 1C; <i>CAV3</i> ; кавеолин-3 | ассоциированные с мембранами белки, участвующие в сигнальной трансдукции |
| | Болезнь пульсирующих мышц; <i>CAV3</i> ; кавеолин-3 | |
| | Изолированное повышение уровня креатинфосфокиназы; <i>CAV3</i> ; кавеолин-3 | |
| | Миопатия дистальная, недифференцированная; <i>CAV3</i> ; кавеолин-3 | |
| | Миодистрофия конечностно-поясная, аутомно-рецессивная, 2B; <i>DYSF</i> ; дисферлин | |
| | Миопатия дистальная, Миоши; <i>DYSF</i> ; дисферлин | |
| Плектинопатия | Миодистрофия плечевого и тазового пояса с буллезным эпидермолизом, аутомно-рецессивная; <i>PLEC1</i> ; плектин | плектин - структурный белок, соединяющий цитоскелет с мембраной |

Матриксные миопатии. В группу матриксных миопатий могут быть выделены заболевания, обусловленные наследственными дефектами структурных белков внеклеточного матрикса. Это основной структурный белок базальной ламины – мерозин или ламинин 2, непосредственно взаимодействующий с α -дистрогликаном, и его рецептор - интегрин $\alpha7 \beta1D$.

Мутации в генах, кодирующих эти белки, являются причиной развития двух аутосомно-рецессивных миопатий, одна из которых – *мерозин-дефицитная* – является наиболее частой среди врожденных миопатий. Врожденные непрогрессирующие миопатии традиционно выделяют в самостоятельную клиническую группу. В классическом варианте клинические проявления ограничиваются только скелетными мышцами. Болезнь проявляется мышечной слабостью гипотонией, задержкой моторного развития. Дети поздно начинают садиться и ходить, при этом оказываются неспособны передвигаться по неровной местности и на большие расстояния. В сыворотке крови наблюдается повышенное содержание кретинкиназы.

К матриксным миопатиям можно отнести генетически гетерогенные аутосомно-доминантные врожденные миопатии Бетлема и Ульриха, часто сочетающиеся с множественными контрактурами суставов и кардиомиопатией. Эти аллельные заболевания, как мы уже писали ранее, обусловлены дефектами трех разных α -субъединиц микрофибриллярного коллагена VI типа, выполняющего в мышцах роль моста между клетками и внеклеточным матриксом.

Ламинаопатии. Нарушения структуры белков ядерной ламина миофибрилл ассоциированы с другой группой мышечных дистрофий, получивших название ламинаопатии. Это X-сцепленная, аутосомно-доминантная и аутосомно-рецессивная формы *мышечной дистрофии с контрактурами Эмери-Дрейфуса*, которые клинически протекают сходным образом. Начальные признаки заболевания отмечаются в возрасте 4-5 лет. Поражаются мышцы тазового пояса при интактности дистальных сегментов. Рано развиваются ретракции ахилловых сухожилий, а в последующем контрактуры в локтевых суставах. Часто болезнь сопровождается кардиомиопатией с нарушением сердечной проводимости. Нередко причиной летального исхода является остановка сердечной мышцы. При наиболее частой X-сцепленной форме заболевания дефектным оказывается ядерный ламина-ассоциированный белок, получивший название эмерин.

Аутосомные формы миодистрофии Эмери-Дрейфуса обусловлены мутациями в гене *LMNA*, кодирующим два белка ядерной ламины, образующихся в результате альтернативного сплайсинга – ламины А и С. Оба эти белка, относящийся к классу промежуточных филамент ядерной ламины, взаимодействуют с эмерином. При этом они настолько полифункциональны, что различные мутации в кодирующем их гене *LMNA* приводят к широкому спектру аллельных заболеваний, включающих, наряду с мышечными дистрофиями, различные варианты липодистрофии, полинейропатии, мандибулоакральной дисплазии и целую серию прогерических синдромов – табл. 11.

Таблица 11.

Клинический полиморфизм ламинопатий

| Нозологическая форма, | Ген, локализация | Белок, функции |
|---|---------------------|--|
| Миодистрофия Эмери-Дрейфуса, Х-сцепленная, | EMD | эмерин – ядерный ламина-ассоциированный белок |
| Миодистрофия конечностно-поясная, аутосомно-доминантная, 1В | Xq28 LMNA, | ламин А/С – относящийся к классу промежуточных филамент структурный белок ядерной ламины - фиброзного слоя, выстилающего внутреннюю ядерную мембрану и служащего каркасом для ядерной оболочки |
| Миодистрофия Эмери-Дрейфуса, аутосомно-доминантная | 1q21.2 | |
| Миодистрофия Эмери-Дрейфуса, аутосомно- рецессивная | | |
| Липодистрофия, семейная, тип 2 | | |
| Болезнь Шарко-Мари-Тута, тип 2В1 | | |
| Мандибулоакральная дисплазия | | |
| Прогерия Хутчинсона-Гильфорда | | |
| Липоатрофия с инсулин-независимым диабетом | | |
| Синдром Вернера, атипичный | | |
| Миопатия, ранняя с прогерией | | |
| Кардиомиопатия дилатационная, тип 1А | | |

Кардиомиопатия дилатационная,
с миопатией квадрицепсов

Саркомерные миопатии. Хорошо известная клиницистам *немалиновая или нитчатая миопатия*, характеризующаяся присутствием в мышечных клетках нитеобразных патологических фибриллярных образований, представляет собой генетически гетерогенную группу заболеваний, обусловленных дефектами основных структурных белков тонких и толстых нитей саркомера, таких как небулин, тропомиозин, α -актин и тропонин. Нередко немалиновая или нитчатая миопатия диагностируется благодаря ряду дизэмбриогенетических внешних признаков, таких как удлинённый лицевой череп, низко расположенные ушные раковины, готическое нёбо, гипоплазия нижней челюсти, деформация грудной клетки по типу «куриной» и позвоночника по типу кифосколиоза. Мышечная слабость, более выраженная в проксимальных отделах конечностей, и гипотония проявляются с первых месяцев жизни. Характерны амимия, симптом «запрокидывания» головы при попытке поднять ребенка. Выражены симптомы «свободных» надплечий, «треножника» и др. Дети начинают ходить с полутора лет, не могут бегать, прыгать. В дальнейшем больные остаются инвалидами, но способность к самостоятельному передвижению сохраняется. Отчетливо преобладает слабость в руках. Глубокие рефлексy снижены и в течение жизни могут угасать. Течение заболевания относительно стационарное.

Огромный по своим размерам саркомерный белок небулин составляет около 3-4% микрофибриллярного белка. Наряду с актином и титином он является интегральным компонентом тонких филамент поперечно-полосатых мышц. Множество изрформ небулина, образующихся в результате альтернативного сплайсинга гена *NEB*, определяют молекулярное разнообразие Z-дисков саркомера. Мутации в гене *NEB*, сопровождающиеся сдвигом рамки считывания и образованием укороченного белка,

идентифицированы у больных с относительно мягкой аутосомно-рецессивной формой немалиновой миопатии. Тяжелая аутосомно-доминантная форма заболевания, часто заканчивающаяся летальным исходом в младенческом или раннем детском возрасте, обусловлена присутствием гетерозиготных миссенс-мутаций в гене α -актина (*ACNA1*). Более мягкие аутосомно-доминантные генетические варианты немалиновой миопатии обусловлены мутациями в генах тропомиозина 2 и 3 (*TPM2* и *TPM1*) и тропонина T1 (*TNNT1*) соответственно. Тропомиозин 2 является основным белковым компонентом толстых филамент саркомера, а тропомиозин 3 – это главный белковый компонент латеральных Z-дисков. Тропонин T1 является членом Ca^{+} -зависимых комплексов, взаимодействующих с тропомиозиновым димером саркомера. Таким образом, все генетические варианты немалиновой миопатии входят в группу саркомерных миопатий – табл.12.

К этой же группе относятся аутосомно-доминантная (1A) и две аутосомно-рецессивные (2J и 2G) формы конечностно-поясной миодистрофии, обусловленные наследственными дефектами в генах миотилина (*TTID*), титина (*TTN*) и телетонина (*TCAP*) соответственно. Миотилин и титин – это гигантские белки саркомера, содержащие многочисленные Ig-подобные домены и выполняющие не только структурную, но и регуляторную роль. Они управляют образованием ансамблей саркомеров. Миотилин в комплексе с альфа-актинином ассоциирован с актиновыми филаментами. Титин или коннектин занимает половину саркомера между Z- и M-слоями и играет сигнальную роль в ориентации небулина. Телетонин – это небольшой белок, располагающийся в Z-дисках саркомера. Он служит субстратом для титина.

Неожиданным в свое время оказалось обнаружение при мягкой форме аутосомно-рецессивной конечностно-поясной миодистрофии 2A не структурного, а энзиматического дефекта в специфической мышечной протеазе - калпаине-3. Предполагалась возможность участия этой протеазы в

деградации или дестабилизации структурных компонентов цитоскелета, внеклеточного матрикса или дистрофинового комплекса. Оказалось, что одним из субстратов для калпаина-3 служит титин, причем идентифицируемые у некоторых больных мутации в гене *CAPN3* часто затрагивают высоко-консервативный сайт взаимодействия калпаина-3 с титином. Калпаиновая миодистрофия 2А, которую более привычно называют *формой Эрба-Ротта*, является у нас в стране наиболее частой среди конечностно-поясных миодистрофий.

В таблице 12 представлена биохимическая классификация саркомерных миопатий.

Таблица 12

Биохимическая классификация саркомерных миопатий

| Классификация | Нозологическая форма, ген, белок | Биохимический дефект |
|-----------------------|---|---|
| Немалиновые миопатии | Миопатия немалиновая 1, аутосомно-доминантная; <i>TRPM3</i> ; тропомиозин 3 | филаментные белки саркомера |
| | Миопатия немалиновая 2, аутосомно-рецессивная; <i>NEB</i> ; небулин | |
| | Миопатия немалиновая 3; миопатия актиновая; <i>ACTA1</i> ; α -актин | |
| | Миопатия немалиновая 4, аутосомно-доминантная; <i>TRPM2</i> ; тропомиозин 2 | |
| | Миопатия немалиновая 5, аутосомно-доминантная; <i>TNNT1</i> ; тропонин 1 | |
| Титиновые миопатии | Миодистрофия конечностно-поясная, аутосомно-рецессивная, 2J; <i>TTN</i> ; титин или коннектин | структурно-регуляторные белки саркомера |
| | Миодистрофия тиббиальная, дистальная; <i>TTN</i> ; титин или коннектин | |
| | Миодистрофия конечностно-поясная, аутосомно-рецессивная, 2G; <i>TCAP</i> ; телетонин | |
| | Миодистрофия конечностно-поясная, аутосомно-рецессивная, 2A; <i>CAPN3</i> ; калпаин-3 | |
| Миотилиновые миопатии | Миодистрофия конечностно-поясная, аутосомно-доминантная, 1A; | |

| | | |
|--|---|--|
| | <i>TTID</i> ; миотилин | |
| | Миотилинопатия; <i>TTID</i> ; миотилин | |

При целом ряде миопатий причиной дистрофических процессов является накопление в цитоплазме и/или в ядрах мышечных клеток гистологических включений, молекулярные механизмы формирования которых могут быть совершенно различными. Так, при немалиновой миопатии причиной образования в мышечных клетках нитеобразных фибриллярных структур является латеральная экспансия Z-дисков. Определенные гистологические аномалии характерны для пациентов с *болезнью центрального стержня* и *миотубулярной миопатией*. В обоих случаях дефектными оказываются белки, участвующие в контроле дифференцировки мышечных волокон. Нерастворимые цитоплазматические и ядерные включения в мышечных клетках характерны и для других форм миопатий, дебютирующих в гораздо более позднем возрасте. Примерами являются *десминовая миопатия*, *миопатия с инклюзионными тельцами* и *локальная окулофарингеальная миопатия*.

Наследственные дефекты различных мышечных ферментов являются причиной развития относительно доброкачественных метаболических миопатий, таких как *мышечный гликогеноз – болезнь Мак-Ардла*, *миопатия напряжения* и другие. В предыдущей главе мы уже рассматривали митохондриальные миопатии.

2.9.2. Наследственные кардиомиопатии

Однако особое значение в кардиологической практике имеет ранняя диагностика тех наследственных болезней, которые, часто, не имея выраженных клинических проявлений в молодом возрасте, могут явиться причиной внезапной смерти при повышенных эмоциональных или физических нагрузках. Прежде всего, это моногенные формы гипертрофической и дилатационной кардиомиопатии. Каждое из этих заболеваний характеризуется высокой генетической гетерогенностью и

выраженным клиническим полиморфизмом. В связи с идентификацией в последние годы большого числа генов, ассоциированных с наследственными кардиомиопатиями, произошел огромный прогресс в понимании молекулярных механизмов их этиологии и патогенеза. Появилась возможность систематизации этих болезней не только на базе их клинических проявлений, но и на биохимической основе. Разнообразие моногенных кардиомиопатий очень велико, однако их клиническая классификация достаточно проста. Они делятся на две основные формы – гипертрофическую и дилатационную. Генетических вариантов кардиомиопатий гораздо больше. В настоящее время идентифицированы гены для 13 наследственных форм гипертрофической кардиомиопатии и 21 формы дилатационной кардиомиопатии, причем 5 из них аллельны некоторым генетическим вариантам гипертрофической кардиомиопатии.

2.9.2.1. Гипертрофическая кардиомиопатия

Первичными проявлениями гипертрофической кардиомиопатии являются пресистолический ритм галлопа и признаки гипертрофии левого желудочка на электрокардиограмме (ЭКГ). Прогрессирующая обструкция оттока крови из полости левого желудочка может привести к трепетанию предсердий и остановке сердца. Выделяют четыре морфологических типа заболевания: гипертрофия (I) переднего или (II) заднего сегмента межжелудочковой перегородки, с (III) прилегающей частью стенки левого желудочка, (IV) переднее-латерального отдела стенки или апикальной части желудочка. По некоторым оценкам ежегодный риск внезапной смерти у больных гипертрофической кардиомиопатией составляет 4-6%. Основной причиной летального исхода является тахикардия или фибрилляция желудочков. В качестве факторов, увеличивающих риск острых кардиоваскулярных осложнений при гипертрофической кардиомиопатии, выделяют семейную историю внезапной смерти, рекуррентные обмороки, выявляемую при мониторинговании тахикардию желудочков, гипертрофию

левого желудочка (более чем на 3 см) и падение давления при физических нагрузках.

В 45% случаев гипертрофическая кардиомиопатия носит идиопатический характер. Моногенные формы заболевания, представленные в таблице 12, наследуются, главным образом, по аутосомно-доминантному типу.

Таблица 12
Моногенные формы гипертрофической кардиомиопатии

| Нозологическая форма | Ген, локус | Белок, функция |
|---|---|--|
| Кардиомиопатия, гипертрофическая, 1 | <i>MYH7</i> 14q12 | β-миозин, тяжелая цепь, кардиальный, преимущественно экспрессируется в мышечных волокнах I типа с медленной проводимостью |
| Кардиомиопатия, дилатационная 1S | | |
| Кардиомиопатия, гипертрофическая, дигенная | <i>MYH7</i> + <i>MYLK2</i> 20q13.3 | тяжелая цепь кардиального β-миозина + пептид-киназа легкой цепи миозина, кардиальная |
| Кардиомиопатия, гипертрофическая, с поздним дебютом | <i>MYH6</i> 14q12 | α-миозин, тяжелая цепь, кардиальный |
| Перегородочный септальный дефект, 3 | | |
| Кардиомиопатия, гипертрофическая, 8 | <i>MYL3</i> , 3p; <i>MYL2</i> 2q32.1-qter | легкие цепи кардиально-скелетного миозина, (1) щелочная, вентрикулярная, 1 и 3 типа и (2) регуляторная, 2 типа |
| Кардиомиопатия, гипертрофическая, 4 | <i>MYBPC3</i> 11p11.2 | миозин-связывающий белок C, кардиальный |
| Кардиомиопатия, гипертрофическая, с поздним дебютом | | |
| Кардиомиопатия, дилатационная | | |
| Кардиомиопатия, гипертрофическая, 9 | <i>TTN</i> 2q24.3 | титин или коннектин – гигантский белок, занимающий половину саркомера между Z- и M-слоями |
| Кардиомиопатия, дилатационная, 1G | | |
| Кардиомиопатия, гипертрофическая, 3 | <i>TPM1</i> 15q22.1 | тропомиозин 1 – главный белковый компонент латеральных Z-дисков |
| Кардиомиопатия, гипертрофическая, 2 | <i>TNNT2</i> 1q32 | тропонин T2 - член Ca ⁺ -зависимого тропонинового комплекса, взаимодействующего с тропомиозиновым димером саркомера |
| Кардиомиопатия, дилатационная, 1D | | |
| Кардиомиопатия, гипертрофическая, 7 | <i>TNNI3</i> | тропонин I, изоформа 3, экспрессирующаяся в сердечной мышце |

| | | |
|---|----------------------|---|
| Кардиомиопатия, семейная, рестриктивная | 19q13.4 | |
| Кардиомиопатия, гипертрофическая | <i>ACTC</i> | α-актин, гладкомышечный, кардиальный, основной белковый компонент тонких филамент саркомера |
| Кардиомиопатия, дилатационная, идиопатическая, 1R | 15q14 | |
| Кардиомиопатия, гипертрофическая | <i>MTTG</i> мтДНК | митохондриальная глициновая тРНК |
| Кардиомиопатия, гипертрофическая | <i>MTTI</i> мтДНК | митохондриальная изолейциновая тРНК |

Не менее шести наследственных форм заболевания обусловлены мутациями в генах тяжелых и легких цепей миозина, а также миозин-связывающего белка С. У позвоночных миозины состоят из двух тяжелых цепей с м. в. около 200 кД и четырех легких цепей с м. в. около 20кД. Тяжелые цепи подразделяются на альфа- и бета- типы, легкие цепи – на регуляторные или фосфорилируемые (MLC2-типа) и щелочные или нефосфорилируемые (типа MLC1 и MLC3). Все типы тяжелых и легких цепей миозинов представлены в виде изоформ, избирательно экспрессирующихся в специфических тканях.

Наиболее частой является гипертрофическая кардиомиопатия 1 типа, и почти в половине этих случаев у больных обнаруживаются гетерозиготные мутации в структурном гене тяжелой цепи кардиального бета-миозина - *MYH7*. Ген *MYH7* активно экспрессируется в сердечной и скелетных мышцах в позднем эмбриогенезе, а у взрослых – в ответ на физические стрессы или под воздействием тиреоидного гормона. Показано, что характер мутаций влияет на риск сердечно-сосудистых осложнений и продолжительность жизни пациентов. Так, у больных с миссенс-мутацией V606M продолжительность жизни сохраняется в пределах нормы, тогда как около половины пациентов с мутацией R453C погибают в возрасте до 40 лет.

При одной из форм гипертрофической кардиомиопатии, получившей название дигенной, одновременно были выявлены мутации в генах *MYH7* и *MYLK2* - кардиальной пептид-киназы, участвующей в фосфорилировании

легкой регуляторной цепи миозина Мутации в гене тяжелой цепи кардиального альфа-миозина *MYH6*, преимущественно экспрессирующегося у взрослых, обнаружены у больных гипертрофической кардиомиопатией, дебютирующей в позднем возрасте. Аллельным вариантом заболевания является одна из наиболее частых форм врожденного порока сердца – перегородочный септальный дефект. У пациентов с необычной формой гипертрофической кардиомиопатии, затрагивающей среднюю часть левого желудочка, найдены гетерозиготные миссенс-мутации в генах легких цепей кардиально-скелетного миозина – *MYL2* и *MYL3*.

Апикальная гипертрофическая кардиомиопатия 4 типа (японская), характеризующаяся гигантской негативной Т-волной на ЭКГ и локализованной в апексе гипертрофией левого желудочка, связана с присутствием мутаций в гене миозин-связывающего белка С - *MYBPC3*. Этот белок занимает поперечное положение в А-дисках кардиальных саркомеров, связывая тяжелые цепи миозина в толстых филаментах и титин в эластических волокнах. Фосфорилирование миозин-связывающего белка С оказывает модулирующее влияние на функцию сокращения.

Не менее пяти других генетических вариантов гипертрофической кардиомиопатии ассоциированы с мутациями в генах структурных белков саркомера - титина (*TTN*), тропомиозина 1 (*TPM1*), тропонинов Т2 (*TNNT2*) и I (*TNNI3*), а также α -актина (*ACTC*). В предыдущем параграфе мы уже давали краткую характеристику белков, кодируемых этими генами, так как мутации в этих генах обнаруживаются при различных формах миопатий. Однако в отличие от миопатий, при кардиомиопатиях мутации, как правило, затрагивают кардио-специфические домены соответствующих белков. Идентифицированы также две митохондриальные формы гипертрофической кардиомиопатии, обусловленные мутациями в генах тРНК.

2.9.2.2. Дилатационная кардиомиопатия

Дилатационная кардиомиопатия, характеризующаяся дилатацией сердца и снижением систолической функции, представляет собой

гетерогенную группу заболеваний, включающую как наследственные, так и приобретенные варианты. Заболевание протекает настолько тяжело, что часто служит первичным показанием для трансплантации сердца. Частота дилатационной кардиомиопатии, в среднем, составляет 3-4 случая на 10 000 населения. Болезнь может развиваться вследствие перенесенных миокардитов, нарушения функции коронарных артерий, некоторых системных заболеваний, действия сердечных токсинов. Энтеровирусы, в частности вирусы Коксаки, также способны индуцировать дилатационную кардиомиопатию. Около половины всех случаев заболевания это идиопатические варианты, при которых перечисленные выше этиологические факторы исключены. Среди них семейные формы составляют от 20% до 25%. Чаще всего, моногенные формы заболевания наследуются по аутосомно-доминантному типу с неполной пенетрантностью, зависящей от возраста. В более редких случаях наблюдается X-сцепленный характер наследования. Описаны также очень редкие аутосомно-рецессивные варианты. Моногенные формы дилатационной кардиомиопатии характеризуются ранним дебютом, обычно во второй-третьей декаде жизни, и тяжелым течением, часто заканчивающимся внезапным летальным исходом. Наиболее тяжелыми являются врожденные и детские формы болезни.

Разнообразие генетических вариантов дилатационной кардиомиопатии более велико по сравнению с гипертрофической кардиомиопатией. Некоторые варианты дилатационной и гипертрофической кардиомиопатии аллельны друг другу. Это относится, в частности, к тяжелой форме дилатационной кардиомиопатии 1S, часто сопровождающейся сердечной недостаточностью с тромбозом коронарных артерий и внезапной смертью, обусловленной специфическими мутациями в гене *MYH7*. У некоторых пациентов с дилатационной кардиомиопатией найдены мутации в гене кардиального миозин-связывающего белка C. Мутации в гене титина чаще приводят к клинике не гипертрофической, а дилатационной кардиомиопатии

1G, характеризующейся ранним дебютом, расширением полости желудочка в подростковом возрасте и остановкой сердца в третьей декаде жизни. В каждом из генов тропонинов T2 и I соответственно найдены мутации у больных дилатационной кардиомиопатией 1D с синдромом внезапной смерти и рестриктивной формой с диастолической дисфункцией, расширением предсердий без дилатации желудочков. У больных изолированной дилатационной кардиомиопатией 1R найдены мутации в гене α -актина.

В таблице 13 представлена краткая молекулярно-генетическая характеристика наследственных дилатационных кардиомиопатий, не являющихся аллельными вариантами гипертрофических кардиомиопатий.

Таблица 13
Моногенные формы дилатационной кардиомиопатии

| Нозологическая форма | Ген, локус | Белок, функция |
|--|------------------------------|---|
| Кардиомиопатия, дилатационная, 1N | <i>TCAP</i> 17q12. | телетонин – субстрат титина, саркомерный 19-кД белок, располагающийся в Z-дисках сердечной и поперечно-полосатых мышц |
| Кардиомиопатия, дилатационная, 1M | <i>CSRP3</i> 11p15.1 | высоко консервативный белок Z-дисков саркомера сердечной мышцы, взаимодействующий с титином и телетонином |
| Кардиомиопатия, дилатационная, 1I | <i>DES</i> 2q35 | десмин – белок цитоскелета семейства промежуточных филамент, экспрессирующийся в гладких и кардиальных мышцах |
| Кардиомиопатия, дилатационная с некомпактизацией левого желудочка | <i>LDB3</i> 10q22.2-q23.3 | белок, экспрессирующийся в сердечной и скелетных мышцах и взаимодействующий с белками цитоскелета, в частности, с альфа-актинином-2 |
| Кардиомиопатия, дилатационная, X-сцепленная | <i>DMD</i> Xp21.2 | дистрофин – один из членов спектрин/ α -актинового суперсемейства белков цитоскелета, связывающий F-актин с внеклеточным матриксом через дистрофин-ассоциированный комплекс белков |
| Кардиомиопатия, дилатационная, 1L | <i>SGCD</i> 5q33 | δ -саркогликан – трансмембранный белок дистрофин-ассоциированного комплекса |
| Кардиомиопатия, дилатационная, с кератодермой, аутосомно-рецессивная | <i>DSP</i> | десмоплакин – мажорный белок десмосом – мембранных структур, участвующих в клеточной адгезии |
| Аритмогенная дисплазия правого желудочка, семейная, 8 | 6p24 | |

| | | |
|---|--------------------------|--|
| Кардиомиопатия, дилатационная, с дефектом проводимости 1, 1А | <i>LMNA</i> | ламин А/С – относящийся к классу промежуточных филамент структурный белок ядерной ламины - фиброзного слоя, выстилающего внутреннюю ядерную мембрану и служащего каркасом для ядерной оболочки |
| Кардиомиопатия, дилатационная, с миопатией квадрицепсов | 1p11-q11 | |
| Кардиомиопатия, дилатационная, 1Т | <i>TMPO</i> 12q22 | ламина-ассоциированный тимопоетин, взаимодействующий с ламинном А/С |
| Кардиомиопатия, дилатационная 1U | <i>PSEN1</i> 14q24.3 | пресинелины - белки ядерной мембраны, участвующие в организации и сегрегации хромосом; мутации в генах пресинелинов ассоциированы с ранними формами болезни Альцгеймера |
| Кардиомиопатия, дилатационная 1V | <i>PSEN2</i> 1q31-q42 | |
| Кардиомиопатия, дилатационная и сердечная недостаточность, 1Р | <i>PLN</i> 6q22.1 | фосфоламбан – главный субстрат для цАМФ-зависимой протеинкиназы, ингибитор Са(2+)-АТФазы саркоплазматического ретикулула сердечной мышцы |
| Кардиомиопатия, дилатационная, 1O, с тахикардией желудочков | <i>ABCC9</i> 12p12.1 | рецептор 2 сульфонуриказы (вещества, широко используемого при лечении инсулин-независимого диабета), SUR2A – субъединица АТФ-чувствительного К ⁺ - канала |
| Кардиомиопатия, дилатационная с сенсоневральной тугоухостью, 1J | <i>EYA4</i> 6q23-q24 | транскрипционный ко-активатор, экспрессирующийся в сердечной мышце и в улитке, гомолог продукта гена безглазия дрозофилы |
| Кардиомиопатия, дилатационная, 3А, X-сцепленная | <i>TAZ</i> Xq28 | тафаззин – альтернативно сплайсирующийся мембранно-ассоциированный белок с высоким уровнем экспрессии в сердечной и скелетных мышцах |
| Синдром Барса | | |
| Некомпактизация левого желудочка, семейная, изолированная, X-сцепленная | | |

Дефектная работа еще двух саркомерных белков, взаимодействующих с титином, также приводит к клинике дилатационной кардиомиопатии 1N и 1M типов соответственно. В последнем случае у больных наблюдается дилатация полостей желудочков, истончение и снижение сократительной способности миокарда без видимых проявлений гипертрофической кардиомиопатии.

Один из вариантов идиопатической дилатационной кардиомиопатии - 1I, вызван мутациями в гене десмина - белка цитоскелета, экспрессирующийся в гладких и кардиальных мышцах. Другая форма дилатационной кардиомиопатии - 1C, часто сочетающаяся с некомпактизацией левого желудочка, обусловлена генетическими дефектами другого белка цитоскелета, взаимодействующего, в частности, с альфа-актинином-2.

Тяжелая X-сцепленная форма дилатационной кардиомиопатии, дебютирующая в первой или во второй декаде жизни, обусловлена мутациями, затрагивающими промоторную область или первый интрон гена миодистрофии Дюшенна - DMD. При этом продукт гена *DMD* - дистрофин, в сердечной мышце полностью отсутствует, в то время как в скелетных мышцах он присутствует и вполне функционален. Это и приводит к клинике дилатационной кардиомиопатии без проявления признаков скелетной мышечной слабости. При отсутствии дистрофина разрушается трансмембранный комплекс дистрофин-ассоциированных белков, соединяющий цитоскелет клетки с внеклеточным матриксом. Мутации в гене, кодирующем один из белков этого комплекса - δ -саркогликан, также являются причиной развития дилатационной кардиомиопатии типа 1L. Заметим попутно, что разрушение дистрофинового комплекса, по-видимому, является одним из центральных звеньев в этиологии инфекционной дилатационной кардиомиопатии, вызванной заражением вирусом Коксаки. Это предположение основано на том факте, что дистрофин является пока единственным идентифицированным субстратом для протеазы 2A этого вируса.

В отличие от гипертрофической дилатационная кардиомиопатия связана не только с дефектами саркомерных или цитоскелетных белков. Два аллельных варианта дилатационной кардиомиопатии ассоциированы с мутациями в гене ламина A/C - структурного белка ядерной ламины, относящегося к классу промежуточных филамент. Это форма дилатационной

кардиомиопатии 1А с дефектами проводимости, включающими синусовую брадикардию, нарушение атриовентрикулярной проводимости или атриальные аритмии и более тяжелый вариант с предсердно-желудочковыми аритмиями, предшествующими развитию специфической миопатии квадрицепсов. Интересно отметить, что та же самая мутация, которая вызывает последнее заболевание, ранее была обнаружена у пациента с медленно прогрессирующей конечностно-поясной миодистрофией 1В типа без контрактур, но с развивающимися с возрастом нарушениями внутрижелудочковой проводимости. По-видимому, какие-то другие факторы определяют различия в фенотипическом проявлении этой мутации. Причиной развития еще одной тяжелой и достаточно редкой генетической формы дилатационной кардиомиопатии, получившей обозначение 1Т, являются мутации в гене ламина-ассоциированного тимопоетина – *TMPO*. Одна из сплайсинговых изоформ этого белка взаимодействует с ламинем А/С. Оказались, что все идентифицированные у пациентов мутации затрагивают область контакта между двумя белками.

Очень тяжелая форма дилатационной кардиомиопатии с выраженной сердечной недостаточностью обусловлена мутациями в гене фосфоламбана - ключевого регулятора диастолической функции сердца. При этой форме заболевания средняя продолжительность жизни пациентов составляет 25 +/- 13 лет. У больных в третьей декаде жизни нарастает увеличение размеров полости сердца, снижается сократительная функция миокарда и развивается прогрессирующая сердечная недостаточность в течение последующих 5-10 лет после появления первых симптомов. Еще одна тяжелая форма дилатационной кардиомиопатии - 1О, сопровождающаяся тахикардией желудочков, снижением сократительной способности миокарда и нарушением ритма сердца, обусловлена мутациями в гене одной из субъединиц АТФ-чувствительного K^+ -канала.

Причиной развития дилатационной кардиомиопатии и сердечной недостаточности, сочетающаяся с сенсоневральной тугоухостью (тип 1J),

являются мутации в гене транскрипционного фактора, экспрессирующегося одновременно в сердечной мышце и в улитке уха.

Дефектная работа мембранно-ассоциированного белка, избирательно экспрессирующегося в сердечной и скелетных мышцах – тафаззина, ассоциирована с врожденной X-сцепленной дилатационной кардиомиопатией, часто заканчивающейся внезапным летальным исходом в раннем детском возрасте (тип 3A), а также двумя аллельными заболеваниями – синдромом Барса и семейной изолированной некомпактизацией левого желудочка. Клиническими проявлениями синдрома Барса являются миопатия, нанизм, органическая ацидурия, митохондриальная дисфункция в сочетании с дилатационной кардиомиопатией. Некомпактизация левого желудочка проявляется функциональной недостаточностью и аритмиями, ассоциированными с патогномичными ЭКГ-находками.

Редкая аутосомно-рецессивная форма дилатационной кардиомиопатии, сочетающейся с эпидермолитической ладонно-подошвенной кератодермией, шерстистостью волос и изменениями мышечной сократимости, обусловлена мутациями в гене десмоплакина – мажорного белка десмосом. При этой форме дилатационной кардиомиопатии также повышен риск развития застойной сердечной недостаточности и внезапной смерти. Аллельным вариантом заболевания является одна из генетических форм семейной аритмогенной дисплазии правого желудочка.

И, наконец, описаны две новые формы дилатационной кардиомиопатии - 1U и 1V, обусловленные присутствием гетерозиготных миссенс-мутаций в генах пресинелинов - *PSEN1* и *PSEN2*. Интерес к этим генам возник в связи с обнаружением их связи с аутосомно-доминантными формами болезни Альцгеймера 3 и 4 типа, дебютирующими в относительно раннем возрасте, обычно до 60 лет. Продукты этих генов, по-видимому, являются белками ядерной мембраны и участвуют в организации и сегрегации хромосом.

Подводя итог, мы хотели бы еще раз подчеркнуть, что, несмотря на огромное разнообразие генетических вариантов в каждой из групп моногенных кардиомиопатий, существуют общие черты в молекулярных основах их этиологии и патогенеза. Так, при гипертрофической кардиомиопатии дефектными чаще всего оказываются саркомерные белки или белки цитоскелета кардиомиоцитов. Множество дилатационных кардиомиопатий в некотором смысле перекрывается с множеством гипертрофических кардиомиопатий, так как некоторые формы этих заболеваний являются аллельными вариантами. Однако дилатационную кардиомиопатию отличает гораздо большее разнообразие генетических форм, в основе развития которых могут лежать дефекты многих других структурных белков кардиомиоцитов, включая дистрофин-ассоциированный комплекс, белки ядерной мембраны и ламины, а также некоторые другие белки с высоким уровнем экспрессии в сердечной мышце.

Представленные данные можно рассматривать лишь как определенный этап на пути исследования моногенных кардиомиопатий. Очевидно, что в самое ближайшее время следует ожидать расширения списка мутантных генов и специфических мутаций, ассоциированных с подобными болезнями. Для всех перечисленных выше генетических форм кардиомиопатии уже сейчас принципиально возможна молекулярная диагностика. Однако реально она проводится в передовых диагностических центрах нашей страны, таких, прежде всего, как Медико-генетический и Кардиологический научные центры РАМН, только для некоторых заболеваний. В первую очередь это относится к гипертрофической кардиомиопатии 1 типа, обусловленной мутациями в гене *MYH7*. Однако все мы являемся свидетелями огромного прогресса в области совершенствования и автоматизации методов молекулярной диагностики, и не за горами то время, когда диагноз любого наследственного заболевания будет дополняться молекулярным описанием соответствующих мутаций. А значит, лечение этих заболеваний и профилактика тяжелых кардиологических

осложнений будет проводиться строго индивидуально с учетом первичных молекулярных и биохимических нарушений.

Глава 2.10. Генетический контроль предрасположенности к мультифакториальной патологии

Большинство широко распространенных болезней человека относятся к классу мультифакториальных заболеваний. В их этиологию наряду с неблагоприятными факторами окружающей среды существенный вклад вносят генетические составляющие. При болезнях с наследственной предрасположенностью повторные случаи заболевания чаще наблюдаются среди родственников, чем в общей популяции. О вкладе наследственных компонентов в этиологию заболевания судят по его конкордантности среди моно- и дизиготных близнецов, а также по коэффициенту наследуемости (H), определяющему степень превышения конкордантности у монозиготных близнецов по сравнению с дизиготными (см. гл. 2.2, близнецовый метод).

Высокие коэффициенты наследуемости, превышающие 70%, характерны, например, для различных форм умственной отсталости (идиотии, имбецильности, дебильности), маниакально-депрессивного психоза, рахита, что свидетельствует о ведущей роли наследственных факторов в их этиологии. Несколько ниже (в районе 50-70%) коэффициенты наследуемости шизофрении, эпилепсии, сахарного диабета, врожденного пилоростеноза, spina bifida, атопии, псориаза и др. Это свидетельствует о том, что наряду с наследственными компонентами влияние на развитие этих заболеваний оказывают неблагоприятные факторы окружающей среды. Значение средовых факторов еще более возрастает для таких заболеваний, как язвенная болезнь, врожденный вывих бедра, расщелина губы и/или неба и др. Средовые факторы становятся ведущими в этиологии многих других мультифакториальных заболеваний (гипертоническая болезнь, инфаркт миокарда, бронхиальная астма и др.). Но и в этом последнем случае нельзя полностью исключать влияния наследственных факторов на развитие заболеваний. Кроме того, необходимо помнить, что с этиологической точки

зрения каждая из перечисленных выше нозологических форм представляет собой гетерогенную группу заболеваний, причины возникновения и развития которых могут существенно различаться. Достаточно сказать, что для многих из этих заболеваний описаны редкие моногенные варианты.

В формировании наследственной предрасположенности участвует не один, а множество генов, получивших название генов-кандидатов или генов предрасположенности. Число генов-кандидатов может достигать нескольких десятков, а иногда и сотен. Следует подчеркнуть, что даже при значительном суммарном генетическом эффекте влияние каждого отдельного гена на риск развития заболевания может быть относительно небольшим. Комплекс генов, участвующих в формировании наследственной предрасположенности к заболеванию, образует «генную сеть». Каждое мультифакториальное заболевание характеризуется своей специфической «генной сетью». В настоящее время ни для одного мультифакториального заболевания не удалось выявить все гены, участвующие в формировании наследственной предрасположенности. Однако составление «генной сети», идентификация в ней центральных генов и генов-модификаторов, исследование межгенных и ген-средовых взаимодействий, разработка на этой основе комплекса профилактических и лечебных мероприятий индивидуально для каждого пациента составляют стратегическую основу нового, быстро развивающегося направления, получившего название предиктивная (предсказательная) медицина.

Мы уже отмечали ранее, что каждый человек имеет строго индивидуальную наследственную конституцию, которая определяется наличием мутаций и разнообразием полиморфных аллелей генов. Развитие мультифакториального заболевания есть результат взаимодействия наследственной конституции и внешней среды. Важно подчеркнуть, что наследственная конституция остается неизменной в процессе жизни человека. Мутации, возникающие в половых клетках, могут привести к изменениям наследственной конституции только в будущих поколениях.

Соматические мутации, хотя и могут привести к определенным болезням, о которых мы будем говорить в следующей главе, но они всегда затрагивают не все, а лишь относительно небольшую часть клеток организма.

Применительно к мультифакториальным заболеваниям в настоящее время наибольшее практическое значение имеет анализ полиморфных аллелей или полиморфизмов. Однако, отметим сразу, что накапливается все больше фактов, свидетельствующих о том, что не меньшая, а может быть даже ведущая роль в формировании наследственной предрасположенности, принадлежит эпигенетической изменчивости. Полиморфизмы в большинстве своем представляют собой варианты нормы, так как не оказывают или оказывают относительно небольшой эффект на функцию кодируемых белков. Полиморфные аллели найдены практически во всех генах. Как правило, среди населения они представлены достаточно широко, хотя их частоты могут значительно варьировать в различных популяциях. Наибольшую ценность представляют функционально значимые полиморфные аллели, оказывающие влияние на активность кодируемых белков. Часто они располагаются в регуляторных областях генов.

При определённом стечении обстоятельств нейтральность полиморфного аллеля становится условной. Удачным является пример полиморфизма цвета кожи. Как известно, её оттенок детерминируется несколькими генами, и существенно различается у представителей разных рас и этнических групп. Представители белой расы, оказавшиеся в условиях повышенной солнечной инсоляции, подвергаются многократному увеличению риска новообразований наружных покровов. Данное заболевание носит характер эпидемии среди белых иммигрантов в Австралии и ЮАР. Таким образом, низкое содержание в коже защитного пигмента меланина можно считать адаптивным признаком для территорий с малой инсоляцией (увеличивается поглощение солнечного излучения), но вредным – для стран с жарким климатом.

Из этого примера следует другая важная характеристика полиморфных аллелей. Если мутантные версии генов проявляют свои патологические свойства в соответствии с законами Менделя, следуя принципам доминантного или рецессивного наследования, то полиморфные варианты влияют на фенотип только при сочетании с другими генетическими и негенетическими факторами, то есть обладают очень низкой пенетрантностью.

Поиск генов-кандидатов, формирующих «генную сеть» мультифакториального заболевания, осуществляют, исходя из знаний об его этиологии и патогенезе. Что мы знаем о заболевании? Какие метаболические циклы дефектны при тех или иных заболеваниях? Какие белки оперируют в этих патологических метаболических циклах и как устроены гены, кодирующие эти белки? Есть ли там широко распространенные среди населения (полиморфные) аллели, влияющие на функцию гена, прежде всего, снижающие или повышающие его активность, и не являются ли они генетическими факторами риска, предрасполагающим к развитию заболевания? Для ответа на этот последний вопрос проводят оценку частот полиморфных аллелей тестируемых генов-кандидатов в выборках больных и контроле. И только в тех случаях, когда уровни полиморфизма среди больных оказываются достоверно выше по сравнению с контролем, эти аллели рассматривают в качестве *генетических* или *немодифицируемых факторов риска* развития конкретной мультифакториальной патологии. Итак, чаще всего, специфическими генетическими факторами риска оказываются полиморфные аллели генов, продукты которых оперируют в патологических метаболических циклах.

Особое значение для формирования наследственной предрасположенности к широко распространенным болезням имеют полиморфные аллели в генах, участвующих в контроле защитных функций организма, таких как иммунитет, детоксикация, гистосовместимость, стабилизация генетического аппарата клетки. Функционально значимые

полиморфные аллели в этих генах относятся к классу неспецифических генетических факторов риска, так как они могут предрасполагать к широкому спектру заболеваний.

Итак, генетические факторы риска в сочетании с неблагоприятными внешними воздействиями (так называемыми, модифицируемыми факторами риска) могут быть причиной развития любых мультифакториальных заболеваний, включая болезни нервной, эндокринной, иммунной систем, бронхолегочную патологию, онкологические, сердечно-сосудистые заболевания, а также многие другое.

Тестирование состояния генов предрасположенности позволяет, прежде всего, формировать группы лиц с высоким риском развития определенной мультифакториальной патологии. Причем, выявление генетической предрасположенности к какому-либо заболеванию может быть проведено задолго до появления клинических симптомов, что позволяет эффективно предупреждать его развитие или отодвигать сроки манифестации, то есть проводить лечебно-профилактические мероприятия, направленные на снижение степени данного риска под контролем врача. Кроме того, молекулярно-генетические исследования позволяют выявлять индивидуальные особенности этиопатогенеза наиболее частых заболеваний у различных пациентов.

С другой стороны, в настоящее время нужно подходить с большой осторожностью к клинической интерпретации генетических факторов риска, являющихся лишь предпосылкой к возникновению заболевания. При этом необходимо использовать комплексный подход, включающий наряду с анализом распределения полиморфных аллелей среди различных групп больных, предварительные популяционные исследования, а также изучение взаимодействия генетических и средовых факторов риска. Необходимо также учитывать другие факторы, составляющие комбинированный риск развития болезни, и особенно те, которые выявляются при клинико-инструментальном обследовании больного.

2.10.1. Генетические факторы риска сердечно-сосудистой патологии

В качестве примера остановимся более подробно на специфических генетических факторах риска сердечно-сосудистой патологии. Выявление таких факторов и оценка их вклада в развитие сердечно-сосудистых заболеваний являются основными задачами современной молекулярной кардиологии. Полиморфизмы в нескольких сотнях генов исследованы в качестве генетических факторов риска атеросклероза, гипертензии, ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда, инсульта, тромботических и других заболеваний. Для многих подобных исследований, проведенных в разных популяциях, на клинически неоднородных выборках больных, характерна противоречивость полученных результатов. Прямые ассоциации найдены с относительно небольшим количеством генов-кандидатов. Чаще всего связи генетических факторов риска с предрасположенностью к заболеванию обнаруживаются в группах больных, подвергающихся каким-то дополнительным неблагоприятным внешним воздействиям, таким, например, как курение или другие вредные привычки, неправильный образ жизни, гиподинамия, несбалансированное питание, плохая экологическая обстановка и т.п. Во многих случаях показан аддитивный характер действия различных генетических и средовых факторов риска. Обзор этих исследований далеко выходит за рамки настоящего руководства. Мы лишь перечислим группы генов, наиболее часто подвергающихся анализу в связи с выяснением наследственной предрасположенности к сердечно-сосудистой патологии.

Поскольку нарушения липидного метаболизма часто сопутствуют развитию сердечно-сосудистой патологии, одними из первых были исследованы функциональные полиморфизмы генов, участвующих в контроле обмена липидов. Это гены аполипопротеинов А (*LPA*), В (*APOB*), С (*APOC1-3*), Е (*APOE*), рецептора липопротеина низкой плотности (*LPLR*), параоксоназы (*PONI*) и др. Не вызывает сомнения участие нарушений ренин-ангиотензин-альдостероновой системы в патогенезе артериальной

гипертензии и других сердечно-сосудистых заболеваний. В связи с этим были исследованы полиморфизмы в генах ренина (*REN*), ангиотензиногена (*AGT*), ангиотензин-превращающего фермента (*ACE*), рецепторов ангиотензина (*AGTR*) и др. Нарушения в системе свертывания крови и фибринолиза могут явиться причиной развития ранних инфарктов, инсультов, тромботических заболеваний. Поэтому анализу подверглись полиморфизмы генов факторов свертывания крови II (*F2*), V (*F5*), VII (*F7*), ингибитора активатора плазминогена (*PAI1*) и др. Огромное значение в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний придается состоянию сосудистой стенки и эндотелиальной дисфункции. Это явилось основанием для изучения полиморфизмов генов эндотелина (*EDN1*) и его рецептора (*EDNRA*), метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*), синтетазы окиси азота (*NOS*) и др. Список исследованных генов-кандидатов может быть значительно расширен. Полученная в результате этих исследований информация о наличии генетических дефектов, приводящих к дислипидемиям, дисфункции эндотелия, увеличению риска рестенозов коронарных сосудов после кардиоинвазивных вмешательств уже сейчас дает возможность выбрать адекватную тактику ведения больного и проводить патогенетически обоснованное лечение с применением препаратов, модулирующих выявленные метаболические нарушения.

2.10.2. Другие примеры использования генетических факторов риска

Определение наследственной предрасположенности к различным видам физической деятельности человека имеет огромное значение для выбора профессии. Это особенно важно в спорте. Возникло целое новое направление – молекулярная генетика спорта, практические результаты которого имеют первостепенное значение не только для отбора перспективных спортсменов и их специализации, но и для идентификации тех спортсменов, для которых повышенные физические нагрузки противопоказаны, так как могут привести к нежелательным последствиям для здоровья.

Проиллюстрируем последнее положение лишь на одном небольшом примере. Показано, что полиморфный аллель в гене ангиотензин-превращающего фермента (*ACE*), который в гомозиготном состоянии встречается у трети населения, ассоциирован с небольшой гипертрофией сердечной мышцы. Носители этого аллеля способны выдерживать повышенные физические нагрузки, и в некоторых случаях это определяет выбор их профессии. В частности, более высокая частота этого аллеля обнаруживается среди профессиональных спортсменов. Но гипертрофия сердечной мышцы в сочетании с высокими физическими нагрузками может привести к синдрому внезапной смерти, который среди профессиональных спортсменов встречается достоверно чаще, чем в общей популяции. Поэтому необходимо не только выявлять тех спортсменов, которые являются носителями полиморфного аллеля в гене *ACE*, но и с гораздо большей осторожностью подходить к разработке индивидуальных программ их физической подготовки.

Рассмотрим ещё один характерный пример. Известно, что один из рецепторов допамина, *Drd2*, представлен в человеческой популяции как минимум двумя генетически детерминированными изоформами, причём продукт одного из аллелей обладает пониженной активностью. У лиц, унаследовавших этот аллель, слегка снижена возбудимость допаминэргической системы. В результате может несколько обедняться функционирование «центра вознаграждения», находящегося в головном мозге. У таких людей, по-видимому, повышен риск зависимости от стимуляторов допаминэргической системы: алкоголя, никотина, наркотиков. При нормальном поведении этот риск реализуется редко. Однако сочетание генетического и негенетического факторов, то есть присутствие неблагоприятного аллеля в гене *DRD2* и злоупотребление алкоголем или наркотиками, может привести к быстрому формированию зависимости от этих веществ.

Таким образом, полиморфные аллели, в отличие от мутантных, не детерминируют фатальной предрасположенности к патологии, но обладают способностью потенцировать действие других вредных влияний. С другой стороны, неблагоприятные воздействия внешней среды могут привести к развитию заболевания и без участия генотипа, то есть при отсутствии каких-либо особенностей генетической конституции.

К настоящему моменту выявлены десятки полиморфных генов, влияющих на возникновение и клиническое течение различных патологий (табл. 4). Аутоиммунные заболевания ассоциируются с вариантами генотипа HLA - некоторые наборы «лейкоцитарных» антигенов могут провоцировать развитие аномальных иммунных реакций. Предрасположенность к раку, во многом, связана с индивидуальными способностями организма активировать и инактивировать канцерогены. Склонность к тромбозам наблюдается чаще у людей с «неблагоприятными» аллелями белков-участников гемостатического каскада. Риск атеросклероза и его осложнений может модифицироваться полиморфизмом генов аполипептинов. Разнообразием генов метаболизма объясняется также феномен индивидуальной непереносимости некоторых лекарственных препаратов. Очень важно подчеркнуть, что сведения о медицинских аспектах генного полиморфизма только начинают приобретать форму, пригодную для практического применения диагностических тестов, причем новые знания о генах предрасположенности появляются с ошеломляющей быстротой. В заключение, следует напомнить, что присутствие «неблагоприятного» полиморфного аллеля является вероятностным показателем, значение которого нельзя переоценивать - знания о генотипе в данном случае не имеют самостоятельной роли, а являются компонентом комплексного исследования пациента.

2.10.3. Роль генов детоксикации в формировании наследственной предрасположенности к мультифакториальной патологии

Рассмотрим роль неспецифических генетических факторов риска в формировании наследственной предрасположенности на примере

полиморфизмов некоторых *генов «внешней среды»*, продукты которых обеспечивают детоксикацию *ксенобиотиков*. К ксенобиотикам относятся многие чужеродные для организма вещества, такие как промышленные и сельскохозяйственные яды, некоторые пищевые добавки и лекарственные препараты, алкоголь, никотин, наркотические вещества, а также другие природные и химические соединения.

Выделяют 3 фазы *биотрансформации* ксенобиотиков. На I фазе происходит их идентификация и активация с участием членов многочисленного семейства цитохромов P-450 и ферментов нецитохромного окисления – микросомальных эпоксидгиролаз, эстераз, моноаминооксидаз, алкогольдегидрогеназы и др. На этой стадии может происходить образование опасных для клетки активных промежуточных метаболитов. На II фазе происходит нейтрализация этих активных метаболитов с участием глутатионтрансфераз, ацетилтрансфераз и других ферментов, превращающих их в водорастворимые нетоксические соединения, подлежащие выведению из организма. Само выведение через легкие, почки, кишечник осуществляется на III фазе и обеспечивается белками «множественной лекарственной устойчивости». Эффективность детоксикации определяется координированным взаимодействием ферментов I и II фазы, и особенно неблагоприятно сочетание высокой активности ферментов I фазы и низкой активности ферментов II фазы.

Более 50 различных заболеваний ассоциировано с небольшими отклонениями в работе системы детоксикации, обусловленными присутствием функционально значимых полиморфных аллелей в генах соответствующих ферментов. В первую очередь, это относится к онкологическим заболеваниям. В частности, рак легких достоверно чаще возникает у носителей полиморфных аллелей каждого из генов *CYP1A1*, *GSTM1* и *NAT2*, кодирующих соответственно один из цитохромов P-450, глутатион-S-трансферазу $\mu 1$ и N-ацетилтрансферазу 2. Эта ассоциация становится особенно заметной у курильщиков. Продукт гена *CYP1A1*

участвует в метаболизме многих углеводов, в том числе такого известного канцерогена, как бензопирен – одного из компонентов выхлопных газов и табачного дыма. Частота полиморфного аллеля гена *CYP1A1*, ассоциированного с раком легких, в популяции достигает 7%. Но еще более широкое распространение имеет полиморфный, так называемый, «нулевой» аллель в гене *GSTM1*. Его частота в различных популяциях колеблется в пределах от 35% до 50%. У гомозигот по «нулевому» аллелю гена *GSTM1* активность соответствующего фермента полностью отсутствует, у гетерозигот она снижена. Сочетание неблагоприятных аллелей в генах *CYP1A1* и *GSTM1* увеличивает риск возникновения рака легких почти в 40 раз. N-ацетилтрансферазы, кодируемые генами *NAT1* и *NAT2*, обеспечивают во II фазе детоксикации ацетилирование многих ксенобиотиков, в том числе лекарств (сульфаниламидов, изониазида, кофеина и др.), а также токсичных нитрозаминов в табачном дыме. Поэтому неудивительно, что полиморфные аллели, снижающие их активность, в сочетании с курением предрасполагают не только к раку легких, но и к другим формам онкологических заболеваний, например к раку молочной железы. Последнее замечание в равной степени относится ко всем обсуждавшимся ранее генам.

Интересно отметить, что генетически обусловленное снижение активности ферментов детоксикации предрасполагает не только к раку легких, но и к развитию другой бронхолегочной патологии. Пациенты со сниженной активностью глутатион-S-трансфераз μ 1-, T- и P-типов и, особенно с пристрастием к курению, значительно чаще болеют тяжелыми формами хронических обструктивных бронхитов и бронхиальной астмой. Хроническая обструктивная пневмония достоверно ассоциируется с наследственным снижением активности фермента эпоксидгидролазы. С другой стороны, гены ферментов детоксикации вовлечены в патогенез не только онкологических и бронхолегочных заболеваний, но выступают в качестве модификаторов при многих других заболеваниях, связанных с неблагоприятным действием факторов внешней среды, таких, в частности,

как остеопороз, эндометриоз, привычная невынашиваемость беременности и др.

2.10.4. Проблемы генетической паспортизации

Идентификация огромного количества генов человека и присутствие в геноме большого числа полиморфных аллелей, формирующих наши индивидуальные особенности, в том числе предрасположенности к широко распространенным болезням, в сочетании с разработкой высокоэффективных и простых методов тестирования состояния генов делают реальной перспективу генетической паспортизации населения. Под *генетическим паспортом* мы понимаем набор сведений, касающихся аллельного состояния определенных генов и/или иных генетических маркеров у отдельных индивидуумов. Прежде всего, определим некоторые этические условия, соблюдение которых является обязательной предпосылкой для начала этой работы. Это добровольное согласие индивидуума на проведение тестирования, полная конфиденциальность полученных результатов и право личной собственности тестируемого индивидуума на все результаты.

Зачем нужен генетический паспорт, и какие гены при этом необходимо тестировать? Эти два вопроса неразрывно связаны между собой и выбор тестируемых генов в значительной степени определяется целью паспортизации. Очевидно, что набор тестируемых генов не должен быть слишком большим, и он может быть ограничен десятком или несколькими десятками позиций. Поэтому на первое место при составлении генетического паспорта выдвигается задача оптимального подбора тестируемых генов. Очевидно, что генетический паспорт не может быть одинаковым для всех людей. При решении вопроса о том, какой паспорт нужен тому или иному человеку, необходимо учитывать его пол, возраст, национальность, состояние здоровья, образ жизни, данные семейного анамнеза, финансовые возможности и некоторые другие параметры.

Вот один из самых простых примеров. К Вам обратились родители ребенка, среди родственников которых наблюдается несколько больных с сердечно-сосудистой патологией. Родители интересуются, предрасположены ли они и их ребенок к сердечно-сосудистым заболеваниям, и если да, то, что нужно делать, чтобы предотвратить их развитие? Какой генетический паспорт нужно сделать для этой семьи? Прежде всего, нужно составить родословную этой семьи и выявить всех больных сердечно-сосудистой патологией. Затем у всех членов семьи (больных и здоровых) исследовать состояние генов, участвующих в формировании наследственной предрасположенности к сердечно-сосудистой патологии (генов липидного метаболизма, ренин-ангиотензиновой системы, системы свертывания крови и фибринолиза и т. п.). Это позволит выявить те полиморфные аллели исследуемых генов, которые в данной семье ассоциированы с сердечно-сосудистой патологией. Если эти же аллели достались кому-то из консультируемых родителей и их ребенку, то вероятность развития у них в дальнейшем сердечно-сосудистой патологии достаточно высока. В этом случае необходимо совместно со специалистом в области молекулярной кардиологии разработать индивидуальную схему профилактики, направленную на исключение модифицируемых факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний.

Другой пример. Для человека, профессия которого связана с опасными для жизни мероприятиями, необходим такой генетический паспорт, который позволил бы надежно идентифицировать его останки в случае гибели. Для составления подобного паспорта необходимо провести индивидуальное тестирование ряда высоко изменчивых маркерных локусов. Еще один пример. Человек хочет выбрать профессию, при которой у него будет вероятность соприкосновения с определенными токсическими соединениями. В какой степени он устойчив к болезням, индуцируемым этими веществами? Для ответа на этот вопрос необходимо провести тестирование генов, кодирующих ферменты системы детоксикации. В том случае, если он

окажется носителем аллелей, снижающих активность этой системы, работа с вредными веществами будет ему противопоказана. Врачу инфекционисту необходимо тестировать состояние генов, участвующих в формировании иммунной системы, а врачу наркологу необходимо поинтересоваться, имеет ли он наследственную устойчивость к ВИЧ-инфекции. Человеку не следует заниматься спортом или иметь большие физические нагрузки, если он является носителем аллелей, предрасполагающих к раннему инфаркту. Подобных примеров можно приводить еще очень много.

Независимо от нашего отношения к проблеме генетической паспортизации работы в этом направлении уже начались. Они получили финансовую поддержку в некоторых штатах США, в Финляндии, большие средства на генетическое тестирование всего населения выделены правительством Эстонии. Однако по многим прогнозам в развитых странах мира рутинной эта работа станет не раньше чем через 10-30 лет.

Глава 2.11. Фармакогенетика

Фармакогенетика – это раздел медицинской генетики, изучающий влияние наследственной конституции на метаболизм различных лекарственных препаратов. Реакция организма на фармакологические препараты зависит от многих факторов, включая возраст, пол, физиологический статус. Оказалось, что немаловажную роль в этом играют также индивидуальные особенности генотипа. Описан ряд наследственных болезней обмена, ведущих к медикаментозным идиосинкразиям.

В 1952 году Дж. Боурне с соавторами наблюдали продолжительную остановку дыхания при приеме широко используемого в анестезиологии препарата суксаметония (дитилина, сукцинилдихолина). Вместо обычных 2-3 минут апноэ продолжалось более 2 часов. При биохимическом анализе было выявлено резкое снижение у таких пациентов активности одного из сывороточных ферментов – псевдохоллинэстеразы, которая в норме гидролизует суксаметоний до неактивных продуктов. Дальнейшие

исследования показали, что эта особенность метаболизма наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Идентифицировано несколько мутантных аллелей в гене псевдохоллинэстеразы, в разной степени снижающих активность фермента (E_1^a , E_1^s). Гомозиготы по этим аллелям обладают повышенной чувствительностью к суксаметонию. В большинстве европейских популяций частота гетерозигот по мутантным аллелям гена псевдохоллинэстеразы не превышает 2-4%, а частота клинически значимых гомозигот составляет 1:2-3000 населения. Но в некоторых этнических группах, например среди чехов и словаков или евреев – выходцев из арабских стран, частоты аллеля E_1^a значительно выше – 7-10%. Это значит, что частота людей обладающих повышенной чувствительностью к суксаметонию в этих популяциях достигает 1:400.

Еще одним хорошо известным примером фармакогенетического дефекта является недостаточность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) – фермента, катализирующего окисление восстановленного глутатиона. В гене Г-6-ФДГ (*G6PD*), локализованном в области [Xq28](#), идентифицировано большое количество мутаций, ассоциированных с различными формами X-сцепленной рецессивной *гемолитической анемии*. Кроме того, описано несколько полиморфных аллелей, при которых анемия, иногда с тяжелым исходом, развивается только при приеме определенных лекарств, в первую очередь сульфаниламидов, фурацелина, фурадемида, противомаларийных препаратов (примахин) и некоторых других препаратов, а также при употреблении конских бобов (фавизм). В настоящее время известно более 30 лекарственных препаратов, прием которых может вызывать у носителей полиморфных аллелей в гене *G6PD* гемолитический криз. Мутации и полиморфные аллели в гене *G6PD*, ассоциированные с недостаточностью Г-6-ФДГ, имеют наибольшее распространение в странах Ближнего и Среднего Востока, в том числе в Армении и Азербайджане, а также в Средиземноморье, Африке, Новой Гвинее. Для объяснения этого явления привлекают гипотезу преимущества гетерозигот, обусловленного

повышенной устойчивостью к малярийному плазмодию, широко распространенному в тех же географических ареалах.

Прием барбитуратов, сульфаниламидов, некоторых противосудорожных препаратов и антибиотиков может привести к развитию *острой перемеживающейся порфирии* у лиц с наследственной недостаточностью фермента порфобилиноген-дезаминазы (уропорфириноген-1-синтетазы). Ее клиническими проявлениями являются острые боли в животе, красный цвет мочи, анурия, периферические невриты и параличи, в некоторых случаях заканчивающиеся летальным исходом. Наследуется заболевание по аутосомно-доминантному типу с неполной пенетрантностью, его частота в некоторых популяциях достигает 1:10000.

При других наследственных заболеваниях может наблюдаться необычная реакция на определенные лекарственные препараты. Типичным примером является *подагра*, наследуемая по аутосомно-доминантному типу с неполной пенетрантностью. Заболевание обусловлено ускоренным синтезом мочевой кислоты с одновременным снижением ее выведения почками. При этом в различных тканях больных накапливаются ураты, вызывающие воспалительные реакции в суставах и ведущие к образованию мочекислых камней в почках. Некоторые диуретики (хлортиазид, фуросемид) могут ускорить появление первых симптомов и резко усилить клинические проявления заболевания вплоть до развития гиперурикемии вследствие снижения почечной экскреции мочевой кислоты. Сходная реакция на эти препараты может наблюдаться у пациентов, имеющих наследственную предрасположенность к диабету. Таким образом, при появлении в моче больных уратов или сахара в ответ на прием диуретиков необходима их немедленная отмена.

Все рассмотренные выше примеры касались достаточно редких моногенных болезней. Однако различная индивидуальная реакция на лекарственные препараты, влияющая не только на их эффективность, но и на формирование нежелательных побочных действий, наблюдается достаточно

часто. В большинстве случаев она связана не с наследственными заболеваниями, а с присутствием полиморфных аллелей в генах ферментов, участвующих в лекарственном метаболизме. Основную роль в этом метаболизме играют ферменты системы детоксикации, о которых мы уже писали ранее (2.10.3). Одним из наиболее ярких примеров подобного рода является влияние скорости ацетилирования, осуществляемого ферментом N-ацетилтрансферазой 2, на инактивацию противотуберкулезного препарата изониазида. Мы уже писали о том, что в гене *NAT2* имеются полиморфные аллели, влияющие на активность соответствующего фермента. В зависимости от присутствия этих аллелей люди делятся на «быстрых» и «медленных» ацетиляторов. В европейских популяциях соотношение между этими двумя группами населения примерно одинаково, тогда как среди желтой расы преобладают «быстрые» ацетиляторы. «Медленные» ацетиляторы в большей степени склонны к интоксикации, обусловленной накоплением в организме вредных веществ. В частности, при регулярном приеме противотуберкулезного препарата изониазида в организме «медленных» ацетиляторов он не успевает метаболизироваться. В результате происходит его накопление до токсических концентраций, вызывающих дефицит нейротропных витаминов группы В. Поэтому при терапии изониазидом обязательно необходимо назначать больным комплекс этих витаминов для предотвращения развития у них полинейропатии. При этом дозы изониазида могут быть снижены, если больные относятся к группе «медленных» ацетиляторов. «Медленные» ацетиляторы в большей степени склонны к развитию гемолитической анемии при приеме сульфаниламидов, а также некоторых других осложнений при приеме новокаинамида, дифенина, апрессина и других препаратов. В тоже время среди «быстрых» ацетиляторов чаще наблюдаются случаи «изониазидового» гепатита и несемейного рака толстой кишки.

Ключевая роль в метаболизме многих лекарственных препаратов принадлежит цитохромам P450. Их разнообразие очень велико. В настоящее

время идентифицировано 8 семейств цитохромов P450 (I, II, III, IV, XI, XVII, XIX и XXI) с пятью подсемействами в P450II и двумя подсемействами в P450XI. Разберем более подробно связь цитохромов P450 с лекарственным метаболизмом на примере полипептида 9 субсемейства P450IIС, кодируемого геном *CYP2C9*. Это один из нескольких *CYP2C*-генов, расположенных в небольшом районе в области 10q24. Продукт гена *CYP2C9* относится к числу главных лекарственных метаболитов. В частности, он непосредственно взаимодействует с S-варфарином, определяющим антикоагулянтный эффект этого лекарственного препарата. Варфарин широко используется при лечении пациентов с тромботическими заболеваниями или повышенным риском тромбообразования. Очевидно, что терапевтический успех в значительной степени зависит от выбора дозы препарата и длительности курса лечения с учетом специфики заболевания и индивидуальных особенностей пациента, важнейшей из которых является наследственная чувствительность к варфарину. В гене *CYP2C9* идентифицированы два функциональных полиморфизма, влияющие на метаболическую активность этого цитохрома. Их частоты в европейских популяциях колеблются в пределах от 8% до 11%. Оба этих аллельных варианта ухудшают гидроксилирование S-варфарина в системе *in vitro*, причем при гомозиготном носительстве этих полиморфизмов остаточная активность ферментов составляет менее 5% и 12% соответственно. В отечественных популяциях суммарная частота носителей минорных аллелей гена *CYP2C9* достигает 34%. Пациенты с низкой активностью метаболитов имеют большую вероятность геморрагических осложнений при проведении варфаринотерапии. Для них необходимо снижение недельной дозы препарата на 40-70% в зависимости от конкретного генотипа по полиморфным аллелям гена *CYP2C9*.

Полипептид 9 субсемейства P450IIС является одним из первичных цитохромов, ответственных за гидроксилирование толбутамида – препарата, используемого при лечении диабета. Он участвует в метаболизме

противосудорожного препарата фенитоина, глипизиды и некоторых других лекарств. С другой стороны, в метаболизме мефенитоина, некоторых антидепрессантов, противомаларийных и других препаратов участвует полипептид 19 субсемейства P450СС. В гене *CYP2C19*, кодирующем этот цитохром, также найдены полиморфные аллели, снижающие метаболическую активность соответствующего фермента. Частота «плохих» метаболизаторов по этой системе в европейских популяциях составляет 2-5%, а среди населения Японии – 13-23%.

Продукт гена *CYP2D6*, локализованного в области 22q13.1, участвует в детоксикации более 40 лекарств, включая многие антидепрессанты, психотропные, антиаритмические препараты, амфетамины, бета-блокаторы, кодеин. Около 10% европейцев несут функциональные полиморфные аллели в гене *CYP2D6*, а потому им свойственен медленный метаболизм по этой системе детоксикации. При приеме указанных препаратов у них могут возникать тяжелые кардиотоксические, холинолитические, гепатотоксические эффекты. Отмечается повышенная чувствительность к боли, быстрое привыкание к никотину и некоторые другие особенности. Значимыми с фармакологической точки зрения являются некоторые полиморфные аллели в других генах цитохромов, в частности в гене *CYP1A1*. Кроме того, в биотрансформации лекарственных препаратов принимают участие многие другие ферменты – глутатионтрансферазы, упоминавшиеся выше N-ацетилтрансферазы, моноаминооксидазы, холинэстеразы, алкогольдегидрогеназы и др. В настоящее время проводится интенсивное изучение вклада наследственной изменчивости по этим ферментным системам в индивидуальную чувствительность к определенным лекарственным препаратам. Напомним, что наличие у пациента различных полиморфных аллелей во всех перечисленных выше генах можно определить методом ПЦР.

Таким образом, одной из ведущих проблем современной фармакогенетики является разработка схем терапии различных заболеваний с

учетом генотипического статуса пациентов по наследственным детерминантам, участвующим в контроле метаболизма используемых при этом лекарственных препаратов.

Глава 2.12 Генетические основы канцерогенеза

Итак, развитие моногенных и мультифакториальных болезней зависит от присутствия в клетках мутаций и полиморфных аллелей, которые ребенок наследует от своих родителей. Однако в процессе жизни человека под влиянием различных неблагоприятных факторов мутации могут возникать не только в половых, но и в соматических клетках. Их накопление в некоторых случаях может приводить к определенным заболеваниям, которые в генетике называют *болезнями нуклеиновых кислот*. Подобный этиологический механизм характерен, прежде всего, для онкологических заболеваний.

2. 12.1. «Рак – болезнь генов»

В настоящее время не вызывает сомнения тот факт, что ведущая роль в возникновении и развитии канцерогенеза принадлежит генетическим нарушениям. Многие неблагоприятные факторы окружающей среды могут оказывать воздействие на этот процесс, однако подобное влияние чаще всего опосредуется через накопление мутаций в генах. Около 1% генов человека связаны с канцерогенезом. Мутации в этих генах служат предпосылкой для развития неопластического процесса, и они часто обнаруживаются в опухолевых тканях больных и в многочисленных культивируемых раковых линиях клеток. Эти гены делятся на два класса, как по характеру своего действия, так и по типам кодируемых белков. Первый класс - это протоонкогены или доминантные онкогены. Их продукты, как правило, участвуют в позитивном контроле клеточного роста. Вторым классом составляют супрессоры опухолей или рецессивные онкогены, называемые также антионкогенами. Кодируемые этими генами белки часто являются негативными регуляторами клеточного роста и в норме обладают противоопухолевым эффектом.

Заслуживает внимания тот факт, что мутационная теория образования опухолей впервые была сформулирована профессором К. Н. Вауер в одноименном издании, выпущенном в Берлине в 1928 году. Согласно этой теории “не существует наследственной передачи рака в точном смысле этого выражения. ... Речь идет о наследовании склонности тканей образовывать опухоли при определенных внешних условиях”. Эта склонность появляется вследствие возникновения в тканях “соматических мутаций, которые могут быть очень разнообразными и включают как генные, так и хромосомные изменения”. Поражает воображение соответствие последней формулировки современным представлениям о причинах возникновения и прогрессии опухолевого роста. Хромосомная теория рака впервые была выдвинута Т. Бовери в 1929 году на основании того наблюдения, что в раковых тканях присутствует большой процент клеток с аномалиями кариотипа. В дальнейшем эти теории отошли на второй план и уступили место другим гипотезам.

К доминантным онкогенам относятся гены сигнальной трансдукции, определяющие переход клетки от состояния покоя к делению. Это гены факторов роста, их рецепторов, промежуточных молекул, передающих сигнал от мембраны к ядру и ядерных транскрипционных факторов – регуляторных белков, способных координировано запускать или подавлять работу целых каскадов других генов, экспрессия которых необходима для деления клетки. Поскольку передача сигнала от белка к белку осуществляется за счет фосфорилирования, трансмембранные рецепторы факторов роста и промежуточные молекулы, участвующие в сигнальной трансдукции, часто обладают протеинкиназной активностью. Это могут быть рецепторные или цитоплазматические тирозинкиназы и серин/треонинкиназы. Сигнальная трансдукция может осуществляться и с участием ГТФ-связывающих белков (G-белков). Мутации в генах, контролирующих апоптоз – программированную клеточную гибель – также могут сопровождаться индукцией канцерогенеза. Апоптоз относится к

наиболее действенным инструментам регуляции тканевого гомеостаза, а также участвует в поддержании генетической стабильности, избирательно элиминируя клетки с поврежденной ДНК.

В некоторых случаях канцерогенный эффект доминантных онкогенов обусловлен гиперпродукцией кодируемых белков, что характерно, в частности, для генов факторов роста. В опухолевых тканях больных часто наблюдается избирательное увеличение числа копий (амплификация) этих генов. Однако для других протоонкогенов в большей степени характерны не амплификации, а доминантные мутации, которые приводят к образованию аномального продукта, обладающего новой агрессивной функцией. В общем случае, у мутантного белка появляется способность к передаче сигнала, индуцирующего клетку к делению, при отсутствии внешнего стимула. Это приводит к постоянной активации всей сигнальной цепи и неконтролируемому делению клетки.

В то время как доминантные онкогены интенсивно исследуются уже на протяжении нескольких десятилетий, участие в инициации и промоции канцерогенеза генов, вовлеченных в контроль системы негативных регуляторов роста, было обнаружено значительно позднее. Для проявления трансформирующего эффекта этих генов необходима инактивация обоих гомологичных аллелей, сопровождающаяся потерей их функции. Это достигается за счет возникновения в обеих гомологичных копиях генов-супрессоров или антионкогенов рецессивных инактивирующих мутаций. Гетерозиготные носители мутаций в генах супрессоров опухолей, так называемые зародышевые мутанты, часто имеют повышенную наследственную предрасположенность к возникновению онкологических заболеваний, дебютирующих в относительно молодом возрасте. Это наследственные формы раков.

Фундаментальным свойством опухолевых клеток является генетическая нестабильность. В процессе эволюции были выработаны мощные механизмы, направленные на поддержание стабильности

генетического материала при делении клеток. Одним из таких механизмов является негативный контроль клеточного цикла. При повреждении ДНК, происходящем в процессе репликации, клетка утрачивает способность дальнейшего продвижения по циклу до того момента, пока дефект не будет исправлен. Если дефект ДНК не удастся исправить, клетка погибает, причем ее гибель носит характер апоптоза. Реализация системы ареста клетки для проведения репарации ДНК и направления ее к апоптозу осуществляется с помощью негативных регуляторов роста, важнейшими из которых являются p53 и Rb, а также некоторые другие белки (p21, p15, p16 и др.). Все они являются транскрипционными факторами и могут взаимодействовать с регуляторными последовательностями других генов, участвующих в контроле клеточного цикла, пролиферации, апоптоза и репарации ДНК.

Мутации в гене *TP53* являются наиболее частыми дефектами ДНК, присутствующими в тканях злокачественных опухолей человека, и их наличие свидетельствует о плохом прогнозе в отношении развития опухоли. Гетерозиготные зародышевые мутации в гене *TP53* идентифицированы при редком аутосомно-доминантном синдроме Ли-Фраумени, для которого характерна повышенная предрасположенность к развитию в молодом возрасте широкого спектра злокачественных опухолей. Ген *RB* был идентифицирован при исследовании доминантно наследуемых семейных форм ретинобластомы, при которых у детей в возрасте от 1 до 3 лет развиваются множественные билатеральные опухоли сетчатки. При спорадических формах заболевания опухоли развиваются гораздо позднее и чаще поражают один глаз.

Основной системой поддержания стабильности генетического материала при клеточном делении является репарация ДНК – исправление дефектов, возникающих в процессе репликации ДНК. В зависимости от характера повреждения ДНК, вызванного УФ-облучением, ионизирующей радиацией или действием химических мутагенов, набор ферментов репарации может быть различен. Генетические нарушения различных

компонентов системы репарации сопряжены с развитием наследственных заболеваний, таких как пигментная ксеродерма и синдром Кокейна, вызванные мутациями в генах системы репарации УФ-индуцируемых повреждений ДНК, синдром Луи-Бар, при котором нарушена репарация повреждений ДНК, вызванных ионизирующим облучением, или анемия Фанкони, характеризующаяся хромосомной нестабильностью и повышенной чувствительностью к генотоксическим агентам. У пациентов с подобными заболеваниями, как правило, повышена вероятность возникновения доброкачественных и злокачественных новообразований при соприкосновении с факторами, индуцирующими повреждения ДНК.

Гены ферментов репарации относятся к классу рецессивных онкогенов или супрессоров опухолей. Их инактивация наблюдается во многих типах опухолевых тканей. Семейные формы неполипозного рака прямой кишки в значительной степени обусловлены присутствием доминантных мутаций в генах, кодирующих ферменты системы репарации неспаренных оснований ДНК. Наследственные формы рака молочной железы ассоциированы с доминантными мутациями в двух супрессорных генах *BRCA1* и *BRCA2*, белковые продукты которых участвуют в репарации двунитевых разрывов ДНК.

В настоящее время, можно с уверенностью утверждать, что генетические нарушения в работе онкогенов и антионкогенов, участвующих в контроле клеточного цикла и в репарации ДНК, являются фундаментальными в этиологии подавляющего большинства злокачественных опухолей человека. Существенный вклад в инвазию опухолевых клеток и процесс метастазирования вносят генетические нарушения межклеточной адгезии.

Известно, что на скорость возникновения мутаций существенное влияние могут оказывать как экзогенные, так и эндогенные факторы. Любые физические и химические воздействия, усиливающие мутагенез, такие как облучение или действие мутагенов, обладают канцерогенным эффектом и

приводят к развитию индуцированных форм раков. С другой стороны, наследование инактивирующей мутации в любом из генов-супрессоров опухолей может, опосредовано, приводить к значительному увеличению частоты возникновения мутаций в других онкогенах и антионкогенах, а значит и к ускорению злокачественной трансформации клетки. Это наследственные формы онкологических заболеваний. Их передача в ряду поколений подчиняется законам Менделя. Для наследственных раков характерен семейный характер, причем в некоторых случаях, хотя и не всегда, локализация опухолей у родственников может быть одинакова (сайт-специфические раки).

В настоящее время доказано, что некоторые функциональные полиморфные аллели, в частности, в протоонкогенах или в генах ферментов метаболизма канцерогенов являются генетическими факторами риска, предрасполагающими к развитию опухолей. В этих случаях частоты полиморфных аллелей в выборках больных будут достоверно превышать контрольные уровни, и этот эффект становится особенно очевиден, когда больной подвергается действию канцерогенов. Онкологические заболевания, ассоциированные с подобными полиморфизмами, формально относятся к классу мультифакториальных болезней, то есть болезней с наследственной предрасположенностью. При этом в семье также может наблюдаться более одного больного, хотя и реже, чем при наследственных формах раков. Кроме того, сходный характер локализации опухолей у родственников в этом случае менее вероятен.

Таким образом, в основе развития любых онкологических заболеваний лежит накопление мутаций в специфических генах, причем это происходит в тех соматических клетках, которые затем вовлекаются в процесс неопластической трансформации. Можно с уверенностью утверждать: «Рак – это болезнь генов». Для возникновения трансформированного клеточного клона необходимо как минимум 5-9 мутаций в разных онкогенах и антионкогенах. Если учесть скорость мутационных процессов, подобное

накопление мутаций в одной и той же клетке представляется событием маловероятным. Очевидно, что на каком-то из промежуточных этапов трансформации опухолевый клон приобретает способность к ускоренному мутагенезу, то есть свойство «геномной нестабильности».

Итак, молекулярная онкология вошла в XXI век с достаточно чёткими представлениями о патогенезе новообразований. Суть молекулярно-генетических изменений в опухолях сводится к трём компонентам: 1) активирующие мутации в онкогенах; 2) инактивирующие мутации в антионкогенах; 3) геномная нестабильность. При этом спектр генетических нарушений, сопровождающих злокачественную трансформацию клеток, отличается удивительным разнообразием. Это крупные хромосомные реорганизации, амплификации хромосомных сегментов и отдельных генов, микроделеции и другие небольшие перестройки, доминантные мутации, придающие мутантным белкам новые агрессивные свойства, рецессивные инактивирующие мутации, эпигенетические модификации, происходящие как за счет гиперметилирования регуляторных областей генов, так и нарушения эпигенетического контроля их экспрессии, осуществляемого микроРНК.

2. 12.2. Наследственные опухолевые синдромы

Представления о спектре генных наследственных заболеваний человека в конце XX века претерпели кардинальные изменения. Длительное время описания этой группы болезней ограничивались преимущественно детскими системными патологиями, в основе которых лежат дефекты ферментов или структурных белков

Однако на рубеже 80-х и 90-х годов был сделан ряд впечатляющих открытий, убедительно показавших, что самой распространённой категорией моногенных заболеваний являются наследственные опухолевые синдромы, обусловленные присутствием доминантных инактивирующих мутаций в генах супрессоров опухолей. Условно их можно разделить на две группы. Первую группу составляют хорошо известные генетикам редкие моногенные

болезни, в симптомокомплексе которых часто присутствуют различные новообразования. Опухоли, как правило, не являются главными клиническими проявлениями этих заболеваний. В эту группу, в частности, могут быть включены факоматозы. Первично такие больные, как правило, попадают к педиатрам, неврологам и другим специалистам.

Вторая гораздо более многочисленная группа наследственных онкосиндромов это «семейные раки», главными, а в большинстве случаев и единственными клиническими проявлениями которых являются новообразования, причем риск их появления с возрастом достигает 80-100%. В дальнейшем мы будем говорить только об этой группе заболеваний. Оказалось, что «семейные раки» широко распространены среди населения. Их суммарная частота в различных популяциях достигает 1%, то есть она сопоставима или даже превосходит суммарную частоту всех других наследственных заболеваний. С подобными моногенными заболеваниями преимущественно сталкиваются врачи «взрослого профиля», а не педиатры. Наследственные онкосиндромы характеризуются особенностями патогенеза, принципиально отличающими их от других моногенных болезней. Очень важной характеристикой таких заболеваний является то, что в случае правильной и своевременной диагностики они хорошо поддаются профилактическим и лечебным мероприятиям.

Важно подчеркнуть, что до момента возникновения неоплазмы носители мутаций в антионкогенах остаются абсолютно здоровыми, поэтому клиническая картина заболевания определяется исключительно локализацией и типом прогрессирующей опухоли. Из тех заболеваний, которые мы упоминали ранее, к семейным онкосиндромам относятся синдром Ли-Фраумени, обусловленный присутствием гетерозиготных зародышевых мутаций в гене *TP53*; наследственные формы рака молочной железы, развивающегося у носителей гетерозиготных мутаций в генах *BRCA1* или *BRCA2*; кишечные раки, ассоциированные с наследственными инактивирующими мутациями в генах, кодирующих ферменты репарации.

Основными клинико-генетическими характеристиками наследственных опухолевых синдромов являются (1) доминантный тип наследования, (2) высокая встречаемость онкологической патологии среди кровных родственников больного, (3) необычно ранний возраст появления неоплазм, (4) множественный и часто рецидивирующий характер опухолей. Все эти особенности легко объяснимы с генетических позиций. Гомозиготные носители мутаций в антионкогенах не описаны или встречаются крайне редко, подобные мутации найдены только в соматических опухолевых клетках. По-видимому, это объясняется высокой функциональной значимостью белковых продуктов антионкогенов, полное отсутствие которых несовместимо с жизнью. Для развития опухоли достаточно гетерозиготного носительства мутации. В этом случае один из гомологов определенного антионкогена уже инактивирован во всех 3 миллиардах клеток нашего организма. Вероятность возникновения в какой-то из этих клеток инактивирующей мутации во втором гомологе антионкогена очень высока. Напомним, что именно этот шаг необходимо для инициации трансформации клетки. При семейных формах рака мутации в антионкогенах не подвержены действию естественного отбора, так как болезнь развивается поздно, и большинство носителей мутации успевают до этого времени оставить потомство. Поэтому в отличие от других аутосомно-доминантных заболеваний при наследственных опухолевых синдромах мутации легко передаются из поколения в поколение и относительно редко возникают *de novo*. Этим и объясняется высокая частота онкологической патологии среди родственников больного. Ранний дебют, множественность поражения и высокая частота рецидивов, наблюдаемые при наследственных онкосиндромах, также связаны с гораздо более высокой вероятностью полной инактивации антионкогена у гетерозиготных носителей мутации по сравнению с нормой. В частности, больше шансов, что блокировка супрессорного гена произойдет в двух независимых клеточных клонах.

Следует оговориться, что при описании этиологии и патогенеза опухолевых синдромов мы сознательно прибегали к существенным упрощениям. На самом деле, их механизмы и особенности клинических проявлений выглядят намного сложнее. Достаточно упомянуть, что в настоящий момент известно не менее 100 «наследственных раков». Если вспомнить, что их суммарная частота составляет 1%, то, в среднем, частота каждого отдельного онкосиндрома равна 1: 10 тысяч.

Все наследственные опухолевые синдромы, безусловно, обладают общими отличительными чертами, которые ставят их в отдельную группу наследственных заболеваний. Во-первых, «семейным ракам» присуще не наследование заболевания как такового, а наследование чрезвычайно высокого риска онкологической патологии. Во-вторых, при данных синдромах отсутствует системность поражения: фенотипический дефект возникает не в органе или ткани, а лишь в одном клеточном клоне – родоначальнике опухоли. Следовательно, для наследственных раков исключительно характерным является существование фенокопий – спорадических неоплазм, которые по своей клинической картине зачастую не отличаются от «наследственных» малигнизаций. В общей структуре онкологической заболеваемости на долю наследственных онкосиндромов приходится 2-5% случаев, в то время как оставшаяся часть неоплазм не связана с наследуемыми мутациями. Эти цифры с учетом суммарной частоты наследственных опухолевых синдромов находятся в соответствии с известной оценкой риска возникновения в течение жизни онкопатологии, которая для отдельного индивидуума, в среднем, составляет 40%.

Глава 2.13. Врожденные пороки развития

Среди врожденных заболеваний значительный процент составляют пороки развития, представляющие собой стойкие структурные и морфологические дефекты органа или его части, возникающие в периоде внутриутробного развития ребенка и нарушающие функцию пораженного

органа. В соответствии с литературными данными в 2-3% случаев новорожденные имеют различные пороки развития. Не все врожденные пороки развития (ВПР) могут быть диагностированы сразу после рождения, но большинство из них выявляются в первые годы жизни ребенка. В результате более поздней диагностики некоторых ВПР частота этой патологии среди детей первого года жизни возрастает до 5-7%. ВПР нервной, мочеполовой эндокринной систем, органов чувств и т.д. могут быть выявлены еще позже. Таким образом, по подсчетам разных исследователей истинная частота ВПР достигает 7-10%. По мнению известного белорусского генетика академика Г. И. Лазюка врожденными обычно называют пороки, возникшие в период внутриутробного развития плода под влиянием тератогенных или других вредных внешних воздействий. На долю подобной патологии приходится более половины ВПР. В остальных случаях причиной развития ВПР являются структурные нарушения генетического материала в половых клетках родителей, то есть эти ВПР являются наследственными. Деление патологии ребенка на наследственную и врожденную чрезвычайно важно для прогноза заболевания и выработки тактики ведения больного. Это также имеет большое значение для медико-генетического консультирования семьи в отношении здоровья будущих братьев-сестер (*сибсов*) и собственного потомства больного.

Внутриутробное развитие будущего ребенка от оплодотворения до рождения исследователи разделяют на два периода: эмбриональный и фетальный или плодный. Эмбриональный (*embriion* – по греч. зародыш) период составляет первые 8 недель. Весь остальной период, отсчет которого начинается с 9-й недели гестации, – фетальный (*fetus* – по лат. плод). Важно отметить, что первые 14-15 дней эмбрионального периода, называемого преэмбриональным или периодом бластогенеза, в оплодотворенной яйцеклетке происходят очень важные морфогенетические процессы, детерминирующие будущее развитие организма. Происходит активация генов зиготы, начинает осуществляться дифференцировка клеток,

формируются зародышевые листки будущих внутренних органов и внезародышевых тканей амниона, амниотических ножек (будущей пуповины) и др. Эти две недели являются первым критическим периодом внутриутробного развития человека – время, при котором крохотный организм в высшей степени чувствителен к различного рода «посторонним» воздействиям. Ответная реакция реализуется по принципу «все или ничего». Зародыш или погибает, или, благодаря большой репаративной способности, продолжает развиваться без формирования пороков.

Максимальная чувствительность (ранимость) зародыша наблюдается на 3-8 неделе – второй критический период. В это период продолжается дифференцировка («специализация») клеток и тканей (гистогенез), происходит закладка и формирование органов. Этот процесс в основном заканчивается к 10-й неделе, когда плод принимает облик человека. ВПР, такие как дефекты зарощения нервной трубки (ДЗНТ), пороки сердца и сосудистой системы (ВПС), расщелины губы и/или неба и многие другие, формируются в этом периоде, и потому они называются эмбриопатиями. Из 100 зарегистрированных беременностей в 13 (13%) наблюдаются эмбриопатии у зародыша; в 10% эти беременности завершаются самопроизвольными абортами; 60% замерших беременностей и выкидышей составляют зародыши с хромосомными аномалиями.

ВПР, формирующиеся после 9-й недели гестации и далее в фетальном периоде, называются фетопатиями. В этом периоде возможна гипоплазия отдельных органов или плода в целом, обусловленная различными воспалительными процессами, которые могут развиваться, в частности, при наличии у беременной генитальных инфекций. Чаще всего результатом этого процесса будет самопроизвольное прерывание беременности. Но в отдельных случаях беременность продолжится, но при этом у плода произойдет формирование фетопатии.

Структура, частоты и динамика ВПР по данным МГЦ

ВПП чрезвычайно многообразны и многочисленны. Они различаются по этиологии, времени возникновения, локализации, объему поражения, тяжести и частоте. Наиболее значимыми с клинической точки зрения являются ДЗНТ, ВПС, а также расщелины губы и/или неба. Рассмотрим их более подробно.

2.13.1. Дефекты зарощения нервной трубки

Распространение ДЗНТ примерно составляет 1 на 1000 новорожденных. К этому виду ВПП центральной нервной системы относятся анэнцефалия и *spina bifida* – неполное закрытие позвоночного канала (*spina* по лат. ость, хребет; *bifidus* – по лат. разделенный на двое, расщепленный).

Наиболее тяжелым ДЗНТ является анэнцефалия, при которой не закладывается зачаток будущего головного мозга. У плода отсутствует свод черепа и большая часть головного мозга. Пораженные плоды погибают внутриутробно или в первые часы постнатального развития. К тяжелым ДЗНТ относится энцефалоцеле – черепномозговая грыжа, содержащая оболочки и вещество головного мозга, но не включающая его желудочки.

Самым безобидным дефектом является *spina bifida occulta* (по лат. *occultus* скрытый), при которой не происходит срастания одной или нескольких позвоночных дужек и не задействованы оболочки или ткани мозга. *Spina bifida occulta* относится к врожденным аномалиям позвоночника, а не к ВПП нервной системы. Скрытую *spina bifida* в пояснично-крестцовом отделе позвоночника можно рассматривать как вариант нормы, так как ее наличие не отражается на качестве жизни человека и не требует коррекции.

При *spina bifida aperta* (*aperta* по лат. открытый) позвоночный канал имеет доступ к внешней среде, и у плода могут формироваться спинномозговые грыжи. В том случае, если в их состав входят только оболочки мозга, они называются менингоцеле, если же и спинной мозг – называются миеломенингоцеле. В спинном мозге, оказавшемся в грыжевом мешке, может скапливаться ликвор. Это приводит к образованию кистозной полости – гидроменингоцеле. Анэнцефалия формируется при сроке гестации 3,3

недели, а *spina bifida* – 3,7-4 недели. Большинство детей с тяжелыми ДЗНТ погибают в раннем неонатальном возрасте.

Одной из причин ДЗНТ является дефицит фолиевой кислоты в организме женщины. Поэтому рекомендация, принятая в настоящее время во многих странах мира, предписывает женщинам за 2-3 месяца до предполагаемой беременности начинать прием фолиевой кислоты в дозе не менее 400 мкг в день. При этом отмечается значительное снижение рождения детей с ДЗНТ. Применение препаратов фолиевой кислоты показано также при беременности до срока 12 недель.

ДЗНТ у плода чаще всего выявляется при ультразвуковом обследовании беременной, а так же при выполнении биохимического скрининга во втором триместре беременности. Этот скрининг основан на определении содержания альфафетопротеина в сыворотке крови беременной, которое увеличено в 3-6 раз при наличии у плода открытой *spina bifida*.

Наследственных вариантов изолированных ДЗНТ не описано, хотя некоторые синдромы сочетаются с мягкими проявлениями ДЗНТ. К ним относятся, в частности, синдром Кноблоха (редкая аутосомно-рецессивная форма дегенерации сетчатки), диссегментальная дисплазия Сильвермана-Хандмакера (летальная форма неонатальной карликовости с диспропорциональным укорочением конечностей), синдром Ваарденбурга I типа (мягкая скелетная дисплазия, сочетающаяся с нарушением пигментации и дефектами слуха). Последний синдром обусловлен мутациями в гене транскрипционного фактора *PAX3*. В связи с этим был предпринят целенаправленный поиск мутаций в гене *PAX3* у больных с семейными формами ДЗНТ. При этом у одного больного с люмбосакральным миеломенингоцеле была выявлена гетерозиготная делеция в гене *PAX3*. Однако это единичное наблюдение, имеющее скорее теоретическое, чем практическое значение.

Клинически значимым является тот факт, что присутствие у беременной женщины полиморфной замены С677Т в гене

метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*) достоверно коррелирует с более высоким риском развития ДЗНТ у плода. Патогенетической основой для этой ассоциации служит то, что полиморфный аллель 677Т способствует повышению уровня гомоцистеина в сыворотке крови, а высокий уровень гомоцистеина, в свою очередь, оказывает повреждающее действие на эндотелиальные ткани, увеличивая их проницаемость.

2.13.2. Врожденные пороки сердца

ВПС относятся к наиболее распространенным *ВПР* у человека. В среднем их частота равна 8-12 на 1000 новорожденных. При отсутствии хирургического лечения около 50% детей с пороками сердца умирают в течение первого года и чаще всего в первые недели жизни. В некоторых случаях *ВПС* являются частью наследственных синдромов. Примерами являются синдром Марфана, при котором у больных часто наблюдается пролапс митрального клапана и аневризма аорты; синдром Ди Джорджи, сопутствующими клиническими проявлениями которого являются перерыв дуги аорты и общий артериальный ствол; или синдром Вильямса-Бурена, при котором у больных в 50% случаев выявляются надклапанный стеноз аорты и стеноз лёгочной артерии. Различные *ВПС* сопровождают многие хромосомные аномалии, как числовые (синдромы Патау, Эдвардса, Дауна), так и структурные (делеции 4p- – синдром Вольфа-Хишхорна – и 5p- – синдром «кошачьего крика»). Однако в подавляющем большинстве случаев *ВПС* относятся к классу мультифакториальных болезней неясного генеза. В четверти этих случаев у больных выявляются и другие *ВПР*, однако чаще *ВПС* сердца является изолированным. Наиболее частыми *ВПС* являются дефект межжелудочковой перегородки (30% от всех *ВПС*) и дефект межпредсердной перегородки (5-10%). Вероятность повторного рождения в семье ребенка с *ВПС*, в среднем, составляет 2-4%. Она возрастает до 6-10% при наличии в семье двух больных *сibs* (табл.14). Частота *ВПС* повышена и в тех случаях, когда один из родителей имеет подобный порок, особенно когда *ВПС* присутствует у матери.

Таблица 14.

Вероятность повторного рождения в семье ребенка с ВПС

(цит. по В.Г. Любомудрову, 2007)

| Врожденный порок сердца | Вероятность повторного рождения в семье ребенка с ВПС при наличии ВПС у | | | |
|------------------------------------|---|------|--------|------|
| | сисбсов | | матери | отца |
| | одного | двух | | |
| Дефект межжелудочковой перегородки | 3 | 10 | - | - |
| Дефект межпредсердной перегородки | 2,5 | 8 | 4-4,5 | 1,5 |
| Открытый артериальный проток | 3 | 10 | 3,5-4 | 2,5 |
| Тетрада Фалло | 2,5 | 8 | 2,5 | 1,5 |
| Коарктация аорты | 2 | 6 | 4 | 2 |
| Стеноз аорты | 2 | 6 | 13-18 | 3 |

2.13.3. Расщелина губы и неба

До настоящего времени некоторые врачи используют термин «заячья губа» и «волчья пасть» при наличии у ребенка расщелины губы и/или неба – heilopalatoschisis. Такие термины крайне отрицательно воспринимаются родителями и больными с этим дефектом. Поэтому указанные названия порока челюсти, по нашему мнению, должны быть исключены, и тогда они навсегда уйдут из медицинского и бытового разговорного словаря.

Расщелина губы и неба составляет от 12% до 30% всех ВПР, популяционная частота равна 1 на 1000 новорожденных, причем преобладают мальчики. Однако изолированные расщелины неба у мальчиков бывают в 2-3 раза реже, чем у девочек. Описаны, по крайней мере, 5 редких наследственных форм изолированной расщелины губы и/или неба. Этот порок может также входить в структуру наследственных синдромов, сочетаясь с хондродисплазиями, краниосиностозами, аномалиями зубов, неспецифической умственной отсталостью и некоторыми другими наследственными нарушениями.

Однако чаще всего расщелина губы и/или неба формируется под действием тератогенных факторов, причем характер порока зависит от времени воздействия, нарушающего развитие верхней губы и неба. Одним из тератогенных действий на зародыш с формированием обсуждаемого дефекта является применение беременной противосудорожных препаратов (фенобарбитала, дифенина, вальпроатов: конвулекса, депакина). Выявление этого ВПР у плода при ультразвуковом обследовании не является рекомендацией для прерывания беременности. В настоящее время применяется комплексное (хирургическое, терапевтическое и логопедические) лечение детей с расщелиной губы и/или неба с первых дней жизни больного. При этом можно во многих случаях получать хорошие эстетические и функциональные результаты, даже при тяжелых вариантах порока, и обеспечить высокое качество жизни больных.

Глава 2.14. Медико-генетическое консультирование

2.14.1. Цели и задачи медико-генетического консультирования

Медико-генетическое консультирование семей,отягощенных наследственной патологией, представляет собой один из видов специализированной медицинской помощи, которая может квалифицировано осуществляться лишь врачом – специалистом в области медицинской генетики. Его главная цель – предупреждение рождения больного ребенка. Прежде всего, это касается тяжелых, трудно поддающихся лечению наследственных болезней и врожденных пороков развития, приводящих к физической или психической неполноценности. В задачи медико-генетического консультирования входят: (1) помощь врачам в постановке диагноза наследственного заболевания с привлечением методов медицинской генетики; (2) информирование в доступной форме больного и его родителей о причинах, характере и прогнозе заболевания, возможностях лечения и социальной адаптации, существующих государственных и спонсорских организациях, оказывающих помощь семьям больных, родительских

комитетах; (3) определение прогноза здоровья будущего потомства в семьях с наследственной патологией и объяснение родителям смысла генетического риска, опасности повторного рождения в семье больного ребенка и возможностях рождения здорового ребенка; (4) помощь родителям в принятии решения по поводу деторождения, планирования беременности, здоровья будущего ребенка и возможности проведения пренатальной диагностики; (5) пропаганда знаний в области медицинской генетики среди врачей и населения.

Прогноз здоровья будущего потомства может осуществляться проспективно или ретроспективно. При проспективном консультировании риск рождения больного ребенка определяется до наступления беременности или на ее ранних сроках. Это наиболее эффективный вид консультирования, но он возможен лишь в ограниченном числе семей: при наличии кровного родства между супругами, неблагоприятном семейном анамнезе, воздействии вредных средовых факторов (производственных вредностей). Значительно чаще проводится ретроспективное консультирование в тех семьях, где уже родился ребенок с наследственной или врожденной патологией. Его целью является предупреждение повторного рождения больного ребенка. В связи с успехами в области молекулярной диагностики, позволяющей выявлять носителей мутаций среди родственников больного не только первой, но и более дальней степени родства, число семей высокого риска, в которых можно проводить проспективное консультирование, неуклонно возрастает.

Успех медико-генетического консультирования определяется правильной постановкой диагноза. Уточнение диагноза консультируемого проходит в тесном контакте между генетиком и врачом, специализирующимся в той области патологии, которая явилась предметом консультирования (педиатром, невропатологом, эндокринологом и др.). Основой служит клинический диагноз. Для его уточнения врач-генетик может использовать весь арсенал методов медицинской генетики, которые

редко используются в обычной клинической практике. Обязательным является клинико-генеалогический метод, часто проводится цитогенетический анализ. Во многих медико-генетических центрах применяются методы биохимической генетики, специально разработанные для диагностики различных наследственных болезней обмена. Наиболее точными являются молекулярные методы диагностики, которые, зачастую, вытесняют биохимические методы. Молекулярно-генетическая диагностика чаще всего проводится в специализированных лабораториях и центрах. Напомним, что ДНК-диагностика принципиально возможна для всех наследственных заболеваний, для которых открыты мутантные гены. Однако на практике она осуществляется лишь для ограниченного круга наиболее частых наследственных заболеваний. В таблице 15 представлен список наследственных болезней, для которых в нашей стране проводится молекулярная диагностика, а также указаны соответствующие медицинские центры и учреждения.

Таблица 15.

Моногенные болезни, диагностируемые в России молекулярно-генетическими методами и доступные для пренатальной диагностики (с указанием молекулярно-диагностических центров)

| Название синдрома, болезни | Медицинские центры |
|---|---------------------------|
| Агаммаглобулинемия | МГНЦ |
| Адреногенитальный синдром | ИАГ, ГНЦ, МГНЦ, ЦОЗМиР |
| Альбинизм (тип 1) | МГНЦ |
| Альпорта синдром | ГНОКДЦ, МГНЦ |
| Альфа-1-антитрипсина дефицит | ИЭМ |
| Амиотрофия невральная | МГНЦ, ТИМГ, УНЦ |
| Шарко-Мари-Тута | |
| Амиотрофия спинальная, X- сцепленная | МГНЦ |

| | |
|--|------------------------|
| Ангельмана синдром | МГНЦ, ММА, ТИМГ |
| Апера синдром | МГНЦ |
| Атаксия Фридрейха | МГНЦ |
| Ахондроплазия | МГНЦ |
| Беквита-Видемана синдром | МГНЦ, ММА |
| Бета-талассемия | ГНЦ |
| Виллебранда болезнь | ГНЦ, ИАГ |
| Вильямса синдром | ММА |
| Вольфрама синдром | ММА |
| Врожденная контрактурная арахнодактилия | МГНЦ |
| Врожденная мышечная дистрофия, тип | МГНЦ |
| Фукуяма | |
| Гемофилия А | ГНОКДЦ, ГНЦ, ИАГ, ТИМГ |
| Гемофилия В | Там же |
| Гепатолентикулярная дегенерация (болезнь Вильсона-Коновалова) | МГНЦ |
| Гиперхолестеринемия семейная | ГНОКДЦ, ИЭМ |
| Гипофизарный нанизм (дефицит гормона роста) | МГНЦ |
| Гликогенозы | МГНЦ |
| Глухота сенсоневральная, несиндромальная | МГНЦ |
| Грейга синдром | МГНЦ |
| Дефицит ацил-КоА-дегидрогеназы | МГНЦ |
| Ди-Джорджи синдром | ММА |
| Жильбера синдром | МГНЦ |
| Катаракта зонулярная | МГНЦ |
| Коффина-Лоури синдром | МГНЦ |

| | |
|--|--|
| Криглера-Найяра синдром | МГНЦ |
| Лимфедема наследственная, тип 1 (болезнь Нонне-Милроя) | МГНЦ |
| Луи-Бар синдром (телеангиоэктазия) | МГНЦ |
| Леш-Нихана синдром | МГНЦ |
| Мартина-Белл синдром (ломкой X-хромосомы синдром) | МГНЦ, ММА, ТИМГ |
| Марфана синдром | МГНЦ |
| Миллера-Дикера синдром | МГНЦ |
| Милроя синдром | МГНЦ |
| Миодистрофия Дюшенна/Беккера | ГНОКДЦ, ИАГ, МГНЦ, ТИМГ, УНЦ |
| Миодистрофия Эмери-Дрейфуса | МГНЦ |
| Миодистрофия окулофарингеальная | МГНЦ |
| Миотоническая дистрофия | ИАГ, МГНЦ |
| Муковисцидоз | ГНОКДЦ, ИАГ, ИЭМ МГНЦ, РНИИА и П, ТИМГ, УНЦ |
| Мукополисахаридозы | МГНЦ |
| Нейробластома | ММА |
| Нейрофиброматоз | ММА |
| Ниймегена синдром | МГНЦ |
| Норри болезнь | МГНЦ |
| Периодическая болезнь | МГНЦ |
| Поликистоз почек рецессивный | МГНЦ |
| Прадера-Вилли синдром | ИАГ, МГНЦ, ТИМГ |
| Проксимальная спинальная мышечная атрофия (тип 1 – болезнь Верднига- Гоффмана, тип 2, тип 3 – болезнь Кугельберга-Веландер) | ИАГ, МГНЦ, РНИИА и П, ТИМГ |
| Псевдоахондропластическая дисплазия | МГНЦ |

| | |
|--|--|
| Ретинобластома | МГНЦ |
| Ретта синдром | ММА |
| Смита-Лемли-Опитца синдром | МГНЦ |
| Спастическая параплегия Штрюмпеля | МГНЦ |
| Спино-бульбарная мышечная атрофия (болезнь Кеннеди) | ИАГ, МГНЦ, НИИН, ТИМГ |
| Тестикулярной феминизации синдром | ИАГ, МГНЦ, ТИМГ, УНЦ |
| Тугоухость несиндромальная, нейросенсорная | МГНЦ, ТИМГ, УНЦ |
| Унферрихта-Лундберга болезнь | МГНЦ |
| Фенилкетонурия | ГНОКДЦ, ГНЦ, ИАГ, МГНЦ, РНИИА и П, ТИМГ |
| Фибрилляция желудочков на фоне удлинения интервала QT (Уорда-Романо синдром) | МГНЦ, ТИМГ, УНЦ |
| Хантера болезнь | ИАГ |
| Холт-Орама синдром (руки-сердца синдром) | МГНЦ |
| Хорея Гентингтона | ИАГ, МГНЦ, НИИН |
| Эктодермальная ангидротическая дисплазия | МГНЦ |
| Элерса-Данло синдром (классический тип) | МГНЦ |

| Обозначения | Названия учреждений |
|-------------|--|
| ГНОКДЦ | Государственный Новосибирский областной клинический диагностический центр, г. Новосибирск |
| ГНЦ | Гематологический научный центр МЗ РФ, г. Москва |
| ИАГ | НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН, г. Санкт-Петербург |
| ИЭМ | НИИ экспериментальной медицины РАМН, г. Санкт- Петербург |
| МГНЦ | Медико-генетический научный центр РАМН, г. Москва |

| | |
|-----------|--|
| ММА | НИИ Молекулярной медицины ММА им. И.М. Сеченова, г. Москва |
| НИИН | НИИ неврологии РАМН, г. Москва |
| РНИИА и П | Ростовский НИИ акушерства и педиатрии, г. Ростов-на-Дону |
| ТИМГ | НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН, г. Томск |
| УНЦ | Уфимский научный центр АН РФ, г. Уфа |
| ЦОЗМ и Р | Центр охраны здоровья матери и ребенка МЗ РФ, г. Москва |

Молекулярная идентификация мутации в определенном гене у больного и его родителей во многих случаях является необходимой предпосылкой для проведения пренатальной диагностики заболевания при последующих беременностях с целью предупреждения повторного рождения больного ребенка. Самым ответственным этапом медико-генетического консультирования является помощь родителям в принятии решения по поводу планирования беременности и проведения пренатальной диагностики. При этом врач-генетик должен предоставить семье объективную информацию о возможных рисках на всех этапах подготовки и проведения пренатальной диагностики. В случае неблагоприятного прогноза решение о прерывании или продолжении беременности семья должна принимать самостоятельно, основываясь на полученных результатах.

Подчеркнем еще раз, что медико-генетическое консультирование может быть эффективным лишь при тесном творческом и профессиональном взаимодействии специалистов всех уровней, участвующих в оказании медицинской помощи семье. Большая ответственность, во многих случаях определяющая результативность медико-генетической службы, лежит на специалистах первого, то есть поликлинического, звена.

2.14.2. Кто «виноват» в рождении детей с моногенной патологией?

Застрахованы ли мы от рождения детей с тяжелыми наследственными заболеваниями? К сожалению нет! Во-первых, возникновение новых мутаций в наших половых клетках событие, хотя и редкое, но все же

возможное. Здесь уместно вспомнить, что многие неблагоприятные факторы окружающей среды, такие как общее ухудшение экологической обстановки, облучение, воздействие вредных химических веществ и токсических соединений могут привести к увеличению частоты возникновения мутаций. Это уже в первом поколении приведет к нарастанию частоты хромосомных и доминантных заболеваний с одновременным увеличением числа бесплодных браков, спонтанных выкидышей и мертворождений. Однако вредные воздействия окружающей среды не приведут сразу к скачку рецессивной патологии. Их последствия могут сказаться лишь в будущих поколениях, по мере накопления подобного генетического груза среди населения. Еще более существенно второе обстоятельство, которое необходимо учитывать, говоря о риске рождения детей с моногенной патологией. По некоторым оценкам каждый человек является гетерозиготным носителем 10 - 12 рецессивных мутаций, способных в гомозиготном состоянии приводить к тяжелым наследственным заболеваниям. Но мы помним, что больные дети рождаются с вероятностью 25% в браке тех родителей, у каждого из которых присутствует гетерозиготная рецессивная мутация в одном и том же гене. Вот почему так опасны близкородственные браки. При таком браке повышается вероятность присутствия у родителей мутации в одном и том же гене и вследствие этого повышается вероятность рождения детей с тяжелой моногенной патологией.

Очень часто у родственников больного ребенка и, прежде всего, у его родителей возникает вопрос, кто «виноват» в том, что родился ребенок с тяжелым наследственным заболеванием? В данном случае совершенно исключено вести разговор о «виновности» кого-либо из родителей. Конечно, это не вина, а абсолютно случайная их беда. Она заключается в некотором сходстве между ними, в том, что у каждого из них в половых клетках мутантным оказывается один и тот же ген. Все люди ответственны за рождение детей с моногенной патологией, так как в равной степени несут и распространяют патологические аллели. Поэтому больные дети и их семьи

ни в коем случае не должны оказываться изгоями, и помощь им должна оказываться всем обществом. Осознание этого положения чрезвычайно важно для нравственного здоровья самого общества.

2.14.3. Показания для направления на консультацию к врачу-генетику

Основной целью профилактики наследственных заболеваний является предупреждение рождения больных детей. Первым шагом на этом пути, без которого невозможны все другие мероприятия, является диагностика наследственных болезней, которая включает несколько этапов. Первый и один из самых главных этапов – это первичная диагностика, основная роль в которой принадлежит участковому врачу и, прежде всего, педиатру. При подозрении на наследственное или врожденное заболевание врач должен провести обследование членов семьи больного с целью выявления у них сходной патологии, а затем направить больного и его семью на консультацию не только к соответствующему специалисту, но и к врачу-генетику. Для этого участковый врач должен быть хорошо знаком с показаниями для направления пациента на медико-генетическое консультирование. Поэтому мы еще раз остановимся на этих показаниях.

Всем супругам, независимо от возраста, планирующим расширение семьи (рождение ребенка), показана консультация врача-генетика. Это необходимо для оценки прогноза здоровья будущего потомства и составления плана всех необходимых мероприятий, способствующих благоприятному конечному результату – рождению здорового ребенка. В особенности такая консультация необходима при наличии наследственных или тяжелых хронических заболеваний у одного из супругов, при кровнородственном браке, при возрасте супругов, превышающих 35 и более лет или при их физиологической незрелости, при систематическом приеме лекарственных препаратов незадолго до беременности или в ее процессе, а также в том случае, если будущие родители подвергались действию облучения или агрессивных токсических веществ (например, на производстве).

Консультация специалиста по вопросам генетики нужна членам семьи, в которой есть или были больные с тяжелыми инвалидизирующими заболеваниями центральной нервной, опорно-двигательной и других систем организма, хромосомными или моногенными заболеваниями, врожденными пороками развития. Сказанное справедливо и в тех случаях, когда при предыдущих беременностях у плода были выявлены различные дефекты развития, которые, возможно, и стали причиной спонтанного или индуцированного аборта.

Предположение о возможности у ребенка наследственного заболевания, то есть генетически обусловленного нарушения углеводного, жирового или водно-солевого обмена, вероятности наличия хромосомной болезни является основанием для обращения за помощью к врачу-генетику. Наличие малых генетических аномалий (дизморфий, дисгенетических стигм), врожденная умственная отсталость, рецидивирующие пневмопатии, поражения кожи в сочетании с эпилептиформными пароксизмами и отставанием психического развития, сочетание врожденного порока сердца с поражением опорно-двигательного аппарата, детский аутизм – может быть основанием для исключения наследственно обусловленной патологии.

По мнению Г. Р. Мутовина особенно значимыми показаниями для обращения к врачу-генетику и проведения лабораторной диагностики на первом году жизни ребенка является задержка психомоторного и физического развития в сочетании с: (1) прогрессивным течением и эпилептическими припадками в первые месяцы жизни; (2) рвотой, дегидратацией, желтухой, мышечной гипотонией, нарушением дыхания, судорогами, летаргией, комой, асцитом; (3) необычным цветом и запахом мочи и/или тела; (4) диареей, не связанной с экзогенными причинами; (5) гепатомегалией и/или спленомегалией неясного генеза. Выявленные при лабораторном исследовании метаболический ацидоз; алкалоз; присутствие в моче сахара, белка, ацетона; лейкоцитопения и/или тромбоцитопения;

нарушения иммунологических показателей являются дополнительными указаниями на возможность наследственного заболевания.

В последующие годы жизни ребенка значимыми показаниями являются: (1) прогрессивное течение умственной отсталости и неврологической симптоматики после периода нормального развития; (2) умственная отсталость в сочетании с задержкой физического развития, черепно-лицевым дисморфизмом, дефектами органов зрения и слуха, дистрофией ногтей, волос и зубов, гепато- и/или спленомегалией, эпилептическими припадками, интоксикацией, летаргией, комой, привычной рвотой, диареей, алалией, дизлексией; (3) скелетная дисплазия, умственная отсталость и мышечная гипотрофия неясной этиологии, нефролитиаз. Настораживающим симптомом являются непереносимость отдельных продуктов питания, проявляющаяся анорексией, диареей, задержкой развития.

Основанием для обращения к врачу-генетику является наличие среди братьев-сестер похожей по симптомам болезни. В частности, это относится к клинике детского церебрального паралича, так как примерно в 3% случаев у таких больных выявляются моногенные мутации.

Показанием для консультации врача-генетика является бесплодие супругов, два и более выкидышей или замершие беременности в первом ее триместре, так как примерно в 2-3% случаев в основе этих состояний лежат генетические нарушения у кого-либо из супругов, в частности, носительство сбалансированных хромосомных перестроек. Зарегистрированное носительство хромосомных аномалий у кого-либо из супругов так же является основанием для консультации врачом-генетиком. Все беременные в возрасте 35 лет и старше при первом же обращении к врачу по поводу беременности должны быть направлены в медико-генетический кабинет (отделение, центр). Известно, что в этом возрасте риск рождения больного синдромом Дауна и другими хромосомными болезнями значительно выше, чем у беременных до 35 лет.

2.14.4. Организация медико-генетической службы

В настоящее время медицинская генетика должна иметь такое же значение среди медицинских дисциплин, какое имеют акушерство и гинекология, педиатрия, хирургия, онкология и т.д. Проблемы профилактики, ранней диагностики и терапии практически всех заболеваний человека не могут быть решены без развитой специализированной медико-генетической службы.

Первым прообразом медицинской генетической службы в России можно считать Бюро по евгенике при Комитете по изучению естественных производительных сил в России РАН, открытие в марте 1921 года в Санкт-Петербурге (тогда Петрограде). Руководителем Бюро был заведующий кафедрой генетики Петроградского университета профессор Ю. А. Филипченко (1882-1930). Бюро ставило перед собой следующие задачи:

1. «Изучение вопросов наследственности специально в приложении к человеку путем устройства анкет, обследований, экспедиций и т.д.
2. Распространение в широких народных массах сведений о законах наследственности у человека и о целях и задачах евгеники путем издания популярных книг, брошюр, устройства публичных лекций и т.п.
3. Подача советов евгенического характера желающим вступить в брак и вообще всем интересующимся собственной наследственностью».

Ю. А. Филипченко писал о всемерном поощрении рождаемости и выплате премий за рождение и воспитание 3-го и 4-го ребенка, но при этом был сторонником ограничения рождаемости в семьях с наследственными заболеваниями, разумеется, на основе добровольного согласия супругов. В 1929 году основоположник классической медицинской генетики в России профессор С. Н. Давиденков (1880-1961) организовал первую в мире медико-генетическую консультацию. В клинике С. Н. Давиденкова были собраны и детально описаны десятки больных с различными наследственными болезнями нервной системы.

В 1935 году московский Медико-биологический институт в день своего пятилетия был переименован в Медико-генетический. Его директором в те годы был профессор С. Г. Левит. Основная тематика института – «разработка с точки зрения генетики и смежных с нею наук ... проблем медицины, антропологии и психологии». Для решения поставленной задачи институт использовал три основных метода: клинико-генеалогический, близнецовый и цитологический. В этом институте клиницисты работали в тесном контакте с генетиками. Результаты проведенных исследований были обобщены в объемном сборнике Трудов Медико-генетического института, вышедшем в 1936 году. В этом сборнике в статье С. Г. Левита обсуждались проблемы доминантности у человека. Были представлены результаты клинико-генетических исследований таких широко распространенных заболеваний человека, как бронхиальная астма, злокачественное малокровие, пароксизмальная тахикардия, диабет, рак молочной железы, язвенная болезнь. Целая серия работ была посвящена анализу роли наследственности и среды в изменчивости нормальных параметров человека, таких как рост и вес, размеры сердца, структура кожных капилляров, папиллярных узоров пальцев и др. Каждое из этих исследований выполнено на большом статистическом материале, и выводы, полученные на основании этих работ, звучат вполне современно. Очень интересные работы выполнены на более чем 1300 близнецовых парах, находившихся под наблюдением в институте. Кроме того, в статье А. Г. Андреса и М. С. Навашина впервые в мире был представлен детальный морфологический анализ хромосом человека. Несмотря на высокий мировой уровень проводимых в институте исследований, он вскоре практически прекратил свое существование, и развитие медицинской генетики в нашей стране было заторможено на несколько десятилетий.

С середины 30-х до начала 60-х годов прошлого столетия генетика как наука у нас в стране была фактически под запретом, в том числе это касалось и ее медицинских аспектов. В 60-е годы, по выражению академика П. М.

Жуковского, «стали раздвигаться темные тучи». Был организован Институт медицинской генетики АМН СССР, прекративший свое существование в 30-е реакционные для генетики годы. Институт возглавил видный ученый генетик академик Н. П. Бочков, его сменил в последующем академик В. И. Иванов. В настоящее время научные идеи и практические разработки по развитию медицинской генетики, заложенные в Институте медицинской генетики, успешно развивают Московский генетический научный центр РАМН (директор - академик Е. К. Гинтер) и другие научно-исследовательские центры страны.

По инициативе чл.-корр. АМН СССР, профессора Е. Ф. Давиденковой был издан приказ МЗ СССР № 261 от 30 марта 1967 года, ставший историческим, «Об образовании опытных медико-генетических отделений в городах Москве и Ленинграде». В Москве научное руководство таких отделений было возложено на чл.-корр. АМН СССР А. А. Прокофьеву-Бельговскую, а в Ленинграде на Е. Ф. Давиденкову. Непосредственным организатором и руководителем медико-генетического центра в Ленинграде была назначена Л. И. Кротова, доктор медицинских наук, блестящий и опытный организатор, высоко профессиональный акушер-гинеколог-онколог. Одновременно со своими молодыми сотрудниками и коллегами Лидия Ивановна осваивала совершенно новую для нее область медицины – медицинскую генетику. Сотрудники медико-генетического центра не только осваивали, но и отстаивали «гражданство» медицинской генетики среди замшелых чиновников от здравоохранения, разрабатывали и внедряли в жизнь методы медико-генетического обследования больных детей, выявления хромосомных и моногенных патологий, внедряли медико-генетическое консультирование в практику отделения.

В настоящее время медико-генетическая служба страны разделена на 4 уровня. Каждый уровень соответствует своим задачам и клинко-лабораторным возможностям.

Первый уровень – лечебно-профилактические учреждения всех профилей. Основная задача специалистов на этом уровне заключается в выявлении наследственных и врожденных заболеваний с выраженным фенотипом. К таковым относятся хромосомные синдромы (синдромы Дауна, Шерешевского - Тернера, Клайфелтера), состояния, при которых показано проведение дифференциального диагноза с моногенными заболеваниями (муковисцидоз, фенилкетонурия, адрено-генитальный синдром, гепатолентикулярная дегенерация и многие другие), ВПР – расщелина губы и неба, врожденные дефекты опорно-двигательной системы, детский церебральный паралич, сложные симптомокомплексы с включением врожденного порока сердца и многие др. В предыдущем параграфе нами рассмотрены показания для направления пациента к врачу-генетику, загруженность которого целиком и полностью зависит от врачей первого звена – участковых и семейных, врачей первичного поликлинического уровня, неврологов, хирургов и т.д. Ответственная роль в отборе женщин высокого риска по рождению больных детей с наследственной и врожденной патологией принадлежит врачам женских консультаций, своевременно направляющих беременных на консультацию к врачу-генетику для решения вопроса о проведении пренатальной диагностики.

Второй уровень – областные и республиканские лечебно-профилактические учреждения, в задачу которых входит все сказанное выше. Однако на этом уровне имеются больше возможностей проведения широкого спектра лабораторно-биохимических и функциональных методов исследования.

Третий уровень – областные (республиканские, краевые) медико-генетические консультации (МГК).

Основными задачами МГК являются:

- медико-генетическое консультирование семей;
- диагностики хромосомных и моногенных заболеваний;

- внедрение массового забора образцов крови у новорожденных в родильных домах для выполнения скрининга по выявлению муковисцидоза, фенилкетонурии, адрено-генитального синдрома, галактоземии и гипотиреоза;

- внедрение и проведение скрининга у беременных на сывороточные маркеры, с включением ультразвукового сканирования, в 1-м триместре и при необходимости во 2-м триместре беременности для выделения группы риска по рождению детей с хромосомными аномалиями, моногенными заболеваниями и ВПР;

- внедрение и проведение методов селективного скрининга и диагностика моногенных заболеваний углеводного и других обменов;

- осуществление ультразвуковой и инвазивной пренатальной диагностики хромосомных, моногенных заболеваний и ВПР у плода;

- развитие и осуществление медико-социальной реабилитации семей, имеющих больных детей;

- пропаганда медико-генетических знаний как среди врачей, так и среди населения.

Четвертый уровень – федеральный. К этому уровню относятся специализированные медико-генетические центры (МГЦ), в штат которых входят высоко профессиональные, эрудированные, опытные специалисты. МГЦ располагает высокопрецизионным дорогостоящим оборудованием, как для проведения лабораторно-биохимических, цито- и молекулярно-генетических исследований, так и инструментальных исследований. Функциональная задача МГЦ соответствует выполнению всех перечисленных ниже программ, но с более широкими возможностями как со стороны врачебного персонала, так и с технической стороны.

МГК и особенно МГЦ тесно взаимодействуют с научными клиническими и медико-генетическими подразделениями (медицинские и биологические институты, кафедры, специализированные центры) как в городе, где находится МГК и МГЦ, так и с научно-исследовательскими

центрами федерального значения: в Москве – НИИ педиатрии и детской хирургии МЗ РФ, Научный медико-генетический центр РАМН, Центр акушерства, гинекологии и перинатологии РАМН, Научно-практический центр медико-социальной реабилитации больных с врожденной и наследственной патологией (при Стоматологическом институте); в Санкт-Петербурге – НИИ экспериментальной медицины РАМН, НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН, Петербургский институт ядерной физики АН РФ; в Томске: НИИ медицинской генетики СО РАМН; в Уфе – Уфимский научный центр АН РФ.

Глава 2.15. Скрининговые программы как профилактика врожденной и наследственной патологии

Термин «скрининг» (англ. screening) означает «просеивание» или «сортировка». Целью программ скрининга является отбор лиц, обладающих повышенным риском развития определенной патологии, из общей популяции или какой-то ограниченной группы населения. Важно подчеркнуть, что положительный тест при скрининге не является диагнозом заболевания, а служит лишь указанием на необходимость более тщательного обследования пациента. Скрининг может быть массовым, когда анализу подвергается не менее 80% из обследуемой группы населения, или селективным, если выборочно анализируется лишь часть этой группы. Любой скрининг проводится только с добровольного согласия обследуемого, его результаты строго конфиденциальны, и их интерпретация проводится только врачом. Хорошо известными примерами являются инструментальные массовые скрининги, например, рентгенологический или ультразвуковой. В качестве тестов для проведения генетического скрининга могут быть выбраны любые маркеры: биохимические, иммунологические, цитогенетические, молекулярные. Однако необходимыми требованиями для тестов являются быстрота и экономичность исследования. Поэтому для проведения массовых скринингов, наряду с инструментальными, чаще всего используют

биохимические или иммунологические тесты, в то время как цитогенетические или молекулярные скрининги всегда носят селективный характер. Примером цитогенетического скрининга является определение кариотипа плода беременных женщин, достигших определенного возрастного рубежа. В некоторых странах это 35 лет, в других 38 или даже 40 лет. Как мы уже неоднократно отмечали, необходимость такого скрининга объясняется резким увеличением с возрастом матери вероятности возникновения хромосомной патологии у плода, в первую очередь, синдрома Дауна. Молекулярные скрининги на гетерозиготное носительство мажорных мутаций проводятся среди тех этнических групп или в тех географических регионах, где эти мутации имеют наибольшее распространение. Так, например, в Израиле проводится тотальный скрининг среди женщин и лиц репродуктивного возраста на носительство мажорных мутаций соответственно в генах BRCA1 и BRCA2, ассоциированных с раком молочной железы, и в генах некоторых лизосомных ферментов, ассоциированных с наследственными болезнями обмена, особенно часто встречающимися среди евреев-ашкенази.

Остановимся более подробно на биохимических скринингах, которые проводятся среди беременных и новорожденных.

2.15.1. Биохимический скрининг маркерных белков при беременности

Основной целью биохимического скрининга беременных является отбор женщин, имеющих повышенную вероятность хромосомных заболеваний у плода и некоторых ВПР, таких как ДЗНТ и дефект передней брюшной стенки (гастрошизис). В начале 70-х годов в работах D. Y. J. Brock с соавторами впервые было показано, что при наличии ДЗНТ у плода в крови беременных женщин резко возрастает содержание α -фетопротеина (АФП) – основного белка сыворотки крови плода, синтезируемого печенью. На определенных сроках беременности (16–18 недель) это повышение имеет диагностическое значение. Тест на АФП не является специфичным для ДЗНТ, и многие другие причины могут привести к его повышению. В первую

очередь, это угроза прерывания беременности, многоплодная беременность, небольшой вес матери в сочетании с крупными размерами плода и др. Однако при исключении этих причин стойкое повышение уровня АФП в крови беременной женщины является показанием для проведения более тщательного УЗИ, а затем и инвазивной пренатальной диагностики, в том случае, если при УЗИ ВПР не удастся обнаружить.

В середине 80-х годов было показано, что при синдроме Дауна и некоторых других хромосомных аномалиях содержание АФП в крови беременной женщины на более ранних сроках (14-16 недель) снижено. В дальнейшем были найдены и другие эмбриональные маркеры, содержание которых в крови беременной женщины меняется при наличии синдрома Дауна у плода. Наиболее значимыми из них оказались хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) и неконъюгированный эстриол (НЭ).

В Санкт-Петербурге селективный биохимический скрининг хромосомной патологии плода, основанный на определении АФП и ХГЧ в крови беременных женщин, проводится с 1993 года, а массовый скрининг начат с 1997 года после появления отечественных тест-систем «Алкор Био», Санкт-Петербург. Начиная с 2000 года на базе Диагностического центра (Медико-генетического) обследуются более 87% беременных города. В лаборатории пренатальной диагностики наследственных и врожденных заболеваний НИИАГ им. Д. О. Отта РАМН разработаны нормативы комбинированного риска хромосомной патологии плода, учитывающие не только биохимические показатели, но и некоторые УЗИ-маркеры, а также анамнез и возраст матери. Эти нормативы позволяют проводить селективный скрининг беременных, отобранных при массовом скрининге. При подтверждении результатов массового скрининга женщина направляется на инвазивную пренатальную диагностику кариотипа плода.

Чувствительность биохимического скрининга беременных для анэнцефалии достигает 98%, для открытой спинно-мозговой грыжи – 90%. Для синдрома Дауна чувствительность биохимического скрининга

составляет 67-72%, при 5-6% ложноположительных результатов. Чувствительность скрининга повышается, а число ложноположительных результатов снижается при комбинированном подходе с учетом УЗИ-маркеров и некоторых других показателей. Значительные отклонения маркерных белков от нормы в сочетании с нормальным кариотипом плода указывают на возможность развития плацентарной недостаточности и гипотрофии плода. Такие женщины нуждаются в дополнительном обследовании и проведении профилактики акушерской патологии.

2.15.2. Неонатальный биохимический скрининг

Биохимический скрининг новорожденных направлен на раннее выявление лиц с патологическими изменениями генотипа и предотвращение развития тяжелых клинических проявлений заболевания. Это основной метод вторичной профилактики наследственной патологии. Подобные скрининги целесообразно разрабатывать для распространенных болезней с тяжелым прогрессирующим течением, приводящим к инвалидизации. Главным условием при этом является существование эффективных методов своевременно начатого лечения. Чувствительность самого скрининга определяется наличием достаточно простых надежных и экономичных специфических диагностических тестов.

Из нескольких тысяч наследственных заболеваний фенилкетонурия, муковисцидоз, галактоземия, адреногенитальный синдром и врожденный гипотиреоз относятся к таким патологиям, при которых своевременно начатое лечение способно предотвратить развитие тяжелых проявлений заболевания и глубокую инвалидизацию. Причем, чем раньше начато лечение, тем благоприятнее прогноз для течения болезни и для жизни больного ребенка. Частоты этих заболеваний в различных популяциях колеблются в пределах от 1:2000 до 1:20000, то есть это достаточно распространенные заболевания. Все это послужило основанием для введения на государственном уровне во многих странах, в том числе и в России,

неонатального скрининга для выявления среди новорожденных детей с повышенным риском каждой из этих пяти патологий.

Скрининг на фенилкетонурию является частью общего скрининга на гиперфенилаланинемию. Он проводится в несколько этапов. На рис. представлена схема оптимальной программы скрининга на гиперфенилаланинемию (стр.580, Иванов).

Рисунок . Оптимальная программа скрининга на гиперфенилаланинемию В ходе первого диагностического этапа, возможно использование качественных тестов на повышение концентрации фенилаланина в моче (проба Феллинга и проба с 2,4-динитрофенилгидразином) или в крови при помощи микробиологического теста Гатри. Однако на современном уровне чаще применяют флюориметрический метод, позволяющий быстро и точно определить повышение концентрации фенилаланина в образце крови обследуемого ребенка.

На уточняющем этапе проводится повторное обследование всех детей из группы риска, и далее повторяется исследование на содержание фенилаланина в крови с использованием аминокислотного анализатора. При концентрации фенилаланина в сыворотке крови $> 15\text{мг}\%$, предполагается диагноз фенилкетонурии, а при концентрации $6-15\text{мг}\%$ – гиперфенилаланинемии. При положительных тестах ребенку сразу назначается безфенилаланиновая диета, на основании эффективности которой планируются мероприятия по уточнению диагноза и выбору дальнейшей тактики необходимого лечения.

На заключительном этапе проводится дифференциальная диагностика наследственных гиперфенилаланинемий, и в первую очередь фенилкетонурии, с помощью молекулярно-генетических методов. Если при этом не удастся выявить мутаций в гене фенилаланингидроксилазы *PAH*, проводится измерение активности этого и других ферментов, участвующих в метаболизме фенилаланина. Исследование проводится в лейкоцитах,

фибробластах, а затем и в гепатоцитах, полученных путем биопсии, на фоне пероральной нагрузки фенилаланином. Определяется содержание птеринов в моче.

При скрининге новорожденных на муковисцидоз в качестве теста используют уровень неонатального иммунореактивного трипсина (ИРТ) в сыворотке крови, концентрация которого при муковисцидозе выше нормы, то есть составляет более 70 нг/мл. У детей группы риска повторно исследуют уровень ИРТ и проводят определение содержания хлоридов в поте (специфический тест на муковисцидоз). Если эти тесты оказываются положительными, назначается ДНК-диагностика. Диагноз муковисцидоза считается доказанным, если удастся идентифицировать мутации в гене *CFTR*. Отметим, что в тех случаях, когда мутации не удается обнаружить, диагноз муковисцидоза не может быть исключен только на этом основании, так как у больного может быть редкая мутация, которую невозможно идентифицировать в условиях той лаборатории, в которой проводилась ДНК-диагностика.

Группа риска детей с адреногенитальным синдромом выявляется по исследованию в образце крови 17-гидрооксипрогестерона (17-ОНР). Пороговая цифра концентрации этого белка составляет 30 нмоль/л. При таком показателе и выше исследование повторяется, а также выполняется ДНК-диагностика.

Для выявления галактоземии в предоставленном в лабораторию образце крови новорожденного исследуют содержание общей галактозы (галактозы и галактоза-1-фосфата). Результат скрининга можно считать отрицательным при уровне галактозы ниже 400 мкмоль/л (7,2 мг/дл). Окончательный диагноз галактоземии устанавливается только после детального исследования активности ряда ферментов, обуславливающих нормальный обмен галактозы, и проведения молекулярно-генетического исследования.

Врожденный гипотиреоз это гетерогенная группа моногенных и мультифакториальных заболеваний. Болезнь дебютирует еще в периоде внутриутробного развития ребенка из-за поражения щитовидной железы, в частности, недостаточности тиреотропных гормонов, прежде всего, циркулирующего тироксина. Ведущими причинами нарушения функции щитовидной железы могут быть метаболические дефекты, обусловленные генетическими нарушениями, воспалительные процессы в самой щитовидной железе, применение беременной повышенных доз тиреостатических препаратов. При дефиците продуктов щитовидной железы замедляются окислительные процессы, основной обмен и теплообмен. В частности, нарушается обмен мукополисахаридов, в результате чего в тканях накапливается большое количество креатинина и муцинозного вещества, приводящих к слизистому отеку – микседеме. Следствием всех этих процессов является отставание нервно-психического и физического развития ребенка. Однако при раннем назначении большим гормонов щитовидной железы, в частности, тироксина можно предотвратить развитие инвалидизирующей симптоматики и значительно улучшить состояние больного.

Тяжелая форма врожденного гипотиреоза регистрируется сразу после рождения ребенка. Больной ребенок отличается от сверстников присутствием микседемы, брадикардии, пупочной грыжи, повышенной сухостью и ломкостью волос, вялостью и сонливостью. Для больных характерны большая масса тела (более 4000 г), сухость, шелушение и бледность кожных покровов, холодных на ощупь. Голос низкий, «каркающий». При отсутствии лечения отставание психического и физического развития неуклонно прогрессируют, в последующем формируется олигофрения.

Наиболее яркая картина врожденного гипотиреоза проявляется к 4-6-му месяцу жизни, особенно при естественном вскармливании. До этого времени тиреотропные гормоны ребенок получает с молоком матери. Со временем их недостает организму, и у больного регистрируются тяжелые

соматические и неврологические нарушения, при этом эффективность лечения снижается. Дети начинают резко отставать в росте, весе, психическом развитии, вяло реагируют на окружающее, перестают узнавать родителей. Все это обуславливает необходимость ранней диагностики заболевания путем биохимического неонатального скрининга.

В качестве основного скринирующего теста используют содержание в образце крови, взятый из пятки ребенка, тиреотропных гормонов гипофиза и гормонов щитовидной железы (тироксина и трийодтрионина). Концентрацию этих гормонов на первом этапе скрининга определяют иммуноферментным методом. Пороговой цифрой уровня тиреотропных гормонов для обследуемых в возрасте от 1 до 7 дней является 20 мкЕд/мл. Уточняющее исследование проводят в 2-недельном возрасте, на этом сроке пороговым значением тиреотропных гормонов является 5 мкЕд/мл и выше. К этому сроку нормализуется большинство временных нарушений функции щитовидной железы, связанных с фетоплацентарной недостаточностью, родовой травмой, функциональной незрелостью, внутриутробной инфекцией и другими экзогенными причинами. Всем детям с повышенными значениями тиреотропных гормонов и низкими значениями гормонов щитовидной железы назначается курс L-тироксина. Они должны находиться на диспансерном наблюдении эндокринолога, как минимум, до 3-летнего возраста, когда может быть поставлен окончательный диагноз врожденного гипотиреоза.

Для проведения неонатального скрининга среди новорожденных используются наборы «Delfia Neonatal hTSH» (Wallac Oy, Финляндия) и «ТТГ-неоскрин» (Иммуноскрин, Россия). Все исследования выполняются в лабораториях медико-генетических консультаций (центров).

Эффективность лечения больных фенилкетонурией, муковисцидозом, адреногенитальным синдромом, галактоземией и врожденным гипотиреозом во многом зависят от профессионализма и ответственного отношения к

работе как со стороны врачебного и сестринского персонала родильных домов, так и специалистов медико-генетических центров (отделений).

Глава 2.16. Пренатальная диагностика наследственных заболеваний

В настоящее время одним из самых приоритетных направлений в медицинской генетике является пренатальная диагностика (ПД) наследственных и врожденных заболеваний. Каждый врач должен иметь представление об этом направлении. В задачи ПД входят: (1) выявление у плода тяжелой наследственной или врожденной патологии; (2) выработка рекомендаций по тактике ведения беременности; (3) медико-генетическое прогнозирование будущего потомства; (4) помощь в проведении новорожденным своевременных профилактических и лечебных мероприятий.

Для непосредственной оценки состояния плода наиболее эффективным и общедоступным методом является *ультразвуковое исследование (УЗИ)*, позволяющее оценивать анатомическое развитие плода. ВПР при УЗИ выявляется более чем в 90% случаев. В настоящее время рекомендуется проведение УЗИ 3 раза – в 10-14, 19-22 и 32-34 недели беременности. При первом УЗИ определяется точный срок беременности, размеры плода, наличие грубых пороков развития. На этом сроке можно выявить анэнцефалию, отсутствие конечностей и другие грубые аномалии развития. Считается, что почти все анатомические дефекты плода формируются уже к 18-22 неделям. Обследование на этом сроке в высшей степени ответственно. При обнаружении ВПР у плода беременная должна быть направлена в медико-генетический центр, где работают высококвалифицированные специалисты по ВПР у плода. Данные УЗИ в 32-34 недели беременности имеют значение для тактики ведения родов, указывая положение плода и т.д.

Несмотря на высокую разрешающую способность УЗИ, для большинства наследственных болезней этот метод диагностики оказывается неэффективен и используется *инвазивная* (от латинского слова *invasio* –

проникновение) ПД. Инвазивная ПД основана на получении и анализе биологического материала плода – биоптата хориональной оболочки (метод хорионбиопсии), плаценты – плацентоцентез, амниотической жидкости – амниоцентез и крови из пуповины плода – кордоцентез. С диагностической целью хорионбиопсию проводят с 10 по 14 недели беременности, плацентоцентез или амниоцентез – с 14 по 20, кордоцентез – с 20 недели. Получение плодного материала заключается в следующем. Под контролем ультразвукового сканирования оператор специальной иглой, закрепленной в датчике-фиксаторе, через брюшную стенку проникает в хорион, плаценту, амниотическую полость или в пупочную вену и отсасывает (аспирирует) небольшое количество материала плода. Характер процедуры зависит от срока беременности. При хорион- или плацентобиопсии оператор аспирирует в иглу 15-20 мг ворсинок плодного места или хориона, амниотической жидкости получают не более 10 мл и крови – 1-1,5 мл. Этого материала вполне достаточно для проведения всех необходимых цитогенетических, молекулярных, биохимических и серологических исследований.

Самой распространенной причиной рождения детей с ВПР или с поражением легочной, сосудисто-сердечной и других систем является наличие у беременной *внутриутробных инфекций* бактериального, а чаще вирусного происхождения. По данным ИАГ им. Д. О. Отта РАМН частота генитального хламидиоза у беременных женщин составляет 25%. Риск передачи инфекции ребенку равен 40-70%. Примерно 6-7% новорожденных оказывается инфицированными хламидиями. Это ведет за собой поражение легких (воспаление легких), сердца (воспаление сердечной мышцы, так называемый миокардит), головного и спинного мозга (менингоэнцефалит) и т.д. Очень серьезным осложнением менингоэнцефалита может быть детский церебральный паралич и/или эпилептическая болезнь. Хотя и редко, но влекут за собой рождение ребенка с серьезными поражениями нервной системы цитомегаловирусная и токсоплазменная инфекции. Поэтому женщина, предполагающая стать матерью, непременно должна

обследоваться на наличие генитальных инфекций и при их обнаружении проходить соответствующее лечение.

Большую угрозу для здоровья будущего ребенка представляет *краснуха*. Если женщина перенесла это вирусное заболевание в первом триместре беременности, то риск рождения у нее ребенка с поражением слуха (глухотой), зрения (катарактой) и сердца (врожденным пороком) – так называемой триадой Грэгга – составляет 50%. Этот риск хотя и уменьшается, но остается достаточно высоким в случае заболевания женщины на более поздних сроках беременности (25% – во втором и 7-10% – в третьем триместре беременности). Практически всегда при этом наблюдается поражение головного мозга и отставание психического развития ребенка.

Известно, что все люди делятся на две группы в отношении *резус-принадлежности*. 85% - резус положительные Rh(+), то есть имеют в крови белок, называемый резус-фактором. Остальные 15% его не имеют и являются резус-отрицательными – Rh(-). В том случае, если у резус-отрицательной женщины муж резус-положительный, то с вероятностью 25-50% и ребенок окажется с положительной резус-принадлежностью, то есть возникнет резус-конфликт между плодом и матерью. В главе 2.4 мы уже подробно писали об этиологии, патогенезе и профилактике резус-конфликта.

Каждая женщина с отрицательным резус-фактором должна знать о существовании противорезусного гама-глобулина. Применение этого препарата при резус-положительном плоде предотвращает формирование резусных антител в крови матери и далее гемолитической анемии у плода. Последнее вызывает развитие билирубиновой энцефалопатии с формированием у ребенка детского церебрального паралича с развитием эпилептиформноподобных судорог и глубокого отставания психического развития. Каждая женщина с отрицательной резус-принадлежностью должна знать о существовании анти-D-иммуноглобулина, а также должна быть информирована специалистом (врачом-генетиком или гинекологом) о показаниях и методе применения этого препарата в своем конкретном случае.

Напомним еще раз, что будущие родители должны знать свою группу крови по Rh и АВ0 системам. Женщина с Rh(-) непременно должна обсудить с врачом-генетиком проблемы профилактики рождения ребенка с ВПР.

В настоящее время во всем мире и у нас в стране проводится ПД хромосомных и некоторых моногенных заболеваний, причем только в тех семьях, в которых риск рождения больных детей заведомо повышен. Чаще всего, это те семьи, в которых уже имеется ребенок с тяжелым наследственным заболеванием. В этом случае целью ПД является предотвращение повторного рождения больного ребенка.

2.16.1. Пренатальная диагностика хромосомных болезней

ПД хромосомных болезней может проводиться на любом сроке беременности по анализу кариотипа плода. С возрастом беременной резко увеличивается риск рождения ребенка с хромосомной патологией. Повышен этот риск и у юных физиологически незрелых беременных. Если у женщин в возрасте до 30 лет вероятность рождения ребенка с хромосомной болезнью составляет, в среднем, 1 на 1000, то среди 40-летних женщин этот риск возрастает почти в 8 раз. Поэтому возраст беременной женщины является показанием для проведения ПД хромосомных болезней у плода. В развитых странах такая диагностика проводится всем женщинам старше 35-38 лет. Иногда причина рождения ребенка с хромосомной болезнью связана с присутствием сбалансированной хромосомной перестройки (транслокации) у одного из родителей больного. В этом случае при каждой беременности сохраняется высокий риск рождения больного ребенка, достигающий 10%, если сбалансированная транслокация присутствует у матери, и около 3% - при наличии хромосомной перестройки у отца. В подобных семьях обязательно рекомендуется проводить ПД хромосомных болезней плода и, в первую очередь, синдрома Дауна.

Мы уже упоминали, что частота синдрома Дауна составляет 1 на 700 новорожденных. При нормальном кариотипе родителей повторный риск иметь ребенка с синдромом Дауна у женщин, находящихся в возрасте от 20

до 30 лет невелик и, обычно, не превышает 1%, к 35 годам он увеличивается в два раза, а затем и в большее количество раз. Несмотря на это, наибольшее количество больных с синдромом Дауна рождается у женщин, находящихся в оптимальном детородном возрасте, так как доля женщин, решающихся завести ребенка в возрасте старше 35 лет, а тем более, старше 40 лет относительно невелика. Поэтому усилия многих специалистов были направлены на разработку простых и безопасных диагностических тестов, позволяющих отбирать для проведения ПД те семьи, в которых риск рождения детей с хромосомной патологией повышен. И такие тесты были найдены, хотя все они не доказывают наличие хромосомной патологии у плода, а лишь могут служить показаниями для проведения инвазивной ПД. Оказалось, что плоды с синдромом Дауна характеризуются некоторыми морфологическими особенностями (такими как отсутствие назальной косточки и утолщение воротникового пространства), которые могут быть выявлены при проведении УЗИ на сроке 10-13 недель беременности. Кроме того, при подобной патологии плода в крови беременной женщины могут наблюдаться количественные изменения некоторых белков. Мы уже писали об этом в предыдущей главе. Добавим только, что в первом триместре информативным является ассоциированный с беременностью белок-А, а на сроке 15-18 недель упоминавшийся выше АФП и хорионический гонадотропин человека (ХГЧ). Таким образом, при проведении в указанные выше сроки массовых УЗИ и соответствующих биохимических скринингов беременных женщин можно выявить до 90% плодов с болезнью Дауна. У нас в стране подобные обследования избирательно проводятся только в некоторых крупных городах, в первую очередь в Москве и Санкт-Петербурге. Для точного расчета риска синдрома Дауна по показателям указанных выше белков в крови беременной разработаны и широко применяются специальные компьютерные программы. При риске хромосомной патологии 0,5% и выше рекомендуется применение инвазивной ПД с целью кариотипирования плода. Таким образом, показаниями для

проведения инвазивной *ПД хромосомных болезней* являются следующие: (1) возраст беременной 35 лет и старше; (2) наличие при предыдущей беременности ребенка (или плода) с хромосомной болезнью; (3) наличие у кого-либо из супругов или их родственников сбалансированных хромосомных перестроек; (4) наличие в предыдущей беременности ребенка (или плода) с множественными ВПР, у таких плодов более чем в 13% случаев встречаются хромосомные аномалии; (5) наличие ультразвуковых маркеров хромосомных болезней у плода; (6) риск у плода хромосомной патологии, в первую очередь болезни Дауна 0,5% и выше по результатам исследования маркерных сывороточных белков в крови матери; (7) применение женщиной или ее супругом фармакологических препаратов цитостатического действия или курсов рентгенотерапии незадолго до наступления беременности.

2.16.2. Пренатальная диагностика моногенных болезней

Многие моногенные заболевания относятся к классу тяжелых неизлечимых болезней, и потому предотвращение рождения больных детей с использованием ПД является единственным методом их профилактики. Если в семье уже имеется больной с моногенной патологией, то чаще всего при всех последующих беременностях будет сохраняться высокий риск повторного рождения больного ребенка. Этот риск определяется типом наследования заболевания и рассчитывается врачом-генетиком. Многие доминантные заболевания развиваются только у взрослых и даже на 4-5-ом десятилетии жизни. В этих случаях вопрос о необходимости проведения ПД не является однозначным и в значительной степени зависит от тяжести течения патологии и сроков ее дебюта.

Основным универсальным методом ПД моногенных заболеваний является молекулярно-генетическое тестирование или ДНК-диагностика мутаций у плода. Перед проведением ПД необходимо обследование каждого из родителей, а также больного ребенка в семье (если он имеется) с целью молекулярной идентификации мутаций и определения возможности и

условий проведения ПД. Для проведения ДНК-диагностики достаточно получения от 1 до 5 мл венозной крови от каждого из обследуемых членов семьи. Подобный анализ лучше всего проводить до наступления беременности с тем, чтобы оптимизировать конкретную тактику инвазивной ПД. После этого семья может планировать свою беременность. Заметим, что при некоторых наследственных заболеваниях, таких, в первую очередь, как муковисцидоз и фенилкетонурия, в качестве материала для молекулярной идентификации мутаций у больного и его родителей могут быть использованы высушенные на фильтровальной бумаге пятна крови. В настоящее время у нас в стране проводится ПД более 60 наследственных заболеваний (табл. 15, гл. 2.14).

Глава 2.17. Молекулярная диагностика инфекций

Глава 2.18. Геномная дактилоскопия

Глава 2.19. Лечение больных с врожденной и наследственной патологией

Методы лечения наследственных заболеваний очень разнообразны. В большинстве своем они носят симптоматический характер, при этом никогда или очень редко удается добиться полного излечения больного. Однако основной принцип, которым должен руководствоваться врач, заключается в том, что нет ни одного больного, которого заведомо не нужно лечить, Нет ни одной семьи с наследственной патологией, членам которой не удастся, хотя бы в небольшой степени, облегчить страдания. Причем, это касается как самого больного, так и его ближайших родственников, в первую очередь, родителей. Мы неоднократно вспоминали нашего выдающегося медицинского и клинического генетика академика Сергея Николаевича Давиденкова. Сошлемся на него и сейчас: «Может быть сформулировано общее правило, звучащее на первый взгляд парадоксально: хотя эти болезни и не удастся излечить, но, тем не менее, мы их лечить непременно обязаны» - С.Н. Давиденков, 1957. Речь идет о наследственно обусловленной патологии, в том числе и о хромосомных синдромах.

Проблемы профилактики и/или лечения больных с врожденной и наследственной патологией обсуждались нами практически после каждого описания нозологической формы или в конце соответствующих глав. Вместе с тем, мы сочли необходимым в отдельной главе суммировать общие подходы, используемые при лечении этих заболеваний.

К сожалению, до настоящего времени находятся люди с врачебным дипломом, которые крайне скептически относятся к лечению больных с наследственной патологией и коррекции генетически обусловленных состояний. Однако в самых безнадежных случаях у врача должны найтись оптимистические слова и рекомендации для облегчения состояния самого больного и его близких. Не можем не отметить, что число результативно курируемых больных с наследственной патологией увеличивается с каждым годом.

Помимо индивидуальных рекомендаций по подготовке супругов к зачатию (проведение медико-генетического обследования, консультаций эндокринолога, уролога, гинеколога и т.д.) существуют общепринятые для всех советы, способствующие снижению числа рождения детей с наследственной или врожденной патологией. К ним, в частности, относится рекомендация по применению женщиной препаратов фолиевой кислоты за 2-3 месяца до начала и в первом триместре беременности. Эта нехитрая процедура в ряде случаев может предотвратить формирование некоторых врожденных пороков у плода. Повторим, что к фолатзависимым дефектам относятся ДЗНТ, врожденные пороки сердца, редукции конечностей. Разработан комплекс профилактических препаратов аналогичного действия, рекомендуемый для приема мужьям за несколько месяцев до планируемой беременности супруги.

2.19.1. Симптоматическое лечение

При всех наследственных и врожденных заболеваниях, независимо от уровня наших знаний об их этиологии и патогенезе, показано симптоматическое лечение. Такое лечение не влияет на причину

заболевания, но может снизить скорость его прогрессирования, значительно облегчить состояние больного, отодвинуть или даже предотвратить развитие инвалидизирующих осложнений. При этом могут быть использованы самые разнообразные методы терапии – медикаментозные, хирургические, физиотерапевтические и др. Результаты симптоматического лечения, обычно, не очень продолжительны, требуется многократное повторение лечебных процедур, причем их эффективность со временем снижается. Тем не менее, не следует отказываться от подобного лечения, и пока пациент жив, нужно стараться делать все возможное для облегчения страданий самого больного и его близких.

Набор методов симптоматического лечения может быть очень широким от использования болеутоляющих и противовоспалительных средств при гемоартрозах и других наследственных болезнях с выраженными болевыми и воспалительными синдромами; противосудорожных препаратов при наличии эпилептической болезни и эпилептиоформных пароксизмах; препаратов ноотропного действия при умственной отсталости; препаратов, улучшающих процессы тканевого дыхания при митохондриальных болезнях и прогрессирующих мышечных дистрофиях и т. д., до хирургической коррекции врожденных пороков развития, гидроцефалии, контрактур суставов, сопровождающих некоторые формы миопатии и метаболической артропатии, и многих других тяжелых врожденных и наследственных заболеваний.

В последнее время все больше входит в практику трансплантация органов и тканей как метод лечения наследственных заболеваний. Ее успех зависит от решения двух основных проблем трансплантологии – наличия органа для пересадки и преодоление реакции иммунологического отторжения. Пересадки костного мозга используются при липидозах, серповидно-клеточной анемии, болезни Гоше, анемии Фанкони; трансплантации печени – при болезни Гоше, гепатолентикулярной дегенерации, болезни Нимана-Пика; пересадки почки – при первичном

амилоидозе и семейном поликистозе; сердца и легких – при муковисцидозе и др. Сообщается об успешной аллотрансплантации поджелудочной железы при сахарном диабете. Нет сомнения в том, что эта методология в сочетании с терапевтическим клонированием различных органов и тканей имеет большие перспективы и в дальнейшем будет широко использоваться для лечения не только наследственных заболеваний, но и многих других хронических болезней, которые в настоящее время считаются неизлечимыми.

Арсенал средств неспецифического, но высоко лечебного действия увеличивается с каждым днем. У мужчин с синдромом Клейнфельтера при наличии мешающей ему гинекомастии производят удаление молочных желез. Жене супруга с синдромом Клейнфельтера для расширения семьи может быть применено экстракорпоральное оплодотворение с использованием донорской спермы. Многие женщины, мужья которых страдают бесплодием, прибегают к этому способу деторождения.

При синдроме Шерешевского-Тернера применяются гормональная терапия для стимуляции роста и при необходимости препараты ноотропного действия. У отдельных женщин с этим синдромом при мозаичных вариантах и наличии гениталий (возможно, гипопластичных) используются методы новых репродуктивных технологий. Благодаря этому женщины с синдромом Шерешевского-Тернера становятся мамами.

До настоящего времени считалось, что при синдроме Дауна никакие вмешательства не изменяют психический статус больного. Однако, при хорошем внимательном отношении к ребенку с синдромом Дауна со стороны окружающих, первым делом мамы и папы, степень умственной неполноценности можно уменьшить и добиться оптимального снижения ограниченных возможностей больного в семье. Длительное применение упражнений по развитию мелкой моторики пальцами рук, регулярные занятия с логопедом-дефектологом, разработанные для конкретного ребенка физкультурные упражнения по улучшению координации и увеличению

мышечной силы – все эти элементы воспитания должны присутствовать в семье, имеющей ребенка с синдромом Дауна. Наряду с этим, желательно применение препаратов ноотропного действия, фолатов, витаминотерапия и т.д. В этих случаях можно добиться не только оптимального контакта с ребенком в семье, но и его адаптации в обществе. Кроме того, у больных синдромом Дауна нередко наблюдаются врожденные пороки: атрезия желчновыводящих путей, порок сердца, лейкоз и др. Указанные заболевания на сегодняшнем уровне медицины поддаются коррекции.

Мы были свидетелями посещения французскими детьми с синдромом Дауна музея королевского дворца в Версале, конечно, в сопровождении специалистов по работе с подобными детьми. Надеемся, недалеко время, когда будут заказывать экскурсии для русских детей с синдромом Дауна в Эрмитаже. Умственно неполноценные дети, в том числе с синдромом Дауна из специализированного интерната № 4 (г. Павловск, Санкт-Петербург) в результате проводимой с ними работы настолько активны, что привозят домой медали всех достоинств со специальных олимпийских игр, завоеванных по гимнастике, конному спорту и др.

2.19.2. Патогенетическое лечение

Патогенетическое лечение наследственных болезней направлено на коррекцию биохимических и физиологических процессов, нарушение работы которых связано с дефектом или полным отсутствием мутантного белка. В настоящее время этот метод лечения наиболее эффективен для наследственных болезней обмена. Необходимой предпосылкой для разработки методов патогенетического лечения является знание первичного биохимического дефекта, функций, выполняемых мутантным белком в различных тканях организма и характера повреждения этих функций у больного. Важно знать, обусловлено ли развитие патологического процесса накоплением токсических концентраций промежуточного метаболита или отсутствием конечного продукта метаболических превращений. Связаны ли

патологические нарушения с изменением активности мутантного белка или появлением у него нового агрессивного свойства.

Самым простым методом патогенетического лечения является диетотерапия. Но она эффективна лишь в тех случаях, когда патологический процесс определяется накоплением токсических промежуточных метаболитов, а субстрат для первично дефектной метаболической цепи поступает в организм с пищей. В этом случае диетотерапия направлена на ограничение или полное прекращение поступления в организм продуктов, превращение которых нарушено в результате ферментативного блока. Примерами таких заболеваний является фенилкетонурия и галактоземия, при которых назначение в первые недели жизни больного ребенка диеты, не содержащей фенилаланина и лактозы соответственно, предотвращает развитие тяжелых клинических проявлений.

В тех случаях, когда субстрат для патологической метаболической цепи не поступает с пищей, а синтезируется в организме, проводится заместительная терапия, направленная на повышение активности дефектного фермента. Это может достигаться различными терапевтическими средствами: введением лекарственных препаратов, стимулирующих выработку ферментов, введением коферментов, введением чистого фермента. Первые два метода являются малоэффективными, хотя и применяются при лечении некоторых наследственных заболеваний. Например, при гомоцистинурии в качестве кофактора используют пиридоксин, при метилмалоновой ацидемии – кобаламин, при недостаточности СоА-дегидрогеназ – рибофлавин. Пиридоксин может быть рекомендован при пиридоксинзависимых судорогах, витамин Д – при фосфатдиабете и препараты карнитина – при системной недостаточности карнитина, причем эти назначения могут быть сделаны уже врачом поликлинического уровня.

Наиболее эффективным способом терапевтической коррекции наследственных энзимопатий является введение недостающего фермента в

те клетки больного, которые в наибольшей степени в нем нуждаются. Основными проблемами, возникающими при этом способе введения являются: получение в достаточном количестве чистого фермента, преодоление реакции иммунологического отторжения при введении этого фермента в организм больного и обеспечение его доставки в нужные типы клеток. Наибольшие успехи в разработке подобных схем заместительной терапии достигнуты при лечении лизосомных болезней накопления – аутосомно-рецессивных заболеваний, обусловленных мутациями в генах ферментных систем лизосом. Особенно большого успеха удалось достичь при лечении с помощью клеточной ферментотерапии болезни Гоше. Своевременно начатое лечение и постоянный прием больными β -глюкозидазы (препараты церезим или церезидаза) предотвращает развитие болезни и инвалидизацию больных, способствуя их оптимальной адаптации в обществе. Нам известны случаи, когда больные болезнью Гоше, многие годы получая церезидазу, практически не ощущали своей болезни и имели лишь относительно небольшие ограничения в жизни. Хорошие результаты получены при заместительной ферментотерапии некоторых других лизосомных болезней и мукополисахаридозов, особенно в тех случаях, когда они не сопровождаются тяжелыми неврологическими аномалиями. До сих пор не удалось создать ферментативные препараты, успешно проникающие через гематоэнцефалический барьер и влияющие на метаболические процессы в нейронах мозга. Противоположный подход используется при лечении наследственных болезней, обусловленных повышением ферментативной активности мутантного белка. Примером может служить лечение падагры и синдрома Леша-Нихана аллопуринолом, подавляющим активность ксантиноксидазы.

Один из способов лечения наследственных заболеваний, патогенез которых обусловлен, главным образом, накоплением в различных органах и тканях больного токсических соединений, основан на использовании препаратов, которые способны связывать эти соединения и выводить их из

организма. Удовлетворение получает врач при лечении больных гепатолентикулярной дегенерацией (болезни Вильсона-Коновалова) препаратами D-пенициллина и цинка. D-пенициллин содержит сульфгидрильные группы, образующие комплексы с тяжелыми металлами, в том числе с медью. Напомним, что патогенез заболевания в значительной степени определяется медной интоксикацией. Препараты цинка ограничивают поступление меди с пищей, так как цинк находится в конкурентных взаимоотношениях с медью и препятствует ее всасыванию в тонком кишечнике. При комплексной терапии больных в преклинической стадии возможно полностью предотвратить развитие инвалидизирующей патологии, а в неврологической стадии – приостановить его. Практически 90% больных поддаются коррекции.

При заболеваниях, обусловленных дефицитом конечного продукта патологической метаболической цепи, лечение направлено на возмещение недостающего продукта. Такой подход наиболее эффективен при гормон-дефицитных состояниях. Примером является лечение врожденного гипотиреоза тироксином, своевременное назначение которого полностью предотвращает развитие клинических симптомов. Уместно также вспомнить лечение стероидными гормонами адреногенитального синдрома и лечение различных вариантов нанизма (в первую очередь, гипофизарных) гормоном роста.

Положительные результаты мы видим у больных проксимальной спинальной мышечной атрофией (СМА) при применении комплексного лечения с обязательным использованием вальпроевой кислоты и элькара. Это связано с особенностями структуры хромосомного локуса, содержащего ген *SMN1*, и присутствием в нем псевдогена *SMN2*, активация которого с помощью вальпроевой кислоты и обеспечивает успех лечения. Заметный эффект наступает у детей со вторым типом СМА, у которых в большей степени сохранена подвижность в нижних конечностях, а также при форме Кугельберга-Веландер. Меньший эффект наблюдается у детей с первым

типом заболевания – болезнью Верднига-Гоффмана. Больным СМА обязательно показано наблюдение ортопеда с целью оказания своевременной ортопедической помощи для предотвращения или коррекции деформаций в крупных суставах и позвоночнике – изготовления ортезов (туторов, ортопедической обуви, корсета), проведения хирургических ортопедических операций по ликвидации контрактур в суставах и искривлению позвоночника. Работа по разработке схемы лечения больных СМА с применением вальпроевой кислоты продолжается.

В настоящее время не считается летальной гемофилия. С разработкой и увеличением областей применения в гематологии различных кровезаменителей и препаратов, способствующих повышению свертываемости крови, больные гемофилией получают результативную медицинскую помощь. Однако не можем и здесь не отметить, что женщина, несущая мутацию в гене гемофилии, а потому сохраняющая при каждой беременности 50%-ый риск рождения больного сына, имеет право на пренатальную диагностику заболевания. В дальнейшем именно за ней и ее мужем сохраняется приоритетное право на решение, касающееся тактики ведения беременности.

Еще 30 лет назад мы не предполагали, что будем иметь возможность более 35 лет наблюдать до сих пор вполне дееспособную и самостоятельную больную гепатолентикулярной дегенерацией (57 лет); больная 25 лет с фенилкетонурией, выявленная нами в результате неонатального скрининга, в скором времени станет полноценной мамой; а юноша с синдромом Дауна будет способен стать равноценным исполнителем одной из ведущих ролей в художественном фильме.

Все эти достижения, безусловно, связаны с прогрессом медицинской генетики и других областей науки. В отдельных случаях реализация этих достижений связана с колоссальнейшим трудом, терпением и неуклонной настойчивостью самих больных. Очень большое значение в результативности лечения, даже при наличии самых целебных лекарств,

имеет забота и внимание как родителей и других членов семьи больного, так и специалистов – врачей, медицинских сестер, педагогов, психологов и т.д. – от которых, в значительной степени, зависит благополучие пациентов.

2.19.3. Этиологическое лечение

Наиболее перспективным способом лечения наследственных заболеваний является исправление генетического дефекта, то есть генотерапия. При этом устраняется причина заболевания, то есть это лечение этиологическое. До недавнего времени, генотерапия развивалась как чисто теоретическая дисциплина, направленная на лечение наследственных, в первую очередь, моногенных заболеваний. Предполагалось, что в этих случаях генный дефект будет исправляться в ранних зародышах или даже в зародышевых клетках. Принципиальная возможность такого подхода многократно доказана на экспериментальных животных и, в частности, на генетических линиях мышей, моделирующих различные наследственные болезни человека. Реальное развитие генотерапии у человека пошло по иному пути. Проводится не зародышевая, а соматическая генотерапия. Считается, что в настоящее время наш уровень знаний о структуре генома еще недостаточен для проведения генетических манипуляций с зародышевыми клетками человека, так как неконтролируемые последствия от таких введений могут сказаться в будущих поколениях. Неожиданным оказалось и то, что генотерапия, которая разрабатывалась специально применительно к лечению наследственных болезней, в большей степени используется для лечения ненаследственных, в первую очередь, онкологических заболеваний, вирусных инфекций и многих других патологических состояний. Большая часть генотерапевтических исследований сфокусирована не столько на исправлении самого гена, сколько на компенсации последствий, вызванных соматическими или зародышевыми мутациями.

Комплексная программа соматической генной терапии включает целый ряд самостоятельных этапов, ключевыми из которых являются

следующие: 1) создание вводимой генетической конструкции, которая может включать несколько генов, один ген или его фрагменты; 2) определение типа клеток, нуждающихся в генетической модификации; 3) разработка способа введения чужеродной ДНК в патологические клетки; 4) обеспечение адресной доставки вводимого генетического материала; 5) обеспечение устойчивой экспрессии введенной ДНК-конструкции; 6) оценка количества клеток, модификация которых необходима для получения клинического эффекта; 7) разработка методов контроля экспрессии введенного генетического материала; 8) оценка длительности экспрессии и периодичности введения чужеродной ДНК; 9) прогнозирование клинического эффекта и возможных побочных эффектов, связанных с проведением генотерапевтической процедуры. Решение каждого из перечисленных вопросов требует проведения большого числа экспериментов на модельных объектах и преклинических испытаний на животных. Только в том случае, если эти эксперименты окажутся успешными, может быть получено разрешение на проведение клинических испытаний. Несмотря на такие строгие ограничения, уже около 500 генотерапевтических проектов в США либо достигли стадии клинических испытаний, либо находятся на стадии утверждения. В нашей стране работы в области генотерапии хотя и проводятся в ряде центров применительно к муковисцидозу, миодистрофии Дюшенна, некоторых онкологических заболеваний, но ни один из этих проектов еще не достиг стадии клинических испытаний.

Первое успешное лечение методами генотерапии было осуществлено около 20 лет тому назад в США в отношении моногенного заболевания – сложного комбинированного иммунодефицита, обусловленного недостаточностью фермента аденозиндезаминазы (ADA). Это редкое аутосомно-рецессивное заболевание с частотой 1:100 000 рождений. При отсутствии аденозиндезаминазы в крови пациентов накапливается промежуточный метаболит - 2-дезоксаденозин, который препятствует нормальному созреванию Т- и В-лимфоцитов. Это и

приводит к развитию заболевания. Дети с ADA-недостаточностью не выдерживают соприкосновения с инфекциями и могут жить только в условиях стерильного бокса. Обычная терапия, которая применялась в отношении детей с ADA-недостаточностью, основана либо на введении высоких доз фермента, либо на пересадке клеток костного мозга от совместимых доноров. Обе эти процедуры не дают длительного эффекта. В 1990 году девочке 4-х лет, страдающей этим редким заболеванием, были пересажены ее собственные лимфоциты, в которые предварительно в условиях культивирования был введен нормальный ген ADA. Лечебный эффект наблюдали в течение нескольких месяцев, после чего процедуру повторяли с интервалом в 3-5 месяцев. На протяжении трех лет терапии в общей сложности было проведено 23 внутривенных трансфузии ADA-трансформированных Т-лимфоцитов без видимых неблагоприятных эффектов. В результате лечения состояние пациентки настолько улучшилось, что она смогла вести нормальный образ жизни. Столь же успешным оказалось лечение и других подобных пациентов, проводимое в США, Италии, Франции, Великобритании и Японии. В настоящее время программа генотерапевтического лечения ADA-недостаточности модифицирована таким образом, что не в зрелые Т-лимфоциты, а в стволовые клетки костного мозга вводится генетическая конструкция, содержащая нормальный ген ADA. При этих условиях получают более пролонгированный эффект от каждой процедуры реинфузии. После 2-3 лет подобной терапии пациенты, как правило, уже не нуждаются в повторных введениях модифицированных клеток.

Начаты клинические испытания генотерапии миодистрофии Дюшенна, семейной гиперхолестеринемии, муковисцидоза, гемофилии В, болезни Гоше. В отношении нескольких десятков других моногенных заболеваний медицинские протоколы клинических испытаний находятся на стадии утверждения. Однако более трех четвертей утвержденных для клинических испытаний генотерапевтических проектов связано с

проблемами опухолевого роста и лечением онкологических заболеваний. Тем не менее, в настоящее время еще рано говорить о широком использовании методов генотерапии для лечения наследственных заболеваний.

Схожая ситуация наблюдается в отношении эффективности применения стволовых и других фетальных клеток при лечении больных с наследственной патологией. Фетальные клетки способны дифференцироваться в любые другие типы клеток, содержат большое количество биологически активных веществ, включая факторы роста, антиоксиданты, стимуляторы регенерации, иммунитета и др., не вызывают иммунных реакций, так как на их поверхности еще не экспрессируются HLA-антигены. Эти и некоторые другие особенности делают их перспективными для лечения многих заболеваний, включая некоторые хромосомные и моногенные болезни, особенно связанные с поражением ЦНС. Источником собственных стволовых клеток может быть консервированная пуповинная кровь, банки которой уже создаются в США и Европе. Планируется проведение подобной работы и в Москве. Стволовые клетки существуют и в тканях взрослого организма, хотя с возрастом их количество резко снижается, и их выделение становится достаточно трудоемким. Основной опасностью терапевтического использования стволовых клеток является их способность к малигнизации. Тем не менее, перспективы клеточной терапии с использованием стволовых клеток достаточно привлекательны. Очевидно, что методы генной и клеточной терапии уже в недалеком будущем получат полноценное «гражданство» в оказании помощи многим больным, в том числе и с наследственными заболеваниями.

Глава 2.20. История развития отечественной медицинской генетики

Первая кафедра по генетике не только в нашей стране, но и в большинстве европейских стран, была организована в 1919 году в Петроградском университете выдающимся русским биологом первой половины XX века Юрием Александровичем Филипченко, начавшим читать курс по генетике уже в 1913 году и подготовившим серию учебников по генетике: «Генетика» (1927), «Эволюционная идея в биологии» (1923), «Изменчивость и методы ее изучения» (1923).

Глава 2.21. Некоторые этические проблемы медицинской генетики

В рамках программы ВОЗ по генетике человека регулярно публикуются рекомендации по этическим проблемам медицинской генетики. основополагающий принцип этих рекомендаций заключается в том, что применение генетических знаний в медицине должно находиться в соответствии с общими принципами медицинской этики. Это забота о благе больного и его семьи, не причинение вреда, свобода выбора при принятии пациентом решения на основе предоставленной информации, обеспечение личной и социальной справедливости. Данные генетического обследования индивидуума не могут быть получены без его ведома и согласия, хотя сам он имеет право свободно распоряжаться своей собственной генетической информацией.

В этическом плане генетическая информация не имеет принципиальных отличий от любой медицинской информации. Она лишь позволяет в совокупности с другими данными более точно прогнозировать возможные изменения состояния здоровья в будущем. Генетическая информация может быть непосредственно использована для пользы больного (если он захочет ее получить), может быть полезна для общества без прямой выгоды для самого обследуемого и, наконец, потенциально может быть использована во вред обследуемому.

В настоящее время разработан большой арсенал биотехнологических и геноинженерных манипуляций, доступных для применения на человеке. Эти

манипуляции не всегда безопасны и в определенном проценте случаев могут нанести вред пациенту. Кроме того, в связи с высокой разрешающей способностью этих технологий в обществе нарастает озабоченность по поводу моральных принципах, лежащих в основе их использования и интерпретации полученных результатов. Эта озабоченность образно выражается в характеристике: «Игра в «Бога».

Основные этические принципы при генетическом обследовании и использовании генетической информации достаточно стандартны:

1. *Принцип автономии личности*, то есть уважение права на личный выбор. Соблюдение этого принципа требует получение информированного согласия на участие в обследовании или опытах и дальнейшее использование персональной генетической информации обследуемого. Гарантия конфиденциальности и приватности в отношении индивидуальных генетических данных. Соответствие процедуры сбора данных существующим стандартам. Интересы недееспособного человека должны быть представлены доверенным лицом (чаще всего, родственником больного), который на основании предоставленной ему информации оценит все недостатки и преимущества участия в обследовании и/или использовании генетических данных.
2. *Принцип «делай добро»*, то есть предписание стремиться к достижению блага для обследуемого или общества. При этом получение выгоды может быть отсроченным, выгода может быть непрямая, трудно осязаемая, ее размер зависит от точности и статистической достоверности, обеспечиваемой всей совокупностью данных. В некоторых случаях важно правильно интерпретировать вероятностный характер результатов тестирования. Часто для извлечения пользы из генетических данных необходимо информировать о них других участников медицинского обследования, что приводит к относительному характеру конфиденциальности.

3. *Принцип «не навреди»* является главенствующим. Причем этот принцип касается не только медицинских аспектов, но и социальных, связанных с медицинским страхованием, наймом на работу и т. п.
4. *Принцип справедливости*, то есть равный подход к диагностике и лечению всех пациентов, а также справедливое и равное распределение всех выгод.

При проведении генетических исследований необходимо учитывать не только международное и национальное законодательство, но и специальные социальные, религиозные, моральные, этические и другие ценности. Абсолютно недопустимо использовать генетическую информацию в целях дискриминации или эксплуатации отдельных личностей или групп людей. Важными моральными и этическими принципами являются (1) предоставление научному сообществу в кратчайшие сроки результатов генетических исследований, а также (2) содействие образовательной деятельности в области генетики.

Основная роль в контроле над соблюдением рекомендаций ВОЗ, касающихся этических принципов медицинской генетики, принадлежит независимым этическим консультативным группам (НЭКГ), составленным из экспертов не только в области научной этики и медицинской генетики, но также и других медицинских дисциплин.