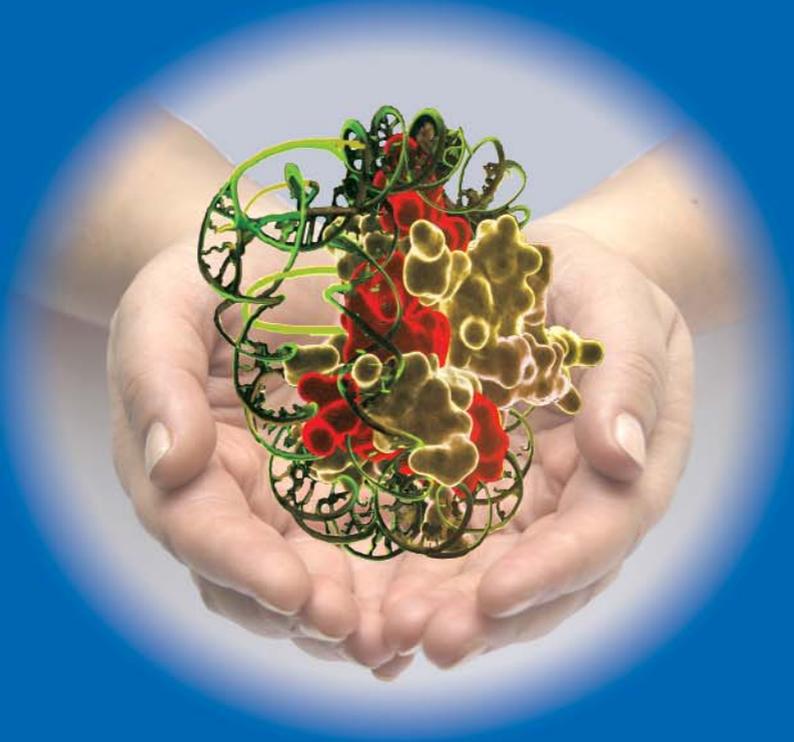


# ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

Под редакцией академика АМН Украины  
В. Н. ЗАПОРОЖАНА



ОДЕССКИЙ  
МЕДУНИВЕРСИТЕТ



# ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

*Под редакцией академика АМН Украины  
В. Н. Запорожана*



Одесса

Одесский государственный  
медицинский университет

2008

ББК 52.522  
Г 34  
УДК 612.6.05+616-056.7

*Авторы:* В. Н. Запорожан, В. А. Кордом, Ю. И. Бажора, В. И. Кресюн,  
И. М. Трахтенберг, Е. Л. Левицкий, В. Ф. Чехун,  
Л. З. Полищук, Л. Г. Бучинская, Н. Л. Аряев, Е. Г. Дерябина,  
Ч. М. Хабибулла (С. М. Habibullah), Р. Хусс (R. Huss),  
Д. Уитли (D. Wheatley), Г. М. Бутенко

*Рецензенты:* директор Института молекулярной биологии и генетики  
Национальной академии наук Украины  
академик НАН Украины профессор А. В. Ельская  
академик Национальной академии наук Украины,  
Академии медицинских наук Украины и Российской академии  
медицинских наук Е. М. Лукьянова  
директор ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН  
академик Российской академии медицинских наук С. Б. Середенин

В книге представлены достижения различных направлений генетической медицины — науки, давно вышедшей за рамки клинической генетики. В отдельных главах рассматриваются как вопросы генетического контроля механизмов функционирования организма человека на различных уровнях его организации, так и применение достижений геномики, протеомики и метаболомики в диагностике, лечении и профилактике заболеваний.

Для научных работников, врачей, студентов высших медицинских учебных заведений.

The book presents the achievements of various trends in genetic medicine, the science which has become much more than clinical genetics. Both the questions of genetic control of human organism functioning mechanisms at various levels of its organization and application of genomics, proteomics and metabolomics achievements in diagnosis, treatment and prophylaxis of diseases are highlighted in certain chapters.

The book is intended for scientists, doctors, students of higher medical educational establishments.

Рекомендовано к изданию  
Ученым советом Одесского государственного медицинского  
университета. Протокол № 8 от 15.03.2007 г.

ISBN 978-966-443-001-9

© Колектив авторів, 2008  
© Одеський державний медичний університет, 2008

## Сведения об авторах



**Валерий Николаевич Запорожан** — лауреат Государственной премии Украины, действительный член Академии медицинских наук Украины, член Президиума АМН Украины, доктор медицинских наук, профессор, ректор Одесского государственного медицинского университета, почетный доктор многих зарубежных университетов и академий. Автор многочисленных публикаций. За весомый вклад в медицинскую науку награжден многими престижными наградами, в том числе премией им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины, Золотой медалью Альберта Швейцера, высшей наградой Польской академии медицины «Большая золотая звезда», медалью университета им. Джорджа Вашингтона и др.



**Виталий Арнольдovich Кордюм** — доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент НАН и академик АМН Украины, заведующий отделом регуляторных механизмов клетки Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины. Научные работы посвящены молекулярной генетике. Создал новое направление генной биотехнологии — фактозависимый суперсинтез. Впервые обосновал возможность использования генной терапии для лечения ряда патологий.



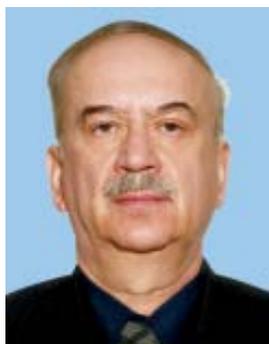
**Юрий Иванович Бажора** — доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки и техники Украины, лауреат Государственной премии Украины, заведующий кафедрой клинической иммунологии, генетики и медицинской биологии, проректор по научно-педагогической работе Одесского государственного медицинского университета. Известный ученый в области медицинской генетики и иммунологии. Автор более 450 опубликованных работ, в том числе 42 монографий, учебников, руководств.



**Валентин Иосифович Кресюн** — доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент АМН Украины, заслуженный деятель науки и техники Украины, заведующий кафедрой общей и клинической фармакологии, первый проректор Одесского государственного медицинского университета. Известный ученый в области фармакологии и клинической фармакологии. Автор более 600 опубликованных работ, в том числе 33 монографий, учебников, руководств, 40 патентов Украины и зарубежных стран.



**Исаак Михайлович Трахтенберг** — доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент НАН Украины, академик АМН Украины, заслуженный деятель науки и техники, лауреат Государственной премии Украины, Академической премии АМНУ по профилактической медицине, председатель проблемной комиссии МЗ и АМНУ «Токсикология», член ряда научных обществ. Автор более 500 научных работ в области профилактической токсикологии, гигиены труда, медицинской экологии, патологии химического генеза. Многие из них опубликованы за рубежом.



**Евгений Леонидович Левицкий** — доктор биологических наук, старший научный сотрудник, главный редактор журнала «Современные проблемы токсикологии», научный редактор журнала «Биотехнология», главный научный сотрудник отдела биохимической фармакологии Института фармакологии и токсикологии АМН Украины. Автор более 160 научных работ в области молекулярной биологии, биохимии, токсикологии, фармакологии, геронтологии.



**Василий Федорович Чехун** — директор Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины, заведующий отделом механизмов противоопухолевой терапии, академик НАН Украины, профессор, доктор медицинских наук, заслуженный деятель науки и техники Украины. Автор более 280 научных работ, в том числе 7 монографий и 17 патентов на изобретения. Главный редактор международного научного журнала «Экспериментальная онкология» и научно-практического журнала «Онкология». Награжден многими престижными наградами.



**Людмила Захаровна Полищук** — ведущий научный сотрудник отдела механизмов противоопухолевой терапии Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины, профессор, доктор медицинских наук. Лауреат премии им. А. А. Богомольца НАН Украины. Автор более 250 научных трудов, в том числе трех монографий и трех авторских свидетельств на изобретения. Активный член Европейской цитогенетической ассоциации.



**Любовь Георгиевна Бучинская** — заместитель директора по научной работе Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины, руководитель лаборатории онкогенетики, кандидат биологических наук, лауреат премии им. А. А. Богомольца НАН Украины. Автор более ста научных трудов, в том числе двух монографий и одного авторского свидетельства на изобретение. Член редколлегии международного научного журнала «Экспериментальная онкология».



**Николай Леонидович Аряев** — член-корреспондент АМН Украины, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой госпитальной педиатрии и неонатологии, проректор по научно-педагогической работе Одесского государственного медицинского университета. Автор более трехсот научных трудов, учебников и учебных пособий. Координатор и руководитель ряда исследовательских программ, как отечественных, так и международных. Лауреат многих наград.



**Елена Григорьевна Дерябина** — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, заведующая лабораторией генно-клеточных модификаций отдела генных технологий Института генетической и регенеративной медицины АМН Украины. Автор более 50 научных публикаций, член Украинского научного общества молекулярной биологии, научного общества микробиологов Украины, а также международного научного общества TERMIS.



**Читтур Мохаммед Хабибулла** — член-корреспондент Академии наук и Академии медицинских наук Индии, доктор медицинских наук, директор Центра исследований и диагностики заболеваний печени (Индия), директор медицинского колледжа, автор многочисленных публикаций по проблемам лечения заболеваний печени, в том числе с использованием клеточной терапии. Награжден многими престижными наградами.



**Ральф Хусс** — доктор медицинских наук, профессор, известный немецкий ученый и общественный деятель, заведующий отделом экспериментальной патологии и исследования стволовых клеток Института патологии Мюнхенского университета (ФРГ). Автор более 130 научных публикаций, книг и монографий по проблемам социальной медицины, лейкемии, молекулярных механизмов образования опухолей, трансплантологии и трансплантационной иммунологии, стволовых клеток и тканевой терапии. Лауреат многих национальных и международных премий.



**Денис Уитли** — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологии Аберденского университета (Великобритания), иностранный член АМН Украины, генеральный секретарь Международной федерации клеточной биологии, главный редактор изданий «Cell Biology International» и «Cancer Cell International». Удостоен многочисленных наград за работы в сфере изучения рака и других научных областях.



**Геннадий Михайлович Бутенко** — член-корреспондент НАН Украины, академик АМН Украины, член-корреспондент Российской АМН, лауреат Государственной премии Украины, директор Института генетической и регенеративной медицины АМН Украины. Автор более 350 научных работ. Основные направления исследований: изучение механизмов возрастных изменений системы иммунитета, связи изменений физиологических систем с развитием патологии при старении.

# Предисловие

---

---

Возникновение многих заболеваний, и это несомненно, объясняется поврежденными генами. Число этих заболеваний постоянно пополняется по мере того, как исследуются различные синдромы. Этому способствуют современные технологии, которые позволяют выявить все новые случаи, ранее объясняемые наследственностью. Сразу вспоминается генетическая предрасположенность к раку. Отсутствие гена или его дефект (неправильная трансляция) может приводить к возникновению мутаций, проявляющихся «синдромами», то есть к множественным мутациям, которые вызывают не одно, а несколько клинических проявлений. Некоторые мутации обладают более вредным действием, чем остальные: одни летальны на ранних стадиях, другие нарушают нормальное развитие на более поздних, а третьи проявляются после пубертатного периода и даже в зрелом возрасте. Мы не можем игнорировать тот факт, что повреждение генов приводит к изменениям, на которые влияет окружающая среда в широком смысле слова (пищевые продукты). Питание, как и природа, должно учитываться, особенно там, где оно может компенсировать крайне тяжелые последствия повреждения генов.

В некоторых случаях поломки генов приводят к незначительным мутациям, а иногда (довольно редко) являются частью нашей эволюции и способствуют появлению полезных свойств, которые облегчают адаптацию к окружающей среде. Однако большинство мутаций отрицательны. Некоторые мутации влияют не на конеч-

ный продукт (белок, полученный при транскрипции комплементарной иРНК), а воздействуют посредством одного гена на весь оперон, что нарушает многие смежные процессы метаболизма. Полная расшифровка генома, транскриптома и протеома может помочь нам проследить влияние, которое оказывает мутация одного гена на весь оперон. Если дефект гена влияет на всю систему метаболизма, что вполне вероятно, учитывая целостную природу жизни, то метаболом может дать ценную информацию об эффекте мутации в локусе одного гена. Медицине это позволит, по крайней мере, идентифицировать нежелательные симптомы, а возможно, и влиять на них.

Применение стволовых клеток с целью исправления генетических дефектов у людей сулит большие надежды на будущее и, очевидно, является актуальным для многих людей. Применение стволовых клеток и изучение его последствий, особенно дифференцировки стволовых клеток в нужные для ткани клетки и обеспечения правильного взаимодействия с существующими в тканях клетками (включая строму), еще находится на начальных стадиях. Есть и нежелательные варианты, такие как злокачественное перерождение стволовых клеток, имплантированных для коррекции дефекта. Стволовые клетки могут оказать непредсказуемое влияние на другие системы. Нам надо еще многое узнать о них, прежде чем мы сможем эффективно их использовать в коррекции генетических нарушений, хотя чем меньше проявление наследуемого нарушения, тем больше

шанс, что применение стволовых клеток будет успешным.

Другой подход — это попытаться обойти последствия генетического нарушения. Очевидно, чем больший эффект этого генетического нарушения, тем труднее решить такую задачу. В первой из изученных генетических аномалий, алкаптонурии, определение, что данное заболевание — результат одного нарушения в метаболизме пути фенилаланин-тирозин (на терминальных стадиях), позволило в большой мере обойти проявления заболевания посредством диеты с низким содержанием фенилаланина. Некоторые задачи будут такими же простыми, но в случаях с более широким спектром эффектов сложность проблемы будет означать, что только ограниченная часть коррекции может быть исследована. Однако чем больше мы будем знать не только о том, какой ген и на какой хромосоме поврежден, но и как это на-

рушение влияет на весь метаболизм, тем большими будут наши шансы контролировать генетические аномалии. А сейчас у нас есть для этого очень небольшие возможности.

В этой книге обсуждаются различные аспекты генетических нарушений у человека. Она предназначена для представителей широкого круга медицинских профессий, а не только для специалистов по генетической медицине. Я бы даже позволил себе высказать мысль, что с нарушениями генома связано большинство заболеваний человека. Медицина развивается бесчисленным множеством путей, и поскольку все живое связано с ДНК, это утверждение может иметь место. Опять я возвращаюсь к онкопатологии, где не одно, а несколько генетических нарушений могут привести к малигнизации. Этот пример является яркой демонстрацией того, что генетическая медицина вплотную подошла к «ядру жизни».

**Денис Уитли**

*Абердин, Великобритания  
Январь 2008*

# Preface

---

---

Many disorders of the body have been attributed, and are clearly due to, defective genes. The list grows steadily as different syndromes are investigated and emergent technologies allow the detection of more instances that may have been thought to be inherited. The inheritance of “susceptibility to cancer” comes to mind. Either the absence of a gene or its malfunction (mistranslation) can produce changes that become manifest as “syndromes”, i.e. multiple changes that produce a number of effects rather than just one. Some have a more devastating action than others, many being lethal at an early stage; some curtail normal development at later stages; and others disturb the body after puberty and may also be expressed in late adulthood. We cannot ignore the fact that genetic defects will produce changes that are influenced by the environment in its broadest sense, right down to what we eat. Nurture as much as nature has to be considered, especially where it can help to offset the more dire consequences of the genetic lesion *per se*.

Gene defects may produce a trivial change in some cases, and are sometimes (quite rarely) the ones that are wrapped up in our own evolution where some small benefit may be incurred that assist in adaptation to the environment. However, most are negative. There is less of a problem in being an albino man than being an albino pheasant. Somewhat bigger changes will disturb not just the end product itself (the protein transcribed from its corresponding mRNA), but will impact through one gene on a whole “cassette” of genes that will alter many related aspects

of metabolism. Knowledge of the genome as a whole, the transcriptome, and the proteome can now help us track down the repercussions of a single gene change affecting a whole cassette. If the whole of the metabolism is affected by a gene defect — quite possible because of the holistic nature of life — then the metabolome may provide future researchers with many more clues as to the impact of changes at a single gene locus. In medicine, this will at least allow undesired symptoms to be identified and perhaps addressed. But where do we stand with regard to gene therapy in all this business?

The appeal of stem cells in correcting genetic defects in man holds out much hope for the future and is clearly in the forefront of many peoples’ minds. Both the application and consequences — especially in terms of their reaching the correct tissues and interacting in an appropriate way with existing tissues of gene therapy (including the stroma) — are in their very infancy. There are worrying scenarios, such as the implanted cells aimed at correcting a defect becoming cancerous. They may impact on other systems in a way that is unpredictable at present. We need to know a lot more about stem cells before we can effectively use them in correcting genetic defects, although the simpler the repercussions on the system of the inherited disorder, the greater the chance that this type of intervention might be corrective.

The other approach is to try to circumvent the consequences of a genetic defect; clearly the wider the effects of a gene defect, the harder this task becomes. In the first known

example of a genetic defect, alkaptonuria, the recognition that this was a single defect in the phenylalanine-tyrosine pathway (at its terminal stages) was found to be circumvented to a considerable extent by keeping patients on a low phenylalanine diet. Few conditions will be as simple as this, but where much more widespread effects are felt, the complexity of the problem will mean that only a limited degree of correction might be envisaged. However, the more knowledge we gain not of just what gene is affected on which chromosome, but how its malfunction affects the whole metabolism is going to give a much improved chance of gaining better control over abnormal genetic behaviour, which today have little opportunity of being ameliorated.

This volume contains a collection of papers discussing different aspects of the problem of human genetic disorders. It should appeal to all in the medical profession, not just specialists in genetic medicine. I would hazard a guess that most human disorders (as opposed to diseases, which I will refer to here as illnesses due to infecting agents) have some direct connection to defects in the genome. There are innumerable ways in which we have approach medicine, and since all life is based on DNA, this supposition must hold. The example of cancer comes again to mind, where not one, but several genetic disturbances can, in time, lead to malignancy. In this way we can see that human genetic medicine most certainly touches at the very "core of life".

**Denys Wheatley**

*Aberdeen UK  
January 2008*

# Предисловие

---

---

Более чем за 60 последних лет генетиками и молекулярными биологами накоплен огромный объем информации, который требует не простого осмысления, а пересмотра концепций, на которых основываются принципы понимания организации живых систем.

Во-первых, стало понятно, что функциональные процессы, протекающие в клетке, невероятно сложные. Они становятся чрезвычайно сложными в целостном многоклеточном организме. В эти процессы вовлечено множество переменных составляющих, которые взаимодействуют друг с другом, формируя многомерные пространственно-временные сети. Поэтому конечный эффект не может быть выведен при механическом сложении составляющих. Исследователи понимают, что существующие методы исследований сложных систем неадекватны.

Во-вторых, расшифровка структуры генома показала наличие в нем большого потенциала функциональной информации, использовать которую ученые в полной мере не могут.

В каждом организме человека в течение жизни координировано функционируют триллионы клеток. Каждая из них содержит десятки тысяч функционирующих генов и огромное количество РНК, белков, продуктов метаболизма, причем многоклеточный организм характеризуется чрезвычайной устойчивостью по отношению к внешним факторам среды и внутренним флуктуациям. За этим кроются пока еще не изученные принципы биологической

организации. Мы до конца не знаем, каким образом из простых элементов, причем не однородных, но имеющих жесткую иерархию, каждый из которых обладает собственной программой действий и имеет свои слабые звенья, могущие давать сбой, приводить иногда к патологии, при такой гетерогенности возникает консолидированная система на уровне организма. Невзирая на то, что каждый ген может стать мишенью неблагоприятных воздействий факторов среды, большинство возникающих рисков сводится к минимуму и нейтрализуется. Очевидно, существуют пока не изученные механизмы, которые эволюция отработывала миллиарды лет и создала стройную систему, обеспечивающую целостность ее структуры и функционирования при таком большом разнообразии элементов.

Таким образом, биологи, занимающиеся вопросами обобщения достижений молекулярной биологии, сходятся во мнении о необходимости системного подхода к анализу столь сложных образований, как живая клетка. Задача усложняется еще и тем, что даже организмы одного вида не идентичны, так как они существенно различаются как по генотипу, так и фенотипу.

Невзирая на значительные успехи молекулярной генетики, все еще мало известно о тонких механизмах реализации наследственной информации в сложных живых системах. Так, до расшифровки генома человека считалось, что он содержит примерно 100 тыс. генов, а их оказалось

около 30 тыс. При этом у менее сложно устроенной нематоды *C. elegans* найдено 19 тыс. генов и она содержит примерно  $10^3$  клеток, а человек —  $10^{14}$  клеток. Очевидно, что существуют механизмы, обеспечивающие функционирование сложных живых систем при таком несоответствии количества генов и уровня организации организма. Одним из таких механизмов служит увеличение функциональной нагрузки на один ген или белок. Так, фермент, катализирующий взаимопревращение D-глюкозо-6-фосфата и D-фруктозо-6-фосфата, идентичен нейрولهйкину (секретируется Т-клетками и обеспечивает выживание некоторых эмбриональных нейтронов и сенсорных нервов); аутокринному фактору (связан со способностью к метастазированию); фактору, способствующему созреванию клеток миелоидной лейкемии человека HL-60 в терминальные моноциты. Следовательно, один белок выполняет столь разные функции. Оказалось, что таких белков очень много. Их даже называют белками, работающими по совместительству.

Расшифровка генома не решила проблему понимания основ жизнедеятельности. Исследователи идут по старому пути — изучают функцию установленного гена. Наибольший эффект достигается в области изучения биохимических процессов, хотя и здесь есть большие затруднения. Практически все методические подходы направлены на установление функции какого-то одного гена, даже при использовании ДНК-микрочипов, в которых каждый ген анализируется независимо от других генов. В то же время, как известно, конкретный ген включается в работу так называемой генной сети. Каждая «генная сеть» сама по себе также является сложной системой. Поэтому при анализе отдельного гена редко получают однозначно интерпретируемую информацию.

Таким образом, в настоящее время нет методов системного исследования целостных комплексов живой клетки (организма). Продолжается период накопления фактов изучения отдельных ее элементов.

Возможно, что настоящий прорыв наступит при появлении качественно новых способов обработки и анализа огромного массива информации, который позволит вскрыть принципы функционирования клетки как целостной живой системы. О строении клетки и многих ее функциях известно немало. Однако предстоит еще установить, как составные элементы клетки взаимодействуют в пространстве и времени.

Большие надежды возлагаются на технологию ДНК-микрочипов. С их помощью можно получить картину экспрессии многих генов в одной клетке по количеству иРНК. Принцип метода построен на том, что меченная флуоресцентным красителем иРНК гибридизируется с соответствующим ей геном на микрочипе. Гены, на которых произошла гибридизация, флуоресцируют, а неработающие в этой клетке гены остаются не мечеными. Гибридизация со смесью иРНК, полученной из другой клетки, даст совершенно иную картину, так как в ней экспрессируются другие гены. По паттернам гибридизации (картина распределения экспрессирующихся и не экспрессирующихся генов) можно увидеть, как ведет себя один и тот же ген в разных клетках, другими словами, составить профиль экспрессии этого гена. Следовательно, представлена возможность с помощью ДНК-микрочипов параллельно анализировать экспрессию практически всех генов генома любого организма. Биоинформатика позволила группировать гены по сходству профилей экспрессии. Это было подтверждено на примере известной группы генов со сходной функцией у *S. cerevisiae*, которые статически группировались по сходству прежней экспрессии. В настоящее время ведутся масштабные исследования клеток различных организмов, включая и человека. Зная, что конкретный ген находится в определенной группе, можно предположить, а затем и подтвердить функцию этого гена. Кроме того, профиль экспрессии генов может, в определенной степени, свидетельствовать о функциональном состоянии клетки. Однако, в

технологии ДНК-микрочипов есть один существенный недостаток. При выделении иРНК из клетки последняя разрушается и остается неизвестным характер распределения изучаемых иРНК в структурах клетки, поэтому невозможно исследовать особенности процессов, в которые эти молекулы вовлекаются.

В связи с вышеизложенным, идет поиск методов, позволяющих исследовать клетку в трехмерном пространстве и в динамике. К таким подходам, в частности, относится и технология *in vivo imaging*. Она включает в себя методы наблюдения за поведением в клетке меченых молекул, например, химерными белками. Большую помощь здесь могут оказать биоинформационные программы, которые позволят интегрировать накопленные факты по строению и функции субклеточных структур и показать, как они работают вместе.

Таким образом, изучение на субклеточных уровнях организации живой материи остается актуальным. Предстоит еще решить множество вопросов, поставленных геномикой, протеомикой и метаболомикой, чтобы перейти на качественно новую ступень понимания основ живого.

Все изложенное выше касается и человека как биологического существа. Во второй половине XX ст. интенсивно развивалась не только общая генетика, но и антропогенетика, изучающая явления наследственности у человека. Следует отметить также бурный рост медицинской генетики.

Как самостоятельная наука медицинская генетика начала формироваться в 30-е годы XX столетия. В 60-х годах, благодаря появлению новых методов цитогенетики, молекулярной генетики, она становится новым разделом медицины.

Традиционно сложилось так, что предмет медицинской генетики — это «изучение роли наследственности в патологии человека, закономерностей передачи из поколения в поколение наследственных заболеваний, разработка методов диагностики и профилактики наследственной патологии, включая болезни с наслед-

ственной предрасположенностью» (В. П. Пішак і співавт., 2006). Примерно так, может быть, более расширенно определяются предмет и задачи медицинской генетики в других учебниках и руководствах (Г. Д. Бердышев, И. Ф. Криворучко, 1979; Н. П. Бочков и соавт., 1989; В. М. Запорожан і співавт., 2005). При этом как учебные программы, так и учебная литература для студентов медицинских вузов и врачей посвящены основному вопросу — изучению наследственных болезней. В то же время наследственные болезни (как бы много их не было) составляют лишь около 2 % патологии у человечества, то есть они не относятся к социально значимым. Остальные 98 % болезней, которые широко распространены, а многие из них занимают лидирующие места по смертности и инвалидности сотен миллионов людей остаются практически за рамками медицинской генетики.

Становление и развитие геномики и сопряженных с ней биоинформатики и протеомики, разработка сверхскоростных автоматизированных систем анализа генов и их продуктов позволили вскрыть неизвестные еще недавно молекулярные механизмы так называемых мультифакториальных болезней, показать конкретное значение генетических факторов в возникновении и развитии многих соматических, инфекционных, онкологических заболеваний.

Возможность культивирования и клонирования эмбриональных и взрослых стволовых клеток человека *ex vivo* открыли новые возможности восстановительной терапии пораженных органов человека.

Примечательно то, что все эти достижения научной мысли сразу же находят применение в медицинской практике. В таких исследованиях заинтересованы крупные фармацевтические корпорации, которые возлагают большие надежды на успехи фармакогенетики и биотехнологии.

Указанные выше и ряд других новых направлений в фундаментальной и прикладной медицине давно вышли за рамки традиционной медицинской генетики. Они вместе с медицинской генетикой фор-

мируются в новое направление медицины — генетическую медицину.

Нам представляется, что генетическая медицина — это наука, которая изучает генетические механизмы развития патологического процесса в организме человека различной этиологической природы на всех уровнях его организации (молекулярном, клеточном, тканевом, органном), разрабатывает для каждого уровня генетические методы диагностики, лечения и профилактики заболеваний.

Достижения геномики и возникших на ее основе сверхновых научных направлений в области биологии и медицины повлекли за собой ряд этических и социальных про-

блем. Они требуют философского обобщения и осмысления возможных негативных последствий этих научных достижений.

Предлагаемая читателю книга — коллективный труд ученых Украины, Великобритании, Германии, Индии. Это первая попытка показать ориентиры генетической медицины, познакомить врачей, молодых исследователей, студентов с ее проблемами и достижениями.

Пути решения многих важных для медицинской практики вопросов еще носят дискуссионный характер, но их постановка заинтересует молодых ученых, призванных раздвигать горизонты генетической медицины.

**Академик Академии  
медицинских наук Украины,  
профессор В. Н. Запорожан**

# Preface

---

---

For the last sixty years the geneticists and molecular biologists have gathered the enormous volume of information, that requires not simple comprehension, but revision of conceptions, on which the principles of understanding of living systems organisation are based.

Firstly, it became clear that functional processes taking place in the cell are enormously difficult. They become very complicated in an integral multicellular organism. A great number of variable constituents, which integrate with each other, are engaged in these processes, forming multidimensional spatial-temporal networks. Therefore the final effect can not be resulted at mechanical addition of constituents. The researchers understand that available methods of studying complex systems are inadequate.

Secondly, decoding of the genome structure showed a great potential of the functional information in it, which cannot be fully used.

Billions of cells co-ordinate in every human organism during a life-period. Each of them contains tens of thousands of functioning genes and great amount of RNA, proteins, metabolism products; thus, a multicellular organism is characterised by extraordinary stability in relation to environmental factors and internal functions. There are unstudied principles of biological organisation behind that. We do not know for sure how from simple elements, thus not homogeneous, but having a hard hierarchy, each of which possesses the own program of actions and has its weak links, which can failure, resulting in patholo-

gy sometimes, at such heterogeneity the consolidated system at the level of an organism arises. In spite of the fact that every gene can become the target of unfavourable influences of environment, the majority of risks come to the minimum and neutralised. Obviously, there are unstudied mechanisms, which have been processed by the evolution for the millions of years and the harmonious system, providing integrity of its structure and functioning with such a great variety of elements, was created.

Thus, the biologists engaged in the questions of generalisation of molecular biology achievements agreed in opinion about a necessity of systemic approach to the analysis of such complex systems as a living cell. The task becomes complicated by the fact that organisms of one kind are non-identical, because they are substantially different both by genotype and phenotype.

Regardless of considerable successes in molecular genetics, still it is little known about fine mechanisms of hereditary information realization in complex living systems. So, before decoding a human genome was considered to contain approximately 100 thousand of genes, and they appeared to be 30 thousand. Thus, 19 thousand of genes were found in a less complicated nematode *C. elegans* and it contains approximately  $10^3$  cells, and a man –  $10^{14}$  cells. Obviously, there are mechanisms providing functioning of complex living systems with such a disparity in amount of genes and level of the organism organisation. The increase of functional loading on one gene or protein serves as one of such mechanisms. So,

an enzyme catalyzing intertransformation of D-glucose-6-phosphate and D-fructose-6-phosphate is identical to neuroleukyn (secreted by T-cells and provides the survival of some embryonic neurons and sensory nerves); the autocrine factor (related to ability for metastasing); the factor, which favours warming of cells of human myeloid leukemia HL-60 to terminal monocytes. Consequently, one albumen executes so different functions. It appeared that such proteins are numerous. They are called proteins combining two jobs.

Decoding of genome did not solve the problem of understanding of bases of vital functions. Researchers hold the old way — they study the function of a set gene. The greatest effect is achieved in the sphere of biochemical processes research, though there are difficulties there too. Practically all the methodical approaches are directed on establishment of gene function, even with the DNA-microchip usage, in which every gene is analysed regardless of other ones. At the same time, as is generally known, a concrete gene is involved in the work of a so-called gene network. Every “gene network” on itself is also a complicated system. Therefore while analysing gene the simply interpreted information is rarely obtained.

Thus, at present there are no methods of systemic research of integral complexes of living cell (organism). The period of accumulation of facts of some of its elements study is on. It is possible that the real break will come with appearance of completely new methods of treatment and analysis of a huge mass of information, which will allow to reveal principles of functioning of cell as an integral living system. There is little information about the structure of cell and many its functions. However, we are faced to establish the way in which the component elements of cell cooperate in space and time.

Great hopes are set on DNA-microchip technology. With their help it is possible to get the picture of expression of many genes in one cell on the amount of iRNA. The principle of the method is based on that iRNA marked by fluorescent dye is hybridized with the gene corresponding to it on the micro-

chip. Genes on which hybridization took place, fluoresce, and the genes unworking in this cell remain unmarked. Hybridization with iRNA mixture, obtained from other cell, will give a completely different picture, because other genes express in it. By hybridization patterns (picture of distributing of expressed and non-expressed genes), one can see how the same gene behaves in different cells, in other words, to make the type of this gene's expression. Consequently, there is a possibility to analyse with the usage of DNA-microchips parallel the expression of practically all genes of genome of any organism. Bioinformatics allowed to group genes by expression of types likeness. It was confirmed on the example of the known group of genes with a similar function at *S. cerevisiae*, which statically formed group by former expression likeness. Scale researches of cells of various organisms are presently conducted, including human. Keeping in mind that a concrete gene is in a certain group, it is possible to suppose, and then to confirm the function of this gene. Besides, the type of expression of genes can, to a certain extent, testify to the functional state of the cell. However, there is one substantial defect in the DNA-microchip technology. During iRNA selection from the cell the latter is destroyed and the nature of studied iRNA distribution in the structures of cell remains unknown and hence it is impossible to study the features of processes into which these molecules are involved.

In connection with the said above, the search for methods allowing to study a cell in three-dimensional space and in dynamics is on. The *in vivo imaging* technology, in particular, is one of such approaches. It includes the methods of supervision after the marked molecules conduct in the cell, for example, by chimera proteins. Bioinformational programs can render great help in this case, they will allow to integrate the gathered facts on the structure and function of subcellular structures and show how they work together.

Thus, the study at subcellular levels of organization of living matter remains actual. We have to solve a number of genomic, proteomic and metabolomic questions in order

to pass to a new stage of understanding of bases of living.

All said above concerns human as a biological creature. In the second half of the XX century not only general genetics developed intensively but also antropogenetics, studying the phenomena of human heredity. Stormy growth of medical genetics should be noted also.

Development of medical genetics as an independent science began in 30-s of the XX century. In 60-s, due to new methods of cytogenetics, molecular genetics, it becomes a new branch of medicine.

It turned out traditionally that the subject of medical genetics is the “study of role of heredity in human pathology, conformities to the law of transmission from generation to generation of the hereditary diseases, development of methods of diagnosis and prophylaxis of hereditary pathology, including illnesses with hereditary predisposition” (V. P. Pishak and co-authors, 2006). Approximately the same way, or more extended by the subject and tasks of medical genetics are determined in other textbooks and guides (G. D. Berdyshev, I. F. Krivoruchko, 1979; N. P. Bochkov and co-auth., 1989; V. M. Zaporozhan and co-auth., 2005). Thus, both curriculums and educational literature for the students of medical institutes and doctors are devoted to the basic question – study of hereditary diseases. At the same time hereditary diseases (no matter how many) make up only about 2% of human pathologies, that is they are not considered as socially important. Other 98% of diseases which are wide-spread and many of them take leading place by mortality and disability of hundreds of millions of people remain practically outside medical genetics.

Formation and development of genomics and attended bioinformation science and proteomics, development of the super-high-speed automated systems of analysis of genes and their products allowed to detect the recently unknown molecular mechanisms of the so-

called multifactorial illnesses, show concrete importance of genetic factors in the origin and development of many somatic, infectious, oncologic diseases.

Possibility of cultivation and cloning of human embryonic and adult stem cells *ex vivo* revealed new possibilities of restoration therapy of human injured organs.

It is notable that all these achievements of scientific thought find application in medical practice. Large pharmaceutical corporations which set great hopes on progress in pharmacogenetics and biotechnology are interested in such researches.

Indicated above and other new directions in fundamental and applied medicine exceeded the limits of traditional medical genetics long ago. They together with medical genetics form a new direction of medicine – genetic medicine.

We believe that genetic medicine is a science which studies the genetic mechanisms of pathological process development in a human organism of a different etiologic nature at all levels of its organization (molecular, cellular, tissue, organic), elaborates for every level genetic methods of diagnosis, treatment and prophylaxis of diseases.

Achievement of genomics and the newest scientific directions, arisen on its basis in the sphere of biology and medicine, entailed a number of ethic and social problems. They require philosophical generalization and comprehension of possible negative consequences of these scientific achievements.

The present book is a collective work of scientists of Ukraine, Great Britain, Germany, India. It is the first attempt to show the reference points of genetic medicine, to acquaint doctors, young researchers, students with its problems and achievements.

The ways of solution of many questions important for medical practice are still debatable, but statement of these questions will interest the young scientists called to extend the sphere of genetic medicine.

**Academician of the Academy of  
Medical Sciences of Ukraine,  
professor V. N. Zaporozhan**

# Глава 1. Введение в генетическую медицину

---

---

Determination of genetic medicine as a new science is given and a necessity of its development in different directions and integration with molecular biology, medical genetics and other branches of biology and medicine is grounded. The attention is concentrated on complicated questions of finding out clinical manifestations of some gene structure violation consequences, taking into account a number of important pre-incoming factors of genetic and epigenetic nature, as well as environmental influence. The examples are given, showing interaction of structural elements in various body systems at various levels of organization resulting from violations in genome, which can lead to a certain clinical presentation.

---

Существует хорошо известное, прочно вошедшее в обиход (несоизмеримо хуже — в повседневную практику) понятие «медицинская генетика». И относительно недавно появившееся направление «генетическая медицина» может вызвать, в общем-то, вполне уместный вопрос — что меняется от перестановки слов? Если ответить кратко — то меняется «все». Термины вводят для определения какого-то понятия. И такая, казалось бы, просто перестановка слов в действительности выступает обозначением разных терминов, охватывающих свои области представлений, методический арсенал, сферу применения. Предметом медицинской генетики являются наследственные болезни с явным, ярким проявлением. Относительно недавно она включила в круг своих объектов наследственно обусловленные предрасположения, но с очень высокой вероятностью возникновения патологий, которые, проявившись, будут иметь яркое выражение. Ну и, конечно, рецессивное носительство мутаций, ведущих в гомозиготном состоянии к плохим последствиям (для тех патологий, которые, как и сейчас еще обычно считают, в гетерозиготном варианте никак не проявляются фенотипически). Здесь все понятно. Медицинская генетика изучает наследственные болезни и гены, за них отвечающие (или, что более правильно — мутации в генах, которые

через цепочку событий ведут к соответствующим патологиям). Таким образом, медицинская генетика — это область медицины.

Совсем иначе обстоит дело с понятием «генетическая медицина». В отношении области, которую она охватывает, окончательного, установившегося, общепринятого определения еще нет. А имеющиеся определения очень расплывчатые, а иногда откровенно завуалированы. Объясняется это тем, что сами представления о том, как современные фундаментальные достижения науки изменяют тысячелетиями ориентированную на реалии болезней медицину, пока еще далеки от того, чтобы считать их общепринятыми. Хотя сами такие изменения уже происходят. Отсюда и осторожность формулировок и их завуалированность. Как пример (и чаще всего), соотношение генетической медицины в виде части молекулярной медицины [1]. Звучит вроде бы очень часто и ограниченно. Но уровнем, с которого в живом все начинается (ниже это будет проанализировано детально), по сути понятия жизни как явления, «молекулярная медицина» уже сама по себе — «все». А генетическая медицина как то, с чего начинаются все «молекулярные процессы», — первооснова такого «все-го». Поэтому, на правах всеобщей первоосновы, ее потенциальная область — вся медицина.

Суть такой всеобъемлемости, при кажущейся частности, — в использовании исчерпывающей информации о наследственном аппарате каждого пациента для того, чтобы строго индивидуально определять профилактику, образ жизни, лечение, исходя из тех особенностей, которые наследственный аппарат (в полном объеме) каждого индивидуума делает из человека «вообще» строго конкретную личность. А в недалеком будущем (которое интенсивно готовится уже сегодня) — «исправление» наследственной информации пациента, чтобы болезни вообще не было. Чтобы во всем этом разобраться, посмотрим, что лежит в основе «всего», как оно реализуется в конкретику и определяет каждого из нас.

Любой организм (и человек в том числе) представляет собой в конечном итоге согласованное взаимодействие макромолекул. И если проанализировать, что есть человек «на самом деле», то картина окажется достаточно необычная (рис. 1.1). Это непривычно для восприятия, что каждый

из нас есть «на самом деле», но наше состояние, наши особенности определяют макромолекулы. Именно от них начинается длинная и сложная цепочка процессов и событий, интеграции макромолекул, структур, клеток и т. д. в каждого самодостаточного, единого в себе самом индивидуума. Макромолекулы синтезируются в самом организме (или, что более конкретно и потому более правильно, в клетках организма).

Но уже в понятии «синтезируются» заложены две составляющие — механизм синтеза и информация о том, что этому механизму синтезировать. И из этих двух, в общем-то функционально неразрывных, составляющих информация тем не менее первична. Она записана в виде последовательности оснований ДНК и является тем, что носит название «геном». Вообще-то, информация (любая, в том числе и генетическая) может быть записана на чем угодно и как угодно — типографской краской в виде букв на бумажном носителе; маг-

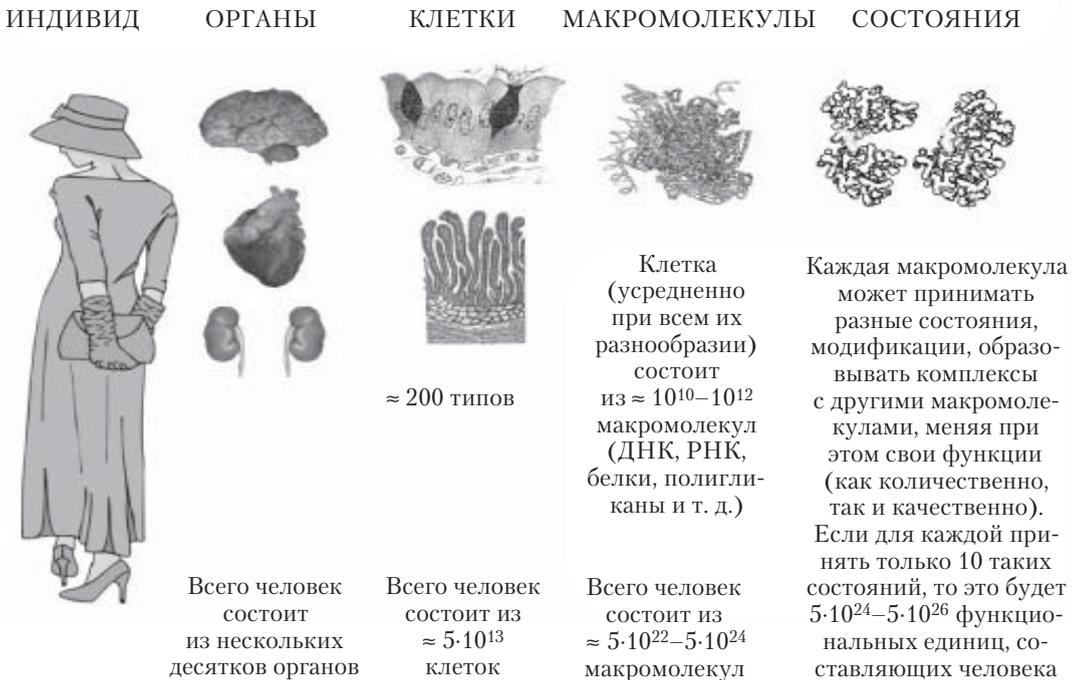


Рис. 1.1. Что такое человек?

нитными состояниями на металлической пластинке; последовательностью оснований нуклеиновых кислот в полимерной молекуле (ДНК или РНК) и т. д. А вот смысл информация приобретает (то есть становится информацией, а не запечатанной бумагой, железкой, полимером и т. д.) только в сочетании со своей, адекватной такой информации, системой ее считывания и обслуживания. Поэтому информация живого проявляет свойства информации только в живом. А на бумажном или магнитном носителе это будет информация о живом, без всяких проявлений свойств живого. И система ее считывания и обработки, соответствующая носителю в неразрывной связи с записанной на нем информацией (а не информации, абстрагированной от своего естественного носителя, на бумаге, «железке»), свойства живого не проявит.

Человек может выделить из капли своей крови свою (персональную!) информацию в виде ниточек ДНК, поместить ее в пробирку и смотреть на себя в своем чисто информационном исполнении со стороны. Смотреть — не будучи в состоянии понять, что там за информация. Ибо такие же «ниточки» будут в пробирке, если ДНК получить из амобы, носорога или кукурузы. Только система обработки информации может установить, что есть что. Определить это можно на любом считывающем устройстве, но реализовать из таких «ниточек» человека, амэбу, носорога или кукурузу — только в своей адекватной информации системе обработки и обслуживания. В этом — двойственность информации. Она, независимо от адекватности системы считывания, несет «все» об объекте, но только в «своей» системе обработки проявляется реальный объект. Ничего живого в пробирке нет — ДНК в пробирке не живая, но информация данного индивидуума в ней присутствует. Обработав ее, можно узнать и что есть данный индивид в биологическом плане, и какие болезни ему уготовлены, и как их избежать, и очень многое другое.

Информация — это еще не объект. Весь, самый полный комплект документации на космический корабль — это еще не космический корабль. Информация индивидуума — это еще не индивидум, но в ней он «записан». В таком «пакете документации» есть «все». И с нее, с информации, начинается вся цепочка событий. Это — «медицинская карточка» индивидуума для генетической медицины. Геном (и конкретные составляющие его гены) служат первоосновой, тем первым, информационным (хотя по носителю — молекулярным) уровнем, с которого начинаются все последующие цепочки событий. И любое изменение в информации генома отражается на всех последующих событиях всех уровнях, заканчиваясь состоянием индивидуума.

Проследим такую цепочку применительно к какой-нибудь патологии. Рассмотрим как пример тяжелое заболевание, затрагивающее весь организм — серповидноклеточную анемию. На уровне больного индивидуума, его органов и тканей поражения носят всеобъемлющий, системный характер. Но если попытаться понять, почему возникают такие поражения и что лежит в их основе, на организменном уровне, то есть непосредственно и только осматривая, прослушивая, пальпируя и т. д. больного, этого достичь невозможно. Анализ причин выводит на следующий уровень — клеточный. При данном наследственном заболевании вместо нормальных эритроцитов образуются серповидные (рис. 1.2). Выяснение причины появления серповидных эритроцитов выводит на уровень молекулярный. Их образование связано с тем, что в них гемоглобин агрегирует в плотные «комки», меняя и свои функциональные свойства, и свойства эритроцитов. Такие изменения, в свою очередь связаны с тем, что в шестом положении аминокислотной последовательности молекулы глобина, вместо гидрофильной аминокислоты (глутаминовой), стоит гидрофобная — валин (рис. 1.3).

В результате происходит агрегация — выталкивание молекул гемоглобина из водной фазы. А «вытолкнуть» их внутри

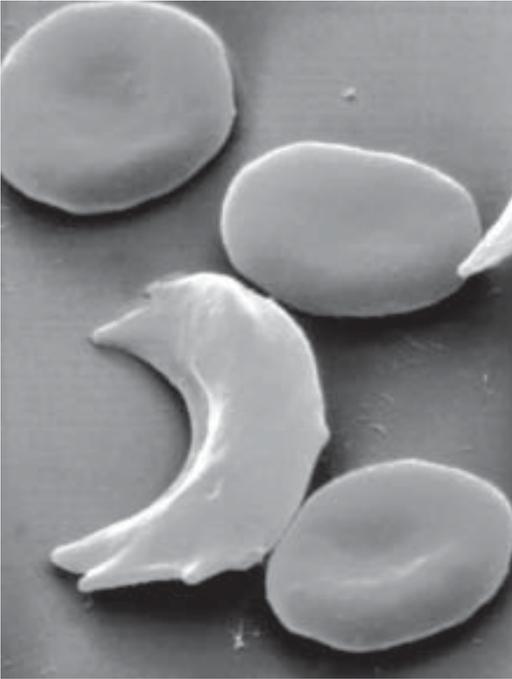


Рис. 1.2. Эритроциты человека — нормальные и серповидные [2]

эритроцита можно только «одна на другую», плотным контактом по возникшим гидрофобным участкам, то есть агрегацией. Наконец, для понимания причины замены аминокислот в молекуле белка, выходят на последний уровень — информационный. Произошедшая замена аминокислот обусловлена тем, что в гене, содержащем информацию, по которой синтезируется глобин, произошла мутация — вместо тимина (в РНК тимина нет и ему соответствует урацил) стоит аденин (рис. 1.4). Тимин и аденин — это буквы генетической информации. Изменилась буква — изменился смысл. И с этого момента все начинается.

Диплоидный (то есть «повседневный», соматический) геном человека состоит из  $\approx 6,6$  млрд пар оснований. В гетерозиготном состоянии (носительство мутации без явных клинических проявлений) в одном наборе хромосом содержится мутация. Но второй полноценной пары аллелей достаточно, чтобы фенотипически человек был здоровым (по данному признаку). Это — одна измененная пара оснований на

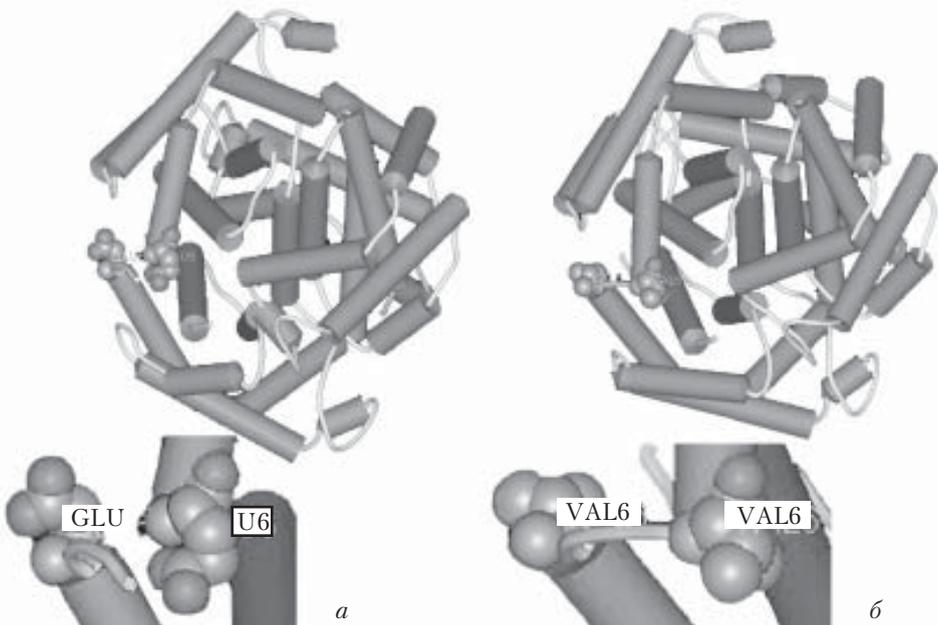


Рис. 1.3. Модель пространственной структуры молекулы глобина: нормального (а) и мутантного (б) [3]

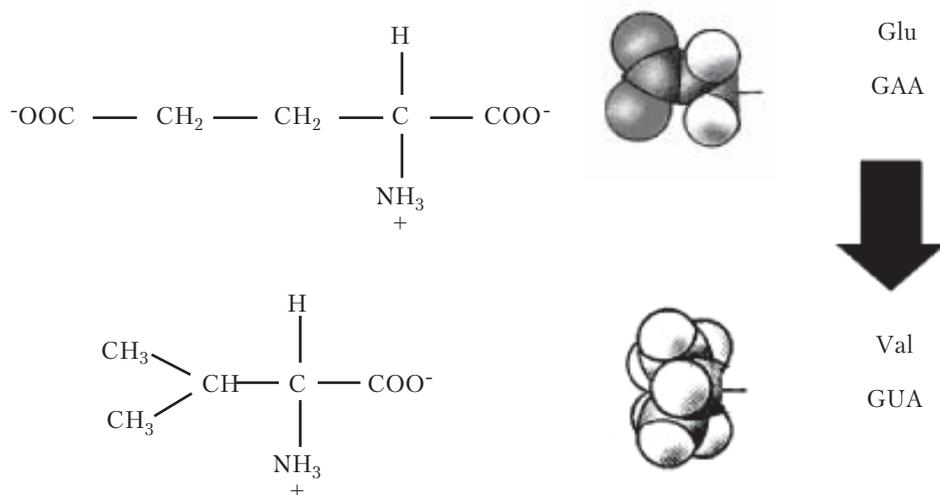


Рис. 1.4. Формулы и модели молекул гидрофильной глутаминовой кислоты (Glu), гидрофобного валина (Val) и их кодоны

≈ 6,6 млрд. При наличии такой мутации у обоих родителей возникает с вероятностью 25 % гомозиготность в потомстве. Мутантный ген кодирует мутантный белок. Измененный белок агрегирует, ухудшая перенос кислорода и искажая форму (и, как следствие, подвижность) эритроцитов. Происходит закупорка капилляров, возникает кислородная недостаточность. И это — во всех органах всех тканей такого индивидуума. Развивается тяжелая патология (рис. 1.5).

Приведенный пример — наследственная болезнь с ярким проявлением. И обусловила ее всего-то пара нуклеотидов (по паре в каждой гомологичной хромосоме). А в нашем геноме (в каждой клетке) с учетом диплоидного набора хромосом ≈ 6,6 млрд пар нуклеотидов. Принципиально (и реально) в каждой из них может возникнуть мутация. Относительно немногие изменения в геноме при мутациях, вызывающих патологии с ярким проявлением, могут пройти весь путь от гаметы до новорожденного и реализоваться в наследственные болезни. А к чему приведут остальные изменения — те, которые возникли, но наследственных болезней не вызывают и прошли от гаметы до новорожден-

ного? До недавнего времени считалось, что если повезло и наследственной болезни нет, то все остальное «в норме». Почему же одни индивидуумы живут 100 лет, а другие умирают в 40? Почему у одних атеросклероз, у других тромбофлебит, у третьих плохо с почками и т. д.? У каждого «что-то есть». И это «что-то» — его персональное. Такое персональное «что-то» может проявляться сегодня (в разное время года) в разных жизненных ситуациях, разным возрасте. Хорошо бы знать, почему так происходит. А еще лучше знать, что делать (и уметь делать), чтобы «так» не было. Или если оно, это самое «так», при существующих возможностях медицины пока еще неизбежно, то знать, как его ослабить, отдалить неизбежность.

До конца прошлого века знать такое можно было только в случае классических наследственных болезней, что и составило предмет медицинской генетики. Но в 90-е годы прошлого столетия был расшифрован геном человека, весь его наследственный аппарат. Определили порядок ≈ 3,3 млрд нуклеотидов в гаплоидном и, соответственно, всех ≈ 6,6 млрд нуклеотидов в диплоидном наборах. Вначале сделали это с каким-то одним геномом. В процессе та-

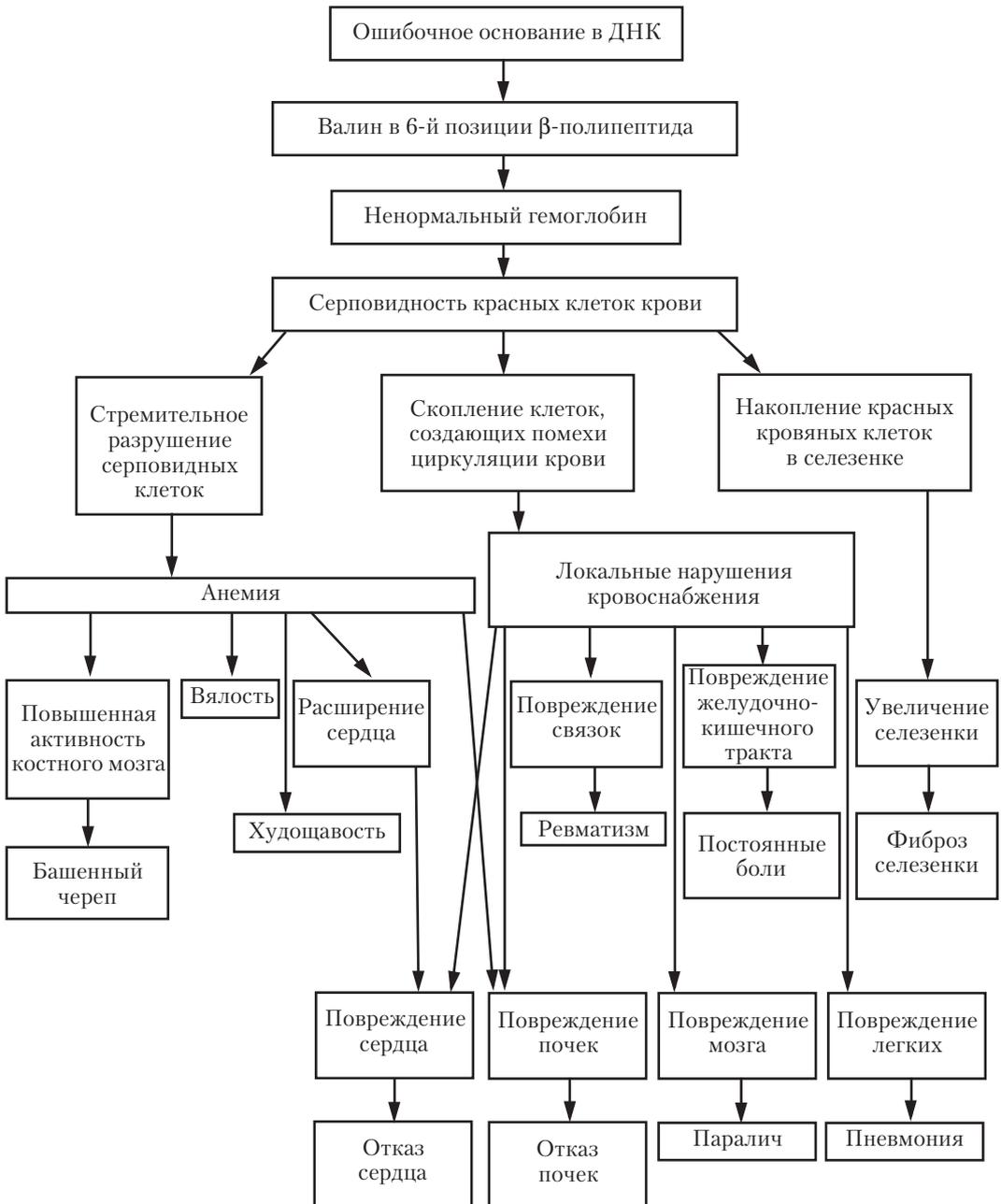


Рис. 1.5. Схема пути от изменения одного нуклеотида в гене до клинической симптоматики гемоглобиноза S [4]

кой работы техника определения последовательности оснований развилась настолько, что возникла возможность перейти к аналогичным определениям у других людей. Начали сравнивать геномы разных индивидуумов — здоровых, больных, принадлежащих к разным этническим группам, мужчин и женщин. Полученные данные вводили в базы данных, создавали для их обработки специальные компьютерные программы. Когда данных накопилось достаточно много, вырисовалась общая картина, а в ней — все те «частности», коими являются индивидуумы.

До этого изменения в геноме определялись, в основном, с целью идентификации классических наследственных болезней, а полученные результаты (идентифицированные последовательности нуклеотидов) соотносились с изучаемыми наследственными болезнями. Их к моменту начала расшифровки всего генома человека и его анализа, насчитывалось несколько тысяч. Большинство наследственных болезней (эти самые несколько тысяч) встречаются исключительно редко. Относительно часто встречаемых наследственных болезней с яркой манифестацией — десятки. Гетерозиготное носительство таких мутаций и определяло, как считалось, различия между индивидуумами. И два неродственных индивидуума, согласно таким оценкам, различались не более чем несколькими десятками изменений (значущих изменений в геноме). В последнее десятилетие прошлого века начала стремительно развиваться техника определения первичной последовательности ДНК. Столь же стремительно накапливались данные по составу отдельных участков генома разных индивидуумов.

Оказалось, что геномы людей в высокой степени сходны, если их сравнивать «вообще». В целом в общечеловеческой популяции геномы с небольшими колебаниями будут на 99,9 % идентичными [5]. Все же различия можно разделить на две группы. В одну входят все те, которые, как до недавнего времени считалось, определяли болезни — мутации разных типов в их

обычном понимании (то есть с ярким фенотипическим проявлением), и изменения, которые последние 20 лет хотя иногда и обнаруживали, но во внимание, с точки зрения их влияния на здоровье и нездоровье, не принимали. Первых, если суммировать их по всей человеческой популяции, — тысячи (проявляющихся в виде всех наследственных болезней — относительно частых, редких и исключительно редких). А между двумя любыми неродственными людьми число таких различий — десятки, или с учетом изменения оценки «что есть наследственная болезнь» — сотни (гетерозиготное носительство «рецессивных мутаций»). Во вторую группу входят любые (в своей совокупности все имеющиеся в геноме) отличия, в подавляющем большинстве по одному нуклеотиду (но в разных участках генома), встречающиеся в человеческой популяции. В целом, по всем геномам людей [6] сумма отличающихся нуклеотидов составляет  $\approx 10$  млн. Это «вообще». А у двух любых неродственных индивидуумов  $\approx 3$  млн мононуклеотидных различий. Таким образом, количественно представленность этих двух групп различается на многие порядки. И соответственно их роль для здоровья и нездоровья тоже.

Если 0,1 % генома рассматривать «вообще», то это величина весьма абстрактная. Геном человека по своему функциональному составу очень неоднороден: если принять его за 100 %, то только  $\approx 2$  % — это кодирующие белки последовательности (экзоны). Еще  $\approx 3$  % составляют интроны, которые белки не кодируют, но кодируют участки РНК, разъединяющие экзоны в составе первично синтезируемого РНК-транскрипта. И если даже принять процент генов (то есть всех последовательностей кодирующих, регуляторных и даже интронов, «разделяющих» ген на экзоны) в таком полном варианте, то они составят не более 5 % общего содержания нашего генома. А 95 % приходится на то, что пока (вследствие непонимания его роли) носит название «незначущие последовательности». Их анализ — отдельная тема. Но для них действительно, пока по совершенно не-

понятным причинам, возможны некоторые количественные (не качественные!) колебания между разными индивидуумами.

Колебания эти могут выходить и за 0,1 %. Но когда пишут и говорят о различии в 0,1 %, имеют в виду иное, а именно сумму всех качественных изменений, составляющих обе вышерассмотренные группы изменений — тот блок преобразований в геноме, который определяет реальные и потенциальные отличия в фенотипе и, что особенно важно для каждого человека, — его здоровье и нездоровье; таковое непосредственно, и в плане возможных ответов организма на неблагоприятные воздействия; изменение здоровья и нездоровья с возрастом и т. д. Это те 10 млн отличий, которые распределены по всему совокупному геному человечества.

Как уже отмечалось, геном человека (в диплоидном исполнении, то есть в соматических клетках) состоит из  $\approx 6,6$  млрд пар нуклеотидов. Поэтому даже чисто формально 0,1 % — это  $\approx 6,6$  млн пар нуклеотидов. Но вклад в геномные различия этих «формальных»  $\approx 6,6$  млн пар оказывается несоизмеримо выше его чисто арифметического числа. Связано это с тем, что отличия теоретически могут находиться (и практически располагаются) в любой последовательности и любых сочетаниях по всему геному, то есть каким-то образом меняют реальную протяженную последовательность неизменных последовательностей всех  $\approx 6,6$  млрд пар нуклеотидов, которые у всех людей идентичны. Кроме таких отличий, изменения в геноме представлены также и всем теоретически возможным спектром изменений, относящихся к упоминавшейся выше первой группе. Они (то есть то, что обычно понимают под термином «мутация») могут быть (и реально существуют) в виде разных структурных проявлений — вставки в различные участки генома, дубликации любых размеров, перестановки последовательностей, изменения нуклеотидов и т. д. Все это влияет на экспрессию генов и по всей цепочке процессов реализуется в фенотип. Но если в геноме изменения могут быть (по крайней

мере, теоретически) любые, то вероятность их реального присутствия вообще и по разным районам генома далеко не одинаковая.

Крупные изменения, как правило, несовместимы с жизнью, и их носители элиминируют. Такая элиминация происходит на всех этапах — в эмбриональной стадии при формировании предшественников репродуктивных клеток, при гаметогенезе, оплодотворении, на всех стадиях пренатального развития. Очень редко (по сравнению с частотой возникновения мутаций) что-то проходит через все эти фильтры. Тогда возникает ярко выраженная наследственная патология.

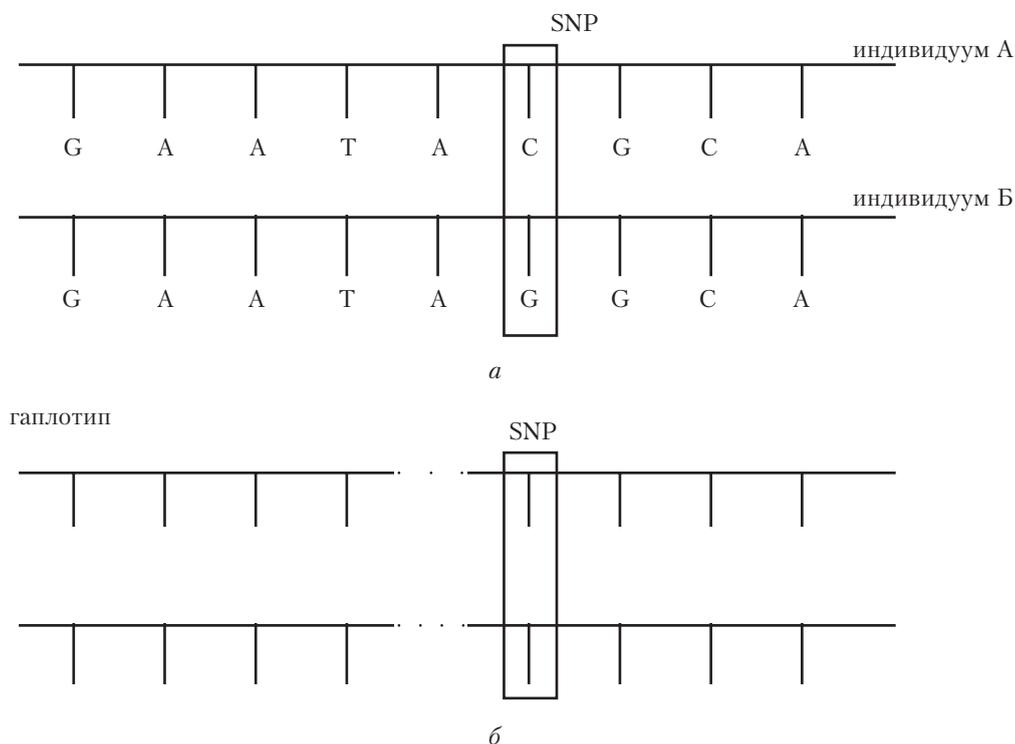
В природе такие нарушения элиминируются вместе с их носителями уже в постнатальном периоде. В результате основная масса крупных изменений (которые по их последствиям часто обозначают как «нарушения») отсекается от возможности передачи потомству, очищая таким образом популяцию от мутационного груза. Отсекание тем эффективнее, чем крупнее изменение (нарушение). И только точечные мутации в большинстве случаев не оказывают значительного влияния на фенотип, поэтому их и накопилось у человечества  $\approx 10$  млн. Они проходят все фильтры и постепенно увеличивают свое представительство в популяции. Здесь возникает удивительная по своим последствиям неопределенность. В случае классических наследственных болезней (в том числе и вследствие точечных, то есть мононуклеотидных, изменений — мутаций) обычно даже не возникает вопрос, что есть норма, а что мутация. И сравнивать здесь есть с чем. На том основана обслуживающая медицинскую генетику генетическая диагностика.

Но изменения, которые не приводят к явным патологиям, строго говоря, нельзя называть мутациями в общепринятом в медицинской генетике понимании, хотя они таковыми и являются, потому что, по определению, мутацией считается любое изменение в геноме. А нельзя, потому что сравнивать не с чем — между двумя любыми неродственными индивидуумами имеется  $\approx 3$  млн мононуклеотидных отличий

на геном. Какое у кого считать нормой, а какое мутацией? Более того, одно отличие часто само по себе вообще не может быть оценено как нарушение. Белки в организме взаимодействуют между собой. Если изменения взаимосогласованны, то это вообще «норма».

В полной мере это стало понятным только тогда, когда в сравнении оказалось достаточное количество геномов разных людей. Наиболее массовые минимальные (только один нуклеотид) и однотипные (только изменения нуклеотидов) отличия составили явление, получившее название

«моноклеотидный полиморфизм» (МНП). Схематически, в общем виде, это может быть представлено так, как изображено на рис. 1.6. Он представляет собой сумму отличающихся оснований, пересчитанное каждое на относительно протяженную, полностью идентичную последовательность ДНК сравниваемых геномов (между двумя сравниваемыми или условно «усредненными» индивидуумами). Таких отличий МНП между двумя произвольными индивидуумами (теперь уже не в формальном, а в конкретном индивидуальном измерении), как указывалось



**Рис. 1.6.** Схема моноклеотидного полиморфизма:

*а* – однонуклеотидные полиморфизмы (single-nucleotide polymorphisms: SNPs), однобазовые вариации среди разных людей. На рисунке показаны полосы нуклеотидов, на которых индивидуум А отличается от индивидуума Б только одним нуклеотидом. Индивидуум А может реагировать на лекарства позитивно, в то время как индивидуум Б может показать как отрицательную или умеренную реакцию, так и абсолютное ее отсутствие); *б* – длинный участок ДНК (примерно 100 000 оснований) с характерным образцом однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) в данном расположении хромосомы называется гаплотипом. Разновидность гаплотипа может быть вызвана новыми аллелями однонуклеотидных полиморфизмов, которые могут возникнуть из-за мутаций в разных положениях хромосом [8]

выше,  $\approx 3$  млн [7]. При усредненной оценке очень больших участков генома, да еще и с учетом гетерозиготности, частоты нуклеотидных отличий колеблются в незначительных границах и близки для всех хромосом человека, кроме половых (табл. 1.1).

Но уже на таком — сравнительно крупномасштабном хромосомном уровне видно, что за усреднением скрывается очень высокая индивидуальность (на примере отличий МНП в аутосомах и половых хромосомах). Индивидуальность полимор-

физма может приводить к самым разным фенотипическим последствиям. Те замены, которые радикально меняют функции продукта данного гена, относятся к классическим мононуклеотидным мутациям в их традиционном понимании и рассматриваются медицинской генетикой как причины наследственных болезней. В этом выше отмеченные две неравные группы изменений пересекаются. Те замены, которые не приводят к полному или значительному изменению продукта данного гена, но тем

Таблица 1.1

Различие нуклеотидов по хромосомам [9]

Хромосома	Гетерозиготное положение	Исследованная высококачественная базовая точка	$\pi(\times 10^{-4})$
1	71,483	92,639,616	7.72
2	81,860	111,060,861	7.37
3	61,190	81,359,748	7.52
4	59,922	74,162,156	8.08
5	56,344	77,924,663	7.23
6	53,864	72,380,717	7.44
7	52,010	68,527,550	7.59
8	44,477	57,476,056	7.74
9	41,329	50,834,047	8.13
10	43,040	52,184,561	8.25
11	47,477	56,680,783	8.38
12	38,607	51,160,578	7.55
13	35,250	43,915,606	8.03
14	35,083	47,425,180	7.40
15	27,847	31,682,199	8.79
16	22,994	27,736,356	8.29
17	21,247	27,124,496	7.83
18	24,711	30,357,102	8.14
19	11,499	15,060,544	7.64
20	22,726	31,795,754	7.15
21	26,160	50,367,158	5.19
22	17,469	20,478,378	8.53
X	23,818	50,809,568	4.69
Y	348	2,304,916	1.51
Всего	920,752	1,225,448,590	7.51

*Примечание.* Гетерозиготность ( $\pi$ ) каждой хромосомы. Данные усреднены, чтобы избежать повторных последовательностей и гетерозиготности, исчисляемой, как описано в методах. Рассмотренные гетерозиготные положения и высококачественные базы вычислялись отдельно для каждого парного сравнения с геномом и потом суммировались по каждой хромосоме.

не менее меняют его, вызывают (вместе с общим генетическим фоном и внешними воздействиями) разной степени предрасположенность к болезням (практически всем). Это — так называемые функциональные МНП. А те, которые никак не меняют продукт (например, синонимические замены), относят пока еще к нефункциональным МНП [10].

Но, скорее всего, почти любой МНП как-то да влияет на фенотип (хотя и не прямо). Просто все это пока сколько-нибудь детально не изучено. Например, показано, что в зонах повышенной плотности МНП чаще происходят рекомбинантные события в аутосомах человека [11]. Так и получается, что отличия в геноме (то есть каждый отдельный геном) — это судьба каждого человека. И охватывает она весь диапазон здоровья и нездоровья: от предмета классической медицинской генетики (в крайних проявлениях) до полного благополучия (в проявлениях уникальных). Как это все конкретно результирует на здоровье конкретного человека? Пока что «все» детально не изучено. Объем исследований здесь исключительно велик. Поэтому концентрируются на наиболее значимых участках генома. И там, где данных оказывается уже достаточно, связь со здоровьем устанавливается надежная. Вот несколько примеров, на которых видно, как и почему любые изменения в геноме, в том числе и МНП, связаны с нездоровьем. Пигментная ксеродерма ассоциирована с пониженной репарацией ДНК. Это наследственная патология с ярким проявлением (то есть предмет медицинской генетики).

Перейдем теперь с организменного уровня на уровень молекулярный. Один из белков, участвующих в восстановлении генома от повреждений — XPD, играет ключевую роль в эксцизионной репарации. При мутациях в их обычном понимании, то есть изменениях в гене, приводящих к синтезу неактивного (или малоактивного) продукта, возникает эта самая классическая наследственная болезнь. Исследовали МНП гена данного продукта (белка) — ERCC2/XPD. В нем обнаружили высокий

уровень МНП. Связать это все со здоровьем «вообще» нельзя. Но если учитывать МНП не вообще (в среднем на ген), а обратить внимание на их конкретную предпочтительную локализацию, то окажется, что она сосредоточена в определенных положениях. И представляет собой не абстрактные МНП, а такие изменения, которые меняют аминокислотную последовательность и тоже не вообще, а в соответствующих участках, кодирующих функционально значимые сайты белка. Только немногие замены приводят к полной утрате активности его продукта, а большинство меняют в разной степени (и проявлениях) активность как таковую, ибо активность даже фермента далеко не полностью связана с его ферментативной активностью «в чистом виде», определяемой *in vitro* по уровню ферментативной реакции. Поэтому рассматривать функцию белка надо во всех проявлениях. В результате такого рассмотрения ситуация очень даже конкретизируется (рис. 1.7). Теперь уже такую конкретизацию можно соотносить с патологией. Когда исследовали определенные группы опухолевых больных, то оказалось, что у них, в отличие от здоровых, обнаружен полиморфизм в гене ERCC2/XPD (табл. 1.2).

При инактивирующих мутациях возникает пигментная ксеродерма. При мутациях слабых, именуемых «естественным полиморфизмом», яркого проявления классической наследственной болезни нет, но есть предрасположенность к опухолям. Функционально значимых сайтов в белках много. Это объясняется тем, что в организме человека, за редчайшим исключением, белки не функционируют сами по себе как индивидуальные молекулы. Они объединены в сложные лабильные многокомпонентные комплексы, примером чего служит и XPD (рис. 1.8). И небольшое, казалось бы, изменение в молекуле одного белка через такие сложные взаимодействия меняет работу многих систем.

В ряде случаев такая связь определена точно и на гене картированы участки, отвечающие за конкретные взаимодействия

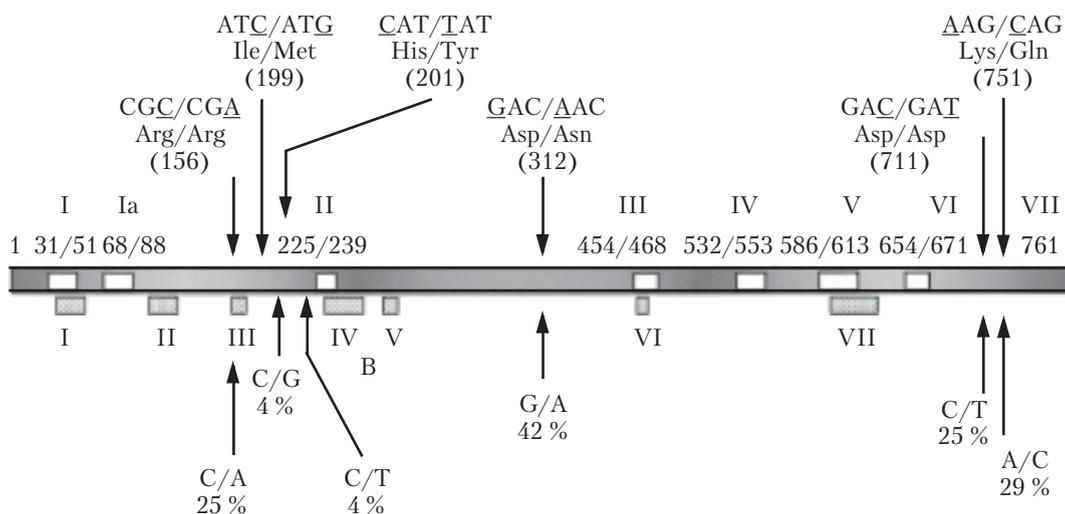


Рис. 1.7. Линейное изображение белка пигментной ксеродермы группы D (XPD). Показаны 6 однонуклеотидных полиморфизмов (single-nucleotide polymorphisms) — SNPs, найденных в экзонах. Открытые прямоугольники относятся к консенсусным сайтам ДНК-ДНК хеликазы, в то время как нарисованные точечным пунктиром — РНК:ДНК доменам хеликазы. Короткие линии показывают расположение А и В нуклеотидсвязывающих доменов. Также выделены количество кодонов и изменения аминокислот. Типы однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs), а также средняя частота незначительных аллелей даны по [12]

кодируемого этим геном белка с другими белками, с которыми он взаимодействует. Тогда и связь со здоровьем и нездоровьем конкретизируется. Так, установлено, что ген предрасположенности к раку молочной железы (*BRCA1*) присутствует как врожденное изменение у 3,3 % женщин США с опухолью молочной железы [13]. Остальные же опухоли молочной железы относят к так называемым спорадическим случаям. Учитывая же сложность взаимодействий белков в белок-белковых комплексах, такая «спорадичность» тоже имеет генетическую основу. Это хорошо видно на *BRCA1*-взаимодействиях (рис. 1.9). Разница только в том, что при МНП, значительно нарушающих функцию, вероятность возникновения опухоли очень высока и четко прослеживается в поколениях. Реализуется классическая наследственная патология с отсроченной манифестацией («высокораковые семьи»).

Здесь прослеживается перекрытие с медицинской генетикой. При изменениях, оказывающих на функцию слабое воздействие, предрасположенность может вообще не реализоваться или окажется модифицирована по своему потенциальному эффекту дополнительной мутацией, слегка измененным взаимодействием нескольких белков в их комплексах (за счет МНП в других генах) и т. д. Но все это «записано» в геноме данного (каждого) индивидуума. Надо только уметь правильно прочесть и понять написанное. Безусловно, к одному только гену *BRCA1* все сводить нельзя. Он — не более чем относительно хорошо изученный пример. Опухоли настолько во всех отношениях неприемлемы для любого человека, настолько демонстративно-вызывающе дают на всю медицину (и не только на нее), выпячивая ее беспомощность, что борьба с ними требует немалых усилий. Постепенно ситуация

Материалы исследований генных полиморфизмов ERCC2/XPD D методом случай-контроль рака кожи и рака, вызванного курением [12]

Ссылка	Страна	Всего случаев	Тип рака	Контрольные индивидуумы	
				Всего	Исходный
Dybdhal et al (1999)	Дания	40	BCC (20 с псориазом)	40	Здоровые (20) и пациенты с псориазом (20)
	США	189	SCCNH	496	
Sturgis et al (2000)	Великобритания	125	Меланома	211	Здоровые
Winsey et al (2000)	Польша	96	NSCLC	96	Доноры трупной почки
Butkiewicz et al (2001)	США	331	Легкое	68	Здоровые
David-Beabes et al (2001)	Шотландия	341	Легкое	360	Здоровые
Spitz et al (2001)	США	28	Меланома	33	Госпитализированные
Tomescu et al (2001)	Корея	71	BCC	117	Доноры крови
Vogel et al (2001)	Швеция	250	Легкое	163	Госпитализированные (пациенты с легкими кожными заболеваниями)
Park et al (2002)	США	185	Легкое	162	Здоровые
Hou et al (2002)		1092	Легкое	1240	Здоровые
Zhou et al (2002)					Друзья и некровные члены семьи

Примечание. BCC (*basal cell carcinoma*) – базально-клеточная карцинома; XPD (*xeroderma pigmentosum group*) – группа пигментной ксеродермы; SCCNH (*squamous cell carcinoma of the head and neck*) – плоскоклеточная карцинома головы и шеи; NSCLC (*non-small cell lung cancer*) – немелкоклеточный рак легкого.

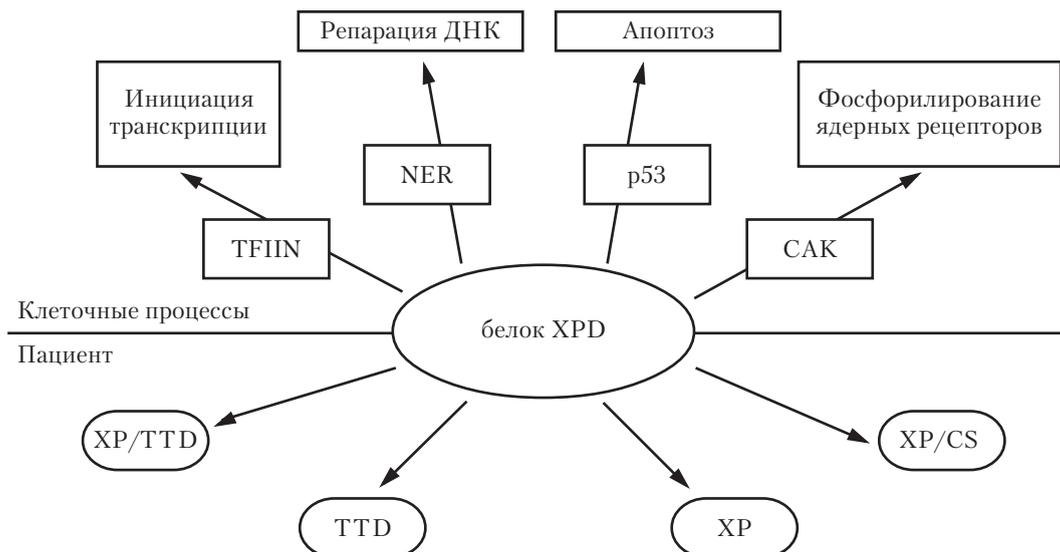


Рис. 1.8. Схематическое изображение взаимодействий между белком пигментной ксеродермы группы D (XPD) и мишенями в клетке и возможные синдромы, возникающие вследствие мутаций на гене этого белка [12]

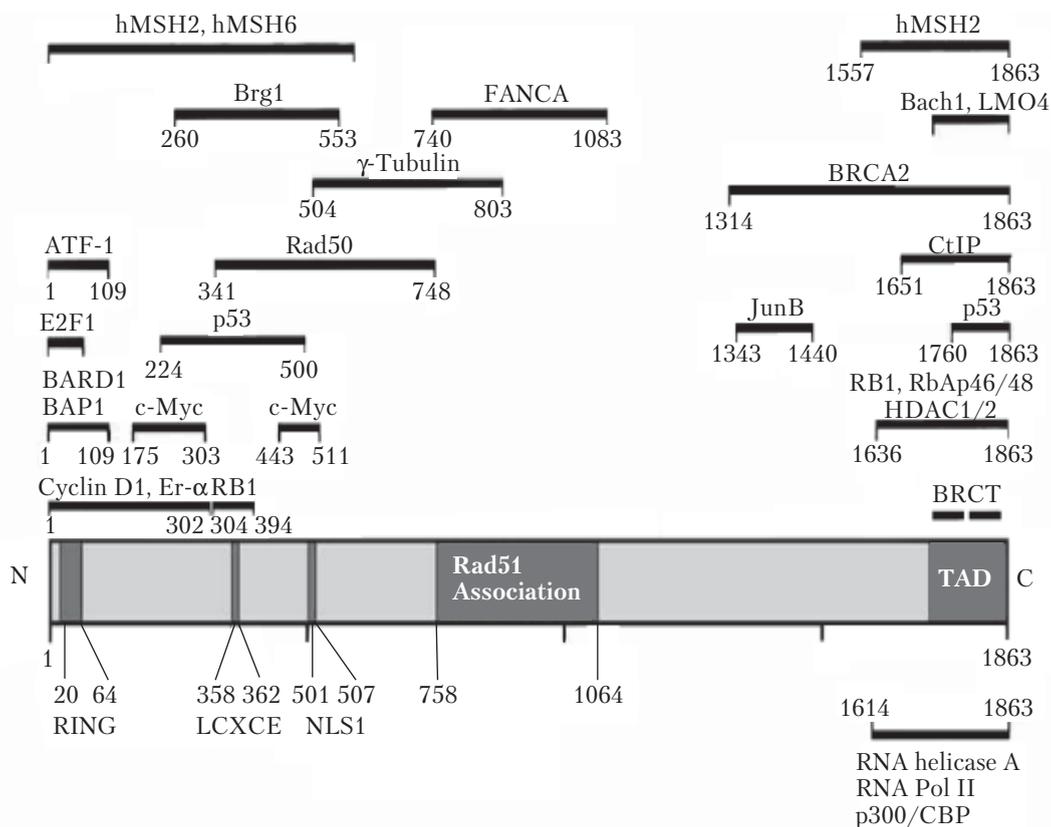


Рис. 1.9. Взаимодействие белков рака молочной железы 1 (BRCA1) (ранние проявления). Схематическая диаграмма, суммирующая BRCA1 (“breast cancer 1, early onset”) белок-белковые взаимодействия: ATF-1 — активатор транскрипционного фактора 1; BAP, BRCA1 — ассоциированный белок 1; BRCT, BRCA1 — С-терминальный повтор СВР, р265 CREB связывающий белок; CtIP, CtBP (С-терминальный связывающий белок) — взаимодействующий белок; ER- $\alpha$  — рецептор эстрогенов  $\alpha$ ; HDAC1/2, гистон-деацетилаза-1/2; LXCXE — консенсус семейства RB-связывающих белков; NLS1 — первичный сигнал ядерной локализации; RB1 — ретинобластома-1; RbAp46/48 (retinoblastoma-associated protein 46/48 kDa) — белок 46/48 kDa, ассоциированный с ретинобластомой; RING (ring finger (zinc finger-like) domain) — кольцевая область (подобная цинковому пальцу); TAD — домен транскрипционного активатора [14]

здесь меняется. Именно области онкологии геномной предопределенности уделяют особое внимание. Не ожидая, когда будет известно «все», создаются информационные «системы предупреждения» со все большим и большим разрешением. Одна из них — база данных SBP 500 Cancer [15], в которой суммирована (и непрерывно пополняется) информация о МНП в кандидатных генах, связанных с развитием рака

(общедоступная по адресу: <http://www.snp500cancer.nci.nih.gov>).

Здесь следует дать некое дополнительное пояснение. В клетке все процессы в той или иной мере взаимосвязаны и взаимозависимы. Уже не примере кандидатных генов, связанных с развитием рака, это хорошо видно. Опухоли возникают при нарушениях в онкогенах, антионкогенах, системах репарации, иммунного надзора и т. д.

Поэтому пока точность прогнозов, оценок, высока далеко не всегда, а только в тех случаях, где хорошо прослежены все, хотя бы ближайшие, взаимодействия и взаимозависимости. Однако по мере изучения разных (в пределе всех) генов, белков ими кодируемых, белок-белковых комплексов, их взаимодействий, прогноз совершенствуется, и меры можно будет определять уже с момента рождения. Ведь если болезнь неизбежна или ее возникновение вероятно, то «лечить» такую болезнь надо до ее возникновения. «Лечить» — путем воздействия на цепи процессов, нарушения которых приводят к патологии, соответствующим режимом жизни, поддерживающей терапией и т. д. Такие анализы уже проводят для всех генов, в которых установлена связь изменений с патологией. Принимаются соответствующие превентивные меры, правда, не везде, а только там, где уровень общества позволяет такие анализы и меры осуществлять.

Как уже отмечалось, МНП — далеко не единственная первооснова, с которой начинается цепочка в нарушении ген-признак. Но она самая массовая и как таковая отвечает за разные нарушения, возникающие у индивидуума «вдруг» или с возрастом, задолго до определяемого (достаточно условно) видового предела срока жизни человека. И по мере изучения — используется практически. Но одного полиморфизма как такового здесь знать недостаточно. Нужны связи. Для этого по уже изученным регионам генома, для которых установлена связь конкретного полиморфизма с конкретной патологией (как правило, вероятностной, если это не классические наследственные болезни с яркой манифестацией), проводят индивидуальный анализ. Сегодня методы такого анализа позволяют в одной пробе определить  $\approx 100\,000$  мононуклеотидных замен по отношению к некому стандарту [10].

Методы такого анализа непрерывно совершенствуются, а для поиска зависимостей организуются целевые программы. Пока они скрупулезно выполняются, пока нет строгих зависимостей, ищут обходные пути. Создаются специальные программы

потенциальных функционально значимых мононуклеотидных полиморфных участков, которые определяются на основании их влияния на структуру белкового продукта и сравнении с полиморфизмом аналогичных участков в геномах разных видов эукариот [16]. Конечно же, учитывают не только МНП, но и все остальные изменения в геноме. Их тоже используют в прогнозах. По мере нахождения зависимостей и доведения методических возможностей до массового использования полученные данные превращаются в достояние практики. Одновременно становится понятным, как реализовать то, о чем очень много говорят, но очень мало делают — индивидуализация лечения. Анализ геномных отличий показал, что они достаточно существенны между индивидуумами одного географического региона и еще в большей степени — между населением разных континентов [17], и это также надо учитывать при профилактических процедурах и лечении.

В тех случаях, когда четкие зависимости уже установлены, индивидуализация конкретизируется, и становятся строго прогнозируемыми как профилактика, так и лечение. Это хорошо иллюстрируется на ставших уже рутинными показателях.

Самая массовая потенциальная причина поражения организма — разнообразные чужие для него вещества, попадающие в него извне с воздухом, водой, пищей, контактно, а также и очень многие эндогенные, в норме как обязательные конечные или промежуточные метаболиты, образуемые в процессе «обмена веществ». Самой массовой они считаются потому, что их общая масса, взаимодействующая с организмом, в зависимости оттого, что и как считать, в сутки приближается к массе всего организма или значительно превышает его [18]. И так — каждый день жизни. А потенциальной — потому, что для защиты от действия таких продуктов в организме предусмотрены совершеннейшие и разнообразные системы их устранения. Первой, наиболее мощной и универсальной в этом ряду стоит система детоксикации. Она реализуется (в обобщенном виде) в три фазы [19].

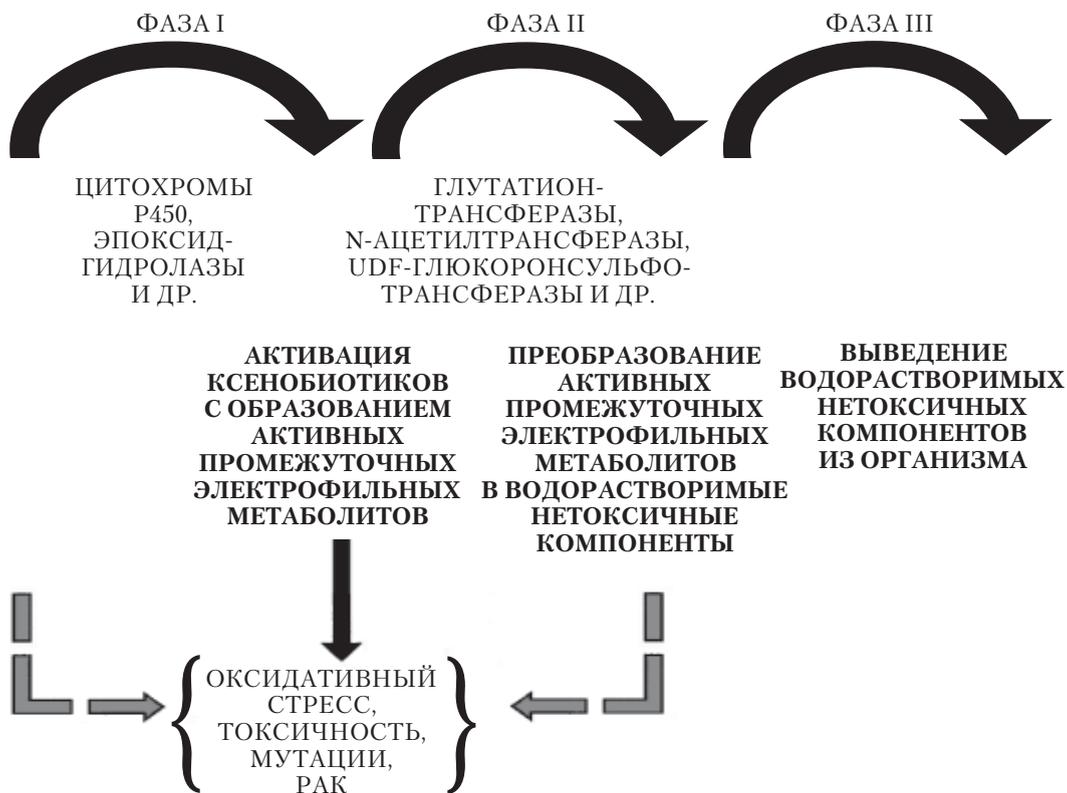


Рис. 1.10. Основные фазы детоксикации [19]

Первые две — определяющие и выполняются, в основном, весьма ограниченным числом ферментов. По сути механизма детоксикации, первая фаза готовит подлежащие детоксикации продукты для второй. Такая подготовка связана с их активацией, поэтому весь процесс должен быть идеально согласован. Иначе или будут накапливаться недетоксицированные продукты и разрушать организм (первая фаза работает слабее второй), или продукты активации — и не менее (а часто даже более) успешно опять же разрушать организм (вторая фаза работает слабее первой). Схематически, с указанием ферментов детоксикации и последствий нарушения их активности, это представлено на рис. 1.10. При не радикальных нарушениях систем детоксикации за счет соответствующих изменений в генах (то есть за счет МНП) человек

доживает до репродуктивного возраста, оставляет потомство и, поболев «по разным причинам», уходит в мир иной. Так накапливается подобный полиморфизм, обуславливая «разные причины» болезней. Насколько распространен среди людей такой полиморфизм, насколько такое явление массово, хорошо видно из табл. 1.3.

Вот и получается, что только от изменений в таком весьма ограниченном, по размерам всего генома, участке наследственного аппарата преждевременно (то есть задолго до так называемого видового срока продолжительности жизни) болеет и умирает очень много людей. По тем самым «разным причинам».

В ряде случаев конкретная связь конкретного полиморфизма в конкретных генах с конкретными патологиями изучена уже достаточно хорошо.

Гены детоксикации [19]

Ген	Мутация, полиморфизм	Первичный дефект	Частота в популяции, %	Заболевание
<i>mEPHX</i>	Exon 3 T-C Tyr-Hist	Нарушение фазы детоксикации	6	Хроническая обструкционная пневмония, эмфизема легких
<i>P4501A1 (CYP1A1)</i> <i>CYP2D6</i>	Exon 7A-G; He-Val Dell/795T Точечные мутации	Нарушение фазы детоксикации Нарушение фазы 1 детоксикации	7 40	Рак легких Болезнь Паркинсона, аутоиммунные заболевания
<i>GSTM1</i>	del/del	Нарушение фазы 2 детоксикации	40	Рак легких, хронический бронхит, эндометриоз
<i>NAT-2</i>	Миссенс-мутации	Нарушение фазы 2 детоксикации	50	Рак легких, мочевого пузыря, рак молочной железы, рак толстой кишки

Таким примером может служить анализ генов, кодирующих цитохромы Р-450. Вообще-то группа белков Р-450 цитохромами называется только в силу исторической традиции — их впервые установили по спектральным особенностям поглощения света. По такому показателю их удалось очистить, сконцентрировать и изучить. Оказалось, что группа белков Р-450 состоит из ферментов, метаболизирующих ксенобиотики. Вследствие полиморфизма их генов у разных людей возможна вся гамма изменений активности отдельных ферментов этой группы — от полной утраты активности до ее усиления выше нормы. Поскольку же лекарственные препараты в своем абсолютном большинстве — соединения либо вообще не природные («химия»), либо получают из неупотребляемых в пищу продуктов (и потому хотя и природных, но по отношению к человеку столь же чуждых ему, как и «химия»), то воспринимаются системами детоксикации организма как ксенобиотики. В результате дефицит активности ферментов Р-450 приводит к накоплению в организме лекарств (при их обычно принятой дозировке) и, как следствие, повышению их токсичности и побочных эффектов. В какой-то (далеко не всегда линейной) мере это происходит пропорционально степени ос-

лабления активности конкретных ферментов детоксикации.

Усиление активности Р-450 выше нормы ведет к ускоренному разрушению лекарств и проявлению устойчивости к препаратам, то есть неэффективности лечения. И это тоже, в первом приближении, пропорционально изменению их активности. А современная медицина как основу дозировки лекарств берет статистическое усреднение доза-эффект на популяционном уровне [20], часто вообще в общепланетарном масштабе. Только зная индивидуальные возможности функционирования генома, можно рассчитать и диапазон ответа на лекарство-ксенобиотик, и оптимальную дозу лекарства, и частоту его приема, и все то, что, собственно, и есть «лечение» в его индивидуализированном, а не статистическом варианте. Лекарства сегодня, пожалуй, самая массовая причина всяких дополнительных поражений организма человека. В то же время один из механизмов таких повреждений — несоответствие лекарств и их доз с возможностями систем детоксикации — уже может использоваться практически полноразмерно. Группа Р-450 изучена очень хорошо. Эти ферменты — редкий случай действия в значительной мере «самих по себе», то есть без образования сложных белковых комплексов с

трудно идентифицируемыми белок-белковыми взаимодействиями. Последствия МНП в Р-450 тоже хорошо изучены. Остановка за малым — реализовать это все в клинике. А еще лучше не доводить до клиники, использовать для организации соответствующей профилактики.

Индивидуализация обязательно должна наличествовать при профилактике. Зная «уязвимые места» организма, из которых далеко не единственный, но самый массовый — полиморфизм генов, отвечающих за защиту (детоксикация) или восприимчивость (мишень) к конкретным факторам конкретного внешнего окружения, можно избежать очень многих реальных и не вообще, а строго индивидуальных, персонализированных опасностей. Очень яркая жизненная ситуация — это курение. Сегодня оно — своеобразная рекламная ложно-престижная рулетка. «Вот видите — этот индивид курит и живет уже во-о-от сколько. А тот не курил и давно умер. Так курите — и будете жить долго, красиво и приятно». А почему иногда курящий действительно живет долго и болеет не более других, а многие не курят, а все равно болеют и умирают рано? И что ждет конкретного начавшего (продолжающего) курить индивидуума? Выше уже приводились данные (см. табл. 1.2, 1.3), показывающие зависимость опухолеобразования от конкретного полиморфизма генов (то есть конкретных мутаций, ослабляющих, а не полностью инактивирующих его продукт). Но контроль и мишени опухолеобразования весьма многочисленны. Они зависят и от систем защиты (первая и вторая стадии детоксикации, репарация, система глутатиона, иммунитет и т. д.), и от состояния мишеней (ключевые точки цитокинеза, клеточные протоонкогены, клеточные антионкогены и т. д.). И если у кого-то все эти системы достаточны и сбалансированы, курение будет наносить организму вред ниже критического (для развития патологии) уровня. Такие люди есть, но их не так уж и много. Но если системы детоксикации токсических продуктов недостаточны, разбалансированы, да еще и мишене-

ни ослаблены «полиморфизмом», а иммунный надзор, вследствие того же полиморфизма, тоже «не тянет» — курение быстро и надежно отправит такого (внешне очень здорового) индивидуума в «лучший мир». И таких в популяциях — большинство. Частота встречаемости таких «возможностей» очень хорошо представлена в табл. 1.3. То же произойдет при недостаточном функционировании систем репарации у некурящего. Поэтому сравнения «курит и здоров — не курит и болеет» не корректны. Реклама же «зовет», рулетка работает, «ритуальные услуги» функционируют с полной нагрузкой. Но и то и другое можно предусмотреть, зная конкретный (во многом уже реально определяемый) генетический полиморфизм индивидуума, и дать каждому реальные, строго индивидуальные рекомендации по профилактике (образ жизни, условия работы, поддерживающая терапия и т. д.). А если необходимо — то по лечению. И так во всем, хотя и не сразу, а по мере выяснения связей, зависимостей и перехода всего этого в клиники.

Переход на генный и обусловленный ею молекулярный уровни (то есть генетическую медицину) позволит решить и такие проблемы, которые сегодня не только решения, но и вообще какого-нибудь рационального объяснения не имеют. Очень часто пациенты жалуются на «общее недомогание», «вялость», «плохое самочувствие» и т. д., которое возникает и «вдруг», но в большинстве случаев появляется после тяжелых (или не очень) болезней и тянется долго, а то и вообще переходит в хроническую форму. Иногда причину удается установить, но чаще всего ничего конкретного не находят. А стоять за этим могут такие генетические особенности индивидуума (то есть по формальному определению — точечные мутации без ярких проявлений, тот самый МНП), которые ослабляют активность продуктов определенных генов. Как указывалось выше, при подобном полиморфизме по генам репарации, антиоксидантной защиты, иммунной системы и т. д. возникает «наследственное предрасполо-

Частичный список нарушений/расстройств в связи с единичными нуклеотидными полиморфизмами [8]

Расстройство, болезнь	Ген
Астма	<i>EDN 1</i> и <i>NOS 1</i>
Первичная открытоугольная глаукома	<i>Mycocillin</i>
Хронический склероз	
Рак легких	<i>Fibrillin 1</i>
Аритмия	<i>MMP-1</i>
Идиопатический артрит	<i>KCNQ 1</i>
Кровяное давление	<i>MIF</i>
Билиарный цирроз печени	<i>TAF 1</i>
Диабет, тип II	<i>MBL</i>
Хроническая красная волчанка	<i>Syntaxin 1A</i>
Расстройства пищеварения	<i>Prolactin</i>
Мигрень	
Оссификация	<i>Melanocortin</i>
Рак легких	
Болезнь Паркинсона с поздними проявлениями	<i>Insulin receptor</i> <i>Npps</i> <i>P53; tau</i>

*Примечание.* SNPs (single nucleotide polymorphisms) — единичный нуклеотидный полиморфизм; POAG (primary open-angle glaucoma) — первичная открытоугольная глаукома; MMP-1 (matrix metalloproteinase) — матричная металлопротеиназа 1; EDN 1 (endothelin) 1 — эндотелин 1; NOS 1, (neuronal nitric oxide 1) — нейронная синтетаза окиси азота 1; MBI (mannose binding protein — маннозасвязывающий белок; Npps (nucleotide pyrophosphatase) — нуклеотидпирофосфатаза; TAF 1 (thrombin activable fibrinolysis inhibitor) — тромбинактивационный фибринолизный ингибитор; KCNQ1 (potassium channel protein) — белок калиевых каналов; MIF (macrophage inhibitory factor) — макрофагингибиторный фактор; PD (Parkinson's disease) — болезнь Паркинсона.

жение» к опухолям, диабету, атеросклерозу и др. И то, что пока такая связь не распространяется на все здоровье и нездоровье, объясняется только недостаточной изученностью проблемы. Сегодня известны лишь небольшие локальные островки ее. Но и они дают конкретизацию (табл. 1.4), которой уже можно пользоваться.

Это то, что уже принципиально известно и интенсивно изучается. Но не только из таких патологий складывается нездоровье. Клетка самодостаточная, самоподдерживаемая и саморегулируемая система. Обмен веществ в ней протекает исключительно напряженно. Количество только внутриклеточно образуемых в процессе нормального метаболизма энергетически

высокоактивных групп ежедневно во много раз превышает массу клетки [18]. И повреждаемость макромолекул в норме исключительно высокая. Поэтому в каждой клетке осуществляется массовая деградация всех макромолекул и образуемых ими структур (за исключением ДНК, которая не деградирует, а ремонтируется). Быстрая деградация реализуется за счет специальных систем опознавания поврежденных макромолекул, а медленная — всех подряд. С такой же скоростью происходит синтез всех макромолекул и сборка надмолекулярных структур. Если геном полноценен, то рециклинг внутреннего содержимого клетки быстро восстанавливает любые повреждения макромолекул и структур (рис. 1.11).



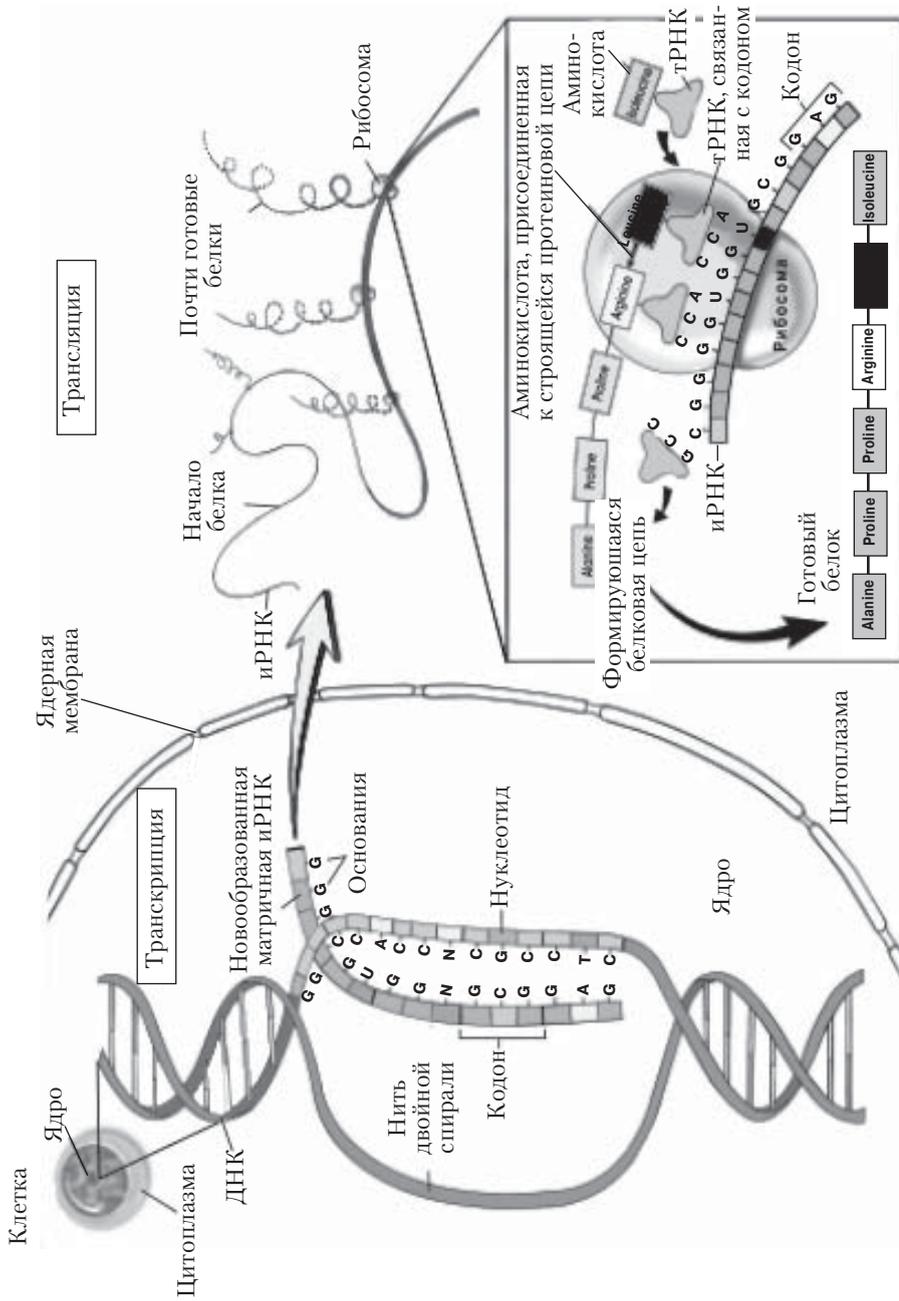


Рис. 1.12. При нарушении в геноме молекулярная машина клетки воспроизводит на всех этапах синтеза неполноценный (измененный) продукт (за основу схемы взят рисунок по [21])

Но если в гене домашнего хозяйства имеется мутация, нарушающая функцию его продукта, то никакой рециклинг ситуацию изменить не сможет — вместо деградируемой неполноценной молекулы будет синтезироваться и включаться в рециклинг такая же неполноценная молекула (рис. 1.12).

Два приведенных примера — крайние состояния (идеальная норма и мутация с ярким проявлением). Полиморфизм приводит к тому, что многие гены изменены «чуть-чуть». Продукты, ими кодируемые, тоже функционируют «чуть-чуть» слабее нормы. Но «чуть-чуть» — понятие не количественное. А под «естественным полиморфизмом» понимают все изменения, не приводящие к ярким патологиям. Изменений же у любого индивидуума — миллионы на геном. И оттого, что их называют не мутациями, а «полиморфизмом», ничего не меняется. У многих в результате такого полиморфизма несколько генов функционируют на пределе. Пока человек здоров, тяжелым стрессам не подвержен, молод, количественного выражения таких генов и активности их продуктов, то есть «возможностей», хватает для рециклинга в требуемом объеме. Но при тяжелых болезнях, да еще и в не самом молодом возрасте, жестких стрессах, когда все в организме активировано до предела возможностей, «естественный полиморфизм» эти самые возможности и ограничивает. Чтобы клетка не погибла, все этапы рециклинга в ней строго согласованы. Нарушенные макромолекулы при их накоплении блокируют (или искажают) нормальный метаболизм. Мощность и полноценность ресинтеза ограничена «естественным полиморфизмом». Деграция испорченных макромолекул в клетке ограничивается уровнем ресинтеза, а ресинтез — уровнем деграции испорченных макромолекул. Круг замыкается. Клетка замедляет свой метаболизм. Организм состоит из клеток. В них исходный «полиморфизм» — наследственный, то есть одинаков во всех клетках. Снижается общий «жизненный тонус» — метаболизм подстраивается под возможно-

сти, которые ему предоставляет «полиморфизм». Возникает затяжное нездоровье.

Если выйти на первоосновы, то ситуация отнюдь не безнадежна. Критичным в таких случаях является не весь «полиморфизм», а те (часто даже одно) изменения в нескольких (одном) генах (гене), продукты которых «слабее» других, менее затронутых полиморфизмом их генов. И если знать эти гены (ген) и эти нарушения, то можно было бы прицельно, именно их, усилить компенсаторно извне в зависимости от таких конкретных «слабостей»: их полноценными продуктами, особым режимом им помогающим, регуляторами воздействиями и т. д. Но не вообще «общеукрепляющими процедурами», а прицельно. Как такое может происходить (и как в «самопроизвольном» варианте действительно происходит), видно на одном достаточно хорошо изученном примере. При острой почечной недостаточности часто причиной патологических проявлений становится системный воспалительный синдром. Пациента необходимо переводить на длительный диализ. И его судьба зависит от мононуклеотидного полиморфизма в генах некоторых цитокинов [22]. В норме, при обычных «спокойных» условиях существования, диапазона ответа генов с таким полиморфизмом хватает для компенсации внутренних и внешних возмущающих воздействий. Но при системном воспалительном синдроме ситуация драматически меняется. И «полиморфизм» не дает возможности организму опять обрести равновесное состояние. Одних цитокинов оказывается слишком много, а других мало — больные с таким «полиморфизмом» умирают (рис. 1.13).

По своей сути такая ситуация — крайне упрощенная. И даже в этом случае зная, что у пациента ослаблен ответ интерлейкина-10, а возможности активации фактора некроза опухолей  $\alpha$  велики, можно заблаговременно принять меры компенсации.

Но поскольку в организме системы взаимосвязаны, задублированы, взаимозависимы, то хотя цитокины являются наиболее значащим фактором, они далеко не все

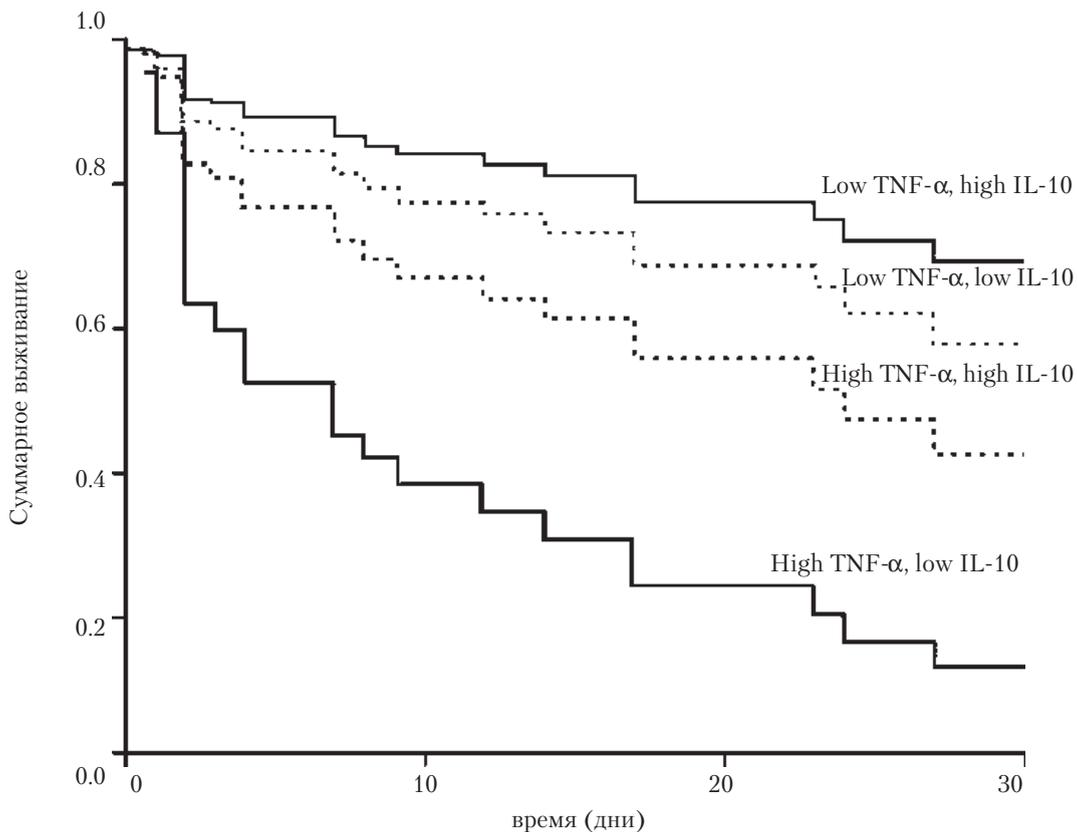


Рис. 1.13. Выживание при диализе в когорте пациентов с ARF (acute renal failure), вызывающем острую почечную недостаточность, усложненную наложением комбинаций TNF- $\alpha$  и IL-10-генным полиморфизмом, построенным по программе APACHE II [22]

определяют. Сколь сложна здесь связь, видно даже из упрощенного схематического изображения (рис. 1.14). Когда по всем связям будут определены значащие взаимосвязанные изменения в генах, можно будет принимать полностью адекватные меры. Принципиально это относится ко всем массовым патологиям, включая такие, как нарушение кровяного давления, сердечные болезни разных этиологий, диабет и т. д. [8]. Но сложность такой идентификации очевидна:  $\approx 10$  млн различий в человеческой популяции в целом и  $\approx 3$  млн между любыми двумя людьми (не связанными между собой прямым родством).

И тем не менее — это только часть той проблемы, которую предстоит решить.

Вторая часть еще более сложная. Связана она с тем, что прямолинейность и однозначность цепочки ген-признак давно ушла в прошлое. Первичность гена — хотя и самый первый, исходный, принципиально все определяющий, но всего лишь один лик информации. С генома начинается неоднозначная цепочка событий, очень существенно в своей неоднозначности (вторично определяюще) влияющая на фенотип. В общей форме ее можно обозначить как альтернативность информации. Она охватывает все информационные события в организме и изучена пока в высшей степени недостаточно.

Промежуточным состоянием такой неопределенности является то, что в свое

время Р. Б. Хесин назвал «непостоянством генома». Кроме уже привычных мутаций (которые тоже представляют собой проявление непостоянства, но в положении в крайнем диапазоне в сторону «постоянства»), в геноме (то есть на уровне его первичной последовательности) происходят амплификации, перемещение транспозируемых элементов, лабильность повторов и т. д. Все это влияет на фенотип. Но наиболее частая причина нестабильности, ведущей к изменению фенотипа, — непостоянство повторов, единичный элемент которых представлен тринуклеотидом. Четыре из них (у человека), а именно ACC, ATC, AAG и AGG, образуют протяженные повторы, состоящие из идентичных триплетов. Число их копий может увеличиваться. Это явление — экспансия повторов, в ряде случаев определяет судьбу экспрессии генов. Изменения в геноме, какими бы они ни были, — это мутации, возникающие

спонтанно и распределяющиеся статистически. Экспансия же повторов ведет себя не случайным образом. Она имеет некий направленный характер. Достаточно часто число их копий превышает критическое число в 40 мономеров, что приводит к изменению экспрессии полноценного, неизменного гена с его собственной неизменной регуляцией — динамическим мутациям [24]. При этом, в зависимости от длины повтора (числа в нем тринуклеотидов), наблюдается вся гамма здоровья и нездоровья, от нормального фенотипа, через едва заметные, слабые, средние, сильные, очень сильные проявления болезни. Экспансия повторов, вызывающая динамические мутации, охватывает не все повторы данного типа, а выступает отдельными событиями среди повторов (табл. 1.5).

Но обусловлена она как структурой самих повторов, так и слабыми, мало заметными по влиянию на все остальные про-

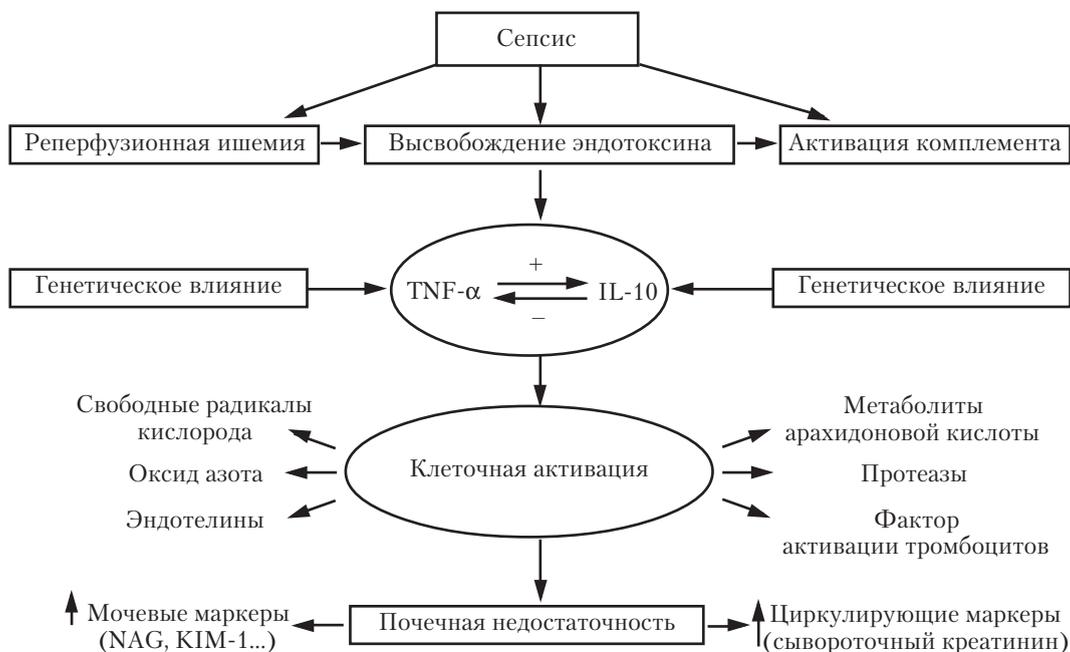


Рис. 1.14. Схема процессов воспалительной реакции в ответ на общее заражение крови и результирующее повреждение почек (взято с разрешения у [23])

Болезни экспансии повторяющихся последовательностей [24]

Нозологическая форма	Ген	Локус	Белок	Тип повтора	Размер повтора: норма/патология	
Болезни экспансии некодирующих повторов						
Синдром Мартина – Белла	<i>FMR1</i>	Xq27.3	FMRP	CGG	6–53	>230
YOFRAХE	<i>FMR2</i>	Xq28	FMR2	GCC	6–35	>200
Атаксия Фридрейха	<i>X25</i>	Xq13–21.1	Фратаксин	GAA	7–34	>100
Миотоническая дистрофия, тип 1	<i>DMPK</i>	19q13.3	DMPK	CTG	5–37	>50
Спиноцеребеллярная атаксия, тип 8	<i>SCA8</i>	13q21	–	CTG	16–37	110–250
Спиноцеребеллярная атаксия, тип 12	<i>SCA12</i>	5q31–33	PP2A-PR55b	CAG	7–28	66–78
Спиноцеребеллярная атаксия, тип 10	<i>SCA10</i>	22q13	SCA10	ATTCT	10-22	<4500
Миотоническая дистрофия, тип 2	<i>ZNF9</i>	3q21	ZNF9	CCTG	<26	75–11 000
Прогрессирующая миоклонус-эпилепсия	<i>CSTB</i>		CSTB	GCG	2–17	30–75
Болезни экспансии кодирующих повторов						
Спинобульбарная мышечная атрофия (болезнь Кеннеди)	<i>AR</i>	Xq13–21	Андрогеновый рецептор	CAG	9–36	38–62
Хорея Гентингтона	<i>HD</i>	4p16.3	Гентинггин	CAG	6–35	36–121
Дентато-рубро-паллидо-люйисова атрофия	<i>DRPLA</i>	12p13.31	Атрофин-1	CAG	6–35	49–88
Спиноцеребеллярная атаксия, тип 1	<i>SCA1</i>	6p23	Атаксин-1	CAG	6–44	39–82
Спиноцеребеллярная атаксия, тип 2	<i>SCA2</i>	12q24.1	Атаксин-2	CAG	15–31	36–63
Спиноцеребеллярная атаксия, тип 3	<i>SCA3</i>	14q32.1	Атаксин-3	CAG	12–40	55–84
Спиноцеребеллярная атаксия, тип 6	<i>CACNL1A4</i>	19p13	CACNA1A	CAG	4–18	21–33
Спиноцеребеллярная атаксия, тип 7	<i>SCA7</i>	13p12–13	Атаксин-7	CAG	4–35	37–306
Спиноцеребеллярная атаксия, тип 17	<i>TBP</i>	6q27	TBP	CAG	29–42	47–55
Окулофарингеальная мышечная дистрофия	<i>PABP2</i>	14ql1	PABP2	GCG	6	7–13

цессы изменениями в функционировании белков репликации [25]. Слабые же изменения функций, как теперь уже хорошо известно, связаны с особенностями их МНП. Здесь уже можно (пока еще и в не полностью детализированном виде) проследить многоступенчатую сеть (уже не цепочку, а сеть) процессов от генов (скорее всего нескольких) к признаку, который этими генами непосредственно не определяется.

Еще более отдаленная от однозначности альтернативность информации — это альтернативный сплайсинг. Суть его определяется структурой генов эукариот вообще и человека в том числе. Большинство генов человека мозаично. В них чередуются участки, кодирующие и не кодирующие. После считывания гена образующийся предшественник информационной РНК, той, которая декодируется на рибосомах в белки, подвергается сложному процессу

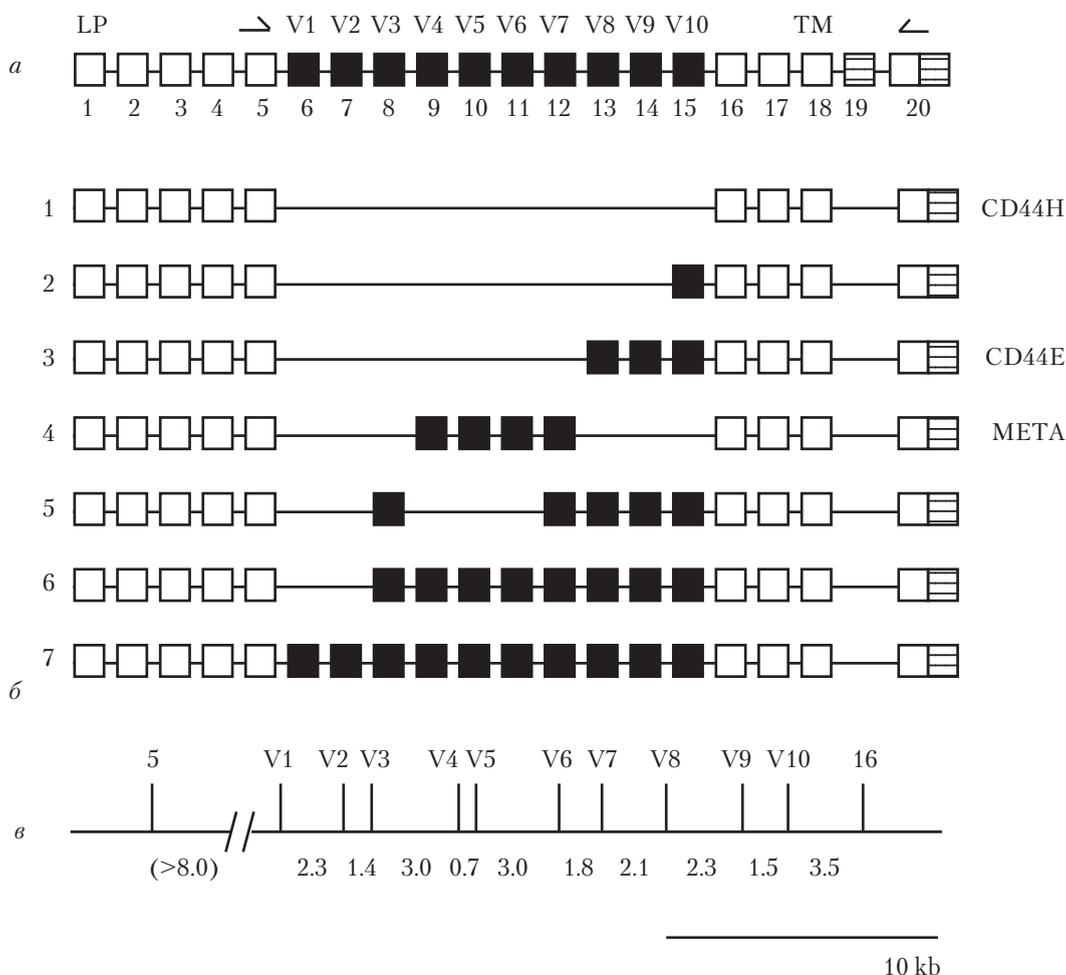


Рис. 1.15. Альтернативный сплайсинг *CD44*: а — карта гена *CD44*. Экзон 1 кодирует лидерный пептид б. Экзон 18 кодирует трансмембранный домен. Экзоны с 6-го по 15-й соответствуют альтернативно-связанным эксонам. Экзон 19 кодирует цитоплазматический домен [32]; б — примеры нескольких ранее рассмотренных изоформ *CD44*: 1, базисный, или гематопоический, вариант *CD44H*; 2, V10 только; 3, эпителиальный вариант [35]; 4, *META*-1 вариант [13]; в — карта-шкала [26]

преобразования. В такой считываемой с ДНК единой цепи РНК происходит вырезание определенных фрагментов (интронов) и их быстрая деградация. Другие фрагменты (экзоны) соединяются в новую сплошную последовательность. Это и есть сплайсинг. Поскольку интронов и экзонов может быть много (у разных генов разное количество), то и вариантов выщепления (вырезаясь, интроны могут захватывать находящиеся между ними экзоны) может

быть много. В результате один ген может давать разное количество отличающихся по своей последовательности (и свойствам) белков. Вот один из относительно хорошо изученных примеров. Трансмембранный белок CD44 имеет 20 экзонов и 19 интронов. Его структура и примеры альтернативного сплайсинга приведены на рис. 1.15.

В результате непосредственно изученное, реально имеющее место число вариан-

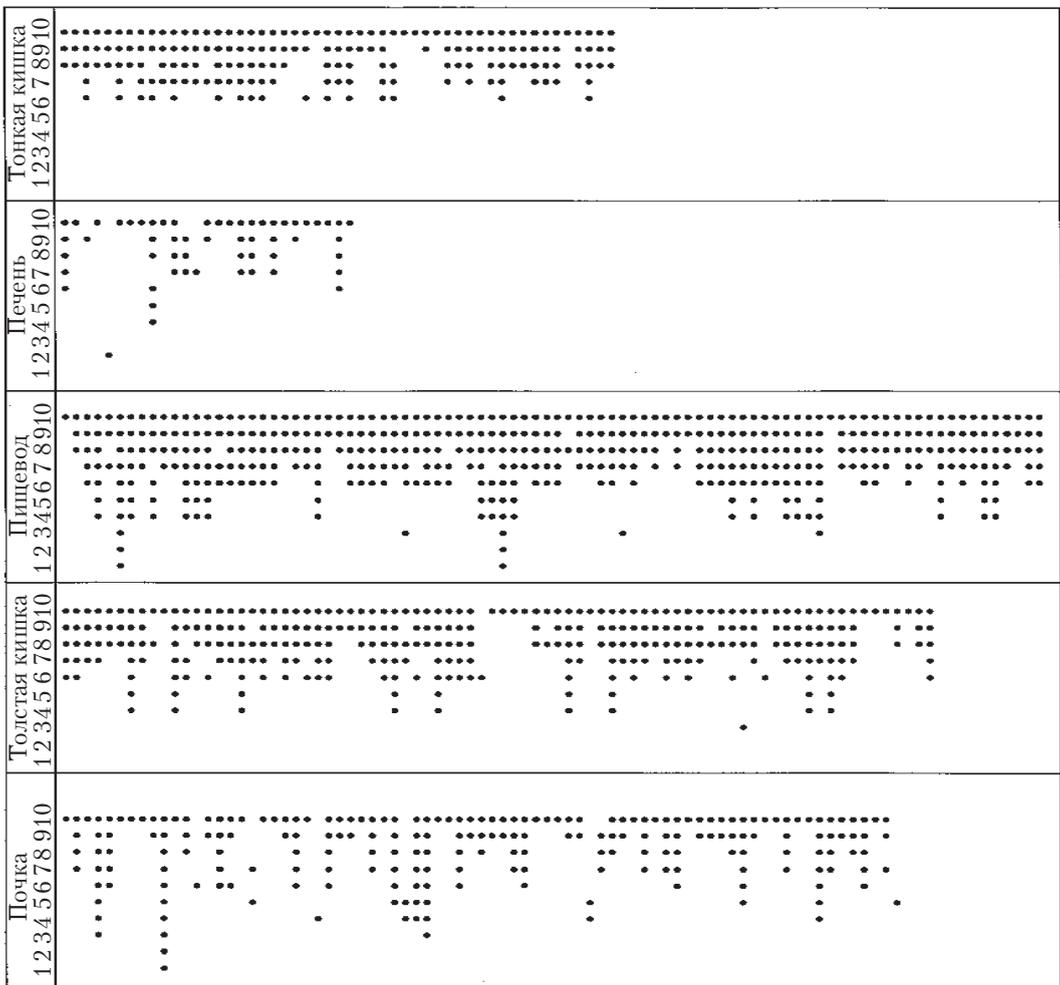


Рис. 1.16. Схематически представленные альтернативные композиции экзона

тов сплайсинга в разных тканях превышает одну тысячу (!), что дает более тысячи различающихся продуктов [26]; 328 из них представлены на рис. 1.16. Благодаря таким особенностям, один ген обеспечивает информацию для синтеза отличающихся, хотя и родственных белков в разных тканях, при разных стрессовых ситуациях, в разном возрасте и т. д. Но альтернативный сплайсинг — лишь один из вариантов альтернативности информации живого. Кроме него, на уровне единой последовательности генов и их первичного продукта — РНК реализуются альтернативные репликации, альтернативные транскрипции, альтернативные редактирования, альтернативные полиаденилирования, альтернативные трансляции и т. д.

Следующий уровень хотя и результируется на геноме, но уже не затрагивает непосредственно его первичную последовательность (или затрагивает опосредованно). Он и носит пограничное название — «Эпигенетика». Ее предметом являются опосредованные на геноме уровни наследования и регуляции, не меняющие генома как такового. В табл. 1.6 приведе-

ны основные составляющие эпигенетики.

Пока здесь больше вопросов, чем их решений. Но то, что уже известно, формирует новые представления о реализации информации, содержащейся в геноме, и открывает новые пути управления такой реализацией. А суть всех этих процессов заключается в том, что при делении клеток (даже на уровне мейоза) происходит неполная ликвидация негеномных (надгеномных, внегеномных и т. д.) структур управления геномом. Вообще-то, но только при митозе, это было хорошо известно на уровне деления дифференцированных клеток (тех, конечно, которые делились в процессе дифференциации или могли делиться после дифференциации). Они при делении сохраняли свои свойства (свой клеточный фенотип) и, стало быть, деление не приводило к ликвидации систем надгеномной регуляции, обеспечивающей специфику их фенотипа. Подавляющее же большинство систем внегеномной регуляции при делении исчезает и после деления воссоздается заново. То, что сохраняется длительно (да еще и переходит в некое самоподдерживающееся состояние), будет ока-

Таблица 1.6

**Механизмы эпигенетической наследственности и эпигенетические маркеры сайленсинга или активации экспрессии генов [27]**

Механизм эпигенетики	Эффект
1. Метилирование ДНК	Сайленсинг
2. Метилирование лизинов в гистонах	Сайленсинг (H1: H3 – K9, H3 – K27, H4 – 20)/ активация транскрипции (H3 – K4, H3 – 79)
3. Ацетилирование гистонов	Активация транскрипции
4. Фосфорилирование гистонов	То же
5. РНК-интерференция: RISC; siRNA, microRNA	Сайленсинг
6. Хромосомный сайленсинг или активация генов путем связывания белковых комплексов (PcG, trx) на границах форум-доменов	Сайленсинг/активация транскрипции
7. Хромосомный сайленсинг с помощью малых РНК; RITS	Сайленсинг
8. Перемещение мобильных элементов: инсуляторы, промоторы, энхансеры	Сайленсинг/активация транскрипции

зывать радикальное влияние на статус клетки, тканей, состоящих из таких клеток, органов, всего организма. Но и здесь первоосновой служит информация, записанная в геноме. За все эти надгеномные процессы управления, реализации генетической информации, все равно отвечают определенные гены. И хотя «пока выявлены лишь некоторые гены, контролирующие механизмы эпигенетической регуляции» [27], суть от этого не меняется — просто мы пока еще далеко не все знаем. Все записано в геноме. Но надо знать, как эти записи реализуются (что оказалось несоизмеримо сложнее, чем расшифровка самих записей). На все это дополнительно наслаивается сложнейшая оперативная регуляция — сигнальные пути, посттрансляционная модификация белков, функциональная модификация белков и многое другое.

Геном индивидуума один и изучен он уже относительно неплохо. Все альтернативности в конечном итоге им детерминированы на уровне первоосновы, то есть самого генома. Но все остальное — обработка и реализация информации и ее внегеномная регуляция, то есть то, что и есть жизнь, пока изучено несоизмеримо слабее. Зато изученное — реализуется, а область изученного непрерывно расширяется. И как бы сложно все это ни было — оно конечно, а начало его — геном, первая точка отсчета всех последующих событий, уже известен. Все это дает уверенность в реальности полного биологического разрешения человека, что привело в действие несоизмеримые (ни с чем ранее, ни с чем в других областях человеческой деятельности сейчас) силы и средства.

Основа человеческого бытия — это правило, которое и сделало из обезьяны (или кого-то еще) человека: «мало знать — надо делать». Так и поступают.

В полном соответствии с исчерпывающей информацией о геноме индивидуума развивается и качественно новое направление — генная терапия (лечение генами). Вообще-то она начала развиваться как единственный путь радикального излечения классических моногенных на-

следственных болезней. Затем ее поле притязаний расширилось и распространилось на массовые патологии (опухоль, сердечно-сосудистые заболевания, эндокринные болезни и т. д.). Но по мере конкретизации представлений о первичных причинах всех видов нарушений генная терапия совершенствуется своим технологическим арсеналом с прицелом на радикальные исправления генома. Исправления — на уровне ныне живущих индивидуумов.

Несколько позднее (но еще более бурно) начало свой путь второе направление. В отличие от генной терапии, второе направление радикального лечения реализуется на клеточном и надклеточном уровнях. Это клеточная терапия, тканевая инженерия, регенеративная медицина. В радикальности решений второе направление пошло по пути еще более радикальному, чем генная терапия. Клетка — это геном, все системы его обслуживания и реализация программ генома на клеточные взаимодействия, общеорганизменное обеспечение, взаимодействие с внешним окружением и т. д. Можно менять геном клетки. Но можно замещать геномы вместе с клетками. Замещать здоровыми клетками ткани отмирающие. Заменять ткани и органы поврежденные тканями и органами полноценными не в виде трансплантации от покойников или доноров, а путем выращивания из собственных стволовых клеток. И это тоже уже делается. Пока не исчерпывающе, но очень быстро охватывая все более и более обширные области тела человека (рис. 1.17). Вплоть до «биопечати» — компьютерно-принтерного набора тканей и органов человека. В компьютер закладывается программа трехмерного послойного (поклеточного) изображения органа (ткани). В принтер помещаются вместо чернил разные типы клеток и начинается процесс создания требуемой биологической пространственной структуры. И хотя пока такой процесс реально осуществляется лишь на уровне отработки технологии, но темпы здесь просто невероятные — первое сообщение об идее биопечати появилось лишь в 2004 г., а уже на октябрь 2007 г. на-

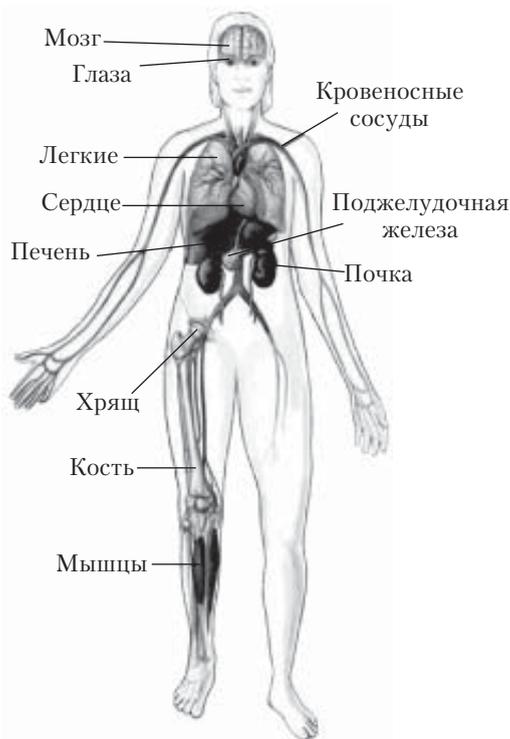


Рис. 1.17. Ткани, которые на разных стадиях клинических испытаний уже восстанавливаются у человека (по [28] с модификациями)

значен Первый Всемирный конгресс по биопечати.

А поскольку в организме все взаимосвязано и взаимообусловлено, то клеточные, тканевые и прочие технологии стремительно объединяются с генными, превращаясь в общий блок технологий реконструкции человека. Реконструкции, в первооснове которых находится информация об индивидууме и умение ее использовать, — генетическая медицина. В таком контексте процессов становится понятно место генетической медицины в Медицине вообще. Генетическая медицина, если ее представить без частных случаев, в общем понимании — это Уровень. Уровень, с которого закладывается человек как индивидуум. Уровень, с которого начинается все остальное. Уровень информации. А информация об индивидууме реализуется в индивиду-

ум, определяя его здоровье и нездоровье, реакцию на стрессы, переносимость операции, лекарств, физических нагрузок и т. д. Генетическая медицина — это вся медицина не потому, что все к ней сводится, а потому, что она лежит в первооснове всего, все с нее начинается. Мы можем этого не знать, планировать и реализовать лечение исходя из оценок большого «на глаз», по «общим показателям». Можем использовать биохимические анализы, послойную томографию и т. д. Но начинается все с генома и реализуется по цепям и сетям событий и процессов в то, что на каком-то этапе (уровне) видно уже «на глаз» или на томограмме. И используя все, что есть в медицине, весь ее арсенал, — надо начинать с первооснов. Тогда видно все.

Хирургия не сводима к генетической медицине и сегодня вообще никак с ней не соотносится (к сожалению). Но в перспективе, зная особенности организма, его возможные ответы на острые воздействия, компенсаторные способности и т. д., можно будет и готовить пациента оптимальным образом, и при операции поддерживать адекватно, и реабилитировать с учетом его персональных особенностей. Делать это не только на основе биохимических анализов, рентгенограмм и УЗИ (которые, конечно же, нужны), а применяя весь арсенал Уровня: информацию о биологических особенностях индивидуума, воздействие на него всем арсеналом технологий Уровня: генными, клеточными, тканевыми и т. д. И уже в полный комплекс всего этого вводить те хирургические процедуры, которые будут совмещены с технологиями Уровня в единое целое — устранение травм, восстановление ткани, реконструкция органа и т. д. И так — во всем. Генетическая медицина пока делает первые шаги. Но и они показывают «что есть что». Зная человека, рассчитывая его клетки, органы, ткани, можно будет далее вести преобразования с использованием тех методов, которые составляют базу хирургии (ровно как и всех иных областей медицины). Все эти базы изменяются тоже. И не только вследствие изменения их ме-

тодических возможностей за счет нанотехнологий, компьютерных обработок и пр. Основные изменения будут связаны с пониманием, как вести лечение с учетом всех этапов реализации первооснов индивидуума. И этот процесс уже начат (не везде) подходом к совмещению: как благодаря таким знаниям организовать все лечение (профилактику, реконструкцию и т. д.) всеми технологиями, объединив их в единый индивидуализированный для каждого пациента комплекс. Вот и получается, что генетическая медицина — это исчерпывающая индивидуализация профилактики и лечения, в перспективе — с полным разрешением человека: реконструкцией индивидуума. С профилактикой, предотвращающей заболевание, которое человеку «на роду написано», и радикальным излечиванием, если таковое все же по каким-то причинам возникло. С исправлением генетической информации, уже частично рандомизированной МНП. С биологической реконструкцией того, что по каким-то причинам стало не функционально. И все это — не в поколениях, не когда-нибудь в непредсказуемом будущем, а на уровне ныне живущих индивидуумов.

Сегодня возможности такого «радикализма» еще весьма ограничены. Но темпы исследовательских и технологических работ здесь столь высоки, что буквально с каждым годом возможности расширяются. Никто нигде не ждет, пока все в полном объеме станет известным, полностью практически выполнимым. Любые продвижения в науке немедленно переходят в технологическую плоскость, а затем — в клинические испытания. Мир изменился. Уже. И продолжает стремительно, с ускорением, меняться. Такова жизнь. Конечно, только там и для тех, где это понимают и реализуют. А для всех остальных...

### **Список литературы**

1. *Kim C. K., Haider K. H., Lim S. J.* Gene medicine: a new field of molecular medicine // *Arch. Pharm. Res.* — 2001. Feb — Vol. 24, N 1. — P. 1-15.

2. *Biology Course Syllabus and Lecture. 2005* (College of sciences San Diego State University) — [www.sci.sdsu.edu/classes/biology](http://www.sci.sdsu.edu/classes/biology)

Vandergast A. General Biology  
<http://www.sci.sdsu.edu/classes/biology/bio100/vandergast>

3. [www.pdb.org](http://www.pdb.org)

4. *An introduction to Genetic Analysis.* — Seventh edition / Antony J. F. Griffiths (U. of British Columbia), Jeffrey H. Miller (U. of California, Los Angeles), David T. Suzuki (U. of British Columbia) et al. — 2000. — 850 p.

5. *Ardlike K. G., Kruglyan L., Seielstad M.* Patterns of linkage disequilibrium in the human genome // *Nature Rev Genet.* — 2002. — Vol. 3, N 4. — P. 299-309.

6. *Twyman R. M.* SNP discovery and typing technologies for pharmacogenomics // *Curr Top. Med. Chem.* — 2004. — Vol. 4, N 13. — P. 1423-1431.

7. *Krugluak L., Hickerson D. A.* Variation in the spice of life // *Nature Genet.* — 2001. — Vol. 27, N 3. — P. 234-236.

8. *Shastri B. S.* SNP alleles in human disease and evolution // *J. Hum. Genet.* — 2002. — Vol. 47. — P. 561-566.

9. *The international SNP Map Working Group.* A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms // *Nature.* — 2001. — Vol. 409, N 15 February. — P. 928-933.

10. *Craig D., Stephan D.* Applications of whole-genome high-density SNP genotyping // *Expert Rev. Mol. Diagn.* — 2005. — Vol. 5, N 2. — P. 159-170.

11. *Sercher M. J., Hurst S. D.* Human SNP variability and mutation rate are higher in regions of high recombination // *Trends in Genetics.* — 2002. — Vol. 18, N 7. — P. 337-340.

12. *Benhamon S., Sarasin A.* ERCC2/XPD gene polymorphisms and cancer risk // *Mutagenetics.* — 2002. — Vol. 17, N 6. — P. 463-469.

13. *Frequency of breast cancer attributable to BRCA1 in a population-based series of American women* / B. Newman, H. Mu, L. M. Butler et al. // *JAMA.* — 1998. — Vol. 279. — P. 915-921.

14. *BRCA1* Gene in Breast Cancer / E. M. Rosen, S. Tan, R. G. Restell, I. D. Goldberg // *J. of Cell Physiol.* — 2003. — Vol. 196. — P. 19-40.
15. *SNP500* Cancer. A public resource for sequence validation and assay development for genetic variation in candidate genes / Packer Bernice R., Yeager Meredith, Staats Brian et al. // *Nucl. Acids Res.* — 2004. — Vol. 32. — P. 528-532.
16. *Mooney Sean D., Altman Russ B.* MutDB: Annotating human variation with functionally relevant data // *Bioinformatics.* — 2003. — Vol. 19, N 14. — P. 1858-1860.
17. *Jorde L. B., Watkins W. S., Bamshad M. J.* Population genomics: a bridge from evolutionary history to genetic medicine // *Human Molecular Genetics.* — 2001. — Vol. 10, N 20 — P. 2199-2207.
18. *Кордюм В. А.* Наша «шагреновая кожа» — это наша проблема. Нам ее и решать. 6. Возврат долга // *Біополімери і клітина.* — 2005. — Т. 21, № 6. — С. 485-514.
19. *Баранов В. С., Баранова Е. В., Иващенко Т. Э.* Геном человека как научная основа предикативной медицины // *Геномика — медицине; Под ред. В. И. Иванова, Л. Л. Киселева.* — М.: Академкнига, 2005. — 392 с.
20. *Свердлов Е. Д.* Перспективы использования достижений геномики в медицине. Начало эры полногеномной медицинской генетики // *Патол., физиол., эксперим. терапия.* — 2001. — № 1. — С. 3-22.
21. *Benjamin Lewin.* *Genes VII.* — Oxford University Press, 2000. — 990 p.
22. *Cytokine* Promoter Gene Polymorphisms and mortality in acute renal failure / Jaber B. Rao M., Guo D., Balakrishnan V. et al. // *Cytokine.* — 2004. — Vol. 25 — P. 212-219.
23. *Cytokine* Single Nucleotide Polymorphism. Role in Acute Renal Failure. Sepsis, Kidney and Multiple Organ Dysfunction / O. Liangos, V. S. Balakrishnan, B. J. G. Pereira, B. L. Jaber / Eds. Ronco C., Bellomo.
24. *Стрельников В. В., Залетаев Д. В.* Молекулярные механизмы этиопатогенеза болезней экспансии повторяющихся последовательностей // *Геномика — медицине; Под ред. В. И. Иванова, Л. Л. Киселева.* — М.: Академкнига, 2005. — 392 с.
25. *Maleki Shohreh Cederberg Hekan, Rannug Ulf.* The human minisatellites MSI, M S 32, M S205 and CEB 1 integrated into the yeast genome exhibit different degrees of mitotic instability but are all stabilized by RAD27 // *Curr. Genet.* — 2002. — Vol. 41 (5). — P. 333-341.
26. *Influence* of intron length on alternative splicing of CD44 // Bell Martyn V., Cowper Alison E., Lefranc Marie-Pierre et al. // *Mol. and Cell Biol.* — 1998. — Vol. 18 (10). — P. 5930-5941.
27. *Чуриков Н. А.* Молекулярные механизмы эпигенетики // *Биохимия.* — 2005. — Т. 70, № 4. — С. 493-513.
28. *Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions (1 on the NCBI site 2001) (stemcells. nih. gov/stemcell/scireport. asp).*

## Глава 2. Иммуногенетика

---

---

In this chapter, the modern picture of genetic mechanisms that control the basic links of immune system participating in formation of its functions is presented. The peculiarities of interaction of genes determining the synthesis of immunoglobulin molecules (antibodies), needed in certain settings cases are shown. The structure of human main histocompatibility complex, HLA, and its role in restriction of immune response are discussed. The structure and functions of the T- and B-lymphocyte receptors, mechanisms of molecular interaction of the cells surface structures of immune system are described. Examples of genetic control violations, resulting in autoimmune aggression, are presented.

---

### 2.1. Генетика иммуноглобулинов

Основные специфические молекулы иммунной системы — это антитела. Их уникальная особенность заключается в том, что они могут существовать в миллионах разновидностей и каждая со своим уникальным так называемым антигенсвязывающим центром.

Совокупность всех антител — иммуноглобулины (Ig) — составляют около 20 % всех белков плазмы крови. Вновь образованный В-лимфоцит синтезирует молекулы Ig с одинаковым антигенсвязывающим центром. Причем первые антитела (АТ) не покидают клетку, а встраиваются в ее наружную мембрану и служат рецепторами для антигена (АГ). Таких молекул на поверхности В-лимфоцита примерно  $10^5$ . В случае присоединения АГ к антигенсвязывающему центру рецептора покоящийся В-лимфоцит начинает пролиферацию и дифференцировку до плазматической клетки, которая синтезирует АТ со скоростью до 2000/с.

Схематично простые молекулы Ig имеют форму буквы Y с двумя идентичными антигенсвязывающими центрами на конце каждой «ветви». Эти «ветви» соединяют-

ся с «хвостами» шарнирным участком. Благодаря этому АТ более эффективно связываются с антигенными детерминантами, образуя большую сеть комплексов АГ-АТ. Последние имеют тенденцию к преципитации (осаждению). Защитные свойства АТ связаны не только с их способностью фиксировать АГ. В выполнении многих функций участвует и «хвост». Установлено, что АТ с одинаковыми антигенсвязывающими центрами могут иметь разные «хвосты», которые определяют различные их функции [1].

Каждая молекула Ig состоит из четырех цепей: двух легких ( $\approx 220$  аминокислот) и двух тяжелых ( $\approx 440$  аминокислот). Каждая легкая (L-) цепь соединяется с тяжелой (H-) цепью нековалентными и ковалентными связями. Последние формируются дисульфидными мостиками. L- и H-цепь образуют один антигенсвязывающий центр. Половинки молекулы Ig соединяются друг с другом множеством таких связей, в том числе -S=S-связями [2].

У высших позвоночных и человека обнаружено пять классов Ig: IgA, IgD, IgE, IgG, IgM. Каждому из них присущи свои H-цепи: соответственно,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ . Разнообразие H-цепей придает особенности конформации и, соответственно, биологическим свойствам «хвостов» Ig [3].

Молекула IgG имеет простое строение в виде буквы Y. В пределах этого класса различают подклассы: IgG1 (61 %), IgG2 (29 %), IgG3 (6 %), IgG4 (4 %). Молекулы подклассов различаются по ряду признаков, в частности, по количеству -S=S- мостиков. IgG составляют 80 % всех Ig сыворотки крови человека, период полужизни — около 30 дней. Его молекула содержит два антигенсвязывающих центра. Fc-конец IgG может фиксироваться к клеткам плаценты, поэтому эти АТ способны проникать из организма матери в кровотоки плода.

IgM — макроглобулин, состоящий из 5 простых молекул Y, которые соединяются Fc-концами в одну молекулу с помощью j-цепи (joining chain). Различают IgM1 и IgM2 подклассы. Существует отличие между клеточным и гуморальным IgM. Он составляет 5–10 % всех сывороточных Ig, период полужизни — 10 дней. Это первые АТ, которые образуются в ответ на внедрившийся АГ. Поскольку молекула IgM имеет 10 антигенсвязывающих центров, то эффективность их довольно высокая [4].

IgA имеет сходную с IgG структуру, содержание в сыворотке крови — 5–15 %, период полужизни — 5 дней. Кроме сывороточного IgA, различают секреторный IgA (SIgA), который обнаружен во всех секретах слизистых оболочек. Его молекула состоит из двух молекул IgA, соединенных Fc-концами j-цепью. Эти компоненты синтезируются плазматическими клетками и в них соединяются в димер. Димеры присоединяют к себе секреторный компонент (SC-), который синтезируется в эпителиальных клетках, и, проходя через эпителий слизистой оболочки, попадают в секрет, где выполняют защитные функции.

IgD впервые обнаружен в сыворотке крови больных миеломой. В сыворотке крови здоровых людей он содержится в ничтожно малых количествах. По строению похож на IgG. Период полужизни — 2–3 дня. В норме IgD фиксируется, в основном, на наружных мембранах лимфоцитов.

IgE — антитела аллергии. По строению похожи на IgG, но с циркулирующими АГ

не формируют видимых реакций, так как в сыворотке крови их содержание очень малое. Период полужизни — два дня. Эти АТ обладают способностью присоединяться Fc-концами к мембране тучных клеток и базофильных лейкоцитов. Взаимодействуя с АГ, они запускают каскад реакций в этих клетках, приводящих к проявлению аллергии.

Молекулы всех Ig отличаются не только по их H-цепям. Они содержат два типа L-цепей:  $\kappa$ - и  $\lambda$ -. Следует подчеркнуть, что в каждой отдельной молекуле Ig могут быть 2 $\kappa$ - или 2 $\lambda$ -цепи. Либо  $\kappa$ -, либо  $\lambda$ -цепи могут соединяться с любыми H-цепями [5].

Связывание АГ с АТ определяется многими слабыми нековалентными взаимодействиями. Они эффективны только тогда, когда молекулы этих структур комплементарны друг другу. Комплементарность возникает между антигенсвязывающим центром Ig и антигенной детерминантой — соответствующей областью АГ.

Как уже отмечалось, АТ существуют в огромном разнообразии: миллионы вариантов каждого класса Ig, которые имеют уникальную структуру антигенсвязывающего центра и последовательность аминокислот. Удалось выделить достаточное количество одного АТ и подвергнуть его иммунохимическому анализу. Такими АТ оказались миеломные белки — АТ, которые продуцируют клетки множественной миеломы. Поскольку клетки этой злокачественной опухоли произошли из одной клетки, то АТ гомогенны или моноклональны.

Изучение миеломных белков дало возможность установить, что N-концевая часть L- и H-цепей чрезвычайно изменчива, а C-концевая часть — устойчива. Каждая L-цепь состоит из варибельной ( $V_L$ ) и константной ( $C_L$ ) части примерно одинаковой длины, а H-цепь — из одной варибельной ( $V_H$ ) и трех или четырех (в зависимости от класса) константных ( $C_H$ ) частей (рис. 2.1).

На N-концевых участках  $V_L$  и  $V_H$  образуются антигенсвязывающие центры. Из-

вестно, что АГ связывается с АТ не по всей длине V-части Ig. Каждая  $V_L$  и  $V_H$  имеет по три гипервариабельных участка короткой длины (рис. 2.2), которые и образуют антигенсвязывающий центр [6].

Структура Ig имеет еще одну особенность. L- и H-цепи сворачиваются с помощью -S=S- связей в своеобразные повторяющиеся сегменты или домены (рис. 2.3). Большинство Ig цепей имеют по 3 константных домена, гомологичных константному домену L-цепи. Вариабельные домены L- и H-цепи гомологичны друг другу и меньше — константным доменам [8].

Гомология между доменами дает возможность предположить, что гены иммуноглобулинов возникли в процессе эволюции. Возможно, в результате многих по-

следовательных дупликаций исходного гена, который кодировал один домен, состоящий из 110 аминокислот с неизвестной функцией. Получены результаты, которые подтверждают такое предположение. Каждый домен константной части H-цепи кодируется участком ДНК, отделенным от следующего кодирующего участка интроном. В процессе образования зрелой и-РНК последовательности, соответствующие интронам, вырезаются (рис. 2.4). Но наличие интронов, вероятно, обеспечило случайную дупликацию сегментов ДНК, которые дали начало генам иммуноглобулинов [10].

Итак, разнообразие АТ связано с их различием по гипервариабельным участкам антигенсвязывающих центров. По раз-

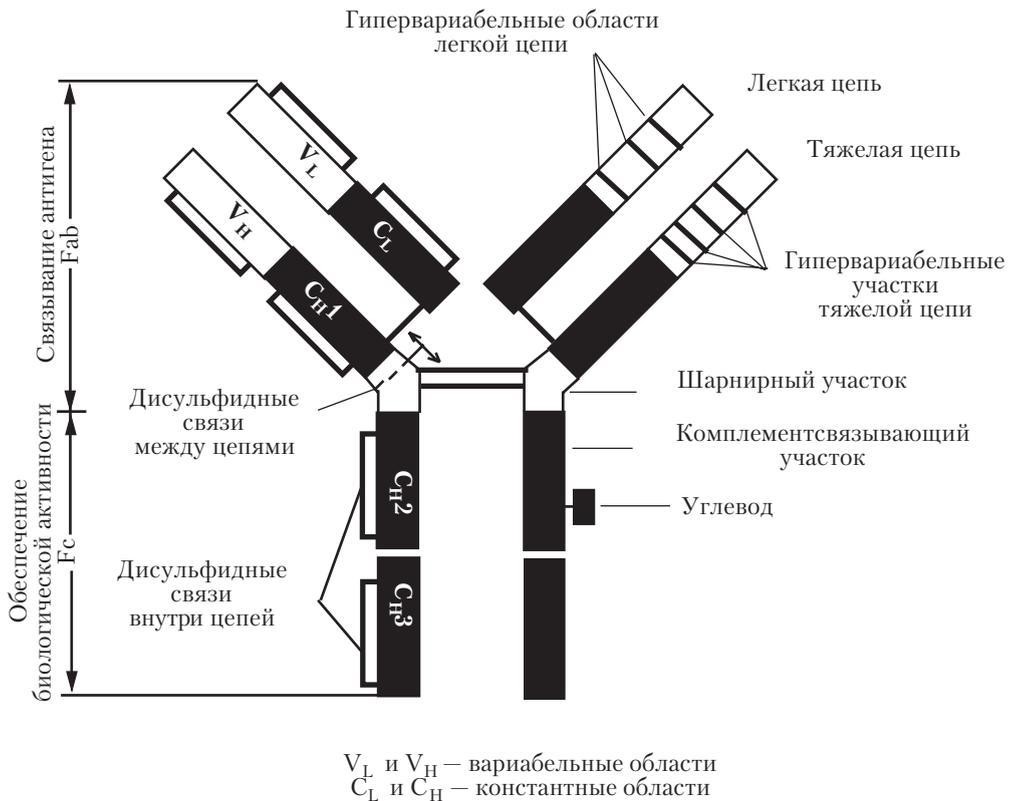


Рис. 2.1. Вариабельные и константные области иммуноглобулина [6]

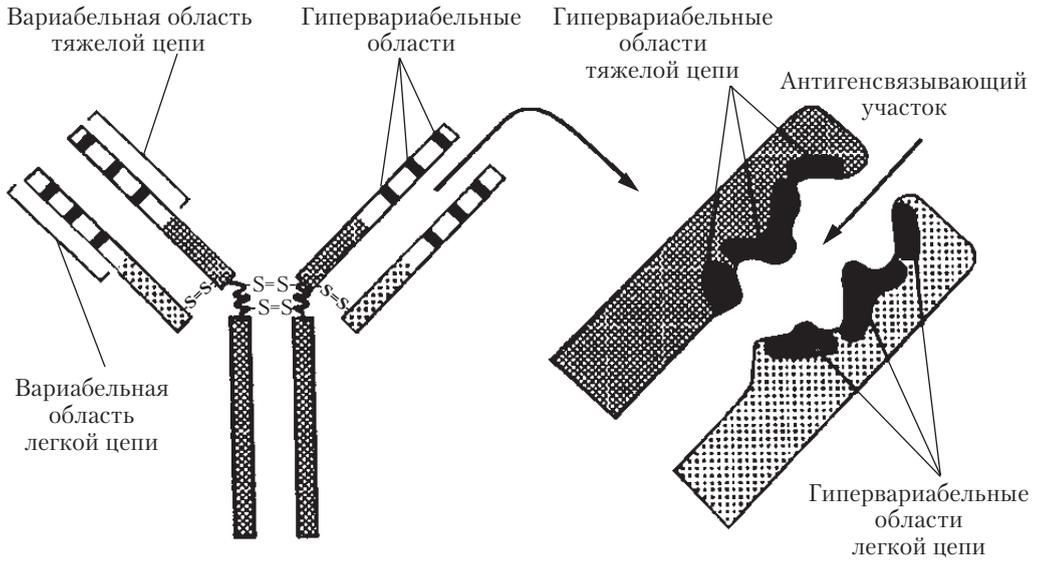


Рис. 2.2. Гиперварибельные области и антигенсвязывающие участки иммуноглобулина [7]

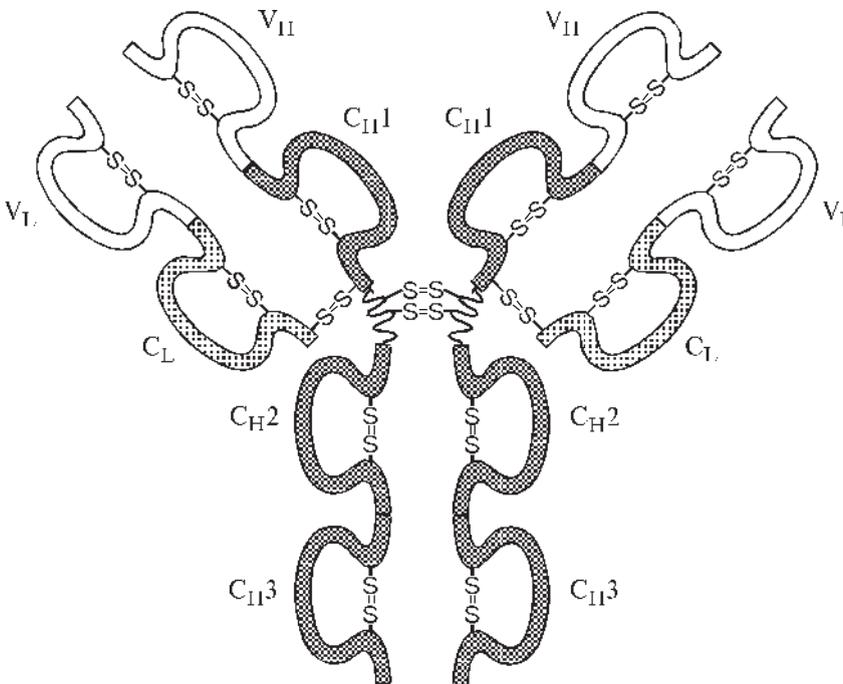


Рис. 2.3. Доменная организация молекулы иммуноглобулина [9]

личным оценкам, у мыши, например, может вырабатываться от  $10^6$  до  $10^9$  различных молекул АТ. Наличие такого большого репертуара специальных белковых молекул поставило вопросы: сколько же генов необходимо для синтеза этих белков? Если их немного, то каковы генетические механизмы, обеспечивающие их работу?

Как и следовало ожидать, в образовании АТ участвуют необычные генетические механизмы. Так, для каждого типа цепей Ig: легких  $\kappa$ , легких  $\lambda$  и тяжелых (H) — существуют отдельные обширные группы («пулы») генов. Они могут участвовать в синтезе каждой отдельной полипептидной цепи. Пулы генов, кодирующих  $\kappa$ -,  $\lambda$ -

и H-цепи, находятся в разных хромосомах. У мышей пулы генов расположены для  $\kappa$ -цепей в хромосоме 6, для  $\lambda$ -цепей — в хромосоме 16, для H-цепей — в хромосоме 22. У человека, соответственно, во 2, 14 и 22-й.

V- и C-части каждой цепи кодируются отдельными генами. Они располагаются в одной хромосоме на большом расстоянии. Каждый пул содержит разное число генов. Так, пул генов для  $\kappa$ -цепей включает около 150 V-генов ( $V_{\kappa 1}, V_{\kappa 2}, \dots, V_{\kappa n}$ ) и один C-ген ( $C_{\kappa}$ ). Пул генов для  $\lambda$ -цепей: по два V-гена ( $V_{\lambda 1}, V_{\lambda 2}$ ) и по два C-гена ( $C_{\lambda 1}, C_{\lambda 2}$ ). Пул генов тяжелых цепей содержит около 150 V-генов ( $V_H$ ) и группу C-генов,

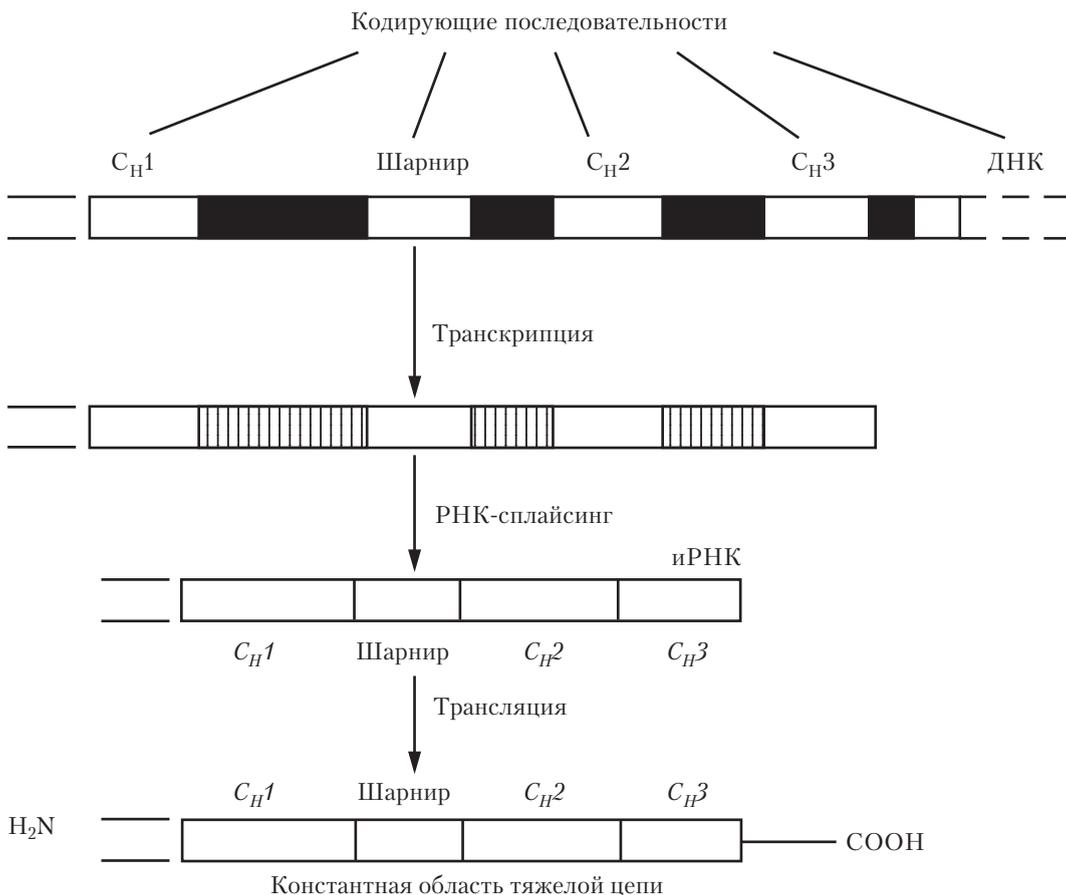


Рис. 2.4. Организация генов, кодирующих константную область тяжелой цепи [2]

каждый из которых кодирует класс тяжелых цепей ( $C_\mu$ ,  $C_\delta$ ,  $C_\lambda$ ,  $C_\epsilon$ ,  $C_\alpha$ ). Таким образом, существует больше генов для V-участков, меньше — для С-участков на каждой хромосоме (рис. 2.5).

В процессе развития В-лимфоцитов любой из V-генов определенного пула может быть транслоцирован и оказаться рядом с любым С-геном. После такой перестройки ДНК происходит синтез цепи Ig. Каждый  $V_H$ -ген может ассоциироваться с каждым  $C_H$ -геном, но первоначально  $V_H$ -ген всегда транслоцируется к  $C_\mu$ -гену, поэтому развивающийся В-лимфоцит вначале синтезирует IgM.

Было установлено, что V-участок полипептидной цепи Ig кодируется не одним V-геном, а двумя или тремя отдельными генными сегментами. Они объединяются в функциональный V-ген только после перестройки ДНК, приводящей к соединению вместе V- и С-областей. Таким образом, значительно увеличивается разнообразие антигенсвязывающих участков.

Так,  $V_\lambda$ -ген легкой  $\lambda$ -цепи Ig кодирует не все 110 последовательностей аминокислот, а только 97, поэтому его обозначают как  $V_\lambda$ -сегмент. Остальные 13 аминокислот кодируются участком ДНК, который обозначают  $J_\lambda$ -сегмент. Он расположен в дру-

гой части генома рядом с  $C_\lambda$ -геном и отделен от него интроном. По мере созревания В-лимфоцита  $V_\lambda$ -сегмент транслоцируется и располагается рядом с  $J_\lambda$ -сегментом, что приводит к образованию такой последовательности:  $V_\lambda - J_\lambda - \text{интрон} - C_\lambda$ . В процессе образования и-РНК интрон удаляется и в результате формируется зрелая и-РНК с последовательностями V-J-C, на которой синтезируется легкая  $\lambda$ -цепь Ig [11].

Впоследствии было установлено, что в каждом пуле генов Ig имеется несколько J-сегментов (в  $\lambda$ -пуле: по одному J — ассоциировано с каждым С-геном, в  $\kappa$ - и  $H$ -пулах — по четыре, причем С-ген отделен от соседнего с ним J-сегмента интроном). При созревании В-лимфоцита любой V-сегмент может соединиться с любым J-сегментом в пуле генов  $\kappa$ - и  $H$ -цепей. Кроме того, существует не точное соединение V-J. Все это значительно увеличивает разнообразие аминокислотных последовательностей (рис. 2.6).

Итак, имеется короткий, так называемый L-сегмент, находящийся слева от V-сегмента, внутри которого находится стартовая точка транскрипции. При транслокации сегменты L — V переносятся вместе. В отличие от генов легких цепей пул генов H-цепи содержит D-сегменты (при-

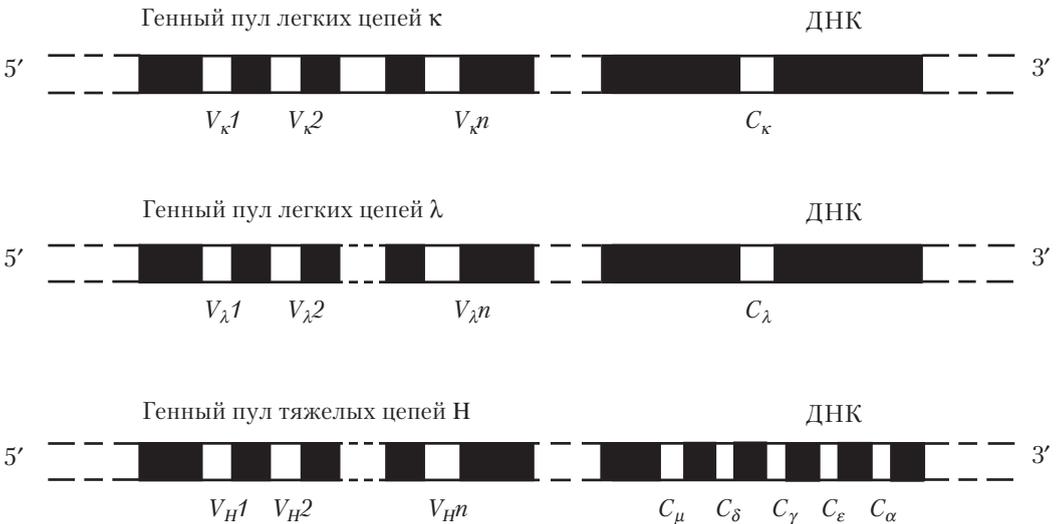


Рис. 2.5. Организация легких и тяжелых цепей [2]

мерно 12 копий), которые кодируют дополнительную аминокислотную последовательность. *D*-сегменты расположены слева от *J*-сегментов и в преципитированном гене тяжелой цепи занимают положение между *L* – *V* и *J*-сегментами: *L* – *V* –

*D* – *J* – *C* (рис. 2.7). *D*-сегменты примерно в 10 раз увеличивают разнообразие  $V_H$ -частей тяжелых цепей [13].

Каким образом соединяются между собой эти сегменты, неизвестно. Есть сведения, указывающие на полную элиминацию

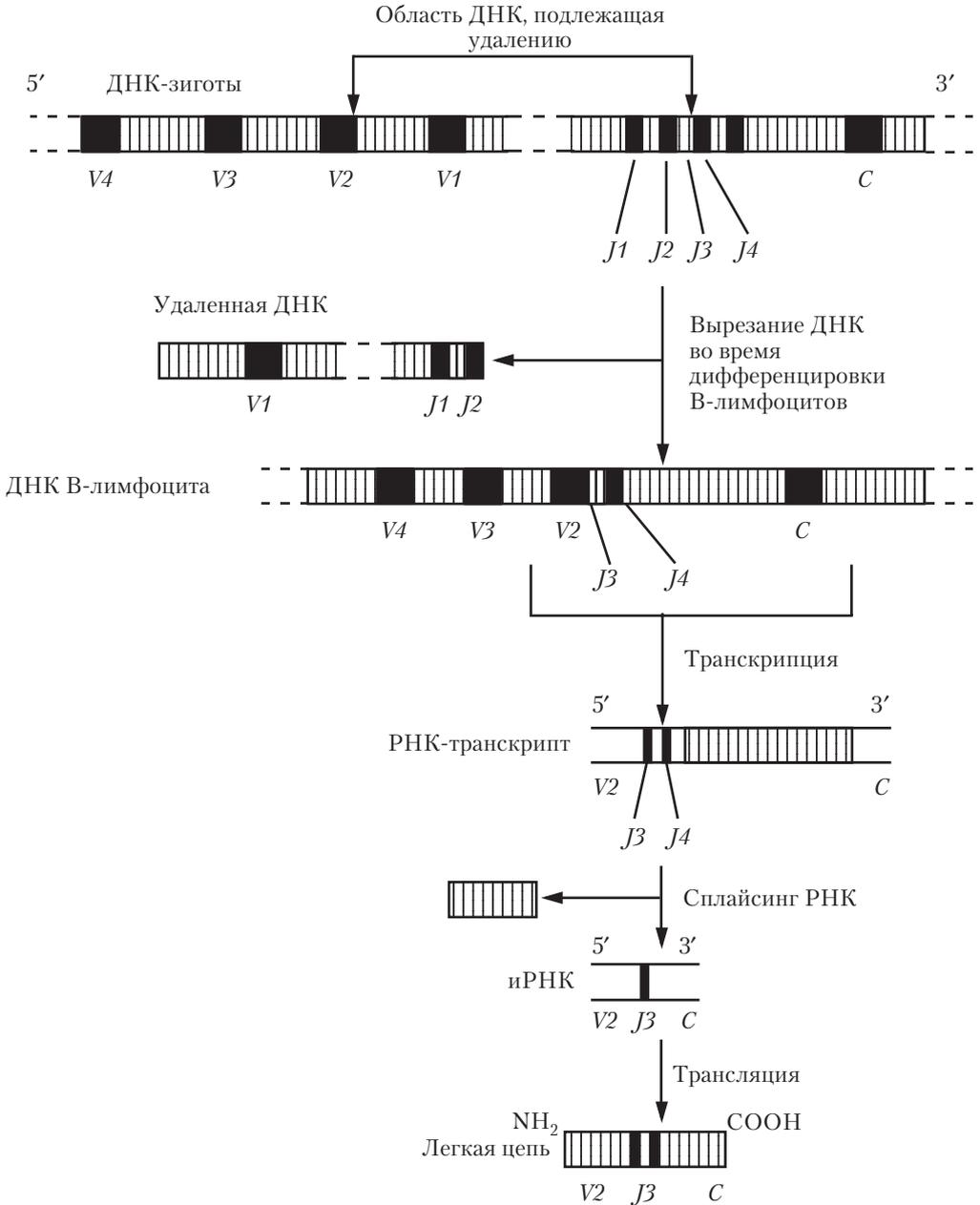


Рис. 2.6. Схема перестройки генов, кодирующих легкую цепь иммуноглобулинов [12]

всей лежащей между ними ДНК. Конкретный механизм соединения тоже остается неясным, но обнаружены консервативные последовательности ДНК, примыкающие к V- и J-сегментам. Они весьма специфичны и могут служить сайтами узнавания для сайт-специфичных ферментов рекомбинации ДНК (рис. 2.8).

Таким образом, соматические перестройки ДНК в ходе созревания В-лимфоцитов дают огромное количество разнообразий антигенсвязывающих центров. Приблизительные подсчеты показывают, что комбинации V- D- J-сегментов у мышей могут дать около 10 000 различных  $V_H$ -участков и 1000  $V_\lambda$ -участков.

Значительно увеличивает количество вариантов антигенсвязывающих центров

простой механизм комбинации различных L- и H-цепей. Поскольку любая L-цепь может сочетаться с любой H-цепью, то разнообразие возрастает до  $10\,000 \cdot 1000 = 10^7$ .

Во многих исследованиях установлено наличие соматических мутаций в генах V-области, что увеличивает число различий в Ig еще в 10–100 раз. Мутации чаще касаются IgA и IgG, чем IgM. Вероятно, это связано с тем, что В-лимфоциты, вырабатывающие IgM, в последующем проходят еще деления, прежде чем начать синтез IgA и IgG. Следовательно, вероятность мутаций резко возрастает. Соматические мутации могут способствовать пролиферации В-лимфоцитов, которые имеют большее сродство с АГ, вызвавшим стимуляцию клона клеток [11].

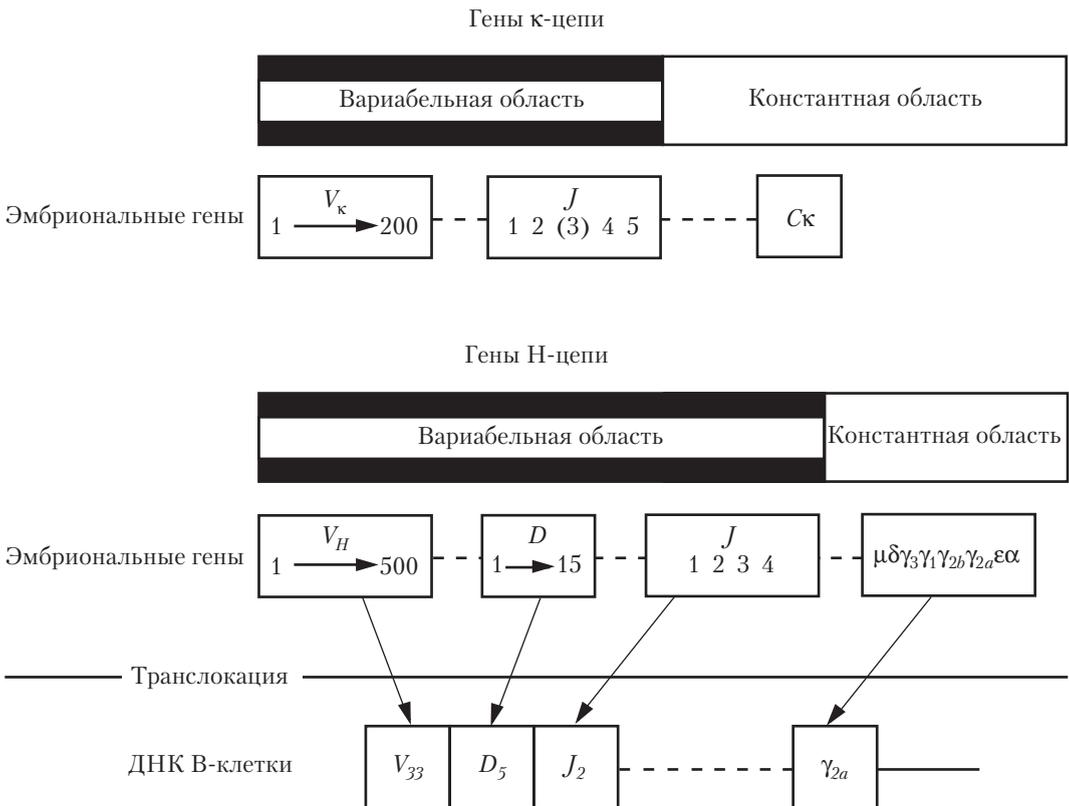


Рис. 2.7. Последовательность соединения генных сегментов тяжелой цепи H [5]  
В качестве примера взят ген, кодирующий тяжелую цепь IgG2a. Ее специфичность определяется последовательностью аминокислот переменной области  $V_{33}D_5J_2$

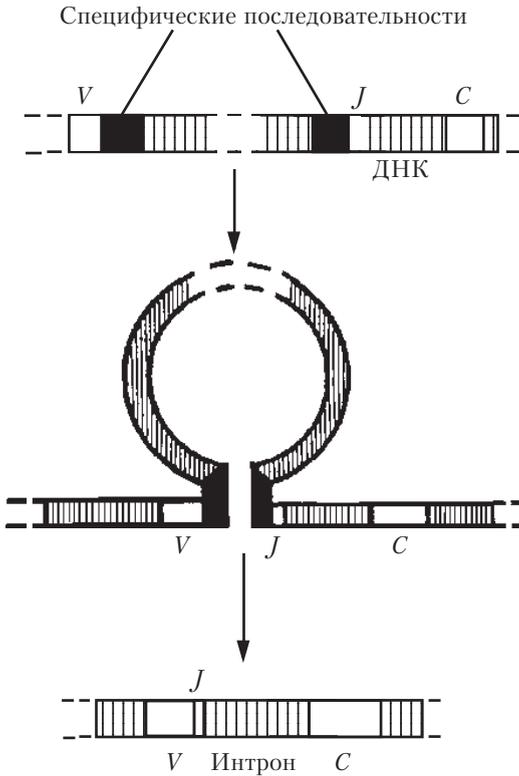


Рис. 2.8. Специфические последовательности ДНК, соединяющие V-J сегменты [7]

Наряду с выяснением механизмов генного контроля за синтезом разнообразных по антигенсвязывающим центрам и биологическим свойствам Ig перед иммуногенетикой стоят и другие нерешенные вопросы.

Исследования в этих направлениях показали следующее. Отдельные В-лимфоциты моноспецифичны, то есть вырабатывают АТ с антигенсвязывающим центром одного типа. В-лимфоцит не может одновременно вырабатывать κ- и λ-цепи. В нем активируется один пул генов L-цепи и один пул для H-цепи.

В-лимфоцит как соматическая клетка содержит диплоидный набор генов, то есть имеет шесть пулов генов, кодирующих синтез Ig: по одному для H-цепи, κ- и λ-цепи (рис. 2.9). Для обеспечения моноспецифичности должны активироваться

гены только двух пулов из шести — один из четырех для L-цепи и один из двух для H-цепи. Другими словами, В-лимфоцит должен сделать выбор между отцовским и материнским генными пулами. В то же время гены отца и матери для других белков экспрессируются в клетке приблизительно одинаково. Экспрессия только материнского или только отцовского аллеля гена Ig в любом В-лимфоците называется аллельным исключением. Такое явление у позвоночных характерно для половой X-хромосомы у самок.

Моноспецифичность обеспечивает идентичность обеих половинок молекулы Ig, то есть АТ будет иметь два одинаковых

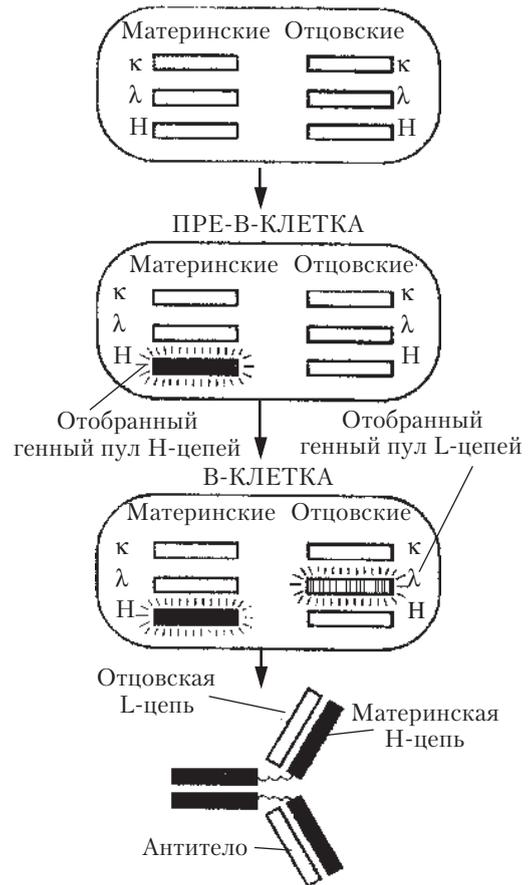


Рис. 2.9. Аллельное исключение генов иммуноглобулина в хромосомах В-лимфоцита [7]

антигенсвязывающих центра, что позволит формировать им обширную сеть шитых АГ.

Механизмы аллельного исключения неизвестны. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что в неэкспрессируемых хромосомах также происходит перегруппировка генов, но неправильно, и она не обеспечивает синтез молекулы Ig. Может произойти случайный процесс перестройки, тогда во многих В-лимфоцитах не будет стимуляции никаким АГ. Такой процесс очень расточительный, но он может служить расплатой за моноспецифичность.

В каждом конкретном В-лимфоците сделанный выбор определенных генов для кодирования антигенсвязывающих центров становится окончательным для этой клетки и для ее потомков. Но тип синтезируемого  $C_H$ -участка может изменяться [14].

Уже отмечалось, что Ig всех клонов могут синтезироваться в мембраносвязанной и в секретируемой форме. Мембраносвя-

занные Ig — рецепторы для АГ и располагаются на поверхностной мембране В-лимфоцита. Так, у IgM эти две формы отличаются С-концевыми участками: у мембраносвязанной формы гидрофобный участок, удерживающий IgM на мембране, у секретируемой — гидрофильный, обеспечивающий выход IgM за пределы клетки.

Смена этих двух форм при активации В-лимфоцита происходит вследствие замещения ядерных РНК-транскриптов.

Длинный РНК-транскрипт, определяющий мембраносвязывающую форму H-цепи, имеет донорный и акцепторный сайты, что дает возможность путем сплайсинга удалить последовательность РНК, кодирующую гидрофильный «хвост» секретируемой формы. Короткий РНК-транскрипт имеет только донорный сайт, и сплайсинг в этом случае невозможен (рис. 2.10).

В процессе развития В-лимфоцита могут происходить и другие виды изменений в С-участке H-цепи Ig. Известно, что все

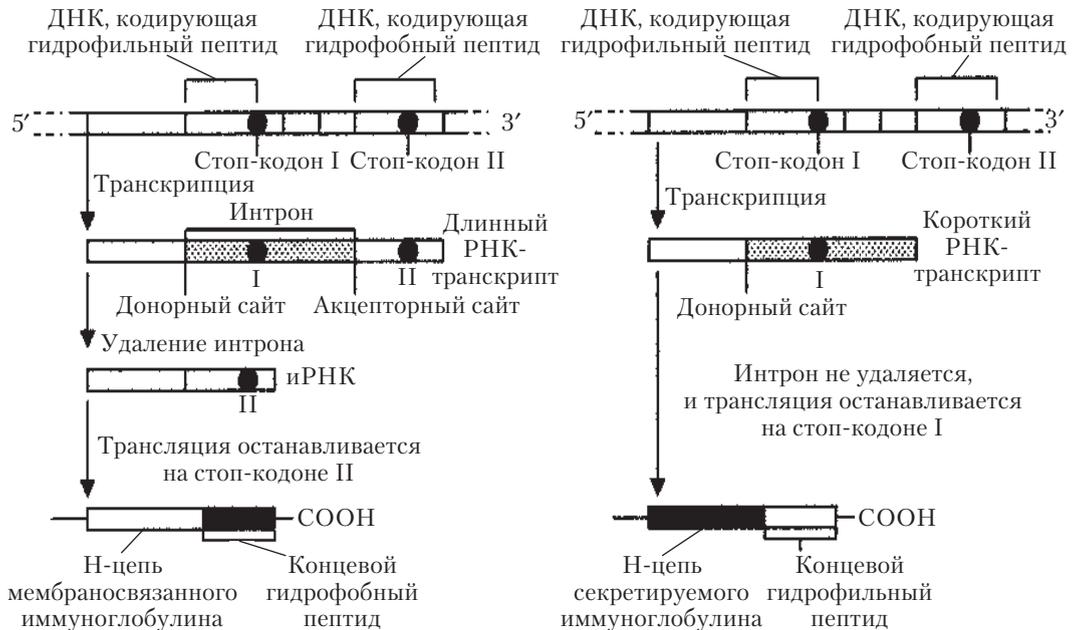


Рис. 2.10. Схема синтеза H-цепей мембраносвязанного и секретируемого иммуноглобулина [5]

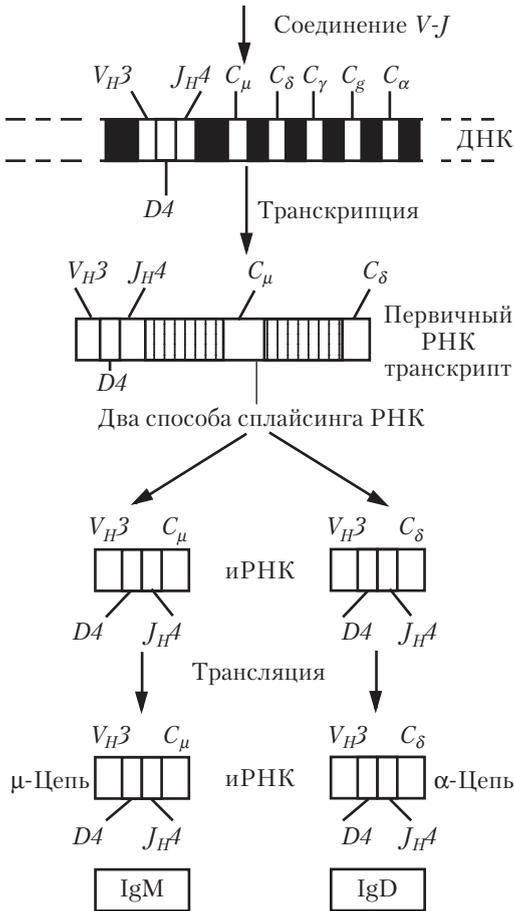


Рис. 2.11. Первый этап переключения класса синтеза антител [7]

В-лимфоциты начинают синтез АТ с продукции IgM, а затем переключаются на выработку IgG или IgA. Это явление получило название переключение класса. Изменение класса Ig без изменения антигенсвязывающего центра означает, что  $V_H$ -ген может последовательно ассоциироваться с разными  $C_H$ -генами [2].

Предполагается, что процесс переключения класса состоит из двух следующих этапов:

1. Клетка, производящая мембраносвязанный IgM, начинает производить одновременно другой, мембраносвязанный Ig, например IgD (рис. 2.11). Возможно, такая клетка вырабатывает длинные РНК-транскрипты, содержащие  $V_H$ -ген и одновременно  $C_{\mu}$ - и  $C_{\delta}$ -гены. Эти длинные транскрипты подвергаются сплайсингу разными способами с образованием двух видов и-РНК. Каждая из них кодирует одинаковые  $V_H$ -области, но одна содержит  $C_{\mu}$ , а другая —  $C_{\delta}$ -последовательности.

2. В-лимфоцит, вырабатывающий мембраносвязанные IgM и Ig другого класса, подвергается антигенной стимуляции и секретирует АТ этого другого класса (рис. 2.12). Этот этап содержит делецию ДНК, а именно части ДНК между  $J_{H3}$  и  $C_{\alpha}$  включающей  $C_{\mu}$ ,  $C_{\delta}$ ,  $C_{\gamma}$   $C_{\epsilon}$ .

Так как  $V_H$ -ген может ассоциироваться с любым  $C_H$ -геном, определенный ан-

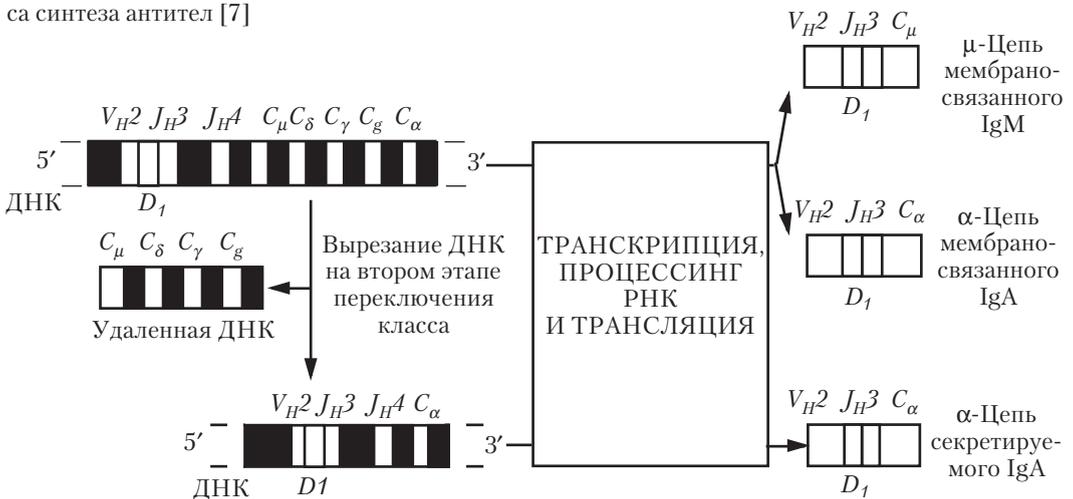


Рис. 2.12. Второй этап переключения класса синтеза антител [7]

тигенсвязывающий центр, отобранный АГ, распределяется между всеми классами Ig и таким образом приобретает все биологические свойства различных классов.

## 2.2. Главный комплекс гистосовместимости

Решающее значение иммуногенетика имеет в выяснении иммунологических механизмов отторжения трансплантатов. Еще в 50-е годы прошлого века было установлено, что отторжение чужеродных тканей происходит вследствие иммунологических реакций на АГ, находящийся на поверхности чужих клеток. Главные клетки, участвующие в этих процессах — Т-лимфоциты: Т-хелперы и Т-цитотоксические. В последующем были открыты реакции «трансплантат против хозяина», бласттрансформации в смешанной культуре лимфоцитов. Эти реакции были названы трансплантационными, и они направлены против АГ чужих клеток, которые получили название трансплантационных АГ, или АГ гистосовместимости. Наиболее значимо из них семейство АГ, кодируемое комплексом генов — главным комплексом гистосовместимости (major histocompatibility complex — МНС).

МНС-антигены располагаются на поверхностных мембранах клеток высших позвоночных. Впервые П. Горер (1936) обнаружил их на клетках мышей. В последующем Дж. Снелл назвал их и подобные им АГ антигенами гистосовместимости. Поэтому эритроцитарный АГП Горера назвали антигенами H-2. У человека подобные антигены были обнаружены на поверхности лейкоцитов и получили название HLA (human-leukocyte-associated). Гены H-2 находятся в 17-й хромосоме мыши, а HLA — в коротком плече 6-й хромосомы [15].

Гликопротеины клеточной поверхности МНС-АГ разделяются на два класса. В трансплантационных реакциях цитотокси-

ческие Т-лимфоциты отвечают на МНС-АГ I класса, а Т-хелперы — на МНС-АГ II класса. Гликопротеины МНС I класса обнаружены на поверхности всех ядродержащих клеток. У человека молекулы гистосовместимости HLA I класса не обнаружены на клетках нейроглии и трофобластов. Каждый полипептид имеет короткий С-конец, находящийся в клетке, гидрофобную часть, пронизывающую мембрану, и N-конец, свернутый в три домена, снаружи клетки (рис. 2.13). Полипептид нековалентно связан с небольшим белком —  $\beta_2$ -микроглобулином, последний кодируется геном, находящимся во второй хромосоме. Исследования показали, что  $\beta_2$ -микроглобулин и одна из петель МНС-АГ по аминокислотной последовательности гомологичны отдельным доменам Ig [16].

МНС-АГ I класса кодируются тремя локусами: H-2K, H-2D, H-2L — у мышей и HLA-A, HLA-B, HLA-C — у человека (рис. 2.14). Каждый из локусов кодирует одну полипептидную цепь. Отличительная особенность этих локусов состоит в том, что каждый из них имеет необычайно большое количество аллелей. Каждый аллель встречается довольно часто.

Несмотря на значительное разнообразие АГ МНС I класса в пределах вида, конкретная особь наследует лишь по одному аллелю каждого локуса от каждого родителя. Следовательно, максимальное число каждого АГ равно 2.

Система HLA обеспечивает регуляцию иммунной системы, осуществляя физиологические функции, представленные в табл. 2.1.

Многообразие отмеченных функций обеспечивается строением МНС (HLA), который является одной из самых сложных, но довольно хорошо изученных генетических структур в геноме человека.

Гены HLA разделяют на три класса (рис. 2.15). Гены I класса (среди них локусы A, B, C) кодируют молекулы HLA I класса, которые обнаружены на всех ядродержащих клетках организма и обеспечивают физиологическое взаимодействие между ними. Локусы A, B, C наиболее хо-

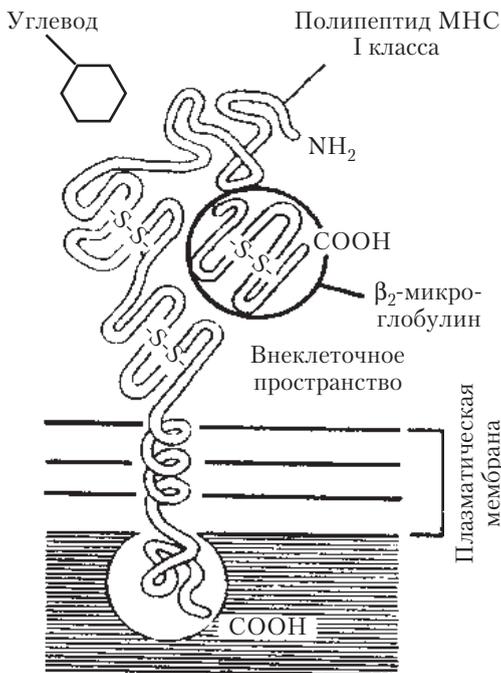


Рис. 2.13. Строение гликопротеина МНС I класса [7]

рошо изучены. Они играют важную роль в развитии иммунного ответа. Большую роль в физиологическом течении беременности играют локусы *HLA-E* и *-G*.

Гены *HLA* II класса кодируют молекулы, представленные на клетках иммунной системы. Локусы *HLA-DR*, *-DQ*, *-DP* обеспечивают взаимодействие между клетками иммунной системы, а ген *HLA-DRB1* (наиболее полиморфный в классе II) является

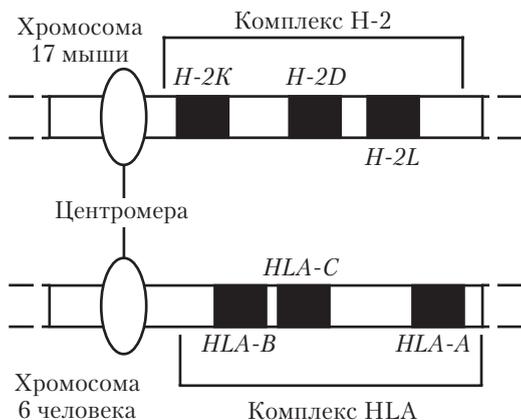


Рис. 2.14. Строение комплекса H-2 у мыши и HLA — у человека [15]

основным геном иммунного ответа человека. Локусы *DM*, *LMP* и *TAP* контролируют процессинг и презентацию чужеродных иммунодоминантных пептидов клетками иммунной системы.

Гены *HLA* III класса регулируют систему комплемента, а также такие важные молекулярные структуры, как фактор некроза опухолей (TNF) и белки теплового шока (HSP) [1].

Открытию антигенов МНС II класса предшествовало обнаружение генов иммунного ответа (*Immune response – Ir*). Гены *Ir* были выявлены у морских свинок при иммунизации Т-зависимыми АГ, которые имеют простое строение (синтетические полипептиды, например полилизин). Было установлено, что способность реагировать в виде сильного ответа на полили-

Таблица 2.1

**Основные физиологические функции системы HLA**  
(Р. М. Хаитов, Л. П. Алексеев, 2005) [1]

1	Контроль и регуляция взаимодействия клеток организма
2	Распознавание собственных, чужеродных и собственных измененных клеток, запуск и реализация иммунного ответа против носителей генетической чужеродности (антигены клеток, вирусов и пр.)
3	Процесс позитивной и негативной селекции Т-клеточных клонов
4	Контроль процессинга и презентации иммунодоминантных пептидов-индукторов и мишеней иммунного ответа
5	Обеспечение генетического разнообразия и выживаемости человека как вида в условиях экзогенной и эндогенной агрессии

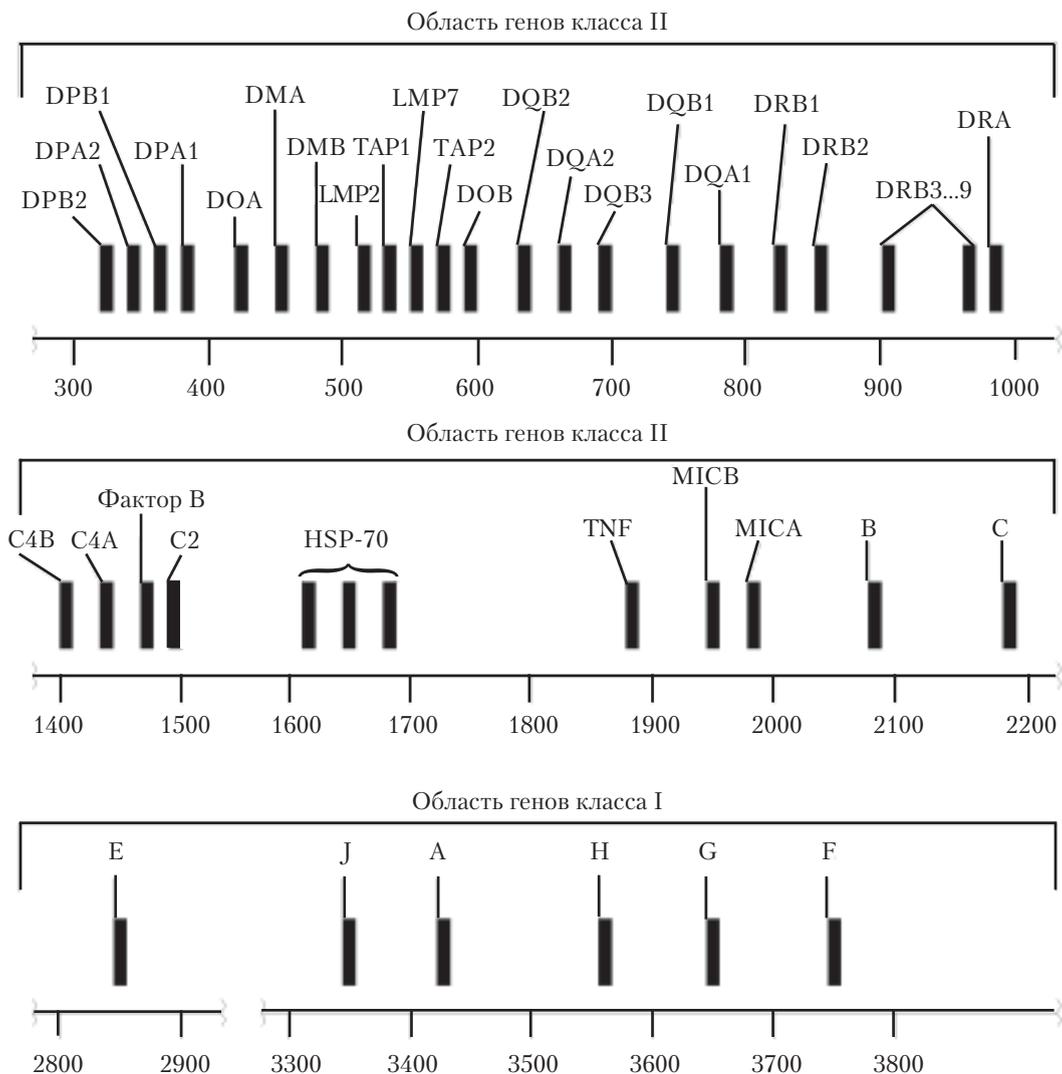


Рис. 2.15. Детальное строение системы HLA [17]

зин определяется одним доминантным геном. Ответы на различные АГ контролируются разными *Ir*-генами. Опыты на мышах дали возможность установить, что *Ir*-гены располагаются в комплексе *H-2* между *H-2K* и *H-2D* областями. Эта область была названа I-областью.

После картирования I-области МНС-генов была открыта и картирована группа генов, кодирующих АГ клеточной поверхности. АГ, ассоциированные с I-областью

(Ia), получили название АГ МНС II класса. Эти АГ находятся только на поверхности В-лимфоцитов, некоторых Т-лимфоцитов и антигенпредставляющих клеток. Ограничение экспрессии АГ II класса на поверхности указанных клеток объясняется тем, что их транскрипционная активность контролируется многочисленными эндогенными модуляторами:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -интерферонами (IFN $\gamma$ ), интерлейкинами (IL), простагландинами, фактором некро-

за опухоли альфа ( $TNF\alpha$ ) и другими цитокинами.

Гликопротеины МНС II класса состоят из двух нековалентно связанных цепей:  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи (рис. 2.16). У мышей и  $\alpha$ -, и  $\beta$ -цепи кодируются субобластью I-A, а у человека — HLA-D. Субобласть I-E у мышей кодирует только  $\alpha$ -цепи, которые соединяются с  $\beta$ -цепями, кодируемыми субобластью I-A. Эти гликопротеины также содержат домены, похожие на таковые у иммуноглобулинов [18].

HLA-система состоит из ряда генетических локусов. У каждого человека в гетерозиготном состоянии имеется по 2 аллеля гена. Большинство генов высокополиморфны. На начальных этапах изучения HLA из-за ограничения методических подходов серологическими и клеточно-определенными методами исследований выявляли относительно небольшое количество HLA-антигенов (HLA-молекул соот-

ветствующей специфичности). В настоящее время систему HLA изучают на молекулярно-генетическом уровне. При этом количество выявленных специфичностей возросло более чем на порядок за счет выявления аллельных вариантов ранее известных HLA-специфичностей, например, в HLA-DRB1, и в итоге выявления новых HLA-генов и их аллелей.

Результаты исследований системы HLA на молекулярно-генетическом уровне имеют важное практическое значение. Если раньше обозначали, например, молекулу HLA-DR4, то сейчас уточняют аллельный вариант HLA-DR4. Например, HLA-DRB1\*0401, с которой связывается один пептид, а с молекулой, кодируемой HLA-DRB1\*0404, — совершенно другой пептид. Это определяет не только индивидуальность реакции каждого конкретного человека на определенный пептид, но и его предрасположенность или устойчивость к тому или иному заболеванию [1].

Принцип взаимодействия клеток в ходе реализации иммунного ответа в схематичном виде показан на рис. 2.17. Как видно, АГ HLA II класса (рис. 2.17, а) обеспечивают начальный этап формирования иммунного ответа. Экспрессируясь на поверхности антигенпредставляющей клетки (АПК), они представляют пептид ТCR Т-клетки-хелпера. На рис. 2.17, б отражен завершающий этап иммунного ответа. Т-клетка — эффектор (Т-киллер) оказывает цитотоксическое воздействие на клетку-мишень, которая несет тот же пептид в комплексе с АГ HLA I класса. Это явление получило название «феномен двойного распознавания». С открытием этого явления стало понятно, что при развитии иммунного ответа на стадии его инициации и дальнейшей реализации могут взаимодействовать только клетки, идентичные по HLA-антигенам. Если же пептид презентруется «чужой» HLA-молекулой, то иммунный ответ будет реализован против нее, как более сильного иммуногена, а не против пептида. Следовательно, иммунному распознаванию и уничтожению подлежит не только истинно чужеродная, но и

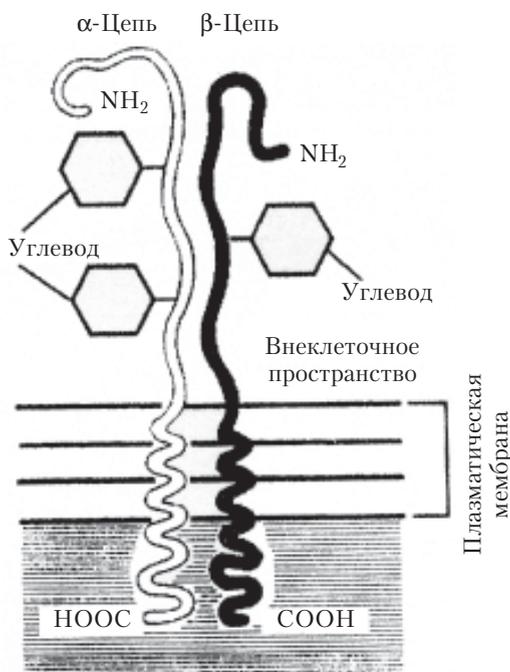


Рис. 2.16. Строение гликопротеина МНС II класса [7]

собственная измененная вследствие мутации, включая онкоперерождение, клетка.

Благодаря распознаванию «своего и чужого», которое осуществляется механизмом селекции Т-клеточных клонов в процессе онтогенеза по HLA-генотипу, формируется толерантность организма к собственным клеткам. Поэтому крайне сложно вызвать искусственную толерантность при пересадке органов и тканей или восстановить ее в случае потери, например, при аутоиммунной агрессии [19].

Молекулы MHC приобретают стабильную форму и соответствующую трехмерную конфигурацию только после встраивания пептида в связывающий сайт ее складки. Удаление пептида из структуры MHC, экспрессированной на мембране, приводит к нарушению трехмерной конфигурации, лишает возможности функционировать и ведет к гибели. Экспрессируемые на поверхности мембраны белки MHC I и II классов находятся в постоянном движении, после чего скапливаются на одном из полюсов клетки, где осуществляется их эндоцитоз. Подобные процессы характерны для большинства клеточных рецепторов.

Комплекс MHC + пептид очень стабильный, находится на поверхности клетки несколько недель, поэтому многие «про-

ходящие» Т-лимфоциты могут сканировать представленный пептид.

Каждый пептид связывается в складке с инвариантным участком, характерным для каждого из аллелей молекул MHC. Это и является по сути основой генетического контроля иммунного ответа. В связывающей складке молекулы MHC I класса пептид удерживается двояко: N- и C-концами с определенными местами «аллель специфического участка MHC», связями боковых цепей пептида с боковыми карманами молекулы MHC. Пептиды, связывающиеся с молекулами MHC I класса, имеют длину 8–10 аминокислот.

В молекуле HLA I класса конформация антигенсвязывающего участка представляет собой антипараллельные  $\beta$ -складчатые структуры, переходящие в  $\alpha$ -спирали. Последние состоят приблизительно из 35 аминокислот. Оба домена  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$  взаимно расположены таким образом, что по четыре  $\beta$ -складки каждого из них вместе образуют платформу из восьми полос, а  $\alpha$ -спирали обоих доменов находятся на некотором расстоянии друг от друга. В конечном итоге образуется углубление, или «бороздка», ограниченная с обеих сторон  $\alpha$ -спиралями, которые имеют форму арок, сближаясь у концов «бороздки».

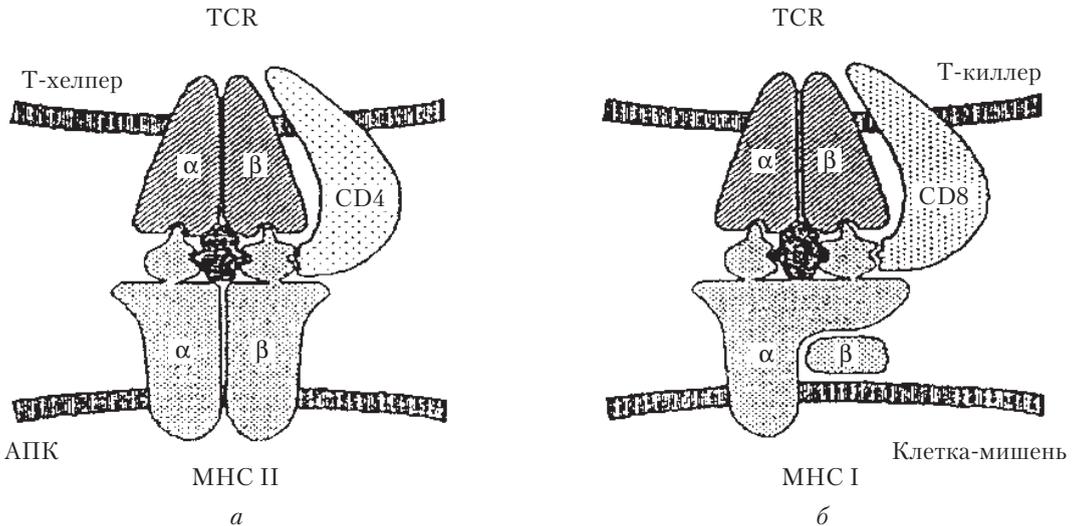


Рис. 2.17. HLA-молекулы и иммунный ответ [17]

Размер углубления  $25 \times 10 \text{ \AA}$ . В нем размещается АГ, с которым связывается HLA-молекула [21].

Более гетерогенны пептиды, связывающиеся с молекулами MHC II класса (9–25 аминокислот).

В формировании антигенсвязывающего участка молекул HLA II класса также принимают участие дистальные домены, но различных цепей ( $\alpha$ 1 и  $\beta$ 1). Конформация антигенсвязывающего участка сходная с таковой у молекулы HLA I класса, то есть он имеет  $\beta$ -складчатое основание с расположенными на нем боковыми  $\alpha$ -цепями. Однако расстояние между  $\alpha$ -цепями больше и конформация участка более открытая. Поэтому в такой бороздке могут размещаться пептиды гораздо больших размеров. Пептиды могут даже выступать с обоих концов «бороздки». Это создает больший полиморфизм в связях HLA + пептид. Следовательно, более широкий спектр пептидов может «аккомодировать» к молекулам HLA II класса по сравнению с I классом [22].

Долгое время считалось, что АГ связывается на поверхности В-лимфоцита Ig, которые образуют мостик между взаимодействующими клетками. Предполагалось также, что Ig представляют АГ Т-лимфоцитам. В таком случае необходимо минимальное время для образования связей между молекулами. Однако исследования показали, что с момента взаимодействия АГ и клетки до его экспрессии на клеточной мембране проходит 30–60 мин. Оказалось, что прежде чем быть представленными Т-лимфоцитам, АГ проходят этап внутриклеточной обработки с участием молекул MHC. Роль посредников, которые не только представляют Т-клеткам АГ, но и связывают его внутри клетки после гидролиза, а затем транспортируют на мембрану, выполняют молекулы HLA.

Таким образом, одна из функций системы HLA, которая обеспечивает регуляцию иммунного ответа, заключается в процессинге и презентации молекулами HLA комплекса HLA + пептид. Следовательно, молекулы системы HLA не только участвуют

в запуске и реализации иммунного ответа на конкретный чужеродный агент, но и обеспечивают получение из него (чужеродная клетка, бактерия, вирус) иммунодоминантного пептида, который затем станет фактором запуска иммунного ответа и мишенью для его реализации. Схематично этот процесс можно представить так (рис. 2.18).

HLA-молекулы связывают олигопептиды АГ следующим образом. После трансляции на рибосомах тяжелая  $\alpha$ -цепь и  $\beta_2$ -микроглобулин молекулы HLA I класса поступают в эндоплазматическую сеть, где образуют гетеродимер. Но эта структура очень неустойчива и быстро распадается на мономеры. Для поддержания гетеродимерной формы и последующей экспрессии HLA-молекулы I класса на поверхности клетки необходимо наличие в эндоплазматической сети АГ.

Первыми в систему процессинга включаются АГ системы HLA локуса *LMP* (гены *LMP<sub>2</sub>*, *LMP<sub>7</sub>*), инкорпорируемые под влиянием  $\text{IFN}\gamma$  в протеосомы. Эти молекулы регулируют размер и специфичность пептидов, приводя их в соответствие со связывающими сайтами молекул MHC I класса. В эндоплазматическую сеть АГ поступает путем активного переноса с помощью TAP-белков (transporter associated with processing — TAP). Образовавшийся стабилизированный комплекс направляется в аппарат Гольджи. Здесь белковые цепи HLA гликолизуются. После этого комплекс HLA I класса + пептид перемещается на поверхность клетки с помощью «пептидных насосов» TAP и встраивается в ее мембрану.

Синтезированные  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи молекулы HLA II класса объединяются в эндоплазматической сети с инвариантной цепью (invariant chain — In). Тримеры  $\alpha$ - $\beta$ -In объединяются в мультимеры, состоящие из трех тримеров, гликолизуются и транспортируются в эндосому. В эндосоме происходит процессинг АГ и связывание АГ-пептида с  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепями HLA молекулы II класса. Возможно, In-цепь предохраняет  $\alpha/\beta$ -димер от преждевременного связывания его с пептидом, а также служит

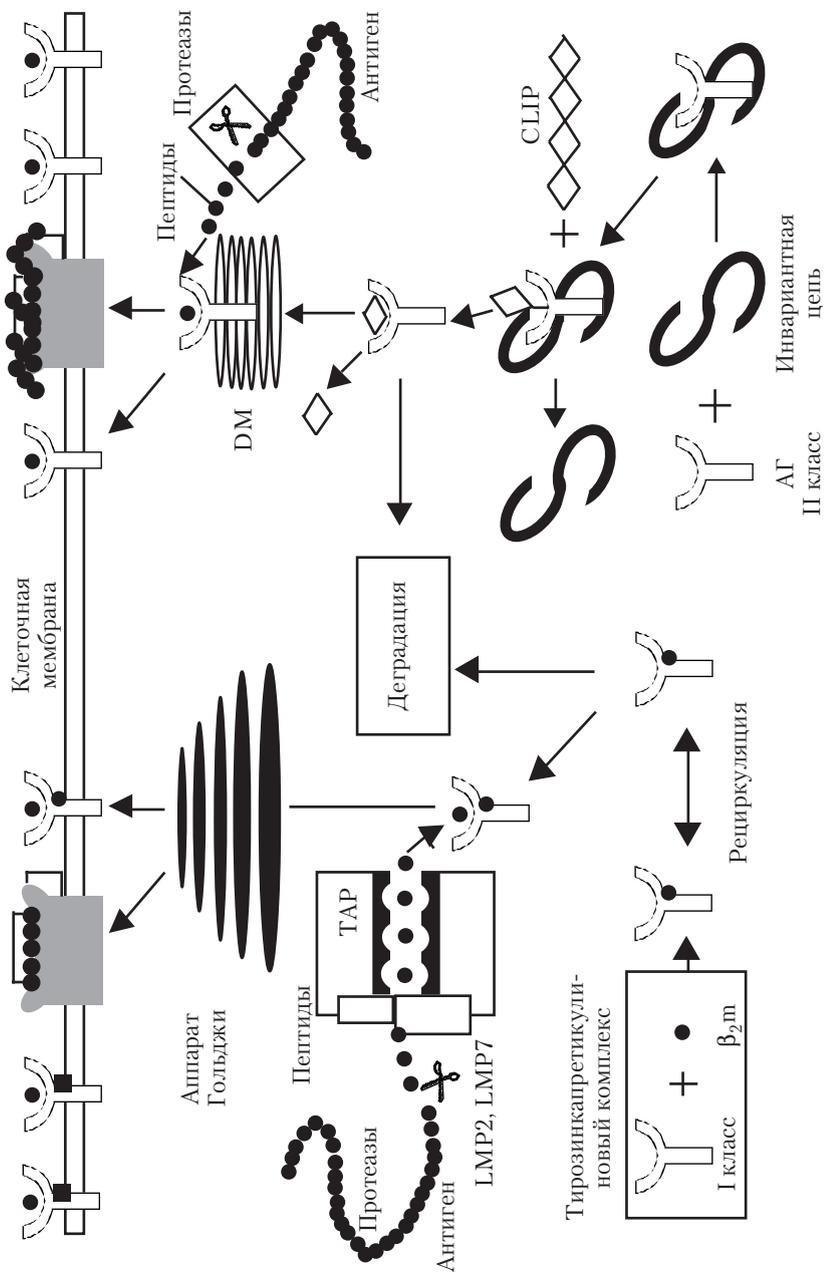


Рис. 2.18. Образование молекул МНС I и II классов [20]

сигналом для транспорта  $\alpha/\beta$ -димера в эндосому.

Вытеснение пептидом инвариантной цепи из молекул МНС II класса обеспечивают белки, также кодируемые системой HLA-DM. Эти белки катализируют замену «временного» пептида инвариантной цепи на специфический пептид. После связывания с пептидом молекулы МНС II класса переходят на поверхность клетки.

В 80-е годы минувшего столетия было установлено, что типы АГ, связываемых молекулами HLA I и II классов, пути их внутриклеточного транспорта и способы обработки принципиально различаются. Молекулы HLA I класса представляют эндогенные и цитоплазматические белки. В то же время молекулы HLA II класса представляют поглощенные экзогенные АГ.

Первоначально синтезированные клеткой пептиды подвергаются деградации в цитоплазматическом протеолитическом комплексе. Это — протеомы, содержащие субъединицы LMP<sub>2</sub>, LMP<sub>7</sub> (low molecular weight protein). Они расщепляют протеины не произвольно, а в участках, соответствующих гидрофобным и основным остаткам. После деградации пептидов до остатков длиной около девяти аминокислот последние переносятся белками TAP<sub>1</sub> и TAP<sub>2</sub> в эндоплазматическую сеть. Перед этим пептидные остатки образуют комплекс с молекулами теплового шока HSP. Предполагают, что HSP 70 либо предотвращают остатки от полного разрушения до аминокислот, либо участвуют в подготовке (распрямлении) их для транспортировки в эндоплазматическую сеть.

В случаях инфицирования клеток вирусом, их молекулы HLA I класса экспрессируют на клеточной поверхности чужеродный АГ. Молекулы HLA II класса представляют на поверхностной мембране АГ, фагоцитированные клеткой извне. Гидролиз АГ происходит в эндосомах.

Таким образом, HLA-АГ I класса связываются с пептидом на ранних этапах биосинтеза. Для HLA-АГ II класса характерно связывание пептида на заключительных этапах внутриклеточного транспорта. Это

различие определяет разделение презентируемых HLA-молекулами белков: молекулы I класса презентуют эндогенно продуцируемые пептиды, молекулы II класса — экзогенно синтезируемые пептиды после их частичного протеолиза [23].

Высокая скорость синтеза и рециклизации молекул HLA-A, -B, -C практически во всех ядродержащих клетках, быстрая транспортировка деградированных белков, синтезированных самими клетками организма в комплексе с молекулами HLA, помогают строго контролировать физиологическое состояние этой клетки.

При малигнизации или вирусной трансформации клеток быстро накапливаются белки, кодируемые онкогенами или вирусными генами. Они взаимодействуют с HLA-АГ, экспрессируются на поверхности клетки и представляются МНС-рестриктированным Т-лимфоцитам.

Поскольку при внутрилимфной дифференцировке CD4<sup>+</sup> — CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты не имеют контакта с подобными белковыми комплексами, происходит уничтожение мутировавших или пораженных вирусом клеток.

После полученных результатов исследований Р. Цинкернагеля и П. Догерти, которые описали феномен МНС-рестрикции, стало понятно, что биологическая роль молекул МНС значительно шире. Оказалось, что CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты распознают АГ только тогда, когда он находится в комплексе с определенной МНС-молекулой. При этом активация Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов происходит лишь в том случае, когда совпадают их МНС-фенотип с МНС-фенотипом АПК или клетки-мишени. Не существует отдельных рецепторов для АГ и МНС-молекулы. На поверхности Т-лимфоцитов есть единственный рецептор для комплекса АГ + МНС-молекула. Установлено, что молекулы МНС, экспрессируемые на клетках тимуса, участвуют в процессах селекции тимоцитов и в формировании репертуара зрелых Т-клеток, экспрессирующих рецепторы определенной специфичности.

От функции *HLA* генов и их продуктов, участвующих в процессинге и презентации пептидов, в итоге зависит экспрессия HLA АГ на поверхности клеток иммунной системы и нормальное функционирование иммунной системы [24].

Гены, контролирующие процессинг и презентацию иммунодоминантных пептидов молекулами HLA класса I и II (*TAP*, *LMP*, *DM*), обладают выраженным полиморфизмом, кодируя различные белковые молекулы, которые существенно отличаются по своей функциональной активности.

Таким образом, в результате процессинга белки HLA приобретают стабильную форму, соответствующую трехмерную конфигурацию и экспрессируются на клеточной поверхности только после связывания с иммуногенным пептидом. Комплекс HLA/пептид удерживается на поверхности клетки несколько недель, что позволяет многим другим «проходящим» клеткам скринировать иммуногенный пептид. Каждый иммуногенный пептид связывается с определенным аллельным вариантом HLA-молекул, что в сущности является генетической основой контроля иммунного ответа. Аллельные варианты молекул HLA различаются по количеству взаимодействующих с ними пептидов. Так, одна молекула HLA-A2, кодируемая аллелем *HLA-A\*0201*, имеет 258 охарактеризованных лигандов. С другой стороны — для 2/3 молекул (с учетом всех их аллельных вариантов) эта цифра не превышает 10 лигандов. Следовательно, иммунная система человека реагирует на широкий спектр чужеродных агентов благодаря выраженному полиморфизму *HLA*. Причем у человека, как вида, полиморфизм генов *MHC* более высокий, чем у других биологических видов, что способствует большей устойчивости к условиям агрессивной внешней среды [1; 22]. Генетический полиморфизм очень выражен не только на видовом уровне. Многочисленные исследования показали значительное различие в частоте встречаемости аллельных вариантов на уровне рас, этнических групп и даже внутри отдельных этнических уровней [25; 26].

Изучение таких различий имеет большое значение для практической медицины [27]. Например, аллельные варианты *HLA-DRB1\*0401*; *HLA-DRB1\*0404*; *HLA-DRB1\*0405* — классические генетические маркеры предрасположенности к сахарному диабету I типа (CD1). Аллельный вариант *HLA-DRB1\*0403* — маркер генетической устойчивости к развитию этого заболевания. Появление нового направления иммунотерапии — пептидная терапия — открывает возможности коррекции аутоиммунных заболеваний, ранее считавшихся неизлечимыми. Это относится и к CD1. Доказано, что лечение CD1 возможно путем специфической блокировки искусственным пептидом сайта HLA-молекулы аллельного варианта *HLA-DRB1\*0401*, ответственного за связь с иммуногенным пептидом. Так как молекулы *HLA* — генетические маркеры CD1 — играют основную роль в развитии аутоиммунного процесса, такой подход в лечении CD1 вполне обоснован. Клинические исследования с использованием блокировки соответствующего эпитопа молекулы *HLA-DRB1\*0401* с помощью синтетического пептида приводит к блокаде клеточного и гуморального звеньев аутоиммунной агрессии. В то же время синтетический пептид, блокирующий молекулу *HLA-DRB1\*0401*, не эффективен при попытке заблокировать развитие CD1 у *HLA-DRB1\*0404*-положительного больного. Этот пример — свидетельство необходимости создания индивидуальных лекарственных средств для конкретных больных [27].

Таким образом, достижения генетики и протеомики в области исследования HLA открывает новые перспективы диагностики и лечения аутоиммунных и других заболеваний. С помощью *HLA*-генотипирования можно установить аллельный вариант, кодирующий белковую молекулу, содержащую «неблагоприятный» мотив. На этом основан прогноз развития заболевания, а использование блокирующих мотив пептидов приводят к восстановлению утраченной толерантности.

HLA-типирование, основанное на методах молекулярно-генетической диагностики, в корне изменило возможности трансплантации костного мозга. Технологии HLA инъекции тканесовместимых доноров и существование шестимиллионного международного регистра HLA-типированных доноров костного мозга позволили достичь высоких результатов в группе трансплантаций от HLA-идентичных неродственных доноров.

На основе HLA-генотипирования разработан новый вид терапии онкозаболеваний. Пораженные органы и ткани «заменяют» соответствующим аллотрансплантатом с одновременной пересадкой тканесовместимого костного мозга. Применяется этот метод лечения у больных с тяжелыми формами заболевания. Фактически проводится пересадка новой функционирующей и HLA-совместимой системы.

Система HLA играет важную роль в репродукции. За счет сцепленности с одорантами МНС поддерживает собственный полиморфизм. У представителей животного мира данный процесс четко поддерживается. С помощью обоняния идентичные по антигенам МНС самка и самец не оплодотворяются, чем устраняется возможность появления гомозигот по МНС. В какой-то мере он реализуется и у человека. Но в человеческом обществе, где важную роль играет социальный фактор, браки между HLA идентичными (полностью или частично) людьми возможны. Гомозиготность ограничивает степень полиморфизма. В то же время у HLA гомозиготных людей повышен риск развития инфекционных (включая СПИД), онкологических, аутоиммунных заболеваний.

Появление HLA гомозиготного потомства ограничивается также акушерской патологией — привычное идиопатическое невынашивание плода. При привычном невынашивании плода совпадение супругов по HLA-специфичностям значительно выше по сравнению с нормальной, физиологически протекающей беременностью. В группе невынашивания снижено количество мужчин, несущих аллель *HLA-*

*DRB1\*01*, но повышено число женщин со специфичностью *HLA-DRB1\*04*, то есть мужчины имеют в данной группе селективный минус. Таким образом, система HLA корректирует свой генетический профиль в популяциях [28].

В репродуктивном процессе реализуется еще одна важная функция HLA. В последние годы установлено, что *HLA* гены класса I, *-E* и *-G* регулируют активность клеток-киллеров в процессе беременности. До беременности молекулы HLA-E и -G у здоровой женщины не выявляются. С началом беременности их гены активируются и молекулы HLA-E и -G экспрессируются на клетках трофобласта, включая его сосудистый эндотелий. Данные молекулы активно связывают и нейтрализуют естественные клетки-киллеры, защищая плод от их воздействия. После благополучного завершения беременности экспрессия HLA-E и -G молекул прекращается. Количество НК-клеток возрастает в лютеиновой фазе менструального цикла, а также в первом триместре беременности. В данном случае НК-клетки выполняют свою физиологическую функцию, предотвращая чрезмерную инвазию трофобластов и возможное развитие местной инфекции. При избыточной функции НК-клетки могут возникать осложнения: преэклампсия и идиопатическое невынашивание беременности. Главные участники этого процесса — НК-клетки, несущие на своей поверхности CD69; АГ HLA-G служит фактором, регулирующим их активность [29–31].

## **2.3. Рецепторы клеток иммунной системы**

### **2.3.1. Строение и функция TCR**

В процессе иммунного ответа на АГ при взаимодействии клеток образуется тримолекулярный комплекс, состоящий из АГ, молекулы МНС, которая представляет АГ, и T-клеточного рецептора.

Т-клетки распознают целостный комплекс МНС-молекула + пептид (рис. 2.19). Описана биохимическая структура белковых молекул Т-рецептора (T-cell receptor — TCR), а также клонированы гены, кодирующие эти молекулы.

В генах Т-клеток мыши и человека, которые не гибридизируются с иРНК Ig, происходит реальная перестройка, объединение сегментов *V* (*variable* — *вариабельный*) + *D* (*dibersitu* — *разнообразный*) + *J* (*junction* — *объединяющий*) + *C* (*constant* — *константный*). Несмотря на формальное сходство генов Ig и TCR по слиянию сегментов *V-D-J-C* и степени гомологии аминокислот их продуктов, гены TCR полностью отличаются от генов Ig.

Гены *TCR* делятся на четыре варианта, каждый из которых кодирует свою молекулу ( $T_{\alpha}$ ,  $T_{\beta}$ ,  $T_{\gamma}$ ,  $T_{\delta}$ ). Они находятся в разных хромосомах:  $T_{\alpha}$  и  $T_{\delta}$  в хромосоме XIV мыши и человека,  $T_{\beta}$  — в хромосоме VI мыши и VII человека,  $T_{\gamma}$  — в хромосоме XIII мыши и VII человека. Хотя в некоторых из этих хромосом находятся гены Ig (в XIV хромосоме — *H*-цепь; в VI хромосоме

— *L*-цепь), они полностью отделены от генов TCR, так как расположены в других участках той же хромосомы.

Принципиальные различия между генами TCR и Ig связаны с разными причинами.

1. Перестройка генов *Ig* строго ограничена. Она может происходить только внутри одной хромосомы с последующей транскрипцией одного гена, трансляцией одной тРНК и выходом молекулы Ig на мембрану В-клетки одного типа. Перестройка генов TCR связана с разными вариантами. Соединяются гены разных сегментов из парных хромосом с последующей трансляцией разных вариантов белков:  $J_1C_2$  или  $J_2C_1$  в  $\alpha$ -цепи;  $V_8D_1$  или  $V_{16}D_2$  в  $\beta$ -цепи; соединение  $D_1$  и  $D_2$  в  $\beta$ -цепи (рис. 2.20).

Ген  $V_{\alpha}$  расположенный рядом с геном  $V_{\delta}$  (хромосома XIV), может перестроиться только после перестройки гена  $V_{\delta}$  и его последующей делеции в эмбриональном периоде. Это приводит к соединению молекул  $T_{\beta}$  и  $T_{\alpha}$  и образованию TCR  $\alpha\beta$ . Продукт перестроенного  $\delta$ -гена сам может сливаться с молекулой  $\beta$ -гена, возникает редкий рецептор —  $\delta\beta$ .

Кроме основного TCR-1 ( $\alpha\beta$ ), у эмбриона возникает вариант TCR-2 ( $\gamma\delta$ ). После эмиграции из тимуса эти клетки обнаруживаются в крови, а также в эпителии кишечника, печени. Известны также и другие варианты TCR:  $\gamma\gamma$ ;  $\alpha\alpha$ ; TCR-3 у птиц.

2. У генов *Ig* перестройка связана с делецией промежуточного интрона. Слияние сегментов *V-D-J-C* у TCR обусловлено не только делецией интрона. Если сегменты  $V_{\beta}$  и  $J_{\beta}$  расположены близко, то они сливаются без участия промежуточного интрона. Ген  $V_{\beta 14}$ , расположенный дистально к гену  $C_{\beta 2}$ , соединяется с ним путем инверсии хромосомной структуры.

3. Гены *V*-сегментов Ig имеют большее число вариантов, чем гены *V*-сегментов TCR, но число вариантов генов *J*-сегментов в TCR значительно больше, поэтому число вариантов объединения комбинаций генов *V-D-J-C* в TCR-1 и TCR-2 значитель-

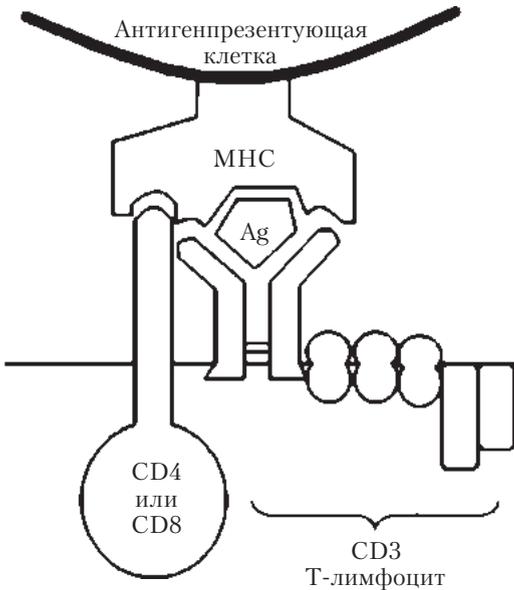


Рис. 2.19. Схема рецептора Т-лимфоцита (TCR) [32]

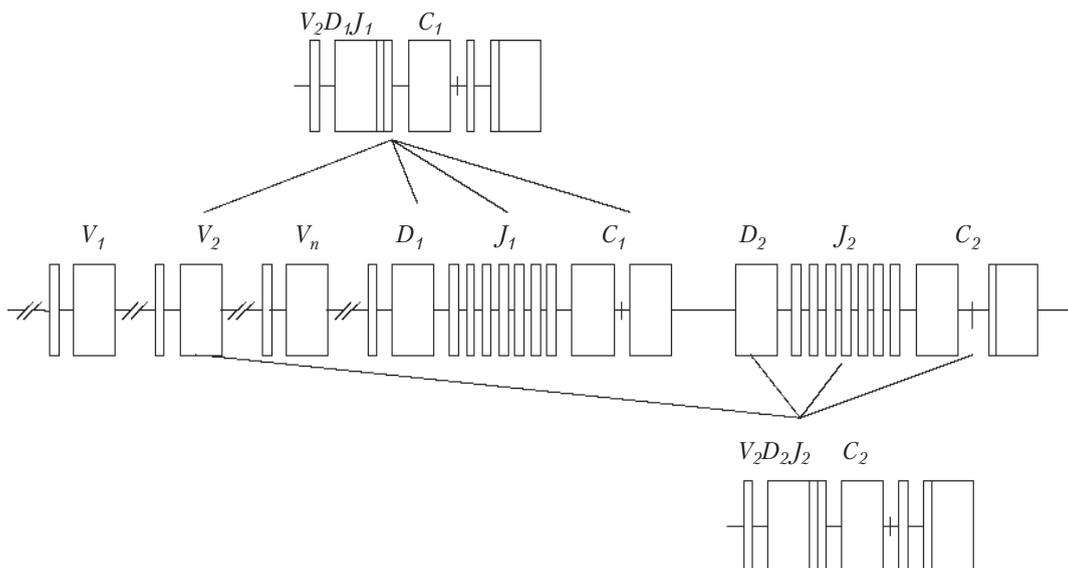


Рис. 2.20. Рекомбинация генов  $\beta$ -цепи TCR [32]

но больше, чем число вариантов комбинаций генов у Ig.

Молекулы TCR-1 ( $\alpha\beta$ ) и TCR-2 ( $\gamma\delta$ ) представляют собой гетеродимеры из двух цепей, расположенных вне мембраны (рис. 2.21). Каждая из цепей имеет V- и C-домены. За C-доменом, ближе к мембране, располагается шарнирный участок, который с помощью S-S-мостика соединяет  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи, далее — трансмембранный (гидрофобный) и в цитоплазме — короткий участок.

Для функционирования любого TCR необходим его контакт с молекулой CD3, состоящей из пяти субъединиц. Каждая субъединица имеет собственные гены:  $\gamma, \delta, \epsilon$  — в хромосоме XI и  $\xi/\zeta$  (мономер) — в хромосоме I. Все эти компоненты CD3 прочно связаны с TCR с помощью двух аминокислот (Асп-Лиз) в трансмембранном домене.

Контакт TCR с молекулами CD3 обеспечивает транспорт TCR на мембрану, его конформацию, передачу сигнала TCR в цитоплазму после его контакта с АГ, активацию  $Ca^{2+}$  в цитоплазме и выход на мембрану протеинкиназы С. От контакта

TCR-CD3 с молекулой МНС + пептид зависит возникновение иммунного объекта и его последующая реализация.

Ранние предшественники Т-лимфоцитов у человека обнаружены в фетальной печени. Они имеют фенотип  $CD4^-, CD8^-, CD3^-$  и содержат CD3-белки в цитоплазме. После миграции таких клеток в микроокружение тимуса перестраиваются гены  $\beta$ -цепи TCR. Сначала рекомбинируют D- и J-сегменты, а затем происходит V-D-J-рекомбинация.  $\beta$ -Цепи ассоциируются в цитоплазме с молекулами ( $\delta, \gamma, \epsilon, \xi$ ) CD3-комплекса, но до появления  $\alpha$ -цепей на поверхности Т-лимфоцитов не экспрессируются. Гены  $\alpha$ -цепей «вступают в действие» только на стадии  $CD4^+ CD8^+$ . Появление  $\alpha$ -цепей в цитоплазме приводит к экспрессии комплекса TCR-CD3 на мембране Т-клеток, несущих  $CD4^+ CD8^+$ .

Дальнейшая дифференцировка Т-лимфоцитов зависит от того, какой АГ они встретят: «свой» или «чужой». При встрече со «своим» АГ Т-клетки подвергаются апоптозу, а при встрече с «чужим» АГ — стимулируются и дифференцируются в эффекторные Т-лимфоциты.

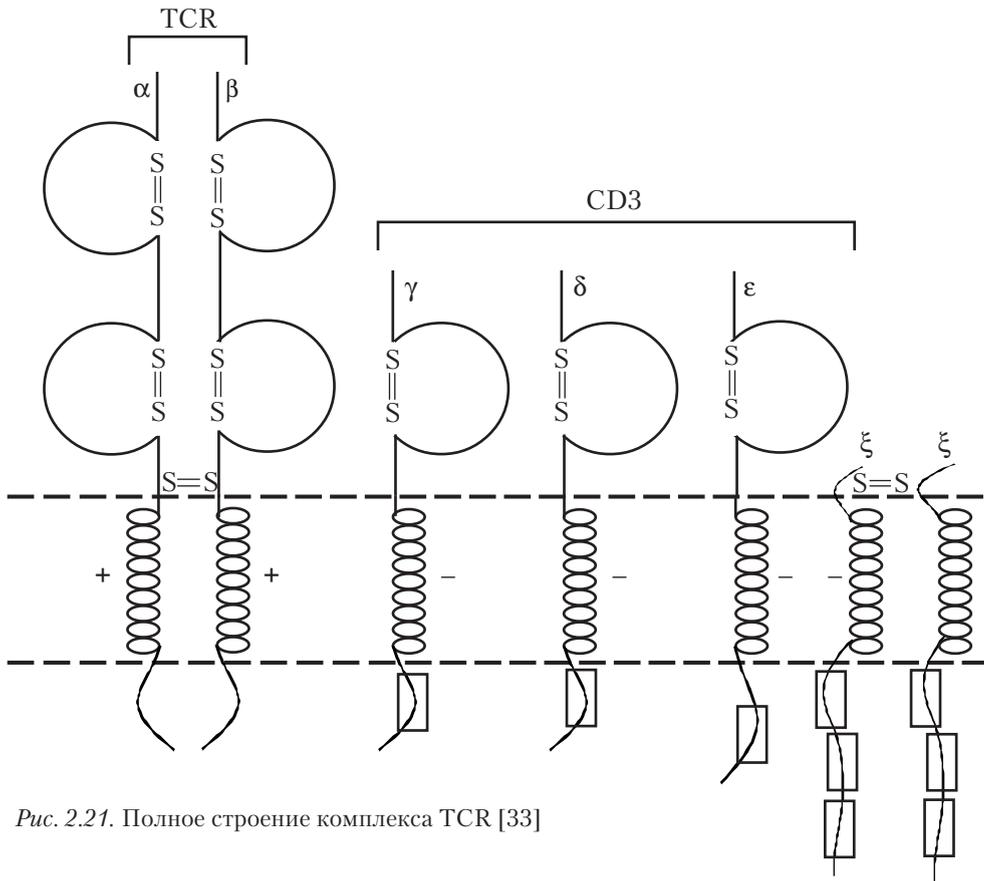


Рис. 2.21. Полное строение комплекса TCR [33]

### 2.3.2. Строение и функция BCR

Предполагалось, что в отличие от сложно устроенного TCR, BCR относительно прост и представлен мембранным Ig (mIg), который отличается от секреторного Ig своим С-концом. Однако накопление результатов исследования в этом направлении свидетельствовало о более сложном строении BCR.

Во-первых, цитоплазматический «хвост» mIgM и mIgD был очень коротким — всего три аминокислоты. Такого количества аминокислот явно недостаточно для взаимодействия с тирозинкиназами и G-белками, запускающими каскад событий, обеспечивающих передачу сигнала с поверхности клетки на ядерный аппарат.

Во-вторых, трансфекция миеломных клеток, не способных синтезировать H-цепи Ig, геном *mμ* приводила к тому, что миеломные клетки синтезировали mIgM, который накапливался в цитоплазме, но не экспрессировался на поверхности клеток. Значит, в миеломных клетках не было какого-то компонента, транспортировавшего mIgM на наружную мембрану. Этим компонентом оказался ранее неизвестный белковый димер.

Он представлял собой гликопротеид, состоящий из двух цепей, которые получили название Ig- $\alpha$  и Ig- $\beta$ . В последующем были открыты специфические для В-клеток гены *mb-1* и *B29*. Оказалось, что ген *mb-1* отвечает за синтез Ig- $\alpha$ , а ген *B29* — Ig- $\beta$ .

Изучение структуры белков Ig- $\alpha$  и Ig- $\beta$  показало, что они относятся к суперсемей-

ству Ig. Белки имеют по одному внеклеточному домену, трансмембранному участку и цитоплазматическому «хвосту» примерно из 50 аминокислот. Цитоплазматические «хвосты» белков Ig- $\alpha$  и Ig- $\beta$  содержат консервативные участки аминокислот, сходные с таковыми в цитоплазматических участках других белковых молекул, входящих в рецепторные комплексы ( $\gamma$ CD3,  $\delta$ CD3,  $\mu$ CD3,  $\xi$ CD3,  $\gamma$ - и  $\beta$ -цепях Fc-рецеп-

торов). Такое подобие, очевидно, обусловлено сходством функций этих белков.

Установлено, что димеры Ig- $\alpha$  и Ig- $\beta$  необходимы для транспорта мембранных H-цепей на поверхность клетки, для трансдукции сигнала с Ig-рецептора на ядро клетки. Они, кроме того, участвуют в презентации АГ В-лимфоцитами [33].

Строение полного BCR-комплекса представлено на рис. 2.22.

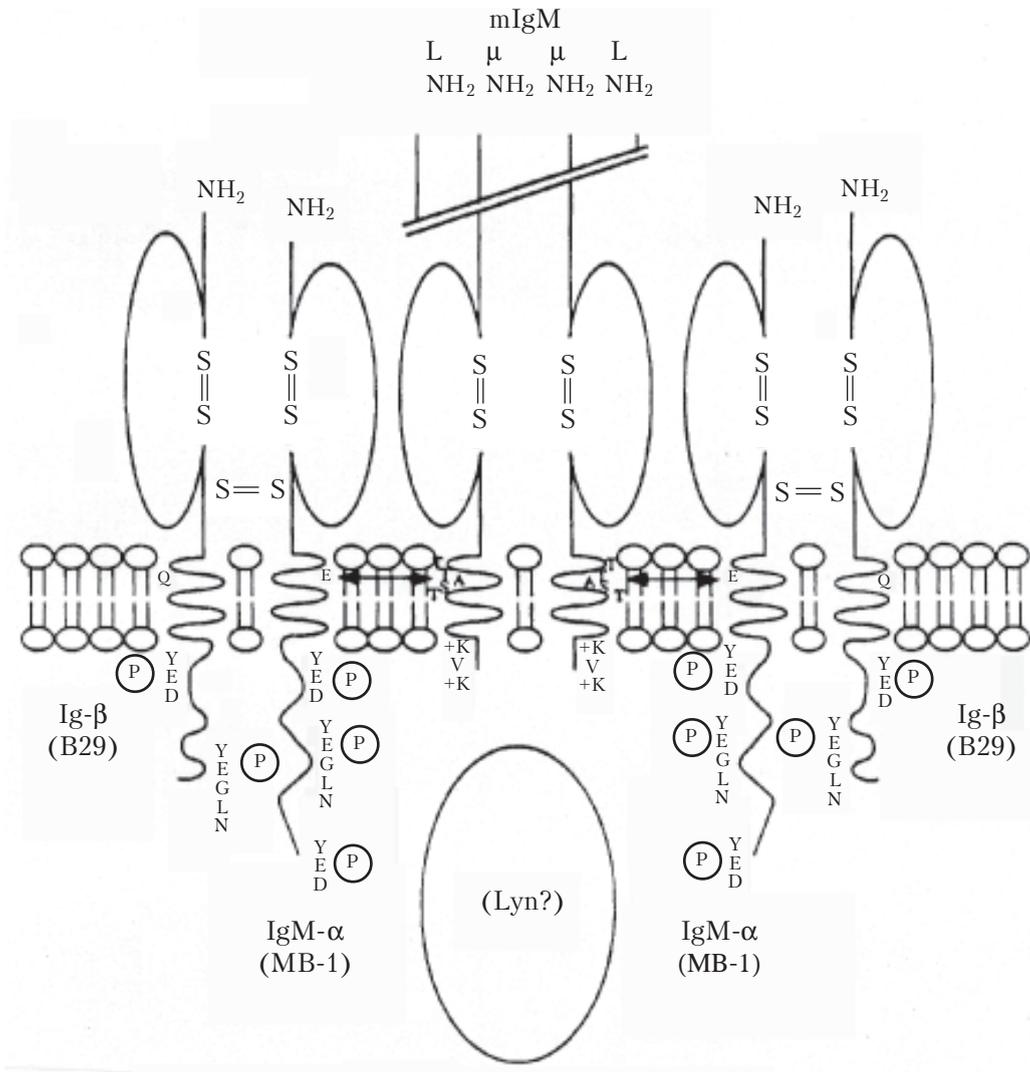


Рис. 2.22. Полное строение комплекса BCR [33]

### 2.3.3. Взаимодействие клеток иммунной системы

После связывания АГ включаются антигензависимые механизмы активации Т- и В-лимфоцитов, обеспечивающие биохимические процессы передачи антигенного сигнала через TCR или BCR к ядерному аппарату клетки.

Наиболее ранние события — активация ферментов фосфорилирования — протеинтирозинкиназ. Затем усиленно образуются вторичные мессенджеры, индуцирующие увеличение концентрации внутриклеточного  $Ca^{2+}$  и активирующие протеинкиназу С. Далее вовлекается ряд ферментов, участвующих в регуляции транскрипции генов. Таким образом, описанные биохимические процессы при проведении сигнала являются общими при активации клеток.

Взаимодействия между клетками иммунной системы играют важную роль как на различных этапах развития, так и во время функционирования системы. Наиболее своеобразны и специфичны они в процессе формирования иммунного ответа.

Взаимодействия могут проявляться в форме прямых контактов клеток и гуморальных влияний. Среди контактных взаимодействий клеток можно выделить два основных типа:

1. Взаимодействия при презентации АГ. В них участвуют АПК: макрофаги, дендритные клетки, В-лимфоциты и Т-хелперы.

2. Взаимодействия при реализации иммунного ответа. Здесь участвуют Т-хелперы и предшественники эффекторных клеток (В-лимфоциты и предшественники Т-киллеров).

В обоих описанных случаях основой для контакта клеток служит распознавание антигенного эпитопа рецепторами лимфоцитов. При взаимодействии АПК — Т-хелпер распознавание комплекса АГ-пептид + молекула МНС II класса осуществляется Т-клеточным рецептором (TCR-CD3) при участии молекулы CD4. При

взаимодействии Т-хелперов с В-клеткой такой тип взаимодействия также имеет место, так как В-клетка выполняет функцию АПК. Однако специфичность ответа В-лимфоцитов определяется связыванием свободного АГ с иммуноглобулиновым компонентом BCR. При этом В-лимфоциты выступают здесь одновременно как доноры и как акцепторы активационных сигналов, то есть как АПК и как предшественники антителообразующих клеток.

Взаимодействие антигенного эпитопа со специфическим рецептором не обеспечивает достаточной адгезии клеток и генерации полноценного сигнала, необходимого для активации лимфоцитов [34]. Адгезия усиливается путем взаимодействия ряда вспомогательных молекул (рис. 2.23). При контакте АПК и Т-хелпера основную роль играет взаимное связывание молекул CD28 Т-лимфоцита и молекул CD80 или CD86 АПК, а также взаимодействие молекул CD40 В-лимфоцита и CD154 Т-хелпера, особенно важное при взаимодействии Т — В.

В конечном итоге под влиянием связывания CD28 усиливается выработка IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$ . Отсутствие взаимодействия CD28 и CD80/CD86, моделированное любым способом, не только ослабляет активацию Т-клеток (из-за недостаточной выработки IL-2) и осуществление ими различных иммунологических реакций, но и обуславливает анергию Т-лимфоцитов. Предположительно в отсутствие этой костимуляции активированные Т-клетки подвергаются апоптозу [36].

Наиболее чувствительны к костимуляции через CD28 клетки Т-хелперной (CD4<sup>+</sup>) субпопуляции. Индукция CD28-зависимого сигнала через молекулу CD80 обеспечивает дифференцировку этих клеток в Th2-хелперы гуморального ответа и выработке IL-4. При дефекте CD28 и в присутствии молекул CTLA4 при дифференцировке CD4<sup>+</sup> клеток формируются исключительно хелперы Th1-типа. Полагают, что молекула CTLA4 служит проводником сигналов, подавляющих пролиферацию Т-хелперов и способствующих разви-

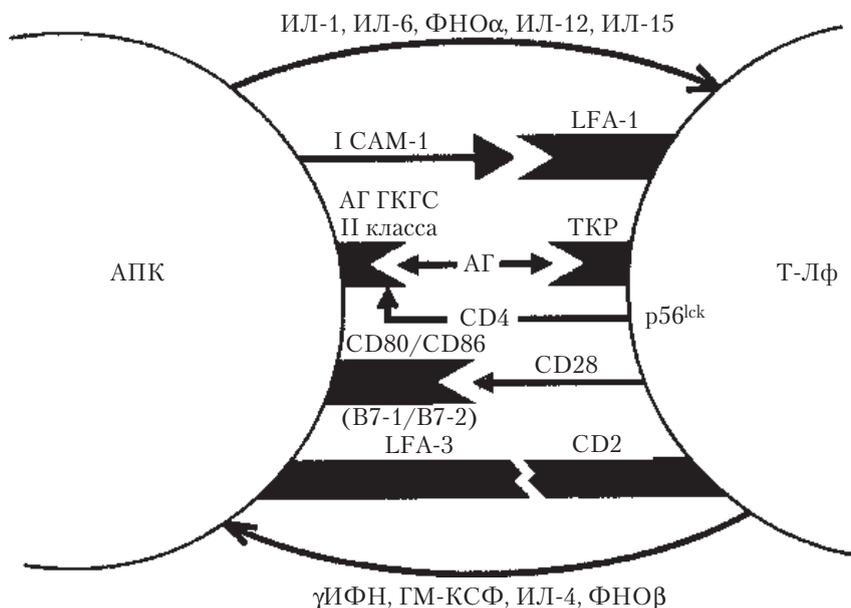


Рис. 2.23. Схема взаимодействия АПК и Т-лимфоцитов [35]

тию их апоптоза, что является важным фактором ограничения иммунного ответа.

Вскоре после открытия межклеточной кооперации при развитии гуморального иммунного ответа было установлено, что хелперная функция Т-лимфоцитов реализуется в двух вариантах: через выделение гуморальных факторов (цитокинов) и посредством прямых контактов между Т- и В-лимфоцитами. При Т-В-кооперации существует двусторонняя направленность сигналов, однако преобладающее направление от Т- к В-клеткам, так как здесь в реакцию вступает В-лимфоцит, а Т-хелпер способствует этому (рис. 2.24). При этом типе кооперации главная роль принадлежит взаимодействию пары молекул: CD40 L (CD 154) Т-клеток.

Таким образом, при взаимодействии АПК и Т-хелперов происходит взаимодействие двух типов костимулирующих молекул — CD28 и CD154 «со стороны» Т-хелперов и соответственно CD80/CD86 и CD40 «со стороны» АПК. При обоих типах взаимодействий генерируются двусторонние сигналы, но главная роль при-

надлежит, в случае взаимодействия CD28-CD80/CD86, сигналу, направленному от АПК к Т-хелперу; в случае взаимодействия CD40 — CD154 — от Т-хелпера к АПК. Последний сигнал — основной костимулирующий сигнал при включении ответа В-лимфоцитов при участии Т-хелперов. В каждой из этих пар одна молекула (CD80 и CD154) не экспрессируется на поверхности покоящейся клетки и индуцируется в процессе ее активации. Сигналом к экспрессии CD154 служит узнавание рецептором TCR комплекса МНС-II с АГ пептидом, а CD80 экспрессируется вследствие взаимодействия CD40 — CD154.

Функциональные последствия Т-В-кооперации также обусловлены взаимодействием не только CD40 — CD154, но и CD28 — CD80/CD86. В обоих случаях сигналы поступают в обе клетки, но последствия этих сигналов не равнозначны. Сигнализация через CD28 более важна для Т-хелперов, а через CD40 — для активации В-лимфоцитов.

Стабилизация межклеточного взаимодействия в процессе взаимосвязи рецепто-

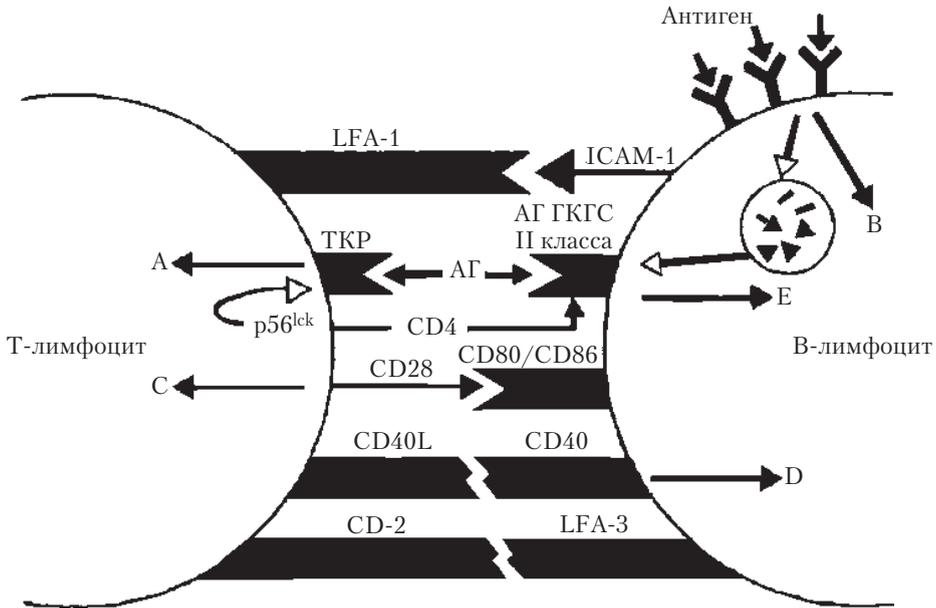


Рис. 2.24. Схема взаимодействия Т- и В-лимфоцитов [35]

ра TCR комплекса МНС — пептид антигена достигается благодаря установлению связей между адгезивными молекулами поверхности взаимодействующих молекул. Адгезивные молекулы могут служить источником сигнала для клетки, но эта функция вспомогательная, так же как адгезивные свойства корцепторов CD4 и CD8. Указанные типы взаимодействия характерны лишь для двух пар молекул адгезии из большого числа присутствующих на поверхности клеток иммунной системы. За осуществление первичного контакта ответственны молекулы CD2 и CD58, которые в свое время идентифицированы как молекулы, связанные с функцией лимфоцитов (*lymphocyte function associated* — LFA). Обе молекулы относятся к подсемейству ракоэмбрионального АГ суперсемейства Ig, для которых характерно присутствие в молекуле доменов  $\xi V$  и C2. Молекулы CD2 экспрессируются на покоящихся Т-лимфоцитах, а CD58 на клетках различных типов.

Эффективность взаимодействия этих молекул очень низкая, но благодаря высо-

кой плотности их экспрессии взаимодействие между ними временно удерживает клетки на близком расстоянии. Взаимодействие CD2–CD58 способствует также зарождению сигнала от TCR.

Вторая пара —  $\beta_2$ -интегрин (LFA-1) и относящаяся к суперсемейству интегринов молекула ICAM-1 — отвечает за стабилизацию взаимодействия TCR с комплексом МНС-АГ — пептид. Следует отметить, что ICAM-1 появляется на АПК лишь после их начальной активации вследствие контакта CD40 и CD158. Молекула LFA-1 экспрессируется на покоящихся лимфоцитах, но средство со своими лигандами приобретает только в результате «активации», происходящей после связывания TCR. Взаимосвязывание этих молекул также служит источником сигнализации. Особенно важны сигналы, посылаемые в АПК через молекулу ICAM-1.

Связывание молекулы CD28 усиливает экспрессию на Т-клетках  $\beta_1$ -интегринов VLA-4 и VLA-5, которые необходимы на поздних этапах активации Т-лимфоцитов. Значение в кооперации АПК — Т-хелперы

и Т- В-лимфоциты других молекул адгезии (L-сегментов, молекул CD5, CD6, CD7, CD143, CD45) до конца не изучено.

Описанные межмолекулярные взаимодействия клеток осуществляются при нормальном ответе, в основе которого происходит активация лимфоидных клеток. При селекции клонов лимфоцитов и индукции анергии молекулярные механизмы межклеточных взаимодействий иные.

Таким образом, распознавание АГ специфическими рецепторами лимфоцитов не способно само по себе обеспечить полноценный ответ клетки. Это лишь «указание», какому клону лимфоцитов предстоит участвовать в иммунном ответе. Лимфоцит стоит перед выбором между различными вариантами ответной реакции на АГ стимул. Активация лимфоцита становится в равной степени предпосылкой его последующей пролиферации и развития апоптоза. Вслед за пролиферацией идет дифференцировка, которая может осуществляться по различным направлениям. Например, Т-хелперы могут дифференцироваться в клетки типа Th1 и Th2, что приводит к различным формам иммунного ответа. В выборе лимфоцитом типа ответной реакции основную роль играют костимулирующие сигналы. Так, наличие костимуляции, вызванной взаимодействиями CD28 – CD80/CD86 или CD40 – CD154, приводит к активации и последующей пролиферации клетки; отсутствие костимуляции – к анергии или апоптозу [35].

Механизмы защиты Т-хелперов и В-клеток от развития апоптоза в результате контактных взаимодействий в целом известны. Взаимодействие CD28 с CD80 или CD86 приводит к экспрессии в Т-хелпере протоонкогена Bcl-X<sub>L</sub>, защищающего клетку от апоптоза. Взаимодействие молекулы CD40 с CD 154 – к экспрессии в В-лимфоците протоонкогенов Bc2 и Bcl-X<sub>L</sub>.

Причина нарушений межмолекулярных взаимодействий заключается в генетических дефектах. Последствия этих нарушений можно моделировать на мышах путем инактивации соответствующих генов. Опыты показали важность взаимодей-

ствия костимулирующих молекул и высокую избыточность адгезивных взаимодействий. Она обеспечивает отсутствие фатальных последствий удаления гена CD28, инактивации гена CD80 и др. Наиболее чувствительна система CD40 – CD154, что подтверждается отсутствием, например, экспрессии молекулы CD154 и, следовательно, взаимодействия CD40 – CD154. В результате нет переключения изоформ Ig и усиленного мутагенеза V-генов, что в норме происходит в зародышевых центрах при иммунном ответе и служит основой для повышения аффинности антител [37].

Понимание механизмов межмолекулярных взаимодействий при клеточных контактах дает возможность влиять на иммунные процессы. В эксперименте на мышах испытывается растворимая форма CTLA4. Взаимодействуя с CD80 и CD86, он блокирует поступление костимулирующего сигнала в Т-клетку через CD28 и способствует развитию их энергии. Введением CTLA4 достигали длительного приживания островковой ткани при сахарном диабете у мышей, сердечной мышцы у крыс, ослабления реакции «трансплантат против хозяина». Эффект повышался при сочетании CTLA4 с циклоспорином А. В эксперименте испытывается также лечебное действие трансфекции генов костимуляторов CD80 и CD86 в опухолевые клетки для повышения иммуногенности последних.

В последнее время в иммунологических исследованиях все большее внимание уделяется образующимся на поверхности взаимодействующих клеток надмолекулярным комплексам. Как отмечено выше, при взаимодействии АПК и Т-лимфоцита между ними формируется контакт с четкой структурной организацией. В зоне контакта упорядочено и последовательно проходит существенное перераспределение клеточных рецепторов. Такой контакт получил название иммунологического синапса [38]. Использование высокоскоростной микроскопии позволило установить, что диаметр зрелого иммунологического синапса составляет несколько микрон, си-

напс образуется в течение ~ 30 мин и поддерживается несколько часов. Образование иммунологического синапса — многоступенчатый процесс: это не только перераспределение молекул в зоне межклеточного контакта, но и изменение морфологии всей клетки, повышение или падение уровня внутриклеточного кальция, активация определенных групп генов и синтез новых белков. Основные стадии формирования синапса и сопровождающие их события представлены в табл. 2.2.

При образовании синапса в контакт входит довольно большая площадь поверхности клетки. Это обеспечивает высокую avidность связывания клеток. Кроме того, более сильные взаимодействия вспомога-

тельных молекул позволяют проявиться более слабым взаимодействиям молекул в паре TCR-МНС + пептид. Концентрирование АГ, TCR и сигнальных киназ в центре синапса приводит к усилению активации за счет уменьшения времени, необходимого для контакта рецептора со своим антигеном и последующего фосфорилирования рецептора. Установлено, что чем сильнее взаимодействие рецепторов в центре синапса, тем быстрее заканчивается сигналинг. Следовательно, центральный надмолекулярный комплекс не только усиливает активацию, но служит самоограничителем, поддерживая баланс между процессами сигнализации и деградации рецепторов. Ограничивая продолжительность сигнала

Таблица 2.2

Стадии формирования иммунологического синапса [38]

Стадия	Уровень внутриклеточного кальция	Особенности стадии	Временной интервал
Ползущая клетка	Нормальный	Каплевидная форма клетки, TCR рецепторы расположены на заднем, а хемокиновые рецепторы — на лидирующем конце Т-клетки	?
Сканирование	Нормальный	Связывание клеток за счет низкоаффинного взаимодействия LFA-1 с молекулами ICAM-1, рецепторы TCR ищут соответствующий антиген на представляющей клетке	1 мин
Генерация стоп-сигнала	Повышенный	Рецепторы TCR начинают взаимодействовать с антигеном и переходят из уроды в зону межклеточного контакта, рост аффинности молекул LFA-1	?
Кластеризация рецепторов	Очень высокий	Рецепторы TCR образуют небольшие кластеры, с которыми кокластеризуются молекулы CD4, фактор NF-AT транслоцируется из цитоплазмы в ядро	5 мин
Централизация рецепторов	Очень высокий	Кластеры TCR рецепторов сливаются и занимают центральное положение в синапсе, вокруг которого формируется периферическое кольцо из молекул LFA-1	30 мин
Интернализация рецепторов	Нормальный	Поглощение и деградация молекул TCR, прошедших взаимодействие с антигеном	1 ч
Латентность	Сниженный	Сигнализация завершается, костимуляторные молекулы продолжают взаимодействие со своими лигандами	?
Распад синапса	Нормальный	Пролиферация и дифференцировка Т-лимфоцита в эффекторный Т-хелпер	1–2 дня

активации, центральный надмолекулярный комплекс защищает клетку от апоптоза, возникающего при избыточной сигнализации.

В последнее время изучены механизмы распознавания чужеродного материала клетками врожденного иммунитета. Известно, что микроб, проникший в макроорганизм, имеет химические структуры, генетически чужеродные для макроорганизма, и иммунная система последнего должна их отличить от собственных клеток. Оказалось, что клетки врожденного иммунитета осуществляют такое распознавание неспецифически. Они распознают молекулярные структуры, которые встречаются только у микроорганизмов (патоген-ассоциированные молекулярные паттерны — pathogen-associated molecular patterns — PAMP). Структуры паттернов состоят из углеводов, липоидов, белков, нуклеиновых кислот и их различных сочетаний [39; 40]. У многих клеток многоклеточных организмов есть паттерн-распознающие рецепторы (pattern-recognition receptors — PRRs), которые участвуют в опсонизации, активации комплемента и коагуляционного каскада, фагоцитозе, активации провоспалительных сигнальных путей и индукции апоптоза. К PRRs относятся CD14, CD116c/CD18, маннозный рецептор, DEC-205, сквенджер-рецепторы, семейство Toll-рецепторов. Все эти рецепторы, за исключением Toll, участвуют в фагоцитарном процессе. Toll-рецепторы осуществляют активацию клеток иммунной системы [41].

Семейство мембранных Toll-рецепторов как важный компонент защиты организма от инфекций возникло эволюционно давно. Его представители обнаружены у растений, беспозвоночных, позвоночных. У человека идентифицировано более 10 Toll-подобных рецепторов (TLRs- Toll-like receptors), каждый из которых распознает определенный бактериальный паттерн или их группу. Как исключение TLR9 располагается внутриклеточно [42; 43].

Трансмембранные белки TLRs имеют внеклеточный домен (leucine-rich repeat,

LRR) и внутриклеточный Toll/IL-1 рецепторный домен (Toll/IL-1), или TIR-домен. При этом LRR-домен распознает бактериальные паттерны и осуществляет передачу сигнала. TIR-домен — консервативный пептид, осуществляющий белок-белок взаимодействие. Кроме того, TIR-домен входит в состав нескольких цитоплазматических белков, в том числе и двух адапторных сигнальных (MyD88 и TIRAP). Эти белки передают сигнал с TLR [44].

Сигналы, которые передаются с TLR, могут быть «общими» и специфическими. Первые сигналы индуцируются со всех TLR, а вторые — с какого-то одного TLR. В состав общих сигнальных путей входят:

1) адапторные белки: MyD88 и TOLLIP (TOLL-interacting protein); 2) протеинкиназа, IRAK (IL-1 R-associated kinase); 3) адапторный белок, TRAF-6 (TNF-receptor associated factor). Взаимодействие между этими структурами приводит к активации членов многочисленного семейства митоген-активированных протеинкиназ (MAPKs). В конечном итоге активируется ядерный транскрипционный фактор NF-κB. Последний направляется в ядро клетки и взаимодействует с промоторами примерно 120 генов иммунного ответа, вызывая транскрипцию соответствующих иРНК. Таким образом через сигнальные молекулы TLR происходит активация всех клеток врожденного иммунитета [45; 46].

Семейство внутриклеточных рецепторов NBS/LRR, также как и семейство Toll-рецепторов, входит в группу PRRs и состоит из ряда белков, имеющих сходное строение. У человека обнаружены следующие рецепторы этого семейства: NOD (NOD1 и NOD2) NALPs (NALP1-14), IPAFs (IPAF, NAIP), CITTA. Для этих белков характерно наличие трех доменов: С-терминального, центрального NBS и N-терминального, который обеспечивает гомофильное взаимодействие. Каждый из доменов имеет свое функциональное значение. С-терминальный LRR-домен распознает соответствующий лиганд, поступивший в клетку. Мутации в этом домене делают клетку нечувствительной к ряду бак-

териальных веществ. NBS-домен содержит большое количество различных мотивов, ответственных за связывание с нуклеотидами, АТФ, ГТФ. Предполагается, что связывание нуклеотидов с NBS-доменом и олигомеризация молекулы NBS/LRR белка — необходимое условие для передачи сигнала, идущего от LRR-домена. N-домен белков NOD, NALPs, CAPD и PYD идентичны TIR-домену TOLL-рецепторов и обеспечивают гомофильное взаимодействие с другими внутриклеточными молекулами, содержащими такой же мотив. CAPD и PYD относятся к доменам смерти, участвующим в апоптозе и воспалении. Так, CAPD-домен обнаружен в проапоптотических белках типа каспазы 1 и 9. CAPD-домен NOD-рецептора взаимодействует с CAPD-доменом адапторного белка Rip 2, который активирует транскрипционный фактор NF-κB. Последний включает гены воспаления и иммунного ответа. PYD-домен участвует в формировании воспалительного процесса. Он входит в состав белка пирина. Его мутация ведет к развитию наследственной лихорадки. N-терминальный активационный домен рецептора СИТА участвует в экспрессии генов *МНС-II* [47; 48].

Наиболее хорошо изучены NOD-рецепторы: NOD1 содержит один CAPD-домен, а NOD2, соответственно, два CAPD-домена. Одно из ключевых событий в активации клетки и развитии провоспалительных сигналов — это олигомеризация NOD-рецептора, что, в конечном итоге, приводит к активации фактора NF-κB. Эти процессы наблюдаются при инфицировании клеток. Например, при внедрении в эпителиальные клетки кишечника вирулентных штаммов *Sh. flexneri* наблюдается олигомеризация NOD1 и последующая активация NF-κB. При индукции в этих клетках NOD2-рецептора происходит избыточная продукция TNF-α и IFN-γ, что может привести к развитию воспалительного процесса [49; 50].

NOD-рецепторы взаимодействуют с различными бактериальными лигандами. К последним относятся пептидогликаны

(PG) стенки бактерий — классические представители PAMP. Пептидогликаны — уникальные молекулы, встречающиеся только у прокариот. Причем клеточная стенка у грамположительных и грамотрицательных бактерий имеет существенные различия. NOD1-рецептор распознает PG-мотив грамотрицательных бактерий. В этом трипептиде концевой является уникальное соединение — мезо-диаминопимелиновая аминокислота (ДАП), которая встречается только у грамотрицательных бактерий. У грамположительных бактерий в этом же положении располагается N-лизин. NOD1-рецептор его не распознает. NOD2-рецептор активируется нуклеиндипептидным мотивом PG, то есть этот рецептор может активироваться как грамположительными, так и грамотрицательными бактериями.

Из-за того, что эпителий слизистых оболочек кишечника — первый барьер для микроорганизмов внешней среды, NOD-рецепторы играют важную роль в защите от инфекций, индуцируя продукцию провоспалительных цитокинов.

Структурные нарушения NOD-рецепторов, приводящие к изменению в их работе, чреваты тяжелыми последствиями для человека. В результате мутаций в *NOD*-гене возникает болезнь Крона. Мутации (сдвиг рамки считывания, миссенс-мутации, преждевременный стоп-кодон) в *LRR*-домене приводят к образованию неполноценного белка, который не может взаимодействовать с PG бактериальной стенки и активировать сигнальные пути для NF-κB. Напротив, миссенс-мутация в *CARD*-домене ведет к образованию белка, склонного к повышенной индукции образования NF-κB, что способствует развитию Вlaw-синдрома (кожная сыпь, увеит, артриты). Мутации в *СИТА*-гене становятся причиной синдрома голых лимфоцитов 2-го типа, не способных экспрессировать молекулы *МНС-II*. Такой дефект проявляется тяжелым иммунодефицитом в виде хронических инфекционных процессов в раннем детском возрасте [48; 51].

В настоящее время известны основные молекулярно-генетические процессы, обеспечивающие взаимодействие врожденного и адаптивного иммунитета. Профессиональные АПК — дендритные клетки (ДК) и макрофаги (МФ) — это главные и единственные клетки, участвующие во взаимодействии врожденного и адаптивного иммунитета. Они распознают чужеродный материал, процессируют и презентуют его клеткам адаптивного иммунитета (В-клеткам, CD4<sup>+</sup>-Т-хелперам, CD8<sup>+</sup>-киллерам), инициируя развитие адаптивного иммунитета.

При взаимодействии с микробной клеткой в АПК протекают два взаимосвязанных процесса, которые индуцируются различными структурами патогена: процесс поглощения микроорганизма с помощью Fc-рецепторов (CD16, CD32, CD64) и лектиноподобных рецепторов (CD207, CD205) и процесс активации — с помощью поверхностных (TLR) и внутриклеточных (NOD) рецепторов. Вследствие первого процесса бактериальные белки поступают в эндосомальное отделение АПК, процессируются и образовавшиеся бактериальные пептиды в комплексе с молекулами HLA-DR презентуются на клеточной поверхности. В результате второго процесса усиливается экспрессия костимулирующих молекул, формирующих тесный контакт между АПК и Т-клеткой, что обеспечивает сигнализацию для специфической активации Т-клеток и синтеза провоспалительных цитокинов, которые активируют соответствующие клетки [52].

## **2.4. Молекулы клеточной адгезии человека**

Взаимодействие клеток между собой и с окружающим их внеклеточным матриксом обуславливает существование и функционирование многоклеточного организма. Такие взаимодействия осуществляются посредством большого разнообразия

молекул клеточной адгезии. Мембранные молекулы, вовлеченные в процессы адгезии, разделяются на четыре суперсемейства: иммуноглобулины, селектины, кадгерини и интегрины.

### ***Суперсемейство иммуноглобулинов.***

Для всех молекул этого суперсемейства характерно наличие типичного, подобного по структуре Ig внеклеточного домена, достаточно варибельного (рис. 2.25).

К представителям этого семейства относятся рецепторы, состоящие из двух Р-субъединиц, соединенных S=S-связями: рецептор Т-клеток (TCR), CD3, CD4, CD8, антигены МНС I и II класса; а также из одной β-субъединицы: ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1, NCAM, LFA-2, LFA-3.

Молекулы NCAM (neural cells adhesion molecule); D2; BSP-2; CD56 участвуют в межклеточной адгезии клеток различных типов, но наиболее существенна их роль в росте и дифференцировке нервной ткани. Внеклеточная часть имеет пять Ig-подобных доменов, сходных с С-доменом Ig. В адгезии NCAM участвует по гомотипическому типу (NCAM — NCAM), ведущую роль при этом играют домен — домен взаимодействия. Одна из основных функций NCAM — участие в формировании синапсов [53].

С началом миелинизации MAG (myelin associated glycoprotein) появляется на олигодендроцитах и в ходе этого процесса экспрессия антигена усиливается. В сыворотке крови больных периферической нейропатией появляются аутоантитела к MAG, и титр их нарастает с прогрессирующей демиелинизацией.

В адгезии нейрон-нейрон, нейрон-глия участвует L1 (NgCAM — neuroglial cell adhesion molecule). Он имеет область, гомологичную RGD-повторам. RGD-трипептид (Арг-Глу-Асп) впервые обнаружен в молекуле фибронектина. Этот домен определяет связывание с фибронектиновым рецептором. Два слившихся RGD-повтора включают в себя Ig-подобные домены, поэтому L1 участвует в самых разнообразных процессах на клеточной поверхности.

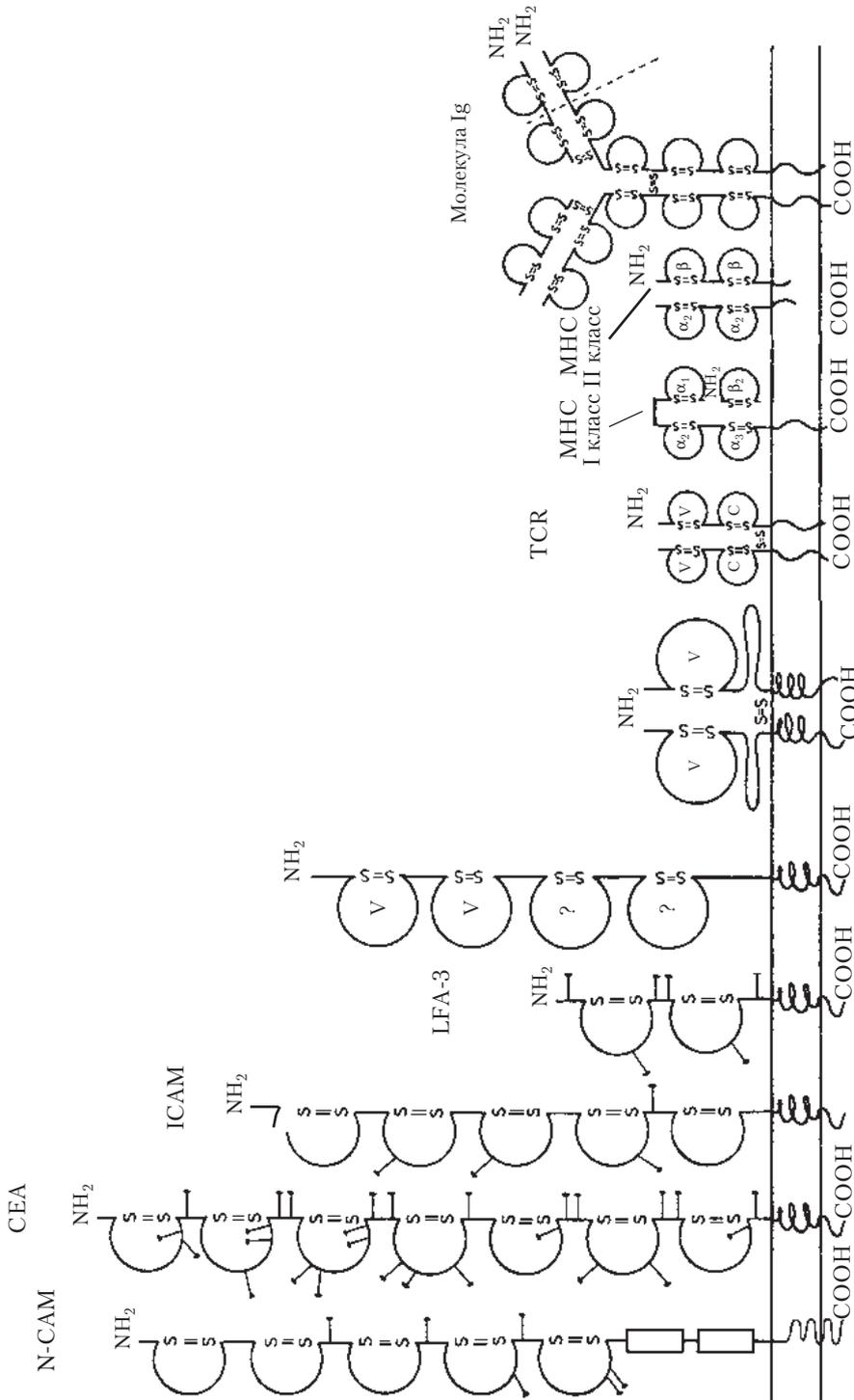


Рис. 2.25. Схема строения молекул суперсемейства иммуноглобулинов [10]

CD-антигены — молекулы адгезии, относящиеся к Ig-подобным белкам, имеют большое значение в иммунологических реакциях. Они участвуют в выполнении контактов Т-лимфоцитов с клетками-мишенями. Наиболее полно процессы взаимодействия между молекулами изучены на Т-хелперах и Т-киллерах. Как отмечено выше, антигены МНС разделяются на два (I и II) класса. АГ-МНС I класса связывают пептиды эндогенного происхождения (в том числе вирусные пептиды, синтезирующиеся зараженной клеткой) и распознаются Т-киллерами. АГ-МНС II класса связывают пептиды, имеющие экзогенное происхождение, и распознаются Т-хелперами.

Антигены CD4 и CD8 имеют значение в процессе дифференцировки предшественников Т-лимфоцитов. В тимусе незрелые Т-лимфоциты экспрессируют CD4- и CD8-антигены, а затем в зависимости от взаимодействия с МНС I или II класса формируются лимфоциты CD8<sup>+</sup> или CD4<sup>+</sup>.

На всех Т-лимфоцитах экспрессируется антиген CD2 (lymphocyte function associated antigen-2 — LFA-2), лигандом для которого служит CD58 (LFA-3), относящийся к суперсемейству Ig. Регуляция адгезии с участием АГ CD2 и CD58 наиболее полно проявляется в процессе розеткиобразования.

ICAM-1 (CD54) и ICAM-2 (intercellular adhesion molecule — CD 102) также относятся к суперсемейству Ig. Они содержат одну  $\beta$ -субъединицу и близки по структуре к NCAM. Лигандом для них служит LFA-1 (CD11a) — молекула адгезии из семейства интегринов.

Обнаружены ICAM-2 на эндотелии, мышечных клетках, фибробластах человека, ICAM-1 — на клетках красной пульпы синусов селезенки, дендритных клетках лимфоидных фолликулов, кортикальном и медуллярном эпителии тимуса и миндалин. Усиление экспрессии ICAM-1 происходит на клетках, участвующих в воспалительных процессах. Индуктором экспрессии ICAM-1 служат медиаторы воспаления: IFN $\gamma$ , IL-1. Увеличение экспрессии

ICAM-1 на эндотелии капилляров в области воспаления под влиянием медиаторов приводит к усилению инфильтрации в зону воспаления нейтрофилов и моноцитов, экспрессирующих лиганд для ICAM-1, — LFA-1. Путем взаимодействия ICAM-1 — LFA-1 лейкоциты вовлекаются в воспалительный процесс. Взаимодействие этих молекул играет ведущую роль в осуществлении функций цитотоксических Т-клеток (CD8<sup>+</sup>), Т-хелперов (CD4<sup>+</sup>), в антителозависимом киллинге нормальными киллерами (NK-клетками) и гранулоцитами; ICAM-2 также принимают участие в воспалительных процессах.

Поверхностный гликопротеид ICAM-3 представляет собой Ig-подобную молекулу, содержит пять доменов C2-типа. Он экспрессирует малые В- и Т-лимфоциты, все тимоциты и является третьим лигандом для LFA-1 [54].

**Суперсемейство селектинов.** На клеточной мембране были обнаружены высокогликолизированные белковые молекулы, определяемые до недавнего времени как рецепторы хоминга лимфоцитов, и белки, индуцированные активацией лимфоцитов и эндотелия. Исследования показали, что они структурно родственны между собой. Каждый из них имеет лектиновый домен на N-конце, за которым идут множественные копии согласованно повторяющихся единиц, характерных для комплементсвязывающих белков, трансмембранный и короткий цитоплазматический участки.

В хромосоме 1 есть тесно связанные гены, кодирующие три белка с подобной структурой. По строению эти гены очень близки и образуются, очевидно, путем дупликации.

Описанные белки участвуют в межклеточных взаимодействиях. Их выделили в отдельное суперсемейство рецепторов клеточной адгезии — селектины. Известны три селектина: L, P, E; L-селектин (LERAM-1, LAM-1, Leu-8, TQI, MEL1) экспрессирован на лимфоцитах и функционирует в качестве рецептора хоминга лимфоцитов в лимфатические узлы; P-селек-

тин (GMP-140, PADGEM) экспрессирован на активированных тромбоцитах и активированных эндотелиальных клетках. Осуществляет адгезию лейкоцитов в участках тромбообразования и повреждения сосудистой стенки; E-селектин (ELAM-1) экспрессирован на поверхности активированных эндотелиальных клеток. Он участвует в адгезии активированного эндотелия к нейтрофилам и является  $Ca^{2+}$ -зависимым лектином.

Одним лигандом для всех селектинов служит CD 15s (сиалил-Lewis x) — углеводный компонент, экспрессирующийся на гранулоцитах, моноцитах, но не на лимфоцитах.

Суперсемейство селектинов отнесено к кластеру дифференцировки (cluster of designation) CD62. L-селектин обозначен CD62L, P-селектин — CD62 P и E-селектин — CD62 E.

**Суперсемейство кадхеринов.** Молекулы этого суперсемейства относятся к  $Ca^{2+}$ -зависимым молекулам адгезии. Они осуществляют адгезию по типу клетка-клетка в процессе эмбриональной дифференцировки.

Суперсемейство включает три вида молекул: E(LCAM); N(A-CAM); P. Все они — самостоятельные по структуре белки и проявляют не более 50 % гомологии. В их молекулах гомологичны большие по длине цитоплазматические домены, которые ассоциируются с актиновыми филаментами. Доказана их ведущая роль в регуляции морфогенеза. У взрослых организмов кадхерины выявлены в эпителиальных тканях.

**Суперсемейство интегринов.** Интегрины — поверхностные клеточные белки, которые запускают адгезию клеток, взаимодействуя с некоторыми белками матрикса. Название этих белков отражает их роль в интеграции между внутриклеточным цитоскелетом и экстрацеллюлярным матриксом. Они выполняют самые разнообразные функции. Так, интегрины лейкоцитов обеспечивают вместе с другими молекулами адгезию, миграцию лейкоцитов из кровотока в ткани, играют важную роль

в агрегации тромбоцитов, иммунологических процессах, метастазировании, дифференцировке тканей, их восстановлении и др. Мутации генов интегринов приводят к тяжелым заболеваниям человека.

Интегрины — суперсемейство гликопротеинов. Их молекулы состоят из  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц. В образовании лигандсвязывающего участка принимают участие обе субъединицы. Различают более 10 типов  $\alpha$ -субъединиц и 9 типов  $\beta$ -субъединиц. Комбинируясь, они формируют около 20 известных интегриновых молекул. В зависимости от типа  $\beta$ -субъединицы они разделяются на три семейства:  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ .

Семейство  $\beta_1$  составляют рецепторы (VLA-1 — VLA-6 или, соответственно, CD49 $\alpha$  — CD49 $\beta$ ), которые обеспечивают связывание клеток с белками экстрацеллюлярного матрикса (фибронектином, ламинином, коллагеном). Они экспрессируются на различных клетках, в том числе на лимфоцитах. Все эти молекулы состоят из одинаковых  $\beta_1$ -субъединиц и уникальной для каждого  $\alpha$ -субъединицы.

VLA-интегрины принимают участие в адгезии, миграции клеток, передаче сигналов по типу клетка-клетка; клетка-матрикс в гемопоэтических, иммунологических, коагуляционных процессах. Экспрессируются  $\beta_1$ -интегрины на лейкоцитах после прохождения этих клеток через эндотелиальный барьер в местах локализации инфекции.

Семейство  $\beta_2$  состоит из молекул, содержащих общую для них всех  $\beta_2$ -субъединицу (CD18) и нековалентно связанную с ней уникальную для каждого интегрин  $\alpha$ -субъединицу.

Субъединица  $\alpha_L$  (CD11a — LFA-1) экспрессируется преимущественно на лимфоцитах и участвует в киллинге клеток-мишеней NK-клетками и цитотоксическими лимфоцитами; во взаимодействии лейкоцитов и эндотелия; агрегации гранулоцитов и моноцитов. Контррецепторы для CD11a — ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3.

Субъединица  $\alpha_M$  (CD11b) экспрессируется в основном на клетках миелоидного ряда, а также NK-клетках, активированных

лимфоцитах. Участвует во взаимодействии миелоидных клеток и эндотелия, связывает растворимые лиганды (компонент комплекса С3bi, фактор X, фибриноген), запускает адгезию нейтрофилов к эндотелию, проникновение их сквозь клетки эндотелия сосудов к месту воспаления, хемотаксис лейкоцитов. Контррецепторы для CD11b — С3bi, фибриноген, ICAM-1, фактор X.

Субъединица  $\alpha_N$  (CD11c) встречается на моноцитах и тканевых макрофагах, ретикулярных клетках, гранулоцитах, НК-клетках, цитотоксических Т-лимфоцитах. Она участвует в адгезии нейтрофилов и моноцитов. Контррецептор для CD11c — С3bi. Больные с дефектами по этим рецепторам погибают от инфекций, так как нейтрофилы не реагируют на хемоаттрактанты и не связываются с эндотелием сосудов в местах инфекции.

Субъединица  $\beta_2$  (CD18) — общий составной элемент для всех молекул этого семейства. Этот антиген экспрессируется на всех клетках, несущих антигены CD11. Ген, кодирующий этот белок, находится в хромосоме 21. При генетическом дефекте возникает иммунодефицит LAD (leukocyte adhesion deficiency), проявляющийся снижением или дефектностью миграции лейкоцитов из кровотока в ткани, что затрудняет борьбу с инфекцией.

Семейство  $\beta_3$  включает в свой состав молекулы, также состоящие из двух субъединиц.

VNR (CD51/CD61) состоит из  $\alpha_V$ -субъединицы (CD51) и  $\beta_3$ -субъединицы (CD61). Рецептор тромбоцитов gpIb/IIIa (CD41a) связывает тромбоциты через RGD-сайт фибриногена. Он образован  $\alpha$ -субъединицей gpIIb (CD41b) и  $\beta_3$ -субъединицей gpIIIa (CD61). Это единственный интегрин, который способен связываться со многими лигандами. В агрегации тромбоцитов первичными лигандами для CD41a функционируют фибриноген и фактор фон Вилленбрандта, но этот интегрин может связываться и с фибронектином, витронектином [53].

Как уже отмечалось, для одних интегрин лигандами служат белки экстрацел-

люлярного матрикса, другие интегрины связываются с мембранными белками клетки. Участком связывания на белках экстрацеллюлярного матрикса и белках адгезии на тромбоцитах для интегринов является трипептид RGD. Интегрин либо распознает этот сайт, либо не связывается с ним.

Некоторые интегрины моноспецифичны и имеют по одному лиганду, тогда как другие могут связываться с двумя и более лигандами. Для этого суперсемейства характерно также то, что его система рецептор — лиганд отличается перекрестным реагированием различных рецепторов с одним и тем же лигандом.

Интегрины могут существовать в активной и неактивной формах. Сигналы, активирующие интегрины, зависят от типа клеток. Так, на Т-лимфоцитах TCR, антигены CD7, CD28, CD31, CD44 — активаторы интегринов. Молекулы интегринов могут активироваться непосредственным взаимодействием с лигандом. Интегрины могут также быть передатчиками сигналов внутрь клетки. В этом качестве они, вероятно, выступают как ко-стимуляторы, синергичные с другими рецепторами клетки.

## **2.5. Эволюция суперсемейства иммуноглобулинов и формирование эффективной системы иммунологического распознавания**

В 60-е годы XX в. сложилось мнение, что способность синтезировать Ig свойственна только позвоночным животным. В последующем была установлена доменная организация Ig, у млекопитающих обнаружены свободные однодоменные белки ( $\beta_2$  микроглобулин, антиген Thy-1

(CDw90)), которые имеют выраженную гомологию с Ig. Это дало возможность предположить, что предковым белком для всех Ig был однодоменный прототип и такой белок должен быть у животных, находящихся филогенетически ниже уровня позвоночных.

В 80-е годы XX ст. в многочисленных исследованиях было показано, что Ig не одиноки в организме, а являются лишь членами большой группы белков, состоящей более чем из 20 Ig-подобных молекул, многие из которых выполняют не только иммунологические функции.

Как уже отмечалось, основными критериями принадлежности белков к суперсемейству служат доменная организация молекул и статистически достоверная гомология с известными Ig. Каждый домен Ig представляет собой двухслойное молекулярное образование, построенное по принципу нескольких антипараллельных  $\beta$ -структур, стабилизированных  $-S=S-$  связями. Все изученные домены делятся на группы по последовательности их аминокислотных остатков: V, C1, C2. В группу V входят переменные домены изотипов Ig и антигенраспознающих TCR. Группа C1 состоит из константных частей Ig, C-доменов TCR и доменов антигенов МНС. Группу C2 составляют домены клеточных рецепторов и свободных белков, обеспечивающих главным образом адгезивные процессы [10].

В суперсемейство Ig входят и однодоменные белки — дифференцировочный антиген Thy-1 (CDw90), P<sub>0</sub>-белок миелина и  $\beta_2$ -микроглобулин ( $\beta_2$ M). По последовательности аминокислотных остатков Thy-1 и P<sub>0</sub> сходны с V-доменом Ig, а  $\beta_2$ M — с C-доменом Ig.

Вероятно, он дал начало двум генам, от которых шла эволюция V- и C-доменов антигенраспознающих структур. Последующие дубликации с увеличением изменчивости переменных и константных генов привели к большому разнообразию доменов [55].

Пока еще трудно воспроизвести точную схему филогенетических связей между

доменами суперсемейства. По мере накопления экспериментальных данных в ней заполняются существующие пробелы и определяется филогенетический уровень, с которого идет формирование соответствующих структур (рис. 2.26). Во всяком случае с большой степенью вероятности можно предположить, что примитивные полудоменные и однодоменные молекулы древних многоклеточных служили для адгезии с примитивными функциями узнавания «своего». В процессе эволюции молекулы суперсемейства усложнялись и специализировались, что привело к резкому уменьшению времени для узнавания «своего» и «чужого», при этом достигалась высокая специфичность за счет появления нескольких групп поверхностных рецепторов клеток, имеющих высокую гетерогенность.

## 2.6. Молекулярно-генетические основы эволюции иммунной системы

Адаптивный иммунитет отличается от естественного иммунитета способностью к специфическому распознаванию антигенов, что обусловлено чрезвычайным разнообразием АГ-распознающих рецепторов. Такое разнообразие обеспечивается генетическими особенностями кодирования Ig и TCR. Их молекулы кодируются не одним целостным геном, а собирающимися отдельными генными сегментами. Рекомбинация этих сегментов осуществляется благодаря функционированию сложного рекомбинационного аппарата, представленного генами *RAG* (*recombination activating genes*). На генетическом уровне антигенраспознающий аппарат формирует сложный комплекс, состоящий из рекомбиназ *RAG* и огромного разнообразия генных сегментов, кодирующих различные участки молекул АГ-распознающих рецепторов. Возник этот комплекс в эволюционном

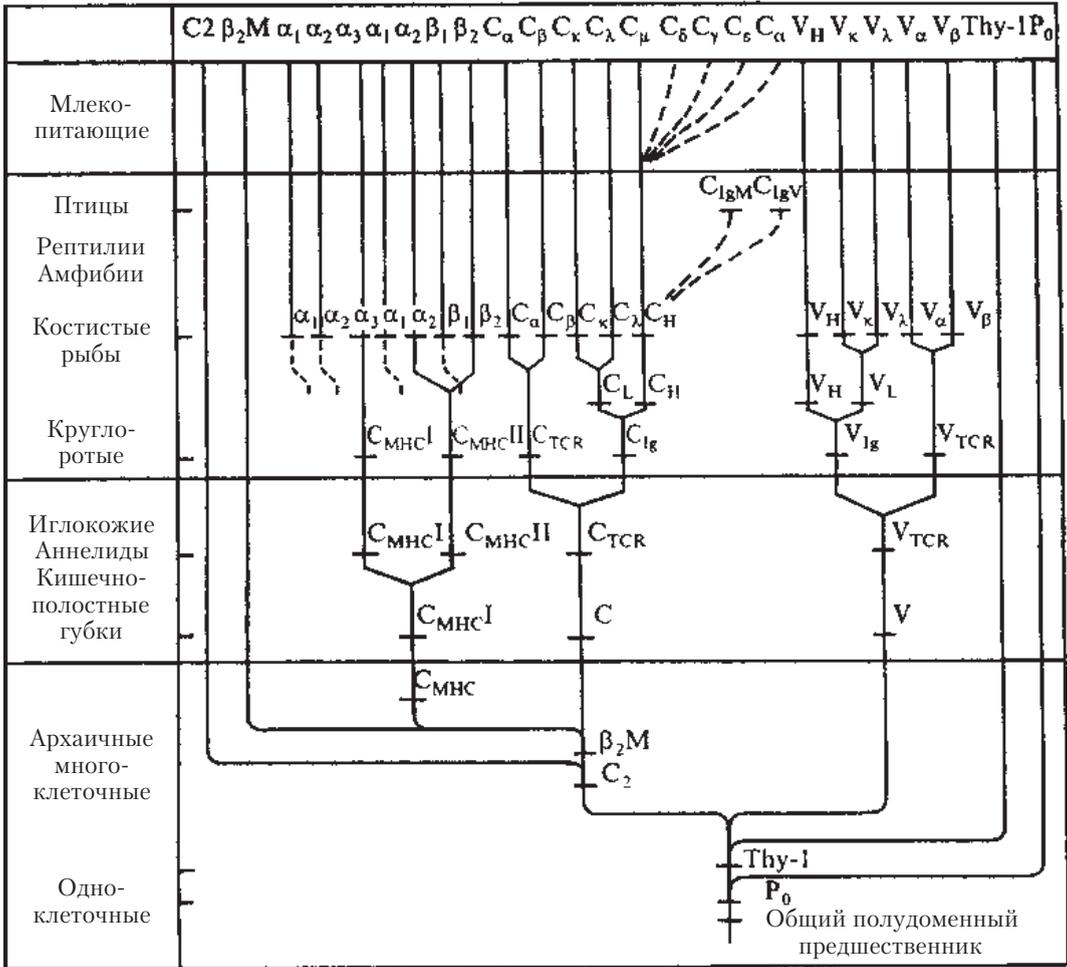


Рис. 2.26. Филогенез доменов суперсемейства иммуноглобулина в процессе филогенеза животного мира [10]

плане относительно недавно (450 млн лет назад) у предков челюстноротых позвоночных, древнейшие представители которых — хрящевые рыбы (акулы, скаты) живут и ныне. У челюстноротых впервые обнаруживается набор генов, характерных для адаптивного иммунитета (гены *Ig* и *RAG*). Гомологов *RAG* у бесчелюстных позвоночных нет. Предполагается, что гены *RAG* попали в гены челюстноротых в результате горизонтального переноса, опосредованно, вероятно, ретровирусами. В последующем их экспрессия была согласована с более старыми механизмами активации кле-

ток. В пользу такого предположения следует отнести отсутствие *RAG*-генов у более низкоорганизованных эукариот и их наличие в геноме прокариот. Кроме того, гены *RAG* у позвоночных не имеют интронов, примыкая непосредственно друг к другу, что характерно для прокариот.

Адаптивная иммунная система имеет также гены, принадлежащие к семейству *Ig*. Продукты этих генов специфически распознают АГ иммунными клетками на молекулярном уровне. К семейству *Ig* относятся гены, кодирующие различные по структуре и функциям белки, включая

гены *MHC*,  $\beta_2$ -микроглобулина, *Ig* и др. [55].

Разнообразие молекул самостоятельных белков суперсемейства *Ig*, имеющих структурную гомологию с *V*- и *C*-доменами *Ig*, возникло в процессе длительной эволюции. Предполагается, что их предшественником был предковый однодоменный белок, предшественником которого, в свою очередь, был полудоменный белок, включающий  $\beta$ -структуру одного из слоев современного *V*-домена. Пространственное единообразие и выраженная гомология между доменами белков суперсемейства *Ig* дают возможность полагать, что они контролируются сложными генами, возникшими как следствие тандемных дупликаций исходного гена однодоменного белка. Молекулярная эволюция генов *Ig*, вероятно, происходила следующим образом (рис. 2.27). При дупликации предкового гена образовались *V* и *C* гены, разделенные интроном (1–4 т. п. н.). В результате дупликации гена *C* образовался *C1*-домен, расположенный вне *V-G* кластера. Он дал

начало генам, кодирующим молекулы *MHC* I и II класса и  $\beta_2$ -микроглобулина. В последующем, вследствие горизонтального переноса генов, опосредованного ретровирусами, в интрон, разделяющий *V*- и *C*-гены, встраиваются *J*-мини-гены и рекомбинационные сигнальные последовательности (*RSS*). Одновременно был перенесен также и рекомбинационный аппарат (*RAG*), что создало условия для рекомбинации и дупликации генов. Последующая дупликация и видоизменения *V*- и *C*-кластера, дупликация *C*-гена и вставка *D*-сегментов с соответствующим *RSS* привели к возникновению *P*-цепи *Ig*,  $\beta$ - и *S*-цепей *TCR*. Затем множественные дупликации и мутации способствовали образованию большого числа подобных кластеров. Таким образом, в ходе эволюции возникло мультигенное семейство *Ig*, гены которого кодируют различные по структуре и функции молекулы [13].

Накопленные к настоящему времени данные позволяют заключить, что по мере усложнения организации многоклеточных

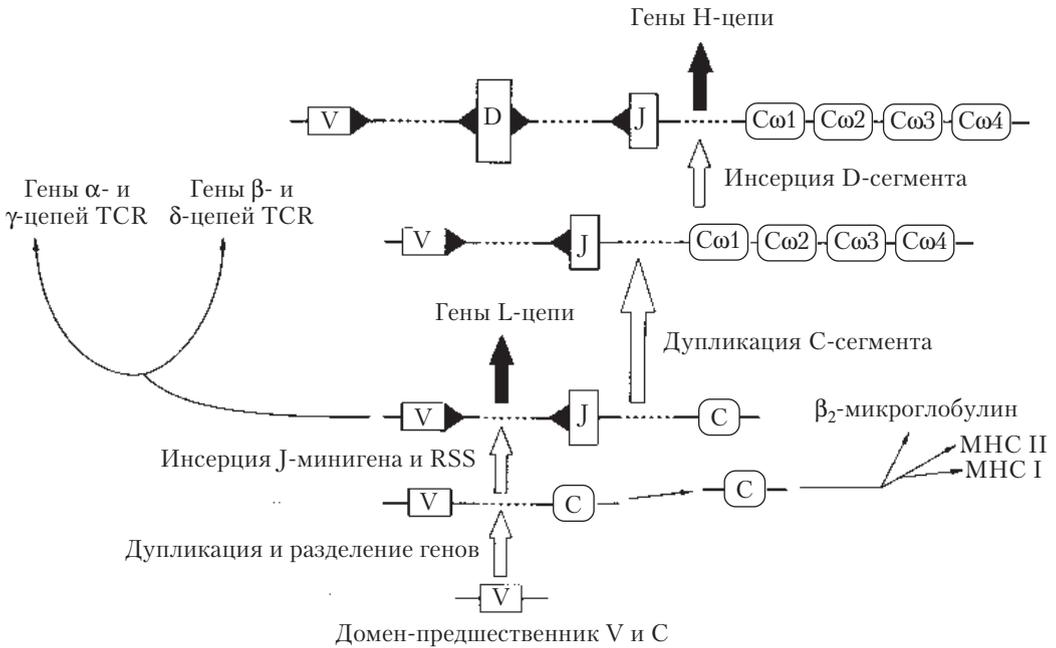


Рис. 2.27. Молекулярная эволюция генов *Ig* [13]

эукариот распознавание своего и чужого осуществлялось по принципу «что не свое — чужое». Предполагается, что начало АГ-распознающим рецепторам могли дать молекулы межклеточной адгезии, например, кадгерина. Сначала распознавалось не чужое, а отсутствие своего. В ходе эволюции появились механизмы, которые позволяли специфически распознавать крупные классы патогенов, такие как грибки, грамположительные и грамотрицательные бактерии. Специфическое распознавание АГ возникло с появлением системы адаптивного иммунитета. Важную роль в ее внезапном появлении и становлении сыграл вирус-опосредованный горизонтальный перенос генов рекомбинационного аппарата. О важной роли этого аппарата в жизнедеятельности организма свидетельствует его эволюционная консервативность. Так, последовательности, характерные для генов Ig, есть в геноме нижестоящих организмов, в том числе и у прокариот: последовательности, подобные S-участкам переключения Р-цепей Ig млекопитающих, есть в геноме дрожжей, морских ежей, дрозофилы; в генах Ig представлены последовательности, идентичные  $\chi$ -сайтам — «горячим точкам» рекомбинаций, различных эукариот и прокариот.

Таким образом, появление рекомбинационного аппарата создало возможность для существенных перестроек генома. Вследствие массовых дупликаций и мутаций генов возникло большое число новых генов, включая гены АГ-распознающих рецепторов. Часть из них прошла естественный отбор и продолжила видоизменяться, положив начало рецепторам комбинаторного типа (Ig и TCR), которые играют существенную роль в распознавании АГ и реализации иммунного ответа у большинства позвоночных, в том числе и человека [13].

## 2.7. Система цитокинов

Цитокины — это белки иммунной системы, которые вырабатываются преимущественно ее активированными клетками.

Они лишены специфичности в отношении АГ и выступают медиаторами межклеточных взаимодействий при формировании иммунного ответа, процессах гемопоэза, воспаления, а также взаимодействий системы иммунитета с другими регуляторными и эффекторными системами организма. Сначала предполагалось, что каждый из цитокинов обладает определенной свойственной ему функцией. После выделения многих из них в чистом виде было установлено, что каждая молекула выполняет несколько различных, часто перекрывающихся синергичных или антагонистичных функций. Для взаимодействия с цитокином клетка должна обладать соответствующим для него рецептором.

Цитокины разделяются на несколько групп. Деление это весьма условно, границы между группами нечеткие:

1. Интерлейкины (IL) — факторы взаимодействия между лейкоцитами.
2. Интерфероны (IFN) — факторы, обладающие противовирусной активностью, более специфичны, чем другие цитокины.
3. Факторы некроза опухоли (TNF).
4. Колонистимулирующие факторы (KSF) — цитокины, воздействующие на гемопоэз.
5. Хемокины (ХК) — факторы, привлекающие клетки в очаг воспаления.

6. Другие цитокины, обладающие ростовым или супрессорным действием на различные клетки. Только некоторые из них могут иметь отношение к клеткам иммунной системы.

К настоящему времени индивидуальное строение, химические функции, эффекты *in vitro* для каждого цитокина достаточно хорошо изучены. Однако *in vivo* проявление цитокинов очень отличается от их действия *in vitro*. В организме все цитокины тесно взаимосвязаны и образуют единую систему — цитокиновую сеть, в которой биологический эффект каждого цитокина существенно модифицируется. Система цитокинов многогранна в своей работе, но руководствуется при этом следующими основными принципами: индуцибельность, в норме локальное функциони-

рование, избыточность, взаимосвязанность и взаимодействие компонентов [56].

Гены цитокинов будут экспрессироваться только при поступлении сигнала с промотора, который генерируется в процессе активации клетки. Следовательно, цитокины не должны продуцироваться в покоящейся клетке, хотя IL-12 и IL-15 в небольших количествах производятся спонтанно. Клетки стромы кроветворных органов вырабатывают KSF в результате простых контактов с окружающими клетками, в том числе кроветворными. Наиболее типичный вариант индукции экспрессии цитокиновых генов или усиления их активности — воздействие внешних факторов. Для макрофагов, моноцитов, стромальных клеток — микроорганизмы и их продукты, для лимфоцитов — представленные антигены [57].

Механизмы активации и ее скорость зависят от типа клеток, продуцирующих цитокины. Макрофаги, моноциты, стромальные и эпителиальные клетки выделяют цитокины, которые раньше назывались монокинами. Эти цитокины дают более быстрый ответ по сравнению с лимфокинами, вырабатываемыми лимфоцитами. Так, после воздействия бактериальным липополисахаридом на моноциты человека экспрессия иРНК IL-1 $\beta$  проявляется через 1–2 ч, достигает максимума через 3 ч, через 12 ч падает, а через 18 ч прекращается. Такая скорость активации генов монокинов связана с функцией, которую они выполняют — это первая линия противoinфекционной защиты.

Выработка лимфокинов начинается после активации лимфоцитов антигенами, то есть происходит только при антигенспецифических процессах [58]. При этом в работу вовлекается ограниченное число клонов клеток, в связи с чем при нормальном реагировании образование этих цитокинов менее интенсивное. Особенность регуляции отдельных цитокиновых генов определяет последовательность экспрессии лимфокинов. Пик их выработки составляет: для IL-2 — 24 ч; IL-4 и IL-5 — 48 ч; IL-9 и  $\gamma$ -IFN — 72 ч.

Изучен ряд механизмов активации генов цитокинов. Индукция генов определяется воздействием транскрипционных факторов на промотор соответствующего гена. Так, только участок промотора гена IL-2 человека содержит 11 дискретных или частично перерывающихся участков связывания транскрипционных факторов, обладающих активирующим или супрессирующим действием (ядерные белки NFAT-1, AP-1 и др., специфичные для лимфоцитов). Эти белки в покоящихся клетках отсутствуют и формируются в процессе активации клеток путем поступления одновременного сигнала с TCR и корецептора CD28. Сигналы от этих структур запускают биохимические реакции MAP-каскада, что приводит к экспрессии транскрипционных факторов.

Клетки будут реагировать на действие цитокинов только при наличии на их поверхности достаточного количества рецепторов, обладающих высоким сродством к цитокину и способных передать сигнал внутрь клетки. Обычно на покоящихся клетках определяются рецепторы к цитокинам, но либо их количество недостаточно, либо нет какого-то компонента и передача сигнала внутрь клетки не происходит. Поэтому клетки не реагируют на физиологические концентрации цитокинов. Под влиянием соответствующих индукторов увеличивается число рецепторов или в их составе появляются дополнительные компоненты. Так, в состав рецепторов для IL-2 входят три цепи:  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ . В сочетании они образуют высокоаффинный рецептор. На поверхности покоящихся Т-лимфоцитов есть  $\beta$ - и  $\gamma$ -цепи. Активация клеток индуцирует экспрессию  $\alpha$ -цепи и увеличивает экспрессию  $\beta$ - и  $\gamma$ -цепей. Индукция генов рецепторов цитокинов идет по тому же пути, что и индукция генов самих цитокинов и их рецепторов, следовательно, реализация их активности происходит примерно в один отрезок времени [37].

Одновременное включение синтеза цитокинов и образование рецепторов для них способствует локальному действию цитокинов. Попадающие внутрь организма ин-

фекционные агенты локализуются, как правило, в определенном небольшом объеме, где одновременной активации подвергаются клетки-продуценты и клетки-мишени для цитокинов. Этому способствует и временная активация генов цитокинов и достаточное количество рецепторов на клетках-мишенях для их полной утилизации. В ходе первичного иммунного ответа при нормальном реагировании цитокины практически не поступают в кровотоки и в сыворотке крови обнаруживаются в следовых количествах. Но даже при экзогенном их введении цитокины очень быстро выводятся почками, а большая часть введенного цитокина удаляется ими через несколько минут. Только при длительных интенсивных воспалительных процессах в крови накапливаются IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ , при множественной миеломе — IL-6, при некоторых опухолях — IL-10. Содержание цитокинов может повышаться и локально в очагах воспаления, например, в суставах при ревматоидном артрите. Таким образом, в норме срабатывают механизмы, обеспечивающие ограничение выхода цитокинов за пределы очага воспаления и накопления их в кровотоке [59].

Цитокиновая сеть отличается избыточностью. Она обеспечивается тем, что каждый тип клеток может продуцировать несколько цитокинов, а один цитокин выделяют несколько типов клеток. Кроме того, все цитокины отличаются полифункциональностью с выраженным эффектом перекрывания. Выделяют три уровня такого перекрывания.

1. Клеточный — различные цитокины влияют на одни и те же клетки, и эффект действия может совпадать.

2. Эффект наложения также связан с рецепторами для цитокинов. Несмотря на разнообразие рецепторов, их существует всего пять типов, внутри каждого из которых может быть большое сходство рецепторов. Кроме того, ряд цитокинов имеет общие рецепторы.

3. Наличие общих компонентов на путях передачи сигнала с поверхности клетки к ядру. Во многих случаях ведущую

роль играют такие связи: цитоплазматические домены рецептора (после связывания с цитокином) — тирозинкиназы семейства Jak — MAP-каскад. Комбинации небольшого количества тирозинкиназ и каскадных путей способствуют проявлению общих эффектов для различных цитокинов.

Все компоненты цитокиновой сети оказывают большое влияние друг на друга, причем оно практически всегда стимулирующее. Лишь IL-6 подавляет выработку IL-1 и TNF $\alpha$ . Такое действие вполне понятно, так как этот цитокин подавляет выработку других противовоспалительных цитокинов, завершает развитие воспалительного процесса [60].

Положительные функциональные взаимосвязи могут выражаться в усилении одними цитокинами эффекта других цитокинов или в виде взаимодополняющего действия. Например, IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6 не являются ростовыми факторами для Т-клеток, но способны усиливать ростовое действие IL-2, IL-4, IL-7, то есть быть кофакторами.

Цитокины могут проявлять и функциональный антагонизм. Взаимно ингибирующее влияние оказывают IL-2 и IFN $\alpha$  с одной и IL-4 с другой стороны на пролиферацию и дифференцировку Т-лимфоцитов [61].

Таким образом, система цитокинов в целостном организме может функционировать в трех основных режимах:

1) минимальный, который необходим для таких непрерывных процессов, как кроветворение;

2) «нормальный» — характерный для ограниченных воспалительных и иммунных процессов как ответной реакции на внедрение чужеродного агента;

3) гипериндукция при очень выраженных воспалительных и иммунных процессах.

В ограниченном пространстве при нормальном реагировании цитокины всегда образуются и действуют в комбинации. Сопряжены процессы индукции генов цитокинов и выработки рецепторов. В связи с этим клетки-продуценты, цитокины

и клетки-мишени формируют единый функциональный комплекс. Он надежно работает, так как имеет значительную степень перекрывания и дублирования эффектов цитокинов. Цитокиновая система четко устроена, она обеспечивает определенную последовательность подключения цитокинов, ответственных за различные фазы и направления защитных механизмов.

Применение современных методов выключения отдельных цитокинов, в частности метода *knockout* — направленного удаления генов путем рекомбинации — дало возможность получить интересные сведения, которые можно обобщить следующим образом:

- отключение генов цитокинов никогда не было летальным, а заметные отклонения в иммунной системе практически отсутствовали, например, при удалении гена IL-2;

- в некоторых случаях при удалении гена нарушались определенные функции, например, резкое снижение продукции Ig при удалении гена IL-4. Значит, в таких случаях дублирование другими цитокинами не происходит;

- инактивация рецепторов для цитокинов в целом приводит к аналогичным последствиям, как и инактивация генов;

- функционирование цитокиновой сети и возникающие системные реакции (со стороны иммунной, кроветворной и нервной систем) быстро проходят [62].

Таким образом, цитокиновая система — надежно функционирующий аппарат взаимодействия между клетками иммунной системы, обеспечивающий четкость, стабильность и направленность формирования иммунного ответа.

К центральным цитокинам клеточного иммунитета относятся IL-12 и IFN- $\gamma$ , а ДК, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Т-хелперы и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Т-киллеры — центральные клетки клеточного иммунитета. Продукция IL-12 индуцируется бактериальными паттернами в макрофагах и ДК. IL-12 усиливает дифференцировку и пролиферацию Th1 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Т-клеток и индуцирует синтез

IFN- $\gamma$  в этих клетках, а также в НК-клетках и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-киллерах.

В НК-клетках, в отличие от Т-клеток, синтез IFN- $\gamma$  начинается на ранних этапах инфекции, что имеет большое значение для защиты организма от патогенов. IFN- $\gamma$  повышает способность нейтрофилов и макрофагов захватывать и умерщвлять бактерии, усиливает цитотоксическую активность макрофагов и НК-клеток, а также продукцию IL-12 АПК [63].

IFN- $\gamma$  усиливает дифференцировку Th1-клеток. Взаимодействие бактериальных паттернов (PARP) с TLR или NOD-рецепторами приводит к активации транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B, в результате чего активируются гены *p35* и *p40*, которые кодируют полипептидные цепи IL-12, взаимодействуют с рецептором Т-клеток CD212 и с помощью транскрипционного фактора STAT4 индуцируют в Т-клетках синтез IFN- $\gamma$ . Последний взаимодействует с рецептором АПК CD119 и посредством транскрипционного фактора STAT1 индуцирует продукцию IL-12. Таким образом, существует 2 пути активации синтеза IL-12:

- а) индукция бактериальными паттернами и опосредован NF- $\kappa$ B;

- б) индукция IFN- $\gamma$  и опосредован STAT1.

Взаимодействие IL-12 и IFN- $\gamma$  необходимо для индукции Th1-клеток [64]. Однако появились данные о том, что IL-12 и IFN- $\gamma$  — факторы роста, но не дифференцировки Th1-клеток. Дифференцировка в Th1- или Th2-клетки зависит от контактного взаимодействия антигенпрезентирующих клеток и Th0-лимфоцитов, которое опосредуется Delta- или Jagged-рецепторами АПК и Notch-рецепторами лимфоцитов [65].

Представленная выше схема активации иммунитета значительно упрощена и представлена лишь основными событиями в работе звеньев клеточного иммунитета. Однако она дает представление о механизмах его повреждения, что может лечь в основу иммунодиагностики и иммунотерапии.

## 2.8. Генетические механизмы аутоагрессии

Родоначальником учения об аутоиммунитете считается П. Эрлих, который еще в начале XX ст. первым описал эту реакцию как «повышенную» аутоксичность. На основании своих исследований он пришел к выводу о том, что иммунный ответ направлен против чужеродных веществ и уходит от повреждения собственных тканей. При нарушении работы иммунной системы, она поражает ткани своего организма. В последующем этому вопросу уделялось большое внимание как иммунологами, так и другими специалистами. В иммунологии возникло отдельное направление — аутоиммунитет и был описан ряд аутоиммунных заболеваний. В течение XX ст. аутоиммунные заболевания изучались на основе исследования, в основном, пораженных органов. По мере развития иммунологии и уточнения механизмов функционирования системы иммунитета на клеточном и молекулярном уровне исследования концентрируются на системных подходах для выяснения общих механизмов аутоагрессии. Такие подходы способствуют лучшему пониманию патогенных механизмов аутоиммунных заболеваний и приводят к разработке новых методов их лечения как, например, основанные на применении антагонистов TNF $\alpha$ . Они весьма успешные, но все же направлены на пораженный орган.

Основная трудность проблемы заключается в том, что при аутоагрессии иммунный ответ сфокусирован на собственные антигены организма, которые невозможно устранить. Поэтому в последнее время усилия исследователей направлены на выяснение генетических механизмов, участвующих в развитии аутоиммунных заболеваний, что, возможно, приведет к принципиально новым стратегиям в их лечении.

Каждый человек толерантен к собственным потенциальным АГ. Нарушение механизмов толерантности лежит в основе аутоиммунных заболеваний (АИЗ). Это

явление довольно хорошо изучено у животных, особенно в отношении CD4<sup>+</sup>-Т-клеток. Ауто толерантность имеет центральные и периферические механизмы. При центральной толерантности незрелые лимфоциты, которые могли бы на зрелых стадиях узнавать собственные антигены, погибают в первичных лимфоидных органах (тимус и костный мозг) путем апоптоза. Периферическая толерантность заключается в том, что зрелые реактивные против собственных тканей лимфоциты, взаимодействуя с аутоантигенами в периферических органах и тканях, погибают или инактивируются. В случае отклонения от механизмов толерантности развиваются аутоиммунные заболевания [66; 67]. Причины отклонения до конца не выяснены, однако все больше распространяется мнение о том, что аутоиммунная реакция — результат взаимодействия определенного генотипа с теми или иными факторами окружающей среды [68].

Моногенные нарушения для оценки роли генетических факторов в восприимчивости к различным заболеваниям в генетической эпидемиологии исследуют по внутрисемейной заболеваемости, конкордантности у близнецов по различным болезням, степени риска заболеть среди членов семьи, где есть больной. На основании таких исследований было установлено, что при моногенных нарушениях риск заболеть конкретного индивидуума очень высокий. Но влияние данного генетического варианта на популяцию минимально, так как такие отклонения встречаются редко.

При этих болезнях, хотя и существуют вариации в фенотипической экспрессии, взаимосвязь между казуальным генетическим вариантом и развитием болезни очевидна. Методом геномного сцепления пытаются определить генетические маркеры (и тем самым геномный участок), где наблюдается большее расхождение аллелей у лиц в семьях, которые подвергаются статистическому анализу. Такие исследования используются больше для определения казуальных генетических вариантов при моногенных нарушениях. Более ре-

зультативны исследования простых признаков. Однако изучение сложных признаков также имеет значение в раскрытии данной проблемы.

Врожденные ошибки метаболизма — заболевания, которые вызываются мутацией или делецией в единичных генах. В связи с этим, для клиницистов понятно, что исследование простых признаков поможет вскрыть механизмы нормальных физиологических процессов и патогенеза заболевания. В некоторых случаях гены, которые установлены виновниками моногенных заболеваний, вызывают больше скрытых нарушений, чем так называемая повышенная предрасположенность к «распространенной» болезни, вызванной комбинацией аллельных генов.

В настоящее время известно много примеров экспериментальных моделей моногенных заболеваний, которые ведут к развитию аутоиммунной агрессии. Ниже представлены те гены, которые, как известно, вызывают соответствующие нарушения и у человека (табл. 2.3).

Аутоиммунный регулятор (*AIRE*) идентифицирован как ген, при мутации которого возникает аутоиммунный полиэндо-

кринный синдром (APS-1). Он манифестируется аутоиммунной атакой против эндокринных желез, кожи и некоторых других органов. В модели мышей, нокаутных по этому гену, установлено, что белок *AIRE* несет ответственность за тимусную экспрессию некоторых антигенов, которые имеют высокий уровень экспрессии в различных периферических тканях. При отсутствии тимусной экспрессии специфические Т-клетки вычлняются из отрицательной селекции (центральная толерантность), уходят на периферию и поражают органы-мишени [69]. Идея о том, что дефекты тимуса лежат в основе аутоиммунной агрессии, высказана задолго до того, как была показана важность *AIRE*-зависимой тимусной селекции для ауто толерантности. Например, один из генов предрасположенности, который ассоциируется с диабетом 1 типа у человека, — это ген инсулина. Было доказано, что ассоциированный с болезнью полиморфизм гена инсулина снижает его экспрессию в тимусе. Это позволяет инсулин-реактивным Т-клеткам избежать уничтожения. Предстоит еще выяснить, являются ли дефекты в центральной толерантности значимыми в пред-

Таблица 2.3

## Моногенные нарушения, ассоциированные с аутоиммунитетом [68]

Ген	Болезни человека	Мутантные или нокаутные мыши	Механизм аутоиммунизации
<i>AIRE</i>	APS-1	Нокаутные	Снижение экспрессии собственных антигенов в тимусе вследствие дефекта негативной селекции аутореактивных Т-клеток
<i>CTLA4</i>	Ассоциируется с болезнью Graves, диабетом 1 типа и другими	Нокаутные	Отмена Т-клеточной анергии и редукция активации аутореактивных Т-клеток
<i>FOXP3</i>	IPEX 8	Нокаутные и мутантные	Снижение продукции CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> регуляторных Т-клеток
<i>FAS, FASL</i>	ALPS	<i>Lpr/lpr</i> ; <i>gld/gld</i> -мутанты	Отмена апоптотической гибели В- и Т-клеток
<i>C4</i> компонент комплемента	Ассоциируется со SLE	Нокаутные	Дефект клиренса иммунных комплексов и возможность отмены В-клеточной толерантности

расположенности к большинству мультигенных аутоиммунных заболеваний [70; 71].

Ингибитор рецепторной экспрессии Т-лимфоцитами CTLA-4, или CD-154, взаимодействует с костимулирующими молекулами B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86). Соединение между ними выключает Т-клеточный ответ и вызывает продолжительную анергию [72]. Работает CTLA-4 попеременно, то блокируя вовлечение активирующего рецептора CD28 (рецептором CD80 или CD86), то трансдуцируя ингибирующие сигналы. Последнее, вероятно, влечет активацию тирозин- и серин/треонинфосфатазы. У нокаутных по *CTLA-4* мышей развиваются тяжелый синдром мультиорганной лимфоцитарной инфильтрации и выраженное увеличение лимфоидных органов. Указанные симптомы типичны для системных аутоиммунных реакций, направленных против множества (пока неизвестных) собственных аутоантигенов. Установленная облигатная функция CTLA-4 указывает на необходимость исследования полиморфизма гена *CTLA-4*, который ассоциируется с аутоиммунными болезнями. Интересно то, что такие тяжелые заболевания, как болезнь Graves, диабет 1 типа и другие эндокринопатии, имеют тесную связь с полиморфизмом *CTLA-4*.

Функциональные последствия неполноценной формы CTLA-4 пока не установлены. Предположительно, для комплексного заболевания биологическое действие каузального аллеля менее заметно, чем при моногенных нарушениях у нокаутных мышей [73].

*FOXP3* (кодирует транскрипционный фактор) — яркий пример гена, роль которого в развитии аутоиммунных реакций изучена как на моделях у животных, так и при редко встречающихся заболеваниях у человека. Высокий уровень экспрессии *FOXP3* отмечен в CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> регуляторных Т-лимфоцитах, которые контролируют иммунный ответ на АГ, в том числе и собственные АГ. Установлено, что у нокаутных по *FOXP3* гену линий мышей или

при спонтанной мутации *FOXP3* гена возникает аутоиммунная патология, ассоциированная с отсутствием CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-клеток. У человека с мутацией *FOXP3* гена связан синдром IPЕХ (дизрегуляция иммунитета, полиэндокринопатия, энтеропатия) — X-сцепленный синдром. Все это указывает на то, что развитие и функция регуляторных Т-клеток зависит от активности одного транскрипционного фактора, большинство функций которого еще не установлены [74–76].

Fas (CD95) — прототип рецепторов смерти из семейства TNF-рецепторов. Его биологическая роль была установлена при изучении эмбриогенеза. Во время эмбриогенеза в интересах развивающегося организма наряду с такими процессами, как пролиферация и дифференцировка, реализуется апоптоз. В развитии апоптоза выделяют три фазы. Первая — рецепция сигнала и начальные этапы его передачи (эта фаза обратима). Вторая — активация каспаз — ключевое событие в развитии апоптоза, которое приводит к необратимым последствиям. Третья фаза — реализация гибели клетки, запрограммированной на предыдущих этапах. Пути запуска апоптоза сводятся к двум известным механизмам: рецепторному и внутреннему (митохондриальному). Рецепторный механизм довольно хорошо изучен. В его реализации как раз и принимают участие рецепторы смерти. Установлено, что у двух линий мышей с аутоиммунным и лимфопролиферативным процессами (линии *lpr/lpr* и *gld/gld*) генетические повреждения связаны с генами, кодирующими, соответственно, Fas и Fas-лиганд. В этих исследованиях было показано, что отдельный генетический дефект повышает риск формирования сложного аутоиммунного фенотипа и что недостаточность одного из путей реализации апоптоза приводит к нарушению ауто-толерантности [77]. Рецептор смерти Fas участвует в делеции зрелых Т- и В-клеток, способных распознавать собственные АГ. Мутации *FAS* у человека вызывают заболевание — аутоиммунный лимфопролиферативный синдром, очень похожее на па-

тологию *Irg* и *gld* у мышей. Это яркий пример того, как изучение модели генетической патологии у мышей способствует лучшему пониманию болезней человека. Хотя эти аутоиммунные поражения внешне напоминают системную красную волчанку (СКВ) у человека, нет очевидных доказательств того, что полиморфизм или мутации *FAS* ассоциируются с СКВ [78].

Такие простые моногенные нарушения стали ключом, вскрывающим механизмы аутоотолерантности и аутоиммунитета. Однако моногенные нарушения встречаются редко, в то время как большинство аутоиммунных заболеваний имеют сложную мультигенную природу.

В отличие от моногенных, мультифакториальные заболевания — результат комбинации различных аллелей во многих локусах и воздействия окружающих факторов (курение, влияние патогенов, гормональный фон), а также действия случайных факторов. Нет единого мнения по вопросу, вызываются эти болезни аллелями с низкой пенетрантностью (то есть генами, дающими незначительное повышение риска заболевания) или множеством редких аллелей с высокой пенетрантностью. В последнее время в связи с появившейся возможностью определять генетическую вариабельность в геноме человека значительно повысилась вероятность обнаружения ранее неидентифицированных аллелей, вызывающих болезни. Как известно, большинство генетических изменений в геноме человека связаны с единичными нуклеотидными основаниями — единичный нуклеотидный полиморфизм (SNP), существующий в виде двух аллелей, делеций или рекомбинаций. Приблизительно 10 млн SNP в геноме человека имеют незначительную частоту аллелей (не более 1 %) и представляют около 90 % генетической изменчивости в геноме человека. В настоящее время ведутся интенсивные исследования, направленные на изучение генов-кандидатов для выяснения их связи с тем или иным заболеванием [79; 80].

До недавнего времени не было значительных успехов в выявлении генов для

мультифакториальных признаков. Поэтому считалось, что успехи в области генетики заболеваний человека ограничиваются изучением болезней, связанных с моногенным менделевским наследованием. Положение изменилось после публикации результатов картирования локусов предрасположенности для сложных признаков. Предельно точное картирование позволило определить место локуса диабета 1 типа в МНС. Картирование позволило определить секвенированные варианты в гене *NOD2* (*CARD15*), который ассоциируется с болезнью Крона [81]. С помощью объединенного ассоциативного картирования определены варианты гаплотипа в кластере цитокиновых генов на хромосоме 5q 31, которые определяют предрасположенность к болезни Крона. Подобным образом были выявлены гены предрасположенности к астме (*ADAM3* и *GPRA*). Широкие ассоциативные исследования генов-кандидатов привели к важным открытиям, в частности, установлен локус *IDM12/CTLA4* при болезни Грейвса и диабете 1 типа, ген *NOD2* при болезни Крона, ген *PTPN22* при диабете 1 типа, ревматоидном артрите. Данные о том, что гены *CTLA4* и *PTPN22* связаны со многими патологическими нарушениями, согласуются с гипотезой о наличии неких общих иммунологических механизмов, свойственных большинству аутоиммунных заболеваний. В то же время другие патофизиологические механизмы специфичны для отдельных заболеваний [82; 83].

Изучение генетических ассоциаций при аутоиммунных заболеваниях, также как и при других сложных болезнях человека, имеет два основных направления. Первое из них связано с природой аллелей, общих для многих заболеваний. Большинство из известных аллелей только незначительно повышают риск возникновения болезни. Возможность обнаружить аллели генов предрасположенности к заболеваниям осложняется чувствительностью аллеля и частотой встречаемости в популяции. Чем слабее действие аллеля, тем больший объем исследований необходим для выяв-

ления ассоциативной связи. Сложность заключается также в том, что первое сообщение о найденной ассоциации часто переоценивает эффект предполагаемого ассоциативного аллеля. Его называют «проклятием победителя». Повторные исследования часто приводят к противоположным результатам. Однако ситуация может быть исправлена путем комбинированных исследований, сопоставлением результатов многих исследований и использованием мета-анализа. Такой подход позволил достоверно установить гены предрасположенности к аутоиммунным заболеваниям, например, *PTPN22* для диабета 1 типа, *IBD5* и *NOD2* для болезни Крона.

Второе направление связано с изучением паттернов нарушенных сцеплений. Хотя существуют интервалы обычной рекомбинации блоков гаплотипов, наблюдается некоторый эффект корреляции между блоками. Учитывая выраженную локальную вариацию такой рекомбинации и плотность генов, исследуемые регионы генома могут содержать единственный ген или множество генов. При этом не всегда удается уменьшить до минимума величину исследуемого региона. Примером может быть гаплотип 250-kl на хромосоме 5q31, который, как выяснилось, ассоциируется с болезнью Крона. Гаплотип, ассоциированный с болезнью Крона, непрерывно охватывает множественные блоки, и в случаях рекомбинации в пределах этого участка нет повышения риска. В ассоциацию вовлечен участок, содержащий минимум 4 гена (*IRF1*, *SLC22A5* (*OCTN2*), *SLC22A4* (*OCTN1*) и *PDLIM3*) и множество SNP, которые имеют по одному аллелю. Последнее является единственным риском для гаплотипа. Следовательно, идентификация гена (генов) и связанного с ним варианта (вариантов) основывается на функциональных исследованиях, указывающих на связь гена / вариантов и фенотипа [84].

Генетики ставят перед собой задачу построить молекулярную модель аутоиммунитета, которая отражала бы информацию о путях взаимодействия генотипа с факторами окружающей среды. Она основывает-

ся на понимании того, что в специфических нарушениях при аутоиммунных заболеваниях ведущую роль играет определенный набор функционирующих В- и Т-клеточных рецепторов. Их функция определяется путем взаимодействия индивидуального генотипа и сочетанием набора факторов среды. Конечно, установление новых генов предрасположенности к заболеваниям или выявление изученных изменений в ранее хорошо изученных генах будут открывать новые механизмы патогенеза аутоиммунной агрессии.

### **Список литературы**

1. Хаитов Р. М., Алексеев Л. П. Предназначение иммунной системы: выполнение физиологических функций, обеспечивающих генетическое постоянство внутренней среды организма // Физиология и патология иммунной системы. — 2005. — Т. 8, № 8. — С. 3-14.
2. Janeway Ch. A., Travers P. Immunobiology: The immune system in health & disease, immunobiology. (6th edition). — London: Garland Science Publishing Current Biology Ltd., 2005. — 823 p.
3. Кохан И. Иммунология. — К.: УКСП «Кобза», 1994. — 444 с.
4. Лебедев К. А., Понякина И. Д. Иммунология в клинической практике. — М.: Медицина, 1999. — 224 с.
5. Ройт А. Основы иммунологии: Пер. с англ. — М.: Мир, 1991. — 328 с.
6. Silvertown E. W., Navia M. A., Davies D. R. Three-dimensional structure of an intact human immunoglobulin // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1977. — Vol. 74. — P. 5140-5144.
7. Молекулярная биология клетки: В 5-ти томах. Т. 5. : Пер. с англ. / Б. Албертс, Д. Брей, Дж. Льюис и др. — М.: Мир, 1987. — 231 с.
8. Джеске Д. Д., Капра Д. Д. Иммуноглобулины: строение и функции // Иммунология: В 3-х т. Т. 1: Пер. с англ. /Под ред. У. Пола. — М.: Мир, 1987-1988. — 476 с.
9. Edelman G. M. The structure and function of antibodies // Science. — 1970. — Vol. 223. — P. 34-42.

10. Галактионов В. Г. Эволюция суперсемейства иммуноглобулинов // Успехи современной биологии. — 1992. — Т. 112. — Вып. 1. — С. 29-43.
11. Макс Э. Э. Иммуноглобулины: молекулярная генетика // Иммунология: В 3-х т. Т. 1. Пер. с англ. / Под ред. У. Пола. — М.: Мир, 1987–1988. — 476 с.
12. *Immunology: the immune system in health and disease* / С. А. Janeway, Jr. P. Travers, M. Walport, J. D. Saper. — 4 ed. — N.-Y.: Garland Publishing, 1999. — 635 p.
13. Давтян ТАК КАК, Геворкян Г. А., Погосян Д. А. Эволюция интегративной функции иммунной системы. 1. Эволюционное развитие иммунной системы // Успехи совр. биологии. — 2005. — Т. 125, № 1. — С. 34-40.
14. Adams G. M. The organization and expression of immunoglobulin genes // *Immunol. today*. — 1980. — Vol. 1. — P. 10-17.
15. Green D. R. The major histocompatibility complex // *Immunology and inflammation: Basic mechanisms and clinical consequences*. — Ed. L. H. Sigal, Y. Ron. — N.-Y.: McGRAW-HILL, Inc., 1994. — P. 63-75.
16. Хаитов Р. М. Физиология иммунной системы / ВИНТИ РАН. — 2001. — 223 с.
17. Хаитов Р. М., Алексеев Л. П. Геномика HLA: новые возможности молекулярной генетики человека в диагностике и терапии // Молекулярная медицина. — 2003. — № 1. — С. 17-31.
18. Наумов Ю. Н., Коненков В. И., Алексеев Л. П. Молекулярные механизмы функционирования антигенов гистосовместимости человека // Иммунология. — 1993. — № 5. — С. 13-17.
19. Zinkernagel R. M., Doherty P. C. The discovery of MHC restriction // *Immunol. Today*. — 1997. — Vol. 18. — P. 14-17.
20. Хаитов Р. М., Алексеев Л. П. Генетика иммунного ответа // Иммунология. — 1998. — № 5. — С. 11-15.
21. Сартакова М. Л., Коненков В. И. Структурные основы межклеточных взаимодействий в процессе представления антигенов Т-лимфоцитам: молекулы главного комплекса гистосовместимости как одна из составляющих частей тримолекулярного комплекса // Успехи совр. биологии. — 1997. — Т. 117. — Вып. 5. — С. 568-583.
22. *Nomenclature for Factors of the HLA System 2000* / S. Marsh, J. Bodmer, E. Albert et al. // *Human Immunology*. — April 2001. — Vol. 62, N 4. — P. 419-468. ELSEVIER.
23. Хаитов Р. М., Алексеев Л. П. Генетика иммунного ответа // Иммунология. — 1998. — № 5. — С. 11-15.
24. *The HLA-B8, DR3 haplotype and immune response in healthy subjects* / M. A. Modica, A. T. Collucci, G. Candore, C. Caruso // *Immunology and Infectious Disease*. — 1993. — Vol. 3. — P. 119-127.
25. *Иммуногенетическая характеристика коренных народностей севера Европейской территории России* / И. В. Евсеева, М. Н. Болдырева, Е. Г. Грудакова, и др. // Иммунология. — 2001. — № 4. — С. 22-27.
26. *Связь параметров иммунного ответа с HLA-фенотипом у здоровых лиц русской национальности* / В. В. Яздовский, Л. П. Алексеев, В. М. Земсков и др. // Иммунология. — 1998. — № 3. — С. 20-24.
27. Bodmer W., Bodmer J. G. Evolution and function and of the HLA system // *Brit. Med. Bull.* — 1978. — Vol. 3. — P. 309-316.
28. *HLA-DRB 1 genes possibly involved in spontaneous abortions of uncertain genesis* / M. N. Boldyreva, I. I. Gousov, O. B. Bartseva et al. // *J. Reprod. Immunol.* April. — 2003. — Vol. 58. — ELSEVIER P. 102.
29. Kovats S., Main E., Librach C. YLA-G expressed in human trophoblast // *Science*. — 1990. — Vol. 248. — P. 220-223.
30. Schmidt C., Orr H. Maternal fetal interactions: the role of the MHC class I molecule HLA-G // *Crit. Rev. Immunol.* — 1994. — Vol. 13. — P. 207-224.
31. HLA-E expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG 2 receptors NK cell / A. King, D. S. Allan, M. Bowen et al. // *Eur. J. Immunol.* — 2000. — Vol. 30. — P. 1623-1631.
32. *Immunologia* / Pod. redakcja M. Jakóbinsiaka. — Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN. — 1995. — 694 s.

33. Сидоров Е. В. Антигенспецифические рецепторы Т- и В-лимфоцитов и передача сигнала // Успехи совр. биологии. — 1995. — Т. 115. — С. 627-639.
34. *Donnadieu E., Revy P., Trautmann A.* Imaging T-cell antigen recognition and comparing immunological and neuronal synapses // Immunology. — 2001. — Vol. 103, N 3. — P. 417-425.
35. *Ярилин А. А.* Основы иммунологии. — М.: Медицина, 1999.
36. *Costimulatory* and endogenous MHC ligands contribute to T cell recognition / C. Wülfing, C. Sumen, M. D. Sjaastad et al. // Nat. Immunol. — 2002. — Vol. 3, N 1. — P. 42-47.
37. *Робинсон М. В., Труфакин В. А.* Апоптоз и цитокины // Успехи совр. биологии. — 1999. — Т. 119. Вып. 4. — С. 359-367.
38. *Филатов А. В.* Физиология рецепторного взаимодействия // Физиология и патология иммунной системы. — 2004. — Т. 8, N 12. — С. 5-12.
39. *Kopp E. B., Medzhitov R.* The TOLL-receptors family and control of innate immunity // Curr. Opin. Immunol. — 1999. — Vol. 11. — P. 13-18.
40. *Recognition* of double stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by TOLL-like receptor 3 / L. Alexopolou, A. Czopk-Holt, R. Medzhitov, R. Ravell // Nature. — 2001. — Vol. 413. — P. 696-712.
41. *Bacterial* CpG-DNA and lipopolysaccharides activate TOLL-like receptors at distant cellular compartments / P. Ahmad-Nejad, H. Hacker, M. Rutz et al. // Eur. J. Immunol. — 2002. — Vol. 32. — P. 1958-1968.
42. *Distribution* of Toll-like receptors 1 and Toll-like receptors 2 in human lymphoid tissues / M.-T. Ochoa, A. J. Legaspi, Z. Hatziris et al. // Immunology. — 2003. — Vol. 108. — P. 10-15.
43. *The repertoire* for pattern recognition of pathogens by innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors / A. Ozinsky, D. M. Underhill, J. D. Fontenot et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2000. — Vol. 97. — P. 13766-13771.
44. *Medzhitov R.* TOLL-like receptor and innate immunity // Nature Revues. — 2001. — Vol. 1. — P. 135-145.
45. *Adachi O.* Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1 and IL-18-mediated function // Immunity. — 1998. — Vol. 9. — P. 143-150.
46. *Aderem, Ulevich R. J.* Toll-like receptors in the induction of the innate immune response // Nature. — 2000. — Vol. 406. — P. 728-787.
47. *Nods, Nalps and Naip: Intracellular regulation* of bacterial-induced inflammation / M. Chamaillard, S. E. Girardin, J. Viala et al. // Cellular microb. — 2003. — Vol. 5. — P. 581-592.
48. *Inohara N., Ogura Y., Nunez G.* Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens // Curr. Opin. Microbiol. — 2002. — Vol. 5. — P. 76-80.
49. *CARD4/Nod 1* mediates NF-kappB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri* / S. E. Girardin, R. Tournibize, M. Mavris et al. // EMBO Rep. — 2001. — Vol. 9. — P. 736-742.
50. *TFN-* and IFN $\gamma$  regulate the expressive of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal cells / P. Rosenstiel, M. Fantini, K. Brautigam et al. // Gastroenterology. — 2003. — Vol. 124. — P. 1001-1009.
51. *Nod 1* detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan / S. E. Girardin, I. G. Boneca, L. A. M. Carnerio et al. // Sci. — 2003. — Vol. 300. — P. 1584-1587.
52. *Пащенко М. В., Пинегин Б. В.* Основные свойства дендритных клеток // Иммунология. — 2001. — № 4. — С. 7-16.
53. *Боценовский В. А., Барышников А. Ю.* Молекулы клеточной адгезии человека // Успехи совр. биологии. — 1994. — Т. 114. Вып.6. — С. 741-753.
54. *Александров А. В., Джексон А. М., Румянцев А. Г.* Анализ механизма модуляции клеточных молекул ICAM // Иммунология. — 1997. — № 1. — С. 4-11.
55. *Фонталини Л. Н.* Происхождение антиген-распознающей иммунной системы позвоночных. Молекулярно-биологические и иммунологические аспекты // Иммунология. — 1998. — № 5. — С. 33-42.
56. *Бажора Ю. И.* Введение в иммуногенетику. — Одесса: Одес. гос. мед. ун-т, 2000. — 72 с.

57. Стариков Э. А., Киселев Е. П., Фрейдлин И. С. Гетерогенность мононуклеидных фагоцитов: субпопуляции или проявления пластичности // Успехи совр. биологии. — 2005. — Т. 125, № 5. — С. 466-477.
58. Пинегин Б. В., Ильинская А. Н. Физиология иммунной системы и иммунопатология // Физиология и патология иммунной системы. — 2004. — Т. 8, № 12. — С. 13-18.
59. Ярилин А. А. Межклеточная кооперация при иммунном ответе. Выбор клеткой формы ответа // Иммунология. — 1999. — № 1. — С. 17-24.
60. Клінічна імунологія / Ю. І. Бажора, В. М. Запорожан, В. Й. Кресюн, І. М. Годзієва. — Одеса: ОДМУ, 2000. — 384 с.
61. Ширишев С. В. Цитокины плаценты в регуляции иммуноэндокринных процессов при беременности // Успехи совр. биологии. — 1994. — Т. 114. — Вып. 2. — С. 223-239.
62. Ярилин А. А. Система цитокинов и принципы её функционирования в норме и при патологии // Иммунология. — 1997. — № 5. — С. 7-13.
63. Mantovani A., Bussolino F., Introna M. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside // Immunology today. — 1997. — Vol. 18, N 5. — P. 231-240.
64. Хаитов Р. М., Пинегин Б. В. Основные представления об иммуотропных лекарственных средствах // Иммунология. — 1996. — № 6. — С. 4-9.
65. Фрейдлин И. С. Интерлейкин-12 — ключевой цитокин иммуорегуляции // Иммунология. — 1999. — № 4. — С. 5-13.
66. Cellular and genetics mechanism of self tolerance and autoimmunity / C. C. Goodnow, J. Sprent, B. F. de St Croth, C. Vinosse // Nature. — 2005. — Vol. 435. — P. 590-597.
67. Kronenberg M., Rudensky A. Regulation of immunity by self reactive T-cell // Nature. — 2005. — Vol. 435. — P. 598-604.
68. Riou J. D., Abbas A. K. Path to understanding the genetic basis of autoimmune disease // Nature. — 2005. — Vol. 435. — P. 584-589.
69. Air regulates negative selection of organ-specific T cell / A. Liston, S. Lesage, J. Wilson et al. // Nature Immunol. — 2003. — Vol. 4. — P. 350-354.
70. Eisenbarth G. S. Insulin autoimmunity: immunogenetics / immunopathogenesis of type diabetes // Ann. NY Acad. — 2003. — Vol. 1005. — P. 109-118.
71. Mathis D., Benoist C. Back to central tolerance // Immunity. — 2004. — Vol. 20. — P. 509-516.
72. Salomon B., Bluestone J. A. Complexities of CD 28/B7: CTLA-4 costimulatory pathway in autoimmunity and transplantation // Annu. Rev. Immunol. — 2001. — Vol. 19. — P. 225-252.
73. Association of the T-cell regulatory gene CTLA 4 with susceptibility to autoimmune disease / H. Ueda, J. M. M. Howson, L. Esposito et al. // Nature. — 2003. — Vol. 423. — P. 506-511.
74. Hori S., Nomura T., Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp 3 // Science. — 2003. — Vol. 299. — P. 1057-1061.
75. Fontenot J. D., Gavin M. A., Rudensky A. Y. Foxp 3 programs the development and function of CD4\* CD25\* regulatory T cell // Nature Immunol. — 2003. — Vol. 4. — P. 330-336.
76. Khattri R., Yasayko S., Ramsdell F. An essential role for Scirfin in CD\* 4CD25\* regulatory cell // Nature Immunol. — 2003. — Vol. 4. — P. 337-342.
77. Nagata S., Suda T. Fas and Fas ligand: Ipr and gld mutations // Immunol. Today. — 1995. — Vol. 16. — P. 39-43.
78. Fisher A., Rieux-Laucat F., Le Deist F. Autoimmune lymphoproliferative syndromes (ALPS): models for the study of peripheral tolerance // Rev. Immunogenet. — 2000. — Vol. 2. — P. 52-60.
79. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome // Nature. — 2004. — Vol. 431. — P. 931-945.
80. The fine-scale structure of recombination rate variation in the human genome / G. A. McVean, S. R. Myers, S. Hunt et al. // Science. — 2004. — Vol. 304. — P. 581-584.
81. Association of NOD 2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's

disease / J. P. Hugot, M. Chamaillard, H. Zonali et al. // *Nature*. — 2001. — Vol. 411. — P. 599-603.

82. *Characterization* of a common susceptibility locus for asthma-related traits / T. Laitinen, A. Polvi, P. Rydman et al. // *Science*. — 2004. — Vol. 304. — P. 300-304.

83. *A frameshift* mutation in NOD 2 associated with susceptibility to Crohn's disease / Y. Ogura, D. K. Bonen, N. Inohara et al. // *Nature*. — 2001. — Vol. 411. — P. 603-606.

84. *Rioux J. D., Abbas A. K.* Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn diseases // *Nature Genet.* — 2001. — Vol. 29. — P. 223-228.

## Глава 3. Фармакогенетика

---

---

The chapter highlights basic problems of general and clinical pharmacogenetics: definition of subject, objective, stages of formation and prospects of development, as well as importance to personalize the choice of medications, increase of efficiency and prevention or abatement of size reactions severity. The modern views on control of medication transport through biological membranes, their relationship with receptor are described. Special attention is given to biotransformation of medications, build up of reactive products and their undesirable effects.

---

### 3.1. Предмет, задачи, методы исследования, проблемы

Общеизвестно, что в изучении фармакологии любого лекарственного средства (ЛС) обязательными составляющими «кирпичиками» служит исследование фармакодинамики, фармакокинетики и фармакотоксикодинамики. Если в отношении первых двух позиций наши представления не претерпели существенных перемен, то по отношению к последнему понятию произошли революционные изменения. Первоначально введенный термин «фармакотоксикодинамика» предполагал изучение токсического действия лекарства на организм, разработку методов его предупреждения и лечения. Однако в последующем оказалось, что нежелательное действие ЛС выражается не только их токсичностью. Это побудило к рассмотрению данного вопроса на XVII сессии Всемирной ассамблеи здравоохранения (1964). По результатам её работы ВОЗ создала ряд научных групп для изучения проблем оценки безопасности и эффективности ЛС. Таким образом, к нежелательному действию лекарств были отнесены собственно токсическое влияние, эмбриотоксическое, алергизирующее, идиосинкразия на ЛС, му-

тагенное, канцерогенное, бластомогенное и тератогенное. Последние четыре так или иначе обусловлены генетическими механизмами, которые определяют характер реакций на ЛС.

Несмотря на то, что термин «фармакогенетика» ввел в науку еще Ф. Фогель (1959) [1], ее серьезное развитие началось в последние десятилетия благодаря успехам молекулярной биологии и генетики. Фармакогенетика — раздел фармакологии, изучающий генетически обусловленные реакции отдельных индивидуумов в популяции на ЛС. До недавнего времени на уровне феноменологии изучались наследственные факторы, которые определяли атипичные фармакологические реакции на ЛС. Как правило, они относятся к биохимическим «поломкам», наследуются по менделевскому типу (обусловлены одним геном) и классифицируются согласно [2]. Приведем наиболее часто встречающиеся случаи.

#### ***Наследственные состояния, вызывающие снижение или отсутствие реакции на ЛС***

1. *Резистентность к кумариновым антикоагулянтам.* У таких пациентов существует изоформа фермента, превращающего витамин К в его редуцированную фор-

му, которая активна и ингибируется кумарином; такие люди обладают качественно иными рецепторами в печени с повышенным сродством к витамину К, в связи с чем для достижения терапевтического эффекта дозу препарата необходимо увеличивать в 20 раз и более.

2. *Устойчивость к миорелаксанту дитилину* связывают с генетически обусловленной повышенной активностью холинэстеразы.

3. *Устойчивость к витамину D*, при которой развиваются судороги, устраняемые введением только больших доз витамина.

### ***Наследственные состояния, связанные с усиленной реакцией на ЛС***

1. *Дефицит псевдохоллинэстеразы в тканях и плазме*, что приводит к замедлению метаболизма миорелаксантов, а следовательно, у больного длительно не восстанавливается дыхание.

2. *Наследственная метгемоглобинемия*, обусловленная дефицитом метгемоглобинредуктазы, способствует длительному нахождению в крови метгемоглобина, который не способен переносить кислород, вследствие чего развивается цианоз. Чаще всего встречается после применения нитратов, сульфаниламидов и др.

3. *Недостаточность фенилаланин-4-гидроксилазы*, приводящая к усилению действия адреналина и норадреналина (фенилкетонурия).

### ***Наследственные состояния, при которых резко возрастает токсичность ЛС***

1. *Дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы* приводит к нарушению стабилизации мембран эритроцитов и включению в их структуру метгемоглобина, что, в свою очередь, приводит к нарушению функции SH-групп и, как следствие, к развитию гемолиза.

2. *Фенотипы ацетилирования*, связанные с разделением популяции на лиц с быстрым (90–65 %) и медленным (55–40 %) ацетилированием. Скорость ацетилирования имеет значение при лечении некоторыми ЛС, такими как изониазид, новокаиномид, сульфасалазин и др.

### ***Наследственные состояния, вызывающие провокационное действие ЛС***

1. *Печеночные порфирии*, при которых происходит обострение заболеваний гепатобилиарной системы в результате применения ингаляционных наркотических средств, этилового алкоголя, барбитуратов, сульфаниламидов, транквилизаторов и др.

2. *Наследственные гипербилирубинемии* (синдромы Жильбера и Криглера – Найяра). В результате приема сульфаниламидов, некоторых антибиотиков, ПАСК, нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) и других препаратов появляется желтуха с соответствующими клиническими проявлениями.

Таких состояний достаточно много. В настоящее время известно около 2000 наследственных заболеваний, еще для 1500 болезней предполагается генетическая природа.

Ежегодно в мире (по скромным подсчетам) рождается около 5 млн детей с генетическими дефектами, а около 10 % населения страдает различными наследственными нарушениями.

Вышеизложенное обосновывает целесообразность выделения фармакогенетики в самостоятельную область научных исследований, которая имеет не только теоретическое, но и практическое значение в обеспечении здоровья населения.

Фармакогенетика представляет собой междисциплинарную область исследований, требующую тесного сотрудничества врачей, фармакологов, генетиков и представителей других смежных дисциплин.

Одна из ведущих проблем фармакогенетики — выяснение мутагенной роли ЛС. Таким образом, с одной стороны, необходимо понимать механизмы и предотвращать мутагенное действие ЛС, а с другой — направленно регулировать функциональное состояние генетического аппарата клеток через синтез ДНК, РНК, белка и т. д., что представляется весьма сложным. Современные достижения науки ставят во главу угла первоочередную задачу — определение роли генетических факторов в чувствительности организма к ЛС с целью повышения эффективности и безопасности фармакотерапии. А это влияет на разработку методологии выявления лекарственных мутагенов, методов регистрации различных категорий мутации и оценки генетического риска мутагенных воздействий для человека. Лекарственные средства или другие ксенобиотики, оказывающие мутагенное действие, принято называть генотоксикантами. В настоящее время известно более 100 различных методов оценки генотоксичности, однако реально для генетического скрининга используется около двух десятков (это оценка повреждения ДНК, мутагенная и рекомбиногенная активность и пр.). Остановимся на основных.

*Регистрация повреждений ДНК* служит основным критерием генотоксичности. Для этого используются методы оценки целостности двунитчатой полимерной структуры ДНК, модифицированные основания ДНК и не прямые методы, основанные на регистрации меченых оснований ДНК, которые включаются в их макромолекулы при репарации повреждений [3–5]. Эти методы сложные, громоздкие, дорогостоящие и требуют соответствующего оборудования (например, жидкостная хроматография). Естественно, что для широких скрининговых исследований синтезированных биологически активных веществ (БАВ) они малопригодны. Сегодня осваиваются перспективные чувствительные и более быстро выполняемые методы учета повреждений ДНК (метод ДНК-комет).

*Регистрация генных мутаций* — наиболее известный и распространенный метод. Чаще всего используют тест Эймса (His-штаммы *Salmonella typhimurium* и микросомальная фракция печени млекопитающих). Реверсии от аутокотрофности к прототрофности служат показателем возникновения генных мутаций [6]. Метод полуквантитативный. В качестве показателя индуцированного мутагенеза учитывают число ревертантных колоний. Этот метод имеет множество модификаций с целью автоматизации процедуры тестирования. Для генетического скрининга также широко используется регистрация генных мутаций в эукариотических клетках млекопитающих с помощью различных тест-систем. Частоту мутаций оценивают по устойчивости клеток к селективному фактору, токсичному для немутагенных клеток. Наиболее распространенный — гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазный тест (ГФРТ-тест), который в норме указывает на сохранение и метаболизм пуринов. Принципиально новый подход в изучении мутагенного действия ЛС — это использование трансгенных животных с интегрированными в геном тестируемыми генами.

*Регистрация хромосомных мутаций* проводится с помощью цитогенетических методов, при которых учитываются хромосомные aberrации в метафазных клетках пролиферирующих тканей *in vitro* или *in vivo* [7]. Методы основаны на микроскопическом учете видимых нарушений структуры хромосом (хромосомных aberrаций) в метафазных клетках. Данная методика широко применяется для скрининговых исследований. Современные компьютерные технологии, рутинная окраска метафазных пластинок позволяют выявлять ахроматические пробелы (гепы), одиночные и парные ацентрические фрагменты хромосом, различные типы хромосомных обменов. Усложнение метода путем дифференциальной окраски позволяет надежно регистрировать хромосомные инверсии и транслокации. Эти методы особо ценные потому, что возникновение хромосомных aberrаций всегда связано с детерминаци-

ей молекулярных нарушений, которые приводят к разрыву спирали ДНК. Особая важность этих методов для фармакогенетики заключается в том, что эти исследования возможно проводить *in vitro* на первичных и перевиваемых клеточных культурах животных и человека, таких как лимфоциты периферической крови и фибробласты кожи человека, эмбриональные клетки хомячка, клетки мышинной лимфомы и др. Не менее перспективно изучение микроядер — внутриклеточных хроматиновых образований, обособленных от ядра и имеющих собственную оболочку. Они образуются из ацентрических фрагментов и цельных хромосом, оставшихся в анафазе из-за дефектов веретена деления. Увеличение выхода микроядер под влиянием ЛС служит неоспоримым доказательством его генотоксичности. Кроме того, учет микроядер может быть автоматизирован, а суспензионный способ приготовления цитогенетических микроядерных препаратов применим практически к любой пролиферирующей ткани, включая гонады [8].

Сравнительно недавно были предложены новые тесты *по изучению рекомбиногенной активности*. Это интегральная оценка индукции ЛС рекомбинационных и различных мутационных воздействий (потери хромосом или их фрагментов, транслокация или генные мутации). Пока широкого применения эти методы изучения мутагенного действия не нашли.

Общеизвестно, что многие ЛС в натуральном виде самостоятельно не изменяют генетические структуры, однако приобретают такие свойства в результате своей биотрансформации. Это предопределяет необходимость метаболической активации данного ЛС, изучение которой осуществляется *in vitro*. В качестве примера можно привести химически индуцированную S9-фракцию микросом гомогената печени млекопитающих. В норме функционирование данной фракции зависит от оптимального содержания коферментов, солей, микроэлементов, индукторов метаболизма и целого ряда других факторов. Фракции S9 не ацетилируют ЛС типа изониазида, по-

этому последний, приобретая мутагенную активность вследствие ацетилирования, в опытах *in vitro* не обнаружит свою генотоксичность [9].

Таким образом, мы заострили внимание на крайней необходимости изучения фармакогенетики на современном этапе развития фармакологии, особенно при создании новых ЛС. Важно определить основные подходы в решении данной проблемы. Несмотря на то, что все ЛС в свое время подвергались проверке на токсичность, большинство из них не были адекватно изучены на предмет мутагенного влияния. В этой связи не снимается с повестки дня вопрос о необходимости всестороннего изучения генотоксичности ЛС, которые широко применяются десятилетиями. Оценке их возможных генотоксических воздействий не уделялось и не уделяется должного внимания. Более того, о мутагенных свойствах лекарственного препарата мы чаще узнаем при его «уходе» с рынка или замене более эффективным. Совершенно не изучаются фармакогенетические последствия применения фитопрепаратов, различных «сборов», «парафармацевтических» средств и пищевых добавок.

Практически нерешенным остается вопрос верификации лекарственного мутагенеза в эксперименте его клиническому соответствию, хотя всем известно, что патологический процесс существенно изменяет реакцию организма на лекарство. Очевидно, что он ощутимо модифицирует и мутагенное действие ЛС. Требуют особого внимания учет дозирования ЛС и условия его применения. Немаловажное значение имеет и определение индивидуальной, видовой, половой, возрастной, наследственной чувствительности к данному ЛС, который изучают с целью выявления мутагенных свойств. Наконец, совершенно не решена проблема оценки генотоксических эффектов при комбинированном применении ЛС, так как для некоторых из них доказаны комутагенные свойства (например, селективные антагонисты кальция).

Вводя ЛС в организм с лечебной или профилактической целью, мы рассчитыва-

ем на новое биологическое явление как результат специфического взаимодействия наследственных факторов и среды (внутренней и внешней), которые непременно необходимо учитывать. Вместе с тем, изучение специфичности действия лекарственных генотоксикантов имеет преимущественно феноменологический характер, а исследования по раскрытию механизмов специфического действия генотоксикантов, как правило, ограничиваются изучением особенностей их метаболизма в разных тест-объектах. Значительное количество переменных, определяющих генотоксичность того или другого ЛС или ксенобиотика, не позволяет в настоящее время сформулировать общую теорию, на основании которой можно было бы прогнозировать индивидуальную количественную вариабельность генотоксического влияния химических соединений, в том числе и ЛС, у отдельного человека или животного.

Вместе с тем, результаты подобных исследований могут обеспечить выбор адекватной тест-системы для генетического скрининга, повысить надежность экстраполяции экспериментальных данных на человека, а в ряде случаев — предопределить дальнейшую судьбу ЛС, особенно если на экспериментальных моделях были получены неоднозначные результаты.

## 3.2. Этапы становления фармакогенетики

Фармакогенетика берет свое начало с конца XIX в. и связана с бурным развитием в то время органической химии. Благодаря ей удалось установить, что большинство лекарств выводится из организма в химическом виде, отличающемся от их первоначального состояния. Было высказано предположение, что некий «внутренний фактор» организма трансформировал или метаболизировал исходное химическое соединение.

На основе открытых еще Г. Менделем (1866) законов наследственности и даль-

нейших успехов в области генетики в начале XX в. были опубликованы работы, свидетельствующие о том, что эти законы управляют биотрансформацией лекарств и детоксикацией ксенобиотиков. Основными в этом направлении стали наблюдения А. Гаррода, касающиеся физиологии пигментов мочи, а в последующем — изучение алкаптонурии. В своей книге «Врожденные нарушения метаболизма» [10] он высказывается об индивидуальной чувствительности к лекарствам, которая возникает из-за «расстройств метаболических факторов».

Интенсивное развитие биохимических составляющих генетики человека и установление наследственных дефектов ферментов, в сочетании с применением ЛС, привели к выделению нового направления в генетике — фармакогенетики.

На основании многочисленных наблюдений Ф. Фогель и А. Мотульски [1] утверждают, что наследственные дефекты метаболизма могут объяснить многие индивидуальные различия в эффективности лекарств и побочных реакций, которые следует отличать от аллергических. Ф. Фогель (1959) впервые дал определение фармакогенетике как «клинически значимой изменчивости в ответ на терапию» [1], W. Kalow (1962) опубликовал первую работу («Наследственность и чувствительность к лекарствам» [11]), специально посвященную фармакогенетике.

Вначале исследования в области фармакогенетики не имели какой-то системности. Тем не менее общепризнано их большое значение в объяснении биохимической и генетической основы многих, казалось бы не имеющих общего между собой, реакций непереносимости лекарственной терапии.

Так, было доказано, что уровень активности сывороточной псевдохлинэстеразы — генетически детерминированный признак. Наблюдения показали, что некоторое число пациентов удовлетворительно перенесли пролонгированный наркотик после назначения миорелаксанта суксаметония (сукцинилдихолина) [12].

Суксаметоний, или сукцинилдихолин, широко используется как релаксант мышц при хирургических операциях. Псевдохолинэстераза, как правило, катализирует гидролиз препарата, поэтому в норме его действие непродолжительно. У отдельных больных этот фермент обладает очень низким сродством к препарату, что приводит к длительной задержке дыхания вследствие подавления деятельности дыхательных мышц. В таких случаях пациенту необходимо вводить очищенный фермент или плазму, содержащую псевдохолинэстеразу, а до того времени — переводить его на управляемое дыхание.

Причиной этого феномена служат различные мутации как в гетерозиготном, так и в компаунд-гетерозиготном состоянии. Они изменяют активный центр псевдохолинэстеразы, которая теряет способность эффективно гидролизировать субстрат. К настоящему времени охарактеризованы некоторые аллельные варианты данного гена и определены молекулярные механизмы его полиморфизма [13]. Основная атипичная форма фермента возникает вследствие замены аспарагиновой кислоты на глицин в участке белка, который присоединяет субстрат. В этом случае не происходит электростатического взаимодействия и субстрат не присоединяется. Аллель, кодирующий нормальную псевдохолинэстеразу, обозначают  $CHE_1^U$ . Мутантным аллелем, который встречается наиболее часто, является  $CHE_1^D$ . Около 3–4 % людей европейской популяции — гетерозиготы ( $CHE_1^U/CHE_1^D$ ), а один из 3500 индивидуумов — мутантная гомозигота ( $CHE_1^D/CHE_1^D$ ). Последние вместе с гетерозиготами составляют группу риска при введении суксаметония. Измененный фермент идентифицируют по его устойчивости к ингибитору дибукаину. Фермент мутантных гомозигот относительно устойчив к дибукаину, у гетерозигот выявляется умеренная устойчивость. Другой аллель псевдохолинэстеразы ( $CHE_1^S$ ) детерминирует полное отсутствие активности этого фермента. Гомозиготы  $CHE_1^S/CHE_1^S$  очень чувствительны к действию суксаметония,

так как в плазме крови у них нет псевдохолинэстеразы. Этот аллель распространен среди эскимосов Аляски. Еще один мутантный аллель ( $CHE_1^F$ ) детерминирует устойчивость к фториду (табл. 3.1).

При исследованиях псевдохолинэстеразы обычно используют бензоилхолин. Однако у некоторых пациентов, перенесших длительную задержку дыхания, нарушение активности фермента обнаруживается только при использовании сукцинилдихолина.

Изучение причин развития гемолитической анемии у мужчин афроамериканской популяции после приема противомаларийного препарата примахина привело к выявлению наследственного дефекта в гене, кодирующем глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу (Г-6-ФДГ) [15].

Во время войны в Корее, в начале 50-х годов XX ст., все американские солдаты проходили профилактический курс лечения противомаларийным препаратом примахином. У 10 % афроамериканцев и 1–2 % белых солдат из 1000 в ответ на прием примахина развивалась сосудистая гемолитическая реакция. Ранее сходные реакции наблюдались при лечении больных негроидной расы сульфаниламидами, а также у жителей Сардинии после употребления в пищу конских бобов. Первоначально это пытались объяснить патологическими иммунными реакциями, но дальнейшие исследования показали, что побочное действие примахина (гемолиз) связано с недостаточностью активности Г-6-ФДГ.

Вскоре была обнаружена еще одна особенность — гемолиз встречался чаще у мужчин, чем у женщин. Дальнейшее изучение уровня глутатиона в эритроцитах показало, что у афроамериканцев наблюдается ярко выраженный бимодальный характер кривой распределения, причем у значительной части популяции уровень содержания глутатиона был крайне низким. В группе афроамериканских женщин кривая смещена влево, а доля больных с низким содержанием глутатиона гораздо меньше, чем в группе мужчин. Исходя из

Типы псевдохолинэстеразы и чувствительность к суксаметиону [14]

Генотип	Активность	Дибукановое число	Фторидное число	Частота фенотипа в европейских популяциях	Чувствительность к суксаметиону
$CHE_1^U/CHE_1^U$	Нормальная	80	59	95 %	Нет
$CHE_1^P/CHE_1^P$	Умеренно	22	27	1:3200	+++
$CHE_1^S/CHE_1^S$	снижена	0	0	1:170 000	++++
$CHE_1^F/CHE_1^F$	Отсутствует	66	35	1:28 000	++
$CHE_1^P/CHE_1^S$	Немного	22	27	1:11 000	+++
$CHE_1^P/CHE_1^F$	снижена	49	33	1:2500	+++
$CHE_1^F/CHE_1^S$	Снижена	67	43	1:33 000	++
$CHE_1^U/CHE_1^P$	Немного	62	48	3,5 %	(+)
$CHE_1^U/CHE_1^F$	снижена	74	50	1,2 %	(+)
$CHE_1^U/CHE_1^S$	То же	80	59	1:200	Неизвестна

этого, было сделано заключение, что данный признак сцеплен с X-хромосомой. Последующие работы касались анализа родословных, а генеалогические данные также подтвердили X-сцепленный характер наследования реакции на данные препараты, причем в этих работах были использованы и прямые тесты исследования активности фермента Г-6-ФДГ. В дальнейшем в популяциях людей выявлены несколько редких типов Г-6-ФДГ, которые отличаются друг от друга активностью фермента, электрофоретической подвижностью в различных буферных системах, зависимостью активности фермента от pH, термостабильностью, субстратной специфичностью и другими параметрами. В настоящее время различают около 400 вариантов Г-6-ФДГ. Генетический анализ ДНК позволил обнаружить большое количество мутаций в гене Г-6-ФДГ. Наименее активная форма фермента возникает в результате только одной замены (аспарагина на аспарагиновую кислоту). Она наследуется как X-сцепленный признак. Более 30 аллелей гена имеют измененную последовательность нуклеотидов. Мутации образу-

ют непрерывный ряд фенотипов от вариантов с практически неизменными биологическими функциями к тем, которые проявляются только в неблагоприятных условиях, вплоть до вариантов, вызывающих развитие заболевания даже при отсутствии неблагоприятных факторов. Кроме противомаларийных препаратов, Г-6-ФДГ метаболизирует широкий спектр ЛС, в том числе хлорамфеникол, сульфаниламиды.

После введения в лечебную практику изониазида появились сообщения об аномальном ответе и развитии периферической нейропатии у значительного числа пациентов, которым назначался этот противотуберкулезный препарат. В серии сравнений реакций моно- и дизиготных близнецов на изониазид была впервые определена генетическая основа полиморфизма N-ацетилтрансферазы [16].

Следующим шагом вперед в изучении индивидуальной чувствительности к лекарственным препаратам было выявление генетической вариабельности путем их окисления, осуществляемого системой цитохрома P-450. Вслед за назначением антипирина и бис-гидроксикумарина по-

явились первые сообщения об индивидуальной изменчивости в клиренсе препаратов [17]. Доказательством того, что это генетически обусловлено, были результаты, полученные при изучении повышенной чувствительности к ряду гипотензивных и антиаритмических средств, к которым относятся дебрисохин и спартеин (табл. 3.2).

Индивиды, способные быстро окислять эти препараты, относятся к нормальным гомозиготам и гетерозиготам, тогда как медленное окисление свойственно лишь мутантным гомозиготам. Выявить окислительный полиморфизм *in vitro*, к сожалению, невозможно. Для определения окислительного статуса человека необходим прием внутрь контрольного препарата и

Таблица 3.2

**Полиморфизм по спартеину/дебрисохину: патологические реакции у людей с «медленным» метаболизмом [1]**

Препарат	Реакция
Дебрисохин	Пониженное давление
Спартеин	Усиленное действие, имитирующее окситоцин, и сердечная недостаточность
Фенацетин	Метгемоглобинемия
Фенформин	Молочный ацидоз
Пергексиллин	Периферическая нейропатия и агранулоцитоз
Каптоприл	Агранулоцитоз
Д-пеницилламин	Протеинурия и тромбоцитопения
Нортриптилин	Пониженное давление
Гуаноксан	Пониженное давление
Метиамид	Агранулоцитоз
Энкаинид	Средство не действует: активен только препарат, подвергшийся метаболизму
<i>β-блокаторы</i>	
Пропранолол	
Метопролол	Брадикардия и пониженное давление
Тимолол	То же
Алпренолол	«
Буфуралол	«

анализ его метаболитов в моче (определение соотношения 4-оксидебрисохина к дебрисохину). Эти ЛС метаболизируются с участием полиморфного фермента CYP2D6 (гидроксилаза дебрисохина) семейства P-450. Повышенная к ним чувствительность была связана с отсутствием функции фермента вследствие мутации в соответствующем гене. Основные типы мутаций, которые обуславливают инактивацию ферментов, идентифицированы. На основании полученных результатов разработаны ДНК-тесты для выявления индивидов с нарушением метаболизма CYP2D6.

В данных примерах отражены концептуальные положения экогенетики в целом и фармакогенетики в частности. Главные из них следующие:

- полиморфизм — это генетический субстрат, на котором формируются восприимчивость или устойчивость к заболеваниям;
- эффективность или безуспешность лекарственной терапии;
- существование достаточно большого числа мутаций генома человека в отдельных локусах, которые обуславливают патологическую реакцию на специфический фактор среды; лишь некоторая часть мутаций приводит к развитию болезни или нежелательной реакции.

Выше шла речь о моногенном характере необычных реакций на факторы внешней среды. Для этой группы экопатологических реакций возможен надежный прогноз повторения или встречаемости подобных состояний у родственников на основе менделевских закономерностей наследования. Известен ряд других, важных, с точки зрения фармакогенетики, состояний, которые наследуются как простые менделевские признаки (табл. 3.3).

Моногенный характер патологических реакций существует наряду с полигенными системами, контролирующими экогенетические ответы. В таких случаях доказательства участия многих генов в реакции на конкретный экологический фактор строятся на близнецовых сопоставлениях,

## Моногенные фармакогенетические признаки [1]

Энзиматические или метаболические аномалии	Результат и/или заболевание
<b>А. Хорошо изученные признаки</b>	
<p><i>Часто встречающиеся признаки</i></p> <p>Некоторые варианты Г-6-ФДГ            Полиморфизм по N-ацетилтрансферазе            Слабое окисление (дебрисохин / спартеин)</p> <p><i>Редкие признаки</i></p> <p>Варианты псевдохолинэстеразы            Нарушение метаболизма кальция            Некоторые нестабильные гемоглобины            Различные порфирии            Недостаточность метгемоглобинредуктазы</p>	<p>Гемолиз            Понижено ацетилирование ряда ЛС            Неспецифические реакции на многие ЛС</p> <p>Продолжительная задержка дыхания под действием суксаметония            Злокачественная гипертермия после ингаляционного наркоза</p> <p>Гемолиз            Некоторые ЛС усиливают симптомы заболеваний            Цианоз, вызываемый ЛС-окислителями</p>
<b>Б. Менее полно изученные признаки</b>	
<p>Полиморфизм по параоксоназе            Слабое окисление мефенитонина            Полиморфизм по тиопурин-метилтрансферазе (цитозолю)            Полиморфизм по катехол-0-метилтрансферазе            Недостаточность эпоксидгидролазы</p>	<p>Люди с пониженной активностью фермента (~ 50 %) более подвержены отравлению паратионом            Тяжелые побочные эффекты мефенитонина            Неэффективность тиопуриновых ЛС (например, меркаптопурина)            Неэффективность L-допа и α-метилдопа            Гепатотоксичность фенитоина</p>

внутрисемейном корреляционном анализе исследуемых фенотипов и сравнении характера реакций в различных этнических группах населения.

В настоящее время основной блок научных исследований в области фармакогенетики состоит из работ, посвященных изучению генетического полиморфизма ферментов, ответственных за метаболизм ЛС.

Таким образом, возникла возможность идентификации молекулярных основ фармакогенетического полиморфизма и, как следствие, скринирования индивидуумов на присутствие соответствующего аллеля, что открывает перспективы предвидения результатов лекарственной терапии и по-

зволит максимально индивидуализировать лекарственную терапию на базе генетической конституции. Это наиболее перспективный путь повышения эффективности ЛС и сокращения числа побочных эффектов.

### 3.3. Транспорт лекарств через биологические мембраны

Многие растворимые вещества (в том числе и ЛС) проходят через биологические мембраны с помощью переносчиков, со-

ставляющих транспортную систему клетки. Предполагается, что от 5 до 15 % всего генома контролирует мембранный транспорт. Переносчики устроены и работают таким образом, чтобы осуществлять направленный перенос веществ. Они участвуют в процессах всасывания, распределения и выведения лекарств.

В настоящее время выделяют несколько групп мембранных переносчиков, которые имеют отношение к процессам фармакокинетики и транспорта эндогенных субстратов. Вместе с тем, растет понимание того, что вариабельность генов, кодирующих транспортные белки, тоже играет важную роль в действии лекарств и токсичности химических веществ благодаря вносящей и выносящей функциям этих транспортеров [18].

Наиболее хорошо изученная группа мембраносвязанных транспортеров — суперсемейство транспортных АТФ-азных белков (АТФ-binding cassette — ABC). ABC-транспортеры (или как их еще называют — транспортные АТФ-азы) человека разделяются на 7 подсемейств (от А до G) на основе гомологичности последовательности аминокислот [19].

ABC-переносчики способны связывать, гидролизировать АТФ и другие адениловые нуклеотиды, обеспечивая энергией перенос различных веществ через биологические мембраны. Эндогенные субстраты ABC-белков — пептиды, производные арахидоновой кислоты, фосфолипиды, стеролы, нуклеозиды и нуклеотиды, ионы хлора, сахара, аминокислоты. Кроме того, ABC-транспортеры способны переносить широкий спектр лекарств и других экзогенных химических соединений (некоторые антибиотики, гидрофобные лекарства, токсины и др.) [20].

ABC-белки содержат в своей структуре 200–250 аминокислот. Такая единица содержит два консервативных пептидных мотива (обозначаются Walker A ( $W_A$ ) и Walker B ( $W_B$ )), которые участвуют в связывании и гидролизе АТФ. Между ними располагается третья консервативная последовательность — Walker ( $W_C$ ) [21].

Транспортная функциональная единица состоит из двух мембраносвязанных доменов. Каждый домен имеет вид трансмембранной спирали из шести завитков, содержащих два АТФ-связывающих участка. Такие единицы могут формироваться из одной полипептидной цепи, гомо- или гетеродимера или составлять систему из множества субъединиц, каждая из которых имеет мембранные домены.

Хорошо изучены четыре больших подсемейства ABC-транспортеров у человека: MRP/CFTR (10 членов); MDR/TAP (11 членов); ALD (4 члена); ABC 1 (11 членов). В транспорте ксенобиотиков участвуют MRP/CFTR и MDR/TAP подсемейства. Транспортеры TAP1 и TAP2 связаны с образованием антигенов. Их роль в клетках подробно изложена в главе «Иммуногенетика».

Наиболее хорошо изучен переносчик, обеспечивающий выведение из клетки ксенобиотиков. Он относится к группе В ABC-транспортеров и является Р-гликопротеином (MDR1). Ген *MDR1* экспрессируется в органах и тканях, которые выполняют экскреторную функцию (почки, тонкий кишечник, печень, плацента, семенники, клетки периферической крови, эндотелий капилляров головного мозга). Столь широкий спектр клеток, где экспрессируется MDR1, позволил предположить, что его основная функция в организме заключается в защите от ксенобиотиков. Кстати, Р-гликопротеин впервые был обнаружен в опухолевых клетках, в которых выявлена его связь с механизмами развития устойчивости к противоопухолевым препаратам.

Р-гликопротеин ограничивает всасывание иммуносупрессанта циклоспорина, сердечного гликозида дигоксина, антагониста  $\beta$ -адренорецепторов талинолола. Возможна как индукция, так и ингибирование Р-гликопротеина, что определяет конечные эффекты лекарственного взаимодействия [22].

Для *MDR1* характерен выраженный полиморфизм. Кроме того, у человека установлены мутации гена *MDR1*. Гомозиготы

ты по мутации С3435Т в 26-м экзоне встречаются в популяциях белых людей с частотой 28,6 %. Установлено, что у них снижен уровень Р-гликопротеина в кишечнике. Поэтому при приеме дигоксина внутрь наблюдается его высокая концентрация в сыворотке крови.

Р-гликопротеин способен выводить определенные субстраты из клеток эпителия в просвет соответствующего органа. В тонком кишечнике он ограничивает всасывание токсинов, в почках и печени — ускоряет выведение их с мочой и желчью, в барьерных образованиях — препятствует их проникновению в соответствующие органы. Р-гликопротеин связан с транспортом гормонов (кортикостероидные гормоны — кортизон, кортикостерон, альдостерон) и репродуктивной функцией, экспрессируется в надпочечниках, матке, плаценте. Предполагается, что в клетках крови он регулирует клеточный объем, транспортирует липиды, играет роль в дифференцировке и гибели клеток [23].

Р-гликопротеин транспортирует многие лекарства: структурно не связанные гидрофобные, амфифильные и препараты смешанной растворимости (табл. 3.4).

Так, субстрат Р-гликопротеина дигоксин у человека слабо метаболизируется. К 2–3-кратному увеличению концентрации дигоксина в плазме крови приводит его совместное введение с хинидином, из-за чего усиливается абсорбция и снижается экскреция с желчью и мочой. Предполагается, что хинидин ингибирует транспортную функцию Р-гликопротеина. Аналогичная ситуация складывается и при совместном применении дигоксина и верапамила, пропafenона, циклоспорина, интраконазола, амиодарона. Обратная картина наблюдается при совместном применении дигоксина с рифампицином. Оказалось, что этот антибиотик активирует Р-гликопротеин, что приводит к нарушению всасывания и снижению концентрации дигоксина в плазме крови [25].

Субстратами для Р-гликопротеина служат и ингибиторы протеазы ВИЧ (индинавир, ритонавир, саквинавир). Исследования на контрольных и «нокаутных» мышцах позволили заключить, что Р-гликопротеин кишечника может быть главной причиной низкой биодоступности ингибиторов протеазы ВИЧ.

Таблица 3.4

## Лекарственные средства, транспортируемые с участием Р-гликопротеина [24]

Группы ЛС	Представители групп
Противоопухолевые	Актиномицин D, этопозид, доксорубин, даунорубин, иринитекан, митомицин С, митоксантрон, тенопосид, пакслитаксел, винбластин, винкристин
Сердечно-сосудистые	β-Ацетилдигоксин, α-метилдигоксин, дигитоксин, дигоксин, хинидин
Блокаторы кальциевых каналов	Дилтиазем, верапамил, мибефрадил
Антибактериальные	Эритромицин, левофлоксацин, спарфлоксацин
Глюкокортикоиды	Дексаметазон
Ингибиторы протеазы ВИЧ	Ампренавир, индинавир, нельфинавир, саквинавир, рифонавир
Иммуносупрессанты	Циклоспорин А, такролимус
Антигистаминные	Циметидин, ранитидин
Противорвотные	Домперидон, ондансетрон
Антидиарейные	Лоперамид
Гиполипидемические	Ловастатин, аторвастатин
Другие	Дебрисохин, лозартран, морфин, фенитоин, рифампин

Важную роль Р-гликопротеин играет и в проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). В мозге «нокаутных» по Р-гликопротеину мышей установлены более высокие концентрации лекарств-субстратов. Так, при нормальной экспрессии Р-гликопротеина прохождение ингибиторов протеазы ВИЧ в мозге затруднено, что может препятствовать достижению в нем терапевтических концентраций противовирусных препаратов. Субстратом для Р-гликопротеина служит агонист опиоидных рецепторов периферического действия лоперамид (имодиум), который применяется в качестве антидиарейного средства. При введении этого препарата внутрь «нокаутным» по данному гену мышам его концентрация в плазме крови увеличивалась в 14 раз и более по сравнению с контрольными животными. При этом у животных отмечались симптомы центрального морфиноподобного действия. В исследованиях на добровольцах введение лоперамида в сочетании с ингибитором Р-гликопротеина хинидином приводило к угнетению дыхания, что характерно для морфина. Следовательно, при снижении активности Р-гликопротеина у человека возможно развитие побочных эффектов этого препарата, обусловленных системным действием [24].

В гене *MDR1* обнаружены мутации, которые могут влиять на распределение лекарств-субстратов. Этот ген локализуется в хромосоме 7q21. У здоровых добровольцев белой расы установлено 20 SNP, 6 из которых находятся в кодирующих участках. Наиболее часто встречалась замена аланина на серин или треонин во втором трансмембранном домене. С нарушением функции Р-гликопротеина связывают пока только один полиморфизм — «молчащая» мутация в экзоне 26 в позиции С3435Т. Гомозиготы по этой мутации (ТТ) имеют более низкую экспрессию Р-гликопротеина в кишечнике и почках. У коренных африканцев отмечается более высокая экспрессия аллеля 3435С по сравнению с представителями европейской и азиатской популяций. Предполагается, что СС-генотип и высокая активность Р-гли-

копротеина дают преимущества таким особям в эндемичных по инфекциям желудочно-кишечного тракта регионах. Это предположение подтверждается данными о важной роли Р-гликопротеина в защите от бактериальных токсинов.

Сходный с Р-гликопротеином транспортер (75 % идентичности по последовательности аминокислот) кодируется геном *MDR3* (*MDR2* или *PGY3*). Однако этот белок не транспортирует лекарственные препараты. Белок *MDR3* — переносчик фосфолипидов. Он экспрессируется в канальцевых мембранах гепатоцитов. У «нокаутных» по *MDR3* гену мышей развивался симптомокомплекс, схожий с прогрессирующим внутрипеченочным семейным холестазом 3-го типа. У больных людей с данной патологией белок *MDR3* полностью отсутствовал. У одного из таких больных была обнаружена 76р делеция, а у другого — нонсенс-мутация.

У человека идентифицирован транспортер, осуществляющий направленный транспорт солей желчных кислот через канальцевые мембраны гепатоцитов, — bile salt export pump (*BSEP*). Его еще обозначают sister Р-гликопротеин (*SPGP*). Ген *BSEP* локализуется в хромосоме 2p24. Обнаружено более 10 его мутаций, приводящих к нарушению последовательности аминокислот в белке *BSEP*, что служит причиной прогрессирующего внутрипеченочного семейного холестаза 2-го типа. Предполагается, что холестаз, наблюдаемый при приеме некоторых лекарств (циклоспорин А), также связан со снижением синтеза *BSEP*.

Важную роль в трансмембранном переносе лекарств играет подсемейство С белков ABC, имеющее также название *MRP*/*CFTR*-подсемейство. Такие *MRP* переносчики лекарств, как и все белки ABC, обладают общей для них схемой строения. Они состоят из четырех доменов, два из которых пронизывают мембрану (*MSD*). Каждый *MSD* состоит из 6 трансмембранных петель. Два домена связывают нуклеотиды (*NBD*). Каждый *NBD* имеет три мотива. Мотивы  $W_A$  и  $W_B$  содержатся во всех АТФ-связывающих Р-петлевых протеи-

нах, а третий  $W_C$ -мотив — уникальный для ABC-белков. Однако MRP1, MRP2 и MRP3 больше по размерам, чем другие ABC-транспортеры, так как содержат до 250 дополнительных аминокислот на N-концевом участке, которые формируют еще один трансмембранный домен (рис. 3.1). Точная функция этого участка белка неизвестна. Возможно, он важен для стабильной экспрессии переносчиков в соответствующих мембранах клеток млекопитающих.

Не содержат дополнительного трансмембранного домена MRP4 и MRP5 («к-

роткие» MRP), то есть они имеют обычную четырехдоменную структуру с 12 петлями, что характерно для многих ABC-белков.

NBD-структуры всех пяти MRP-белков имеют общие черты строения и свойства, которые отличают их от других ABC-переносчиков. На участке между мотивами  $W_A$  и  $W_B$  отсутствуют 13 аминокислот в NBD1, но они есть в C-концевом NBD2. Отличия в аминокислотной последовательности между NBD1 и NBD2 одного MRP-белка большие, чем между соответствующими доменами у разных ABC-белков. Кроме того, NBD1 имеет боль-

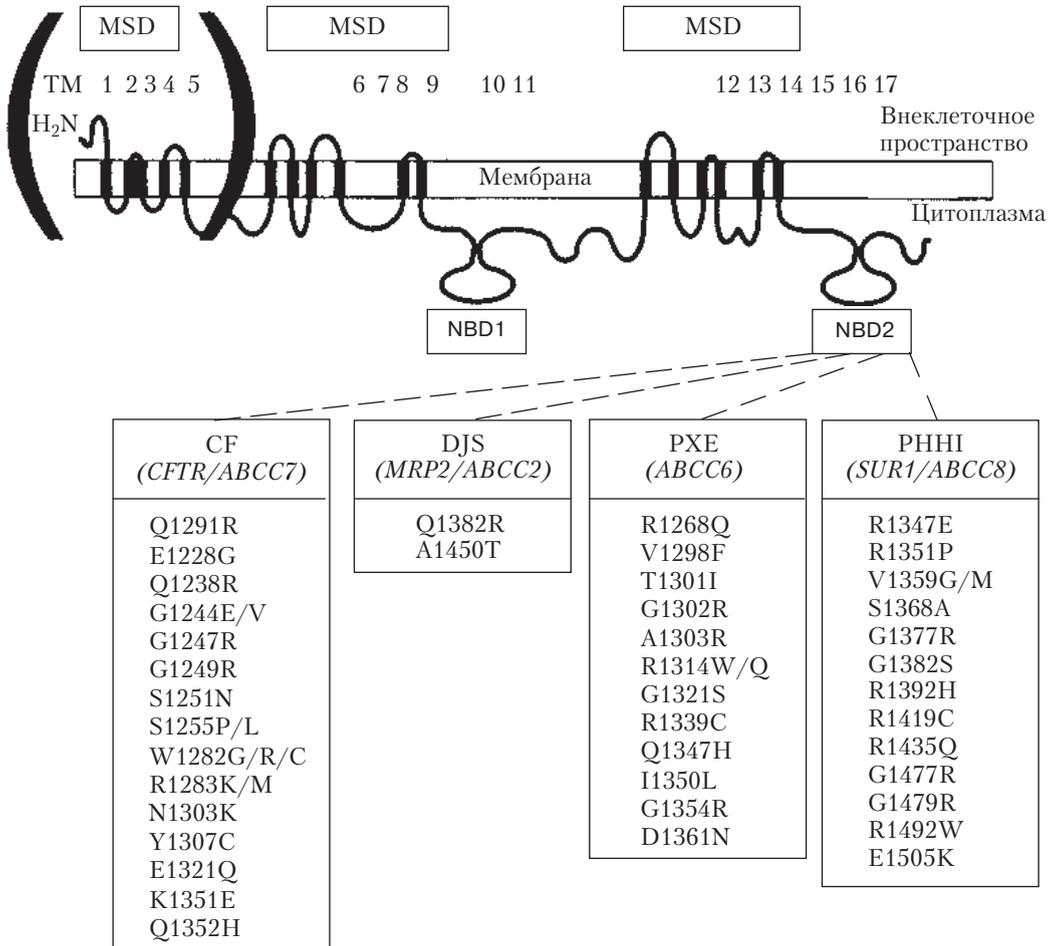


Рис. 3.1. Структура MRP-протеинов [26]

шее сродство к АТФ, чем NBD2, но последний проявляет большую АТФ-азную активность.

Первый транспортный белок MRP1 был идентифицирован и клонирован в 1992 г. [27]. Он содержит 1521 аминокислоту. Его ген локализован в хромосоме 16p13.11. Сверхэкспрессия MRP1 часто наблюдается в мультирезистентных опухолевых клетках человека в результате амплификации гена *MRP1/ABCC1*. Многие из противоопухолевых лекарств, в отношении которых MRP1 приписывают резистентность, есть природными продуктами и их полусинтетическими производными. Однако субстратами для MRP1 служат: антифолаты (метотрексат), антиандроген (флутамид) и оксанионы мышьяка и сурьмы (табл. 3.5).

С помощью MRP1 через мембраны переносятся также ингибиторы ВИЧ (саквинавир, ритонавир), фторхинолон грепафлоксацин.

Также как MRP2 и MRP3, MRP1 — активный переносчик большого числа конъюгированных и неконъюгированных органических анионов, многие из которых ксенобиотики или их метаболиты. Они играют важную роль в терапии и токсикологии. Ярким примером физиологического субстрата MRP1 служит лейкотриен  $C_4$  ( $LTC_4$ ) — медиатор воспаления. Субстратами для MRP1 служат также дисульфид глутатиона и восстановленный глутатион. Транспорт восстановленного глутатиона усиливается под действием фенилалкиламинов (верапамил) и биофлавоноидов (апегинин) [28; 29].

Экспрессируется MRP1 на достаточно высоком уровне в легких, яичках, почках, мышцах, мононуклеарах периферической крови. В поляризованных эпителиальных клетках он локализуется на базолатеральной мембране; в семенниках обнаружен в клетках Лейдинга, а также в сертолиевых клетках; в легких — в альвеолярных макрофагах, бронхиальном эпителии и гиперпластически реактивных пневмоцитах 2-го типа; в почках — в клубочках и дистальных почечных канальцах. Предполагается, что

в мозге MRP1 формирует часть барьера лекарственной проницаемости между кровью и спинномозговой жидкостью [30].

Учитывая локализацию MRP1 в клетках, считают, что он выполняет защитную функцию, удаляя лекарства и их метаболиты из клетки. Это предположение нашло подтверждение в опытах на MRP1-«нокаутных» мышах (табл. 3.6).

Как известно, MRP2 (ABCC2) человека имеет последовательность из 49 аминокислот, которая идентична таковой у MRP2. Оба белка обладают исходным диапазоном транспортировки ксенобиотиков и эндогенных молекул.

В то же время между ними существуют и определенные различия, в частности, в кинетических параметрах, с которыми MRP1 и MRP2 транспортируют один и тот же субстрат. Кроме того, транспорт органических анионов с помощью MRP2 стимулируется веществами, которые угнетают транспортную активность MRP1. Наконец, существуют значительные отличия и в тканевой локализации этих белков. Наиболее выраженная экспрессия MRP2 наблюдается в гепатоцитах, преимущественно на канальцевых мембранах. Также MRP2 найден в пневмоцитах, проксимальных канальцах почек, однако уровень его экспрессии здесь очень низок.

На поляризованных клетках экспрессирован MRP2, где он локализуется на апикальной мембране. На канальцевых мембранах гепатоцитов MRP2 выполняет важную роль в экспрессии эндогенных и экзогенных анионных конъюгатов вместе с желчью, таких как глюкурониды билирубина. Синдром Дабина — Джонсона (генетическое нарушение, сопровождающееся незначительным повышением конъюгированного билирубина в крови) ассоциируется с дефицитом MRP2. К сожалению, роль MRP2 в ограничении всасывания лекарств в кишечнике и опосредовании экскреции лекарств и их метаболитов через почки изучена недостаточно [31].

Преимущественно в тонком кишечнике, поджелудочной железе, ободочной кишке, коре надпочечников обнаруживает-

## Вещества, которые транспортируются или взаимодействуют с MRP1 [26]

Вещество	Примеры
Лекарство (и активные метаболиты)	
Противоопухолевые	Антиметаболиты на основе фолатов (метатрексат, эдатрексат, ZD1694), антрациклины (доксорубин, даунорубин, эпирубин, идарубин), растительные алкалоиды (этопозид, винкристин, винбластин, паклитаксел, иринотекан, SN-38), антиандрогены (флутамид, гидроксифлутамид)
Антивирусные	Санквиавир, ритонавир
НПВС	Индометацин, сулиндак
Антиэпилептические	Вальпроат
Антибиотики	Дифлоксацин, грепафлоксацин
Урикозурические средства	Пробеницид, сульфинпиразон
Метаболиты	Натрия арсенит, натрия арсенат, калия антимонит, калия антимонила тартрат
Конъюгаты лекарств/ксенобиотиков	
GSH конъюгаты	2,4-динитрофенил-SG, бриман-SG, N-этилмалеимид-SG, доксорубин-SG, тиотепа-SG, циклофосфамид-SG, мелфалан-SG, хлорамбуцил-SG, этакриновая кислота-SG, метолахлор-SG, атразин-SG, сульфорафан-SG, афлатоксин $\beta_1$ -эпоксид-SG, 4-нитрохинолин-1 оксид-SG, As(SG) <sub>3</sub>
Конъюгаты-глюкуроныды	Этопосид-Gluc, 4-(метилнитрозамино)-1-(3-пиридил)-1-бутанол (NNAL)-3 бета-O-Gluc, SN-38-Gluc, 4-метилумбелиферил-бета-D-Gluc, 6-гидрокси-5,7-диметил-2-метиламино-4-(3-пирдилметил) бензотиазол сульфат (E3040S)-Gluc
Естественные конъюгаты	
GSH конъюгаты	Лейкотриены C <sub>4</sub> , лейкотриены D <sub>4</sub> , лейкотриены E <sub>4</sub> , простагландин A <sub>2</sub> -SG, 15-деокси-дельта <sup>12,14</sup> простагландин J <sub>2</sub> -SG, гидроксиноненал-SG
Конъюгаты-глюкуроныды	17 бета-Эстрадиол-17 бета-D-Gluc, глюкуронозилбилирубин, бис-глюкуронозилбилирубин, гиодеоксихолат-6 альфа-Gluc
Конъюгаты-сульфаты	Эстрон-3-сульфат. Дегидроэпиандростерон, сульфалитохолат
Прочие	
Флавоноиды, полифенолы	Апигенин, нарингенин, кемферол, мирицетин, генистеин, кверцетин, халкон, эпигалокатехин-3-галлат
Естественные фолаты	Фолиевая кислота, L-лейковорин
Пептиды	GSH, GSSG, Цис-замещенные аналоги GSH (S-MeGSH, г-Gluc-Leu-Gly), N-ацетил-Leu-Leu-норлеуцинал (ALLN)
Флуоресцентные образцы	Кальцеин, Фтор-3, BCECF, SNARF
Токсины	Афлотоксин В <sub>1</sub> , метоксихлор, фенитроцион, хлорпрофам
Другие	Билирубин, фенилалкиламины (верапамил). <sup>99m</sup> Tc-сестамиби, <sup>99m</sup> Tc-тетрофосмин

Транспортная функция и «выключенный» фенотип MRP-родственных белков MRP1-5 [26]

Переносчик (ген человека, хромосома)	Предпочтение субстрата для конъюгации	Прочие субстраты					«Выключенные» фенотипы
		NP	MTX	NMP	HM	GSH	
MRP1 ( <i>ABCC1</i> , 16p13.11)	GS-X> Gluc-X> >Sulf-X	+	+	-	+	+	Нарушение LTC <sub>4</sub> опосредованного воспалительного ответа; повышенная химиочувствительность
MRP2 ( <i>ABCC2</i> , 10q24.2)	GS-X>Gluc-X	+	+	-	+	+	Конъюгированная гипербилирубинемия
MRP3 ( <i>ABCC3</i> , 17q21.33)	Gluc-X>GS-X Sulf-X	+	+	-	-	-	Повышенная химиочувствительность
MRP4 ( <i>ABCC4</i> , 13q32.1)	Gluc-X Sulf-X	-	+	+	-	+	Повышенная химиочувствительность
MRP5 ( <i>ABCC5</i> , 3q27.1)	GS-X	-	-	+	-	+	Нет данных

ся MRP3; с низким уровнем экспрессии он выявляется в печени и почках. Свои субстраты MRP3 транспортирует через базолатеральную мембрану поляризованных клеток в кровь. Среди ABCC-белков MRP3 больше всего схож по аминокислотной последовательности с MRP1, однако субстратная специфичность существенно отличается от таковой у этого переносчика.

Обуславливая резистентность к противоопухолевым препаратам метотрексату и эпиподофилотоксину (например, этопозиду), MRP3 не проявляет ее к антрациклинам (доксорубину), растительным алкалоидам (винбластину). В опытах *in vitro* MRP3 опосредует транспорт желчных кислот и ряда конъюгированных органических анионов, которые также транспортируются MRP1 и MRP2. Он эффективно переносит E<sub>2</sub> 17βG, но имеет низкое сродство к лейкотриену C<sub>4</sub> (и прочим конъюгатам восстановленного глутатиона) и значительно отличается от других MRP тем, что не переносит восстановленный глутатион или дисульфид глутатиона. Может быть, с этим связана относительная неспо-

собность MRP3 переносить антрациклины и другие лекарства естественного происхождения.

К сожалению, физиологическая функция MRP3 *in vivo* изучена недостаточно. Известно, что при холестазах его уровень в печени увеличен. У *Mrp*<sup>-/-</sup>-«нокаутных» мышей не наблюдается определенного фенотипа до тех пор, пока они не подвергаются действию цитотоксических средств [32].

«Короткие» MRP — MRP4 и MRP5. В отличие от вышеописанных MRP, они имеют только два трансмембранных домена; MRP4 экспрессируется во многих тканях человека, наибольшее его содержание в почках и простате. В клетках почек он локализуется на апикальной мембране, а в клетках простаты — на базолатеральной мембране тубулоацинарных клеток, где он, возможно, выполняет защитную функцию. Однако не исключено, что MRP4 служит переносчиком простагландинов. В головном мозге MRP4 локализуется на базолатеральной мембране эпителия паутинной оболочки и апикальной мембране эндотелиальных клеток капилляров головного

мозга. Таким образом, MRP4 имеет гистоспецифическую мембранную локализацию, что, очевидно, отображает его разнообразные физиологические функции [33].

В MRP5 также содержится только два трансмембранных домена, но он имеет около 100 дополнительных аминокислот на NH<sub>2</sub>-конце белковой цепи. Его сходство по аминокислотной последовательности с MRP4 составляет 36 %.

Слабо экспрессирован в большинстве тканей MRP5, в том числе в головном мозге, кардиомиоцитах, клетках гладкой мускулатуры сосудов.

К настоящему времени установлено, что MRP4 как насос выносит из клетки аналоги нуклеотидов 9-(2-фосфонилметоксиэтил) аденин и циклические нуклеотиды цГМФ и цАМФ. Он переносит метотрексат, топотекан, ряд оснований, нуклеозидные и нуклеотидные аналоги. Субстратами MRP4 являются также некоторые желчные соли, конъюгированные желчные кислоты и стероиды, восстановленный глутатион, простагландины E<sub>1</sub> и E<sub>2</sub>. Органические анионы, конъюгированные с сульфатом, — более подходящие субстраты для MRP4, чем те, что конъюгированы с глюкурономидом или глутатионом [34].

Спектр субстратов, переносимых MRP5, сходен с таковым для MRP4. Однако он не определяет резистентность к метотрексату, не переносит простагландины, желчные соли, глюкуроновые или сульфатные конъюгаты. Значительно отличается также аффинитет и способность MRP4 и MRP5 переносить обычные субстраты, что, возможно, имеет важное физиологическое и фармакологическое значение.

У *Mrp4*<sup>-/-</sup> и *Mrp5*<sup>-/-</sup>-«нокаутных» мышей не обнаружено каких-либо фенотипических последствий генных нарушений. Но такие мыши отличались повышенной чувствительностью к определенным лекарствам и токсическим веществам [35].

В настоящее время идентифицировано множество естественных полиморфизмов в широком спектре генов, кодирующих MRP-родственные лекарственные пере-

носчики. Для идентификации гаплотипов необходимо проводить скрининговые исследования среди этнически разнообразного населения. Тогда можно определить клинически значимый полиморфизм в популяциях. Подавляющее большинство генетических вариантов MRP-родственных переносчиков лекарств — это полиморфизмы единичных нуклеотидов (SNP), хотя найдены и повторы короткой последовательности, и короткие делеции. Как и ожидалось, частота полиморфизмов единичных нуклеотидов варьирует между различными генами MRP, а также между их кодирующими и некодирующими последовательностями. Разнообразие зависит от размера мутаций индивидуальных генов, размера и демографической особенности изучаемой популяции, времени, в течение которого накапливаются эти разнообразия, а также от других биологических факторов, например, селекции. Следовательно, можно предполагать, что частота полиморфизмов SNP в MRP-родственных генах различных популяций будет варьировать, и это подтверждается новыми исследованиями в этом направлении.

Фенотипические последствия полиморфизма единичных нуклеотидов в регулирующих областях генов MRP и внутри интронов мало изучены. Полиморфизмы кодирующих областей генов MRP включают в себя миссенс-мутации в виде замены нуклеотидов, нонсенс-мутации в виде стоп-кодонов и «молчание» (синонимические) мутации.

В белке CFTR (ABCC-7) приблизительно 80 % всех мутаций, вызывающих кистозный фиброз, находятся в нуклеотид-связывающих доменах (NBD) и почти все они вызывают тяжелую форму болезни. Значительное количество мутаций, вызывающих эластическую псевдоксантому, синдром Дабина — Джонсона (Dubin—Johnson), персистирующую гиперинсулинемическую гипогликемию младенцев, были обнаружены именно в NBD2 белках, соответственно ABCC6/MRP6, MRP2/ABCC2 и SUR1/ABCC8. Следует ожидать, что подобные мутации в NBD других

MRP-переносчиков ЛС будут нарушать их функционирование. Более того, значительное количество миссенс-мутаций и нонсенс-мутаций, которые ассоциируются с кистозным фиброзом, эластической псевдоксантомой и персистирующей гиперинсулинемической гипогликемией младенцев, найдены в СООН-проксимальной цитоплазматической петле (CL7), которая связывает TM15 и TM16. Будет неудивительно, если нонсенс-мутации кодирующей области сохраненных остатков в области MRP-1, -2, -3, -4 или -5 будут влиять на каталитическую функцию и/или субстратную специфичность. Опыты *in vitro* с широким спектром АВС-белков показали, что трансмембранные домены этих переносчиков, которые имеют более низкую степень консервативной последовательности, чем нуклеотид-связывающие домены, определяют главное сродство и специфичность к субстрату. Поэтому полиморфизмы SNP, увеличивая замены аминокислот в трансмембранных доменах, могут изменять субстратную специфичность без обязательных признаков болезни или общего нарушения функции переносчика.

Известные сейчас полиморфизмы SNP в *MRP1* локализуются, в основном, в интронных последовательностях и в других некодирующих областях гена, хотя есть сообщения и о нонсенс-мутациях полиморфизма SNP. Они возникают с различной частотой внутри популяций и между разными популяциями. Так, полиморфизм SNP G3104C в экзоне 23, который вызывает замену Ser на Cys в CL6, встречается среди афроамериканского населения с частотой 4,5 %, тогда как у представителей белой популяции он не обнаружен. Пока ни один из известных полиморфизмов *MRP1* не ассоциируется ни с одним заболеванием или необычным ответом на ЛС. Необходимы дальнейшие скрининговые исследования в данном направлении.

Нонсенс-мутации SNP в кодирующих участках *MRP1* распространены во всех доменах. Некоторые из них были воспроизведены *in vitro* путем точечного мутагеза, и мутантный белок функционально

проявлялся в задействованных в эксперименте клетках млекопитающих. Результаты показали, что ни одна мутация полностью не инактивирует переносчиков и не предупреждает экспрессию переносчиков на клеточной мембране [36; 37].

После клонирования *MRP2* были определены молекулярные основы аутосомно-рецессивного заболевания, известного как синдром Дабина — Джонсона. Многие точечные мутации и небольшие делеции у больных с этим синдромом находятся в нуклеотид-связывающих доменах (NBD) и в других цитоплазматических областях белка. Например, гомозиготная мутация Arg 768 Trp (C2302T) и Gln 1382 Arg (A4145G) локализуется в NBD1 и NBD2 соответственно. При этом Arg 768 Trp нарушает созревание и присоединение *MRP2* к апикальной мембране, в то время как мутация Gln 1382 Arg снижает перенос органических анионов лейкотриена C<sub>4</sub> и субстрат-индуцированный гидролиз АТФ. Две другие миссенс-мутации в консервативных участках NBD и MRP: Ser 7891 Phe (экзон 18C2366T) и Ala 1450 Thr (экзон 31G4348A) — были обнаружены у нормальных индивидуумов, и неизвестно, влияют ли они на функцию белка или нет, хотя *MRP2*-Ala 1450 находится в функционально важном участке C NBD2, а *MRP2* Ser 7891 расположен близко к мотиву W<sub>V</sub> NBD1 [38; 39].

Точечная мутация *MRP2*, создающая стоп-кодон в 1066 аминокислотной позиции в CL6, ведет к формированию усеченного, нестабильного белка и встречается при синдроме Дабина — Джонсона. Две другие мутации у больных с этим синдромом располагались в CL7 между TM15 и TM16, снижая транспортную функцию *MRP2*. Описаны и другие полиморфизмы у индивидов без синдрома Дабина — Джонсона [40].

Учитывая роль *MRP2* в билиарной экскреции и в абсорбции ксенобиотиков в кишечнике, этот мембранный переносчик следует считать перспективным для дальнейших фармакогенетических исследований.

Большинство SNP полиморфизмов в *MRP3/ABCC3* обнаружены в некодирующих участках гена. Клиническая роль этого «длинного» MRP в транспорте лекарств и органических анионов мало изучена. Изученные SNP мутации не оказывают влияния на функцию этого белка [41].

Полиморфизмы SNP в *MRP4* и *MRP5* описаны в японской и европейской популяциях. Они ведут к изменениям аминокислотной последовательности в консервативных участках и не влияют на функцию белков. Учитывая роль MRP4 и MRP5 в переносе простагландинов и восстановленного глутатиона, что может влиять на транспорт лекарств, можно предположить их значение для дальнейших фармакогенетических исследований.

Описанные выше результаты изучения роли MRP-переносчиков в лекарственном метаболизме базируются, в основном, на моногенном подходе, который позволяет уточнить тонкие механизмы транспорта. В то же время ответ на любой ксенобиотик редко определяется одним белком. Большинство случаев вариантности имеют мультигенную природу. Поэтому фармакогенетический подход, базирующийся на полигенной природе метаболизма, будет более эффективным, чем геномный.

### 3.4. Фармакогенетика рецепторного взаимодействия

Различают четыре основных механизма, обеспечивающих регуляцию внутриклеточных процессов посредством экстраклеточных лигандов. Молекулярные механизмы сигнальных систем трансдукции отличаются между собой.

Наиболее сложная система рецепторов связана с G-белками. В ее состав входит трансмембранный рецептор, к экстрацеллюлярной части которого прикрепляется лиганд. Внутриклеточная часть рецептора сопряжена с гуанин-нуклеотид-связую-

щим белком (G-белком). Этот белок регулирует активность фермента, который генерирует вторичный внутриклеточный мессенджер.

Следующая рецепторная система связана с тирозинкиназой и гуанилилациклазой. Эта система содержит в себе трансмембранный рецептор. Его внутриклеточная часть обладает ферментативной активностью, которая аллостерически регулируется лигандным связыванием на внеклеточном участке рецептора.

Жирорастворимые лиганды проникают через клеточную мембрану и связываются с внутриклеточным рецептором. Образовавшийся комплекс присоединяется к определенному участку ДНК в ядре клетки и регулирует процесс транскрипции.

Наконец, наиболее простую систему рецептора представляет регулируемый лигандом трансмембранный ионный канал. Его открытие осуществляется при прямом связывании лиганда с внеклеточным участком белков, формирующих канал.

Молекулярно-генетические методы, в сопоставлении с фармакологическими и биохимическими, позволили установить значение изменений рецепторных белков в развитии определенных заболеваний. Ярким примером этому служит изучение нарушений в структуре инсулинового рецептора.

Известно, что биологические функции инсулина опосредуются инсулиновым рецептором. Данный рецептор представляет собой мембранный гликопротеин, синтез которого контролируется одним геном. Посттрансляционный процессинг происходит в несколько этапов (глюкозилирование, протеолитическое разделение на  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы). После этого рецептор транспортируется и встраивается в клеточную мембрану. Инсулин присоединяется к экстрацеллюлярному домену, что приводит к активации сопряженной с рецептором тирозинкиназы. Это, в свою очередь, обеспечивает ответ клеток-мишеней на инсулин.

Резистентность к инсулину может быть обусловлена различными мутациями. Так,

выявлена мутация в виде однонуклеотидной замены в 7-м кодоне 735-го экзона 2 (AGC→GT), что ведет к замене Arg на Ser. Вследствие этого предшественник рецептора не разделяется на  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы. Другой вид мутации (экзон 17) приводит к изменению аминокислотной последовательности в АТФ-связывающем участке рецептора, который обеспечивает активацию тирозинкиназы. Описан вариант отсутствия инсулинового рецептора, что связано с гомозиготной делецией в хромосоме 19p13.2 – 13.3 (здесь локализован ген рецептора инсулина). Снижение уровня мРНК инсулинового рецептора может быть следствием бессмысленных мутаций, сцепления интронов и экзонов, а также делецией, которые ведут к нарушению считывания. Скорость транскрипции может понижаться из-за мутаций, расположенных в регуляторных участках генов. Выявлены мутации, которые нарушают посттрансляционные процессы (N-или O-гликозилирование, образование дисульфидных мостиков между  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицами, их протеолитическое разделение, ацилирование). Все это нарушает формирование и транспорт рецептора и его внедрение в мембрану клетки. Известно, что после образования инсулин-рецепторного комплекса последний подвергается эндцитозу. Инсулин высвобождается в кислой среде эндосомы, а рецептор рециклирует в мембрану. При мутациях (Glu 460 и Ser 462) нарушается высвобождение инсулина, что приводит к снижению числа мутантных рецепторов на клеточной поверхности.

*Полиморфизм ядерных рецепторов (ЯР).* Индукция ферментов, метаболизирующих лекарства, возникает, прежде всего, на уровне транскрипции и регулируется ЯР [42; 43]. Они действуют как лиганд-зависимые факторы транскрипции (табл. 3.7). В суперсемействе ЯР человека описано около 50 членов. Некоторые из них активно участвуют в регуляции синтеза ферментов, метаболизирующих ЛС: конституционный андростан-рецептор (CAR), фарненоид-Х-рецептор (FXR), глюкокортико-

идный рецептор (GR), Х-рецептор печени (LXR), Х-рецептор, активируемый пероксисомным пролифератором (PPAR $\alpha$ ), ретиноидный Х-рецептор (RXR), рецептор витамина D (VDR), ядерный фактор 4 печени (HNF4). Кроме регуляции синтеза ферментов, метаболизирующих лекарства, рецепторы CAR, LXR, PPAR $\alpha$ , PXR регулируют также экспрессию некоторых членов суперсемейства транспортных белков ABC. Поэтому их полиморфизм еще и таким путем может влиять на фармакокинетику, элиминацию лекарств из организма, а следовательно, и на лекарственный ответ [44].

Арил-углеводородный рецептор (AHR) и HNF-E2 связанный фактор (Nrf2) не являются членами суперсемейства ЯР, однако механизмы их действия на транспорт ЛС схожи с последними.

Также установлено, что плотность полиморфизмов SNP во всех кодирующих областях выше в генах, кодирующих белки рибосом, чем в генах, кодирующих P-450 или ЯР. Гены ЯР имеют более низкую плотность полиморфизмов SNP в кодирующих областях по сравнению с таковой в нетранслирующихся областях (UTR) или интронах. Гипотетически полиморфизмы SNP могут изменять где-либо в геноме и РНК, и, соответственно, количество белков рецепторов и, тем самым, в дальнейшем влиять на рецептор-опосредованный ответ. Так, в печени человека уровень иРНК CYP3A коррелирует с уровнем иРНК Х-рецептора беременности; уровень иРНК CYP2B6 – с уровнем иРНК CAR и уровнем иРНК PXR [46; 47].

Следует отметить, что полиморфизм в ЯР – не единственная генетическая вариация, влияющая на регуляцию обмена лекарств. Существует множество регулирующих компонентов, которые обеспечивают больше возможностей для разнообразия ответа, чем ежели бы ЯР были бы единственными необходимыми для этого белками.

В свою очередь, гены ферментов (метаболизирующих лекарства), которые регулируются ЯР, сами содержат полиморфиз-

Ядерные рецепторы, играющие основную роль в регуляции P-450 и других ферментов человека, метаболизирующих лекарственные средства [45]

Рецептор или регулятор	Индукующие вещества	Регулируемые P-450 (фаза I)	Другие ферменты (фаза II)
CAR (NR 1/3)	Фенобарбитал 5β-прегнан-3,2, дион CYP2C19	CYP2A6; CYP2B6; CYP2C9; CYP3A4;	UGT1A1; CULT2A1
FXR (NR1H4)	Желчные кислоты	CYP7A1	SULT2A1
GR (NR3C1)	Дексаметазон	CYP3A4?; CYP2B6?; CYP2C8/9?; CYP2C19?; CYP1A1;	
LXR α (NR1 H3)	Оксистеролы	CYP7A1; CYP3A4; CYP2B6	
PPAR α (NR1C1)	Клофибрат, статины	CYP4A	
PXR (NR1/2)	PCN; рифампицина гиперфорин	CYP2A6; CYP3A4; CYP3A5; CYP3A7; CYP2B6; CYP2C19; CYP2C9; CYP1A1; CYP1A2;	UGT1A1; UGT1A6; SULT2A1
RAR α (NR1B1)	Трансретиноевая кислота	CYP26A1	
VDR (NR 1/1)	1α, 25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	CYP3A4; CYP2B6; CYP2C9; CYP24	SULT2A1
AHR	2,3,7,8-TCDD, 3-метилхолантрен, В-нафтофлавои	CYP1A1; CYP1A2; CYP1B1; CYP2C1	UGT1A1; UGT1A6; UGT1A9; ALDH3A1; NQO1; GSTA1
Nrf2γ	Феноловые антиоксиданты		GSTs; NQO1; UGT1A6; HMOX-1

Примечание. PCN – прегненолон-16α-карбонитрил; TCDD – 2,3,7,8-тетрахлородибензо-Р-диоксин.

мы в регулирующих последовательностях, которые нарушают способность «нормальных» рецепторов действовать на этот ген. Так, например, *CYP3A4* индуцируется 1,25-дигидровитамин D<sub>3</sub>. В то же время *CYP3A7* не индуцируется, так как рецептор витамина D<sub>3</sub> (VDR) не может эффективно связываться с промотором *CYP3A7* в связи с мутацией в проксимальном ER6 отделе [48].

Вариации в функции CAR ассоциируются скорее с вариантами сплайсинга, чем с полиморфизмом в кодирующих областях. До сих пор не идентифицирован ни один функциональный полиморфизм FXR. Этот рецептор – один из основных регуляторов, предупреждающих избыточ-

ное накопление желчных кислот. Возможно, из-за этой важной функции генетические вариации в FXR ограничены: *FXR*-«нулевые» мыши жизнеспособны, но у них нарушена экскреция желчных кислот, которая лишь отчасти компенсируется действием других ЯР (CAR, PXR).

Кроме выполнения своей главной физиологической функции, *GR* способен модулировать экспрессию ферментов CYP2B, CYP2C, CYP3A. Множественные полиморфизмы в гене *GR* влияют на метаболические функции или клинический ответ на глюкокортикоидную терапию. Важен LXR для регуляции CYP7A1 и в гомеостазе холестерина [49]. Особое значение имеет PXR, так как он – главный ре-

гулятор индукции фермента CYP3A, а также участвует в регуляции ферментов CYP2B и CYP2C. Есть данные о том, что множественный полиморфизм изменяет функционирование PXR.

Индукцию CYP26A1 ретиновыми кислотами регулирует RAR- $\alpha$ . Полиморфизм лигандсвязывающей области рецептора коррелирует с устойчивостью к лечению лейкемии ретиновой кислотой. Другая группа рецепторов ретиновой кислоты — RXRS — слабо связывающие. Функционируют RXRS преимущественно как димеризующие партнеры, необходимые для начала трансактивации гена с помощью CAR, FXR, LXR, PPARS, PXR, VDR. Следовательно, генетические варианты, изменяющие функцию RXRS, могли бы вызывать распространенное воздействие на регуляцию ферментов, метаболизирующих лекарства. Описано несколько полиморфизмов в генах, кодирующих RXR- $\alpha$ , RXR- $\beta$ , RXR- $\gamma$ , но ни для одного из них не было доказано влияния на изменение цикла хотя бы единственного ЯР [50].

Известно, что мутации в гене VDR ответственны за витамин D, обеспечивающий устойчивость к рахиту. Однако нет данных о влиянии полиморфизма VDR на экспрессию ферментов, метаболизирующих лекарства.

Индукцию большой и разнообразной группы важных ферментов фазы I и фазы II лекарственного метаболизма, а также токсические ответы на диоксинподобные вещества опосредует AHR. На моделях грызунов было установлено, что полиморфизм в лигандсвязывающих областях или в областях трансактивации AHR может оказывать влияние на экспрессию AHR-регулируемых генов и на последующие за этим события. Ряд исследований показал высокую степень консервативности в последовательности AHR человека. Очевидно, в данном случае наблюдается значительное давление отбора, направленного против аккумуляции полиморфизмов, которые могут изменять активность функционально разнообразных рецепторов: Ahr-«нулевые»

мышы жизнеспособны, хотя у них наблюдается большое разнообразие отклонений в развитии [51; 52].

Важным медиатором индукции многих ферментов фазы II метаболизма в ответ на окислительный стресс выступает NRF2. Обнаружено три SNP и один триплетный повтор в промоторной области гена NRF2 человека. При этом не выявлено полиморфизма в кодирующих областях. Предполагается, что кодирующий регион NRF2 человека весьма консервативен. Это подтверждается тем, что *Nrf2*-«нокаутные» мыши очень чувствительны к токсичности ксенобиотиков и воздействию окислительного стресса [53].

Ряд печеночных ферментов, метаболизирующих ЛС, регулирует HNF4. Гены HNF4 имеют многочисленные SNP в не-транслируемых участках. Некоторые SNP в промоторной области HNF4 ассоциируются с предрасположенностью к сахарному диабету 2-го типа. Не доказано, что хотя бы один полиморфизм HNF4 влияет на экспрессию ферментов, метаболизирующих лекарства [54].

Таким образом, в настоящее время известно всего лишь несколько полиморфизмов в ЯР, регулирующих метаболизирующие ЛС ферменты у человека и играющих значительную роль в функционировании рецепторов. Более того, эти аллели очень редко встречаются в человеческих популяциях.

Выявленный полиморфизм в генах ЯР пока не нашел своего практического применения. В то же время многочисленные полиморфизмы ЯР, которые служат в качестве эндокринных посредников, имеют важное клиническое значение.

Исследование полиморфизма ЯР, которые регулируют ферменты, метаболизирующие лекарства, тем не менее перспективно, несмотря на все технические сложности. Не исключено, что в ближайшее время будет установлен механизм полиморфизма некоторых ЯР, влияющих на регуляцию всех генов, которые контролируются этим рецептором. При более глубоком понимании диапазона физиологических функций каждого ЯР можно будет лучше оценить

пределы, до которых эволюция может включать в наших рецепторах генетическое многообразие.

### 3.5. Система цитохрома P-450 в метаболизме лекарственных средств

Большая часть ЛС, поступающих в организм пероральным путем, в той или иной степени липофильны, поэтому их всасывание происходит, в основном, за счет пассивной диффузии. После всасывания лекарства связываются белками плазмы крови и циркулируют с током по всему организму или накапливаются в жировой ткани. В таком виде они не могут выделяться с мочой. Их эффективная элиминация возможна лишь при условии образования гидрофильных метаболитов. Основным органом метаболизма — печень [55]. Эндотелиальные клетки ее синусоидов имеют большие клеточные поры (фенестры), через которые проникают белки плазмы крови. Они пассивно проходят через синусоиды в пространство Диссе. Затем ЛС путем пассивного или активного транспорта поступает в гепатоцит, где метаболизируется комплексами ферментов фазы I и фазы II. Образовавшиеся метаболиты либо вновь попадают в кровь через синусоидальный ток и выводятся почками с мочой, либо через каналикулярную мембрану секретируются в желчь, а затем выводятся с калом [55].

Особую роль в метаболизме ЛС играет ферментная система цитохрома P-450.

*Номенклатура цитохрома P-450.* Цитохромы P-450 представляют большую группу белков. В настоящее время молекулярно-химическими методами (очистка ферментов, определение аминокислотного состава, иммунохимия) установлено значительное количество изоформ цитохрома P-450 и соответственно их генов [56]. Считается, что все они кодируются генами, произошедшими от общего гена-предшественника. Количество таких генов составля-

ет сейчас около 500. Они обнаружены у 85 видов эукариот (беспозвоночные, позвоночные животные, растения, грибы и др.) и 20 видов прокариот. Родственность их происхождения положена в основу широко используемой номенклатуры (то есть в родстве последовательностей, кодирующих соответствующие белки-ферменты) [57].

В настоящее время, исходя из неполного соответствия гемопротейна класса цитохромов, Номенклатурной комиссией Международного союза биохимиков и молекулярных биологов (NC-IUBMB) рекомендовано этот фермент называть гемтиолатный протеин P-450 (вместо цитохром P-450).

Для обозначения цитохромов P-450 используют аббревиатуру CYP (cytochrom P-450). Гены и продукты их экспрессии (mRNA, cDNA) также обозначаются CYP. Исключения составляют гены мышей и дрозофил (Cyp). Все цитохромы P-450 называются суперсемейством [58].

Название отдельного CYP P-450 происходит согласно простому правилу комбинации число-буква-число. Первое число обозначает семейство P-450, представители которого имеют 40 % и более идентичных аминокислотных последовательностей. У животных распознано 43 семейства P-450, у растений — 46 и у грибов — 25.

На сегодняшний день насчитывается более 270 различных семейств генов CYP (18 из них — у млекопитающих). У растений превалирует разнообразие малых молекул, поэтому предполагается содержание у них большого количества ферментов CYP P-450. Это подтверждается геномом небольшого горчичного растения *Arabidopsis thaliana*, который содержит 249 активных генов CYP и 24 нефункциональных псевдогена (1 % от общего числа генов). Сходен и геном риса, в котором найдено 324 функциональных гена. В то же время у человека всего 57 функциональных генов CYP и 33 псевдогена, распределенных в 18 семейств и 42 подсемейства. Предполагается, что это число не изменится, если не будут найдены активные гены человеческих подсемейств CYP2G и CYP2T [59].

Комбинация число-буква, например, P-450 1B, определяет соответствующее подсемейство внутри каждого семейства. Для их обозначения используются буквы латинского алфавита (A, B, C и т. д.). У членов подсемейства отмечается идентичность последовательностей аминокислот более чем 65 % и даже 75 % как внутри вида, так и между видами. Есть семейства P-450, которые не имеют подсемейства. В то же время такие, как семейство 2 у млекопитающих, содержат более 10 подсемейств [60].

Последняя цифра в обозначении используется для определения специфического фермента P-450, например P-450 2C9. Когда обозначают ген *P-450*, то используют трехбуквенный код CYP, который дополняется кодом число-буква-число для закодированного этим геном белка (CYP2C9). Например, ферменты стерол 27-гидроксилаза и витамин D 24-гидроксилаза относятся к семейству CYP27, так как они имеют  $\geq 40$  % идентичности последовательностей. Стерол 27-гидроксилаза затем относится к подсемейству CYP27A, а витамин D 24-гидроксилаза — к подсемейству CYP27B, так как их последовательности идентичны менее чем на 55 %. Если будет открыт дополнительный фермент, который более чем на 55 % идентичен со стерол 24-гидроксилазой, то его назовут CYP27A2 и т. д. [57].

Единая номенклатура обеспечивает идентификацию ферментов, которые метаболизируют множественные структурно разные субстраты. В эту группу включены как ферменты P-450, вовлеченные в метаболизм ксенобиотиков, так и гены, кодирующие P-450 с до сих пор не идентифицированными функциями.

Методы современной молекулярной биологии позволяют выделить гены из любого источника и в достаточном количестве. Благодаря этому, удалось получить изоформы цитохромов P-450, отличающиеся аминокислотной последовательностью от природных гемопротеинов. Для них используют следующую номенклатуру. Вначале указывается природная изоформа ци-

тохрома P-450, затем идет аббревиатура X-число-Y, где X — аминокислота природного цитохрома, число — место ее локализации, Y — аминокислота, которая ее сменила в реконструированном (химерном) гемопротеине. Например, CYP1A1I426V: следует считать, что в CYP1A1 в 426 положении изолейцин заменен валином.

Подсемейства генов P-450 могут быть простыми и сложными. У разных видов в подсемействах с множеством членов третий номер в обозначении белка обычно уникален для каждого фермента каждого вида. Число генов каждого семейства, также как и число каждого подсемейства, может варьировать между видами. Многие из этих генов, вероятно, отражают дубликацию гена и дивергенцию, которая произошла с момента расхождения видов млекопитающих. Так, например, P-450 2C ферментов человека имеют приблизительно 75 % идентичности аминокислотных последовательностей с белками P-450 2C кролика. В то же время сходство среди кроличьих 2C варьирует от 68 до 95 % [61].

В литературе накоплен значительный материал, касающийся определения локализации генов цитохромов P-450. В частности, доказано, что *CYP1A1* и *CYP1A2* находятся близко друг от друга в хромосоме 15 человека. В том случае, когда два и более гена находятся в кластере, рекомендовано указывать только принадлежность к семейству, то есть *CYP1A* кластер. У мышей *Cyp1a1* и *Cyp1a2* локализованы в хромосоме 9 и также соответствуют *Cyp1a* кластеру. Для указания места локализации гена в хромосоме используется принятая в генетике аббревиатура, например, для *CYP1A* 15q22-qter (MPJ). На сегодняшний день локализованы пять функциональных генов у *CYP2D* (15-я хромосома) и аналогичное количество *Cyp2d*. Кластер *CYP2D* (22q13.1) человека представлен 1 геном и 2 псевдогенами.

У крысы *Cyp2a* кластер состоит из 5 генов. Предполагается, что они возникли в результате дубликации единичного гена. После дубликации диплоидные клетки имеют уже не 2, а 4 гена для каждого бел-

ка. В последующих генерациях каждая пара генов может изменяться независимо от других пар генов. При этом одна пара продолжает контролировать синтез исходного функционального белка, другая пара, претерпевая значительные мутационные изменения, отвечает за синтез белка с той же функцией, однако отличается по специфичности или активности.

Вероятно, дубликации генов цитохромов P-450 в ходе эволюции сопровождалась также и их транслокацией. В результате этого близкие гены оказались в различных хромосомах, например, гены человека *CYP2B* (19q13.1–13.2), *CYP2C* (19q12–q13.2) и *CYP2D* (10q24.1–24.3), которые образуют одно семейство. Наиболее древний ген *CYP51* представлен у человека соответствующим кластером *CYP51* (7-я хромосома) и двумя псевдогенами *CYP51P1* (3-я хромосома), *CYP51P2* (13-я хромосома).

Множественность, которая очевидна для P-450 ферментов, с высокой вероятностью отражает дубликацию гена и дивергенцию. Этот процесс значительно расширяет каталитическую емкость системы P-450 для метаболизма широкого круга структурно различных субстратов, включая недавно созданные человеком химикаты, применяемые в промышленности и сельском хозяйстве, фармакологические препараты. Дивергенция удвоенных генов привела также к образованию псевдогенов, кодирующих дефектный аллель, и полиморфным аллелям, кодирующим ферменты с нарушенной метаболической активностью [62].

Врожденные генетические нарушения формируют разнообразие уровней ферментной активности, которая реализуется на уровне популяций. По этим признакам можно выделить, в крайних вариантах, три группы людей: медленных, быстрых и эффективных метаболизаторов. Для медленных метаболизаторов характерна низкая активность ферментов, для быстрых — самая высокая. Группа эффективных метаболизаторов характеризуется полнотой и завершенностью процесса. Кроме того, могут

быть и другие варианты спектра ферментной активности с широким диапазоном колебаний, определяющие метаболизм ксенобиотиков. Распределение может быть гауссовским или полимодальным, включая группы индивидуумов, отличающихся от большинства в популяции различной степенью экспрессии ферментов, вплоть до ультрабыстрых метаболизаторов, которые не реагируют на стандартные дозы ЛС из-за их быстрой деградации [63].

Меж- и внутрииндивидуальная вариабельность ферментов метаболизма ЛС в значительной степени определяет различия в фармакокинетике и фармакодинамике и обуславливает следующие эффекты:

- 1) чрезмерное терапевтическое действие при низкой активности фермента (медленные метаболизаторы);
- 2) увеличение токсичности в результате отсутствия трансформации (медленные метаболизаторы);
- 3) снижение эффекта при высокой активности ферментов (быстрые метаболизаторы);
- 4) появление токсичности от продуктов метаболизма, образующихся на различных, отличающихся от главного, путях биотрансформации.

Функциональные последствия дефектных аллелей явно прослеживаются у человека в локусе *CYP2D*, который кодирует один из P-450 ферментов (P-4502D6), распознаваемый аутоантителами, ассоциированными с аутоиммунным хроническим гепатитом в стадии активации. Дефектный аллель *CYP2D6* встречается с высокой частотой (до 10 %) у людей белой расы. У них одновременно часто обнаруживается его низкая активность, что приводит к нарушению выведения из организма многих ЛС. Нарушение метаболизма ЛС может вызывать неожиданные токсические эффекты. Полиморфизм, приводящий к фенотипам слабых метаболизаторов, был выявлен для ряда P-450 человека. Сниженная способность к выведению ЛС особенно опасна в случаях небольшой разницы между терапевтической и токсической дозами.

Таблица 3.8

**Основные изоформы цитохрома P-450, катализирующие окисление ксенобиотиков в организме человека, крысы и мыши [55]**

P-450	Человек	Крыса	Мышь
1A	1 (100), 2 (100)	1 (79), 2 (75)	1 (80), 2 (73)
1B	1	1	1
2A	6, 7, 13	1, 2, 3	4, 5, 12
2B	6	1, 2, 3, 12, 15	9, 10, 13
2C	8, 9, 18, 19	6, 7, 11, 12, 13, 22, 23, 24	29
2D	6, 18	1, 2, 3, 4, 5	9, 10, 11, 12, 13
2E	1 (100)	1 (80)	1 (77)
2F	1	—	2
2G	—	1	—
2J	2	3	—
3A	4, 5, 7	1, 2, 9, 18, 23	11, 13, 16

*Примечание.* В скобках — процент аминокислотного подобия изоформ P-450, кодирующихся ортологосными генами.

Большой объем информации об изоформах цитохрома P-450 лег в основу построения филогенетического дерева эволюции этих белков. Известно, что функционально те же самые ферменты, из филогенетически удаленных видов, сохраняют общие элементы структуры, однако могут иметь существенно различающиеся последовательности. Важным для таких белков становится отсутствие изменений аминокислотной последовательности в области активного центра. Вероятно, любая перестройка на этом участке либо изменяет его стерическое соответствие и способность связывать субстрат, либо приводит к утрате той группы, которая принимает участие в каталитическом процессе. Следовательно, передачу признаков с модификацией можно легко оценить по дивергенции аминокислотной последовательности гомологичных белков, то есть на основе вычисленного количества мутаций в кодонах [59].

В связи с частым использованием в экспериментальной медицине в качестве подопытных крыс и мышей интерес представляет сопоставление изоформ их цитохрома P-450 с таковыми у человека (табл. 3.8).

Только три изоформы семейства 1 (1A1, 1A2, 1B1) и одна изоформа семейства 2 (2E1) представлены ортологосными формами у человека и грызунов, то есть эти изоформы есть у представителей трех видов. Однако и для них характерна видовая специфичность. Например, CYP1B1 человека эффективно катализирует O-детилирование этоксирезорфина. Аналогичная изоформа мышей абсолютно неактивна в этих реакциях. Отмечены также значительные различия между CYP1A2 человека, с одной стороны, мышинными и крысинными, с другой, по отношению к варфаринмонооксигеназной активности. Видовую специфичность ортологосных изоформ, очевидно, можно объяснить различием в их аминокислотном составе.

Указанные ферменты играют важную роль в метаболизме ксенобиотиков. Так, цитохром CYP1A1 окисляет плоские молекулы полициклических ароматических углеводородов в закрытых конформацион-

ных позициях. В результате таких реакций образуются ареновые окислы, которые недоступны для эпоксигидролаз, превращающих их в соответствующие трансдигидродиолы. Поэтому возрастает вероятность таких реакционноспособных метаболитов ковалентно связываться с белками и нуклеиновыми кислотами, что обуславливает их цитотоксическое, мутагенное и канцерогенное действие [57].

Изоформа CYP1A2 отличается субстратной специфичностью, например, катализирует процессы N-гидроксилирования полиядерных ароматических аминов, которые в организме также образуют реакционноспособные метаболиты.

Изоформа CYP1B1 по субстратной специфичности в большой степени напоминает CYP1A1. Цитохром CYP2E1 катализирует реакции окисления различных углеводородов — производных бензола, стирола, четыреххлористого углерода, хлороформа, дихлорметана, хлорвинила, этилкарбомата, акрилонитрила, в результате метаболизма которых образуются токсические соединения.

Цитохром СYP2E1 — практически единственный фермент, ответственный за образование в организме гепатотоксических метаболитов из ингаляционных наркотических средств. С этой изоформой также связаны этанолокисляющие свойства человека, так как этот фермент, наряду с алкогольдегидрогеназой, метаболизирует спирт до ацетальдегида.

*Образование реактивных продуктов, опосредованное P-450.* Некоторые из P-450 ферментов, представленных в табл. 3.9, распознаются аутоантителами, ассоциированными с аутоиммунным ответом, который индуцирован лекарственными средствами.

Аутоиммунный ответ развивается, преимущественно, под воздействием тех ЛС, которые служат субстратами для ферментов, распознаваемых антителами. Таковыми могут быть гипотензивные (дигидралазин, тиениловая кислота) и противосудорожные препараты (фенитоин, карбамазепин), барбитураты (фенобарбитал), дисульфирам, который используется в качестве инверсионной терапии при алкоголизме).

Тесная связь между распознаванием антигена P-450 и его взаимодействием как

фермента с субстратом позволяет предположить вероятность несложного механизма взаимоотношения между аутоиммунным ответом, лекарством и его метаболизмом, осуществляемым P-450. Реактивные метаболиты, которые образуются при P-450-катализе, могут модифицировать белки. Последние становятся аутоантигенами, к которым формируются аутоантитела. При их взаимодействии возникает цитотоксическая реакция [65].

Продолжительное химическое воздействие на организм также может привести к аутоиммунному ответу. Например, алкогольное поражение печени (АПП) — частое проявление хронической алкогольной интоксикации. Это прогрессирующее заболевание характеризуется стеатозом, гепатитом, фиброзом и, в конце концов, циррозом. Развитие АПП также ассоциируется с аутоиммунными реакциями.

В отличие от других реакций гиперчувствительности, встречающихся относительно редко, отсроченное появление аутоантител предполагает более опосредованную обусловленность повреждения тканей, которая развивается в результате постоянного воздействия. У больных с АПП выяв-

Таблица 3.9

P-450 ферменты человека, взаимодействующие с аутоантителами [64]

P-450	Состояние	P-450	Состояние
1A2	Идиопатический аутоиммунный гепатит	2E1	Алкогольное поражение печени
	Аутоиммунная полигландулярная болезнь	3A7	Лекарственно-индуцированная гиперчувствительность (фенобарбитал, фенитоин, карбамазепин)
	Лекарственно-индуцированная гиперчувствительность (дигидралазин)		Лекарственно-индуцированная гиперчувствительность (дисульфирам)
	Лекарственно-индуцированная гиперчувствительность (дисульфирам)	11A1	Аддисонова болезнь
2A6	Аутоиммунная полигландулярная болезнь		Аутоиммунная полигландулярная болезнь
2C9	Лекарственно-индуцированная гиперчувствительность (тиениловая кислота)	17	Аддисонова болезнь
			Аутоиммунная полигландулярная болезнь
2D6	Идиопатический аутоиммунный гепатит	21	Аддисонова болезнь
			Аутоиммунная полигландулярная болезнь

ляются циркулирующие антитела, взаимодействующие с белковыми комплексами ацетальдегида и гидроксипиридина. Эти два радикала образуются в результате окисления этанола и ковалентного присоединения к белку, что формирует неоантигены, которые инициируют иммунный ответ. Опосредованное окисление этанола CYP2E1 служит важным источником этих радикалов, а CYP2E1 является главным антигеном для образования аутоантител, выявленных у больных алкоголизмом [66].

Прояснить роль этого фермента в образовании радикалов могут CYP2E1-дефицитные мыши, которые служат удобной моделью для изучения иммунного ответа. Уровень экспрессии печеночных P-450 определяется воздействием этанола. Предполагается, что повышение активности ферментов может способствовать прогрессированию АПП. Повышенная активность CYP2E1, возникающая под действием некоторых других химических веществ (включая другие гемогенсодержащие анестетики), активируемых этим ферментом, также может повышать риск развития АПП [67].

Электрофильные продукты, образованные с помощью P-450, могут ковалентно видоизменять клеточные макромолекулы. Предполагается, что этот процесс лежит в основе канцерогенности многих химикатов, которые сами по себе инертны.

Цитохромы P-450 могут катализировать начальные этапы как канцерогенной активации, так и детоксикации. Например, 2-ацетиламинофлуоринон у кролика метаболизируется множеством P-450 в гидроксильированные продукты циклических систем. Они легко выводятся и не считаются канцерогенными. С другой стороны, CYP1A2 катализирует N-гидроксильирование 2-ацетиламинофлуоринона, который может затем образовывать серные конъюгаты. В то же время N-ацетильная группа может формировать N-ацетоксисоединение. Гидроксилсульфат и ацетоксиметаболиты относятся к клеточным нуклеофилам, взаимодействующим с нуклеиновыми кислотами. Возникающая в результате это-

го модификация клеточной ДНК, как предполагается, приводит к мутациям, которые, в свою очередь, ведут к неопластическому росту.

Относительный баланс между процессами детоксикации, катализируемыми одними P-450-ферментами, с одной стороны, и процессами активации, катализируемыми иными P-450-ферментами, с другой, вносит определенный вклад в риск канцерогенеза. Этот баланс зависит от типов тканей, клеток, диеты, возраста и объясняется высокой дифференциацией экспрессии различных членов системы P-450. Баланс может быть нарушен индукцией специфических P-450 в результате воздействия ЛС и химических веществ окружающей среды [64].

Определение фенотипа активности фермента позволяет предположить несколько ответов на применяемые ЛС:

1) токсичность ЛС определяется его исходной формой; элиминация происходит исключительно путем дезактивации полиморфным ферментом; дополнительных путей метаболизма не существует. По такому варианту могут накапливаться продукты метаболизма у медленных метаболизаторов и вызывать токсичность, как, например, изониазидная нейропатия, индуцированная пестицидами болезнь Паркинсона и др.;

2) при наличии нескольких возможных путей метаболизма возможно его смещение на альтернативный, дополнительный путь с образованием реакционноспособного промежуточного продукта токсичности. Вероятность появления такого эффекта возможна у медленных метаболизаторов. Примером может служить изониазидная гепатотоксичность;

3) образование токсичных метаболитов провоцируется реактивным метаболитом под действием полиморфного фермента. У быстрых метаболизаторов, по сравнению с медленными, возникает более высокий риск развития интоксикации или химического канцерогенеза.

*Индукция P-450 экзогенными химическими веществами.* Биосинтез различных

изоформ цитохрома P-450 находится под генетическим контролем. Одни из них могут быть конститутивные, то есть образуются независимо от того, в каких условиях находится клетка, другие — индуцибельные, часто синтезирующиеся в следовых количествах и достигающие необходимого уровня при наличии эндогенных или экзогенных субстратов. Для некоторых изоформ цитохрома P-450 свойственно явление импринтинга. Оно заключается в том, что после введения в неонатальном периоде индуктора (например, фенобарбитала) соответствующие значения гемопротеида в печени животных сохраняются и при достижении половой зрелости. В этом случае происходит необратимая индукция. Для некоторых конститутивных форм ферментов также наблюдается явление индукции. Транскрипционная активация отдельных генов начинается на различных стадиях развития организмов и зависит от вида животных, пола, типа тканей. Для некото-

рых генов обнаружен промотор, содержащий как отрицательные, так и положительные регулирующие элементы. Это может быть специфический белок, который в фосфорилированной форме действует как положительный элемент промотора, а в дефосфорилированной — как отрицательный. Различные гормоны (половые, тиреоидные, глюкокортикоиды, гормон роста) в значительной мере модулируют экспрессию генов [68–71].

Огромное количество чужеродных химических веществ может избирательно увеличивать относительное содержание специфических P-450. Предполагается, что принципиальный механизм индукции заключается в увеличении транскрипции гена (табл. 3.10).

Это было доказано экспериментальными исследованиями внутриядерных процессов в клетке путем изучения индукции ферментов CYP2B — фенобарбиталом, CYP1A2; CYP1A3; CYP1A7; CYP1A8 —

Таблица 3.10

## Опосредованная рецепторами регуляция экспрессии гена P-450 [64]

P-450	Рецептор	Действие	Лиганды
CYP1A1	Ah-рецептор	Индукция метаболизма полициклического ароматического углеводорода	Полициклический ароматический углеводород
CYP4A#	Активированный рецептор $\alpha$ пролиферации пероксисом	Индукция $\omega$ -гидроксилирования жирных кислот	Жирные кислоты, DHEA
CYP2B#	Активированный конститутивный рецептор	Индукция лекарственного метаболизма	Фенобарбитал
CYP3A#	Прегнан X-рецептор	Индукция лекарственного метаболизма и метаболизма стероидов	Рифампицин, глюкокортикоиды
CYP26	Рецептор ретиноевой кислоты	Индукция распада ретиноевой кислоты	Ретиноевая кислота
CYP27B	Рецептор витамина D3	Подавление продукции гормонов	1 $\alpha$ , 25-дигидроксивитамин D3
CYP24	Рецептор витамина D3	Активация распада гормонов	1 $\alpha$ , 25-дигидроксивитамин D3
CYP7	X-рецептор печени	Активация синтеза желчных кислот	Оксистерол
CYP7	Фарнизен X-рецептор	Подавление синтеза желчных кислот	Желчные кислоты

диоксином; СУР3А — дексаметазоном и рифампицином; СУР4А — клофибратом. Наоборот, индукция Р-450-ферментов этанолом или гетероциклическими соединениями (пиразол или имидазол), похоже, отражает устойчивость фермента к превращениям, так как накоплению белка не предшествует повышение концентрации иРНК. Относительное содержание СУР2Е повышается при диабетических состояниях. В этих случаях растет относительное содержание иРНК, но нет доказательств увеличения транскрипции. Индукция СУР3А-ферментов антибиотиками эритромицином и олеандромицином отражает их участие в стабилизации белка, так как период полувыведения СУР3А этими лекарствами увеличивается.

Изучение модифицирующего действия ЛС на активность ферментов представляет важную проблему, имеющую не только научный, но и практический интерес.

Как уже отмечалось, каждый изофермент цитохрома Р-450 может катализировать метаболизм не одного, а нескольких лекарственных средств, подходящих ему своей структурой. Это предопределяет взаимодействие лекарств, одновременно поступающих в организм, например, циклоспорина и эритромицина. При одновременном введении этих лекарств концентрация циклоспорина в крови значительно повышается, что приводит к увеличению токсичности. Последняя вызвана конкурентным связыванием данных ЛС с цитохромом СУР3А в печени. Находящийся в эндоплазматической сети эритромицин угнетает метаболизм циклоспорина пропорционально его концентрации. Метаболизм циклоспорина восстанавливается при отмене эритромицина.

Взаимодействие лекарств может вызывать индукцию цитохрома Р-450. Например, рифампицин индуцирует СУР3А, что служит основой усиленного метаболизма циклоспорина и преднизолонa. Неэффективное действие контрацептивов у женщин, получающих рифампицин, связано с индукцией СУР3А.

Следует отметить, что число индуцирующих агентов варьирует в зависимости от вида организмов. Так, например, антибиотик рифампицин индуцирует ферменты СУР3А у человека и кролика, не влияя на них у крысы.

Член суперсемейства гормональных ЯР прегнан Х-рецептор обычно опосредует активацию транскрипции гена СУР3А в ответ на ксенобиотики. Прегнан Х-рецептор человека и кролика активируется рифампицином, в то время как у крысы — нет. Следовательно, ЯР присоединяются непосредственно к отвечающим элементам в гене-мишени, таких как, например, гетеродимер с ретиноидным Х-рецептором. Лиганд изменяет конформацию рецептора, ведущую к привлечению протеина коактиватором. Этот полипротеиновый комплекс стимулирует транскрипцию гена-мишени [72; 73].

Индукция ферментов СУР2В фенобарбиталом также опосредована гормональным ЯР — конститутивным активированным рецептором. Однако фенобарбитал может изменять способность рецептора активировать ген-мишень. Транскрипционная активация СУР1А ферментов полициклическими ароматическими углеводородами и диоксином также отражает действие цитозольных рецепторов.

Хроническое воздействие индукторов может значительно увеличивать содержание Р-450 в эндоплазматическом ретикулуме вплоть до его чрезмерного содержания. Возможно, что эти изменения нарушают естественный протеолитический процессинг Р-450 и потенциально ведут к презентации клеткам иммунной системы новых пептидных молекул, что инициирует аутоиммунный ответ [74; 75].

Накопление подобных данных о взаимодействии генов риска и их взаимодействии с ЛС позволит в перспективе предотвращать как кратковременные проявления лекарственной токсичности, так и скрыто формирующийся канцерогенез.

### 3.6. Генетическое разнообразие ферментов лекарственного метаболизма

Различные ксенобиотики, в том числе ЛС, которые попадают в организм через желудочно-кишечный тракт, легкие, кожу, при введении в кровь подвергаются метаболизму специальными ферментными системами. Большинство лекарств — это малые липофильные молекулы. При проникновении в организм они метаболизируются с образованием более полярных продуктов, которые удаляются с мочой и желчью. Процесс превращения катализируется, в основном, ферментами печени и состоит из двух последовательных фаз. Фаза I — окисление ЛС цитохром-Р-450-зависимыми монооксигеназами, а также другими ферментами, например, алкогольдегидрогеназой, флавиномоноксигеназой и др.

Ферменты цитохрома Р-450, участвуя в окислении, играют в метаболизме ксенобиотиков двойную роль. С одной стороны, они инактивируют лекарственные препараты и чужеродные химические вещества, подготавливая их к элиминации из организма, а с другой — активируют промутагены и проканцерогены, превращая их в электрофильные интермедиаты, повреждающие ДНК. Таким образом они могут участвовать в процессах мутагенеза и канцерогенеза [58; 76; 77]. Фаза II — конъюгация — включает сульфатирование, ацетилирование, а затем глюкуронирование. В катализ этих реакций вовлекается ряд ферментов, в том числе глутатион-S-трансфераза, О- и N-ацетилтрансферазы, УДФ-глюкуронилтрансфераза, сульфотрансферазы, которые завершают цикл детоксикации (рис. 3.2).

Практически все ферменты, участвующие в метаболизме лекарственных препаратов, сосредоточены преимущественно в печени. Однако они представлены также изоэнзимными формами в большинстве

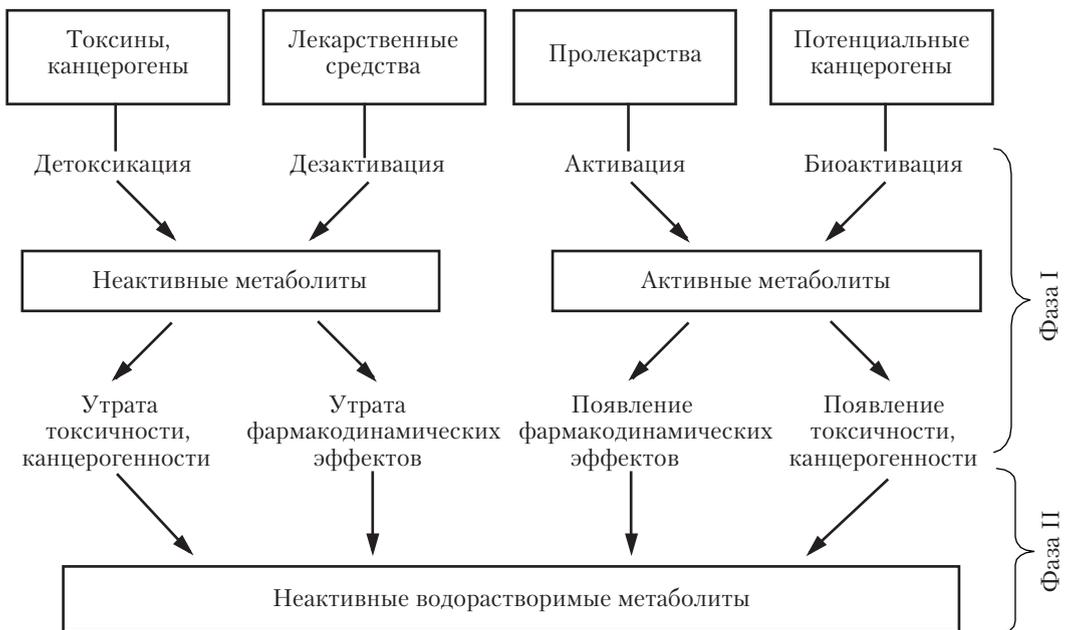


Рис. 3.2. Роль ферментов фазы I и фазы II в биотрансформации ксенобиотиков

других тканей и органов (кишечнике, легких, почках, крови и коже). Широкий спектр (поступающих извне) химических веществ, которые они метаболизируют, объясняет наличие мультигенных семейств ферментов, каждый из которых проявляет уникальную субстрат-специфичность. От скорости метаболизма ЛС ферментными системами зависит длительность их нахождения в кровотоке, а следовательно, и конечный терапевтический эффект.

Лекарственный полиморфизм объясняется мутациями в генах, отвечающих за синтез ферментов метаболизма ксенобиотиков. Мутации могут приводить к усилению или ослаблению и даже отсутствию ферментативной активности. Генетическое разнообразие в экспрессии генов, которые контролируют ферменты фазы I и фазы II, — это один из основных факторов развития токсичности или канцерогенности ксенобиотика, а также канцерогенеза.

Генетический полиморфизм обмена ксенобиотиков определяет разделение людей в популяциях на группы, различающиеся по своей способности метаболизировать ЛС: от недостаточных до сверхбыстрых метаболизаторов.

*Ферменты цитохрома P-450.* Достижения в области молекулярной биологии и геномики облегчили биохимическую характеристику определенных ферментов P-450. Это, в свою очередь, открыло много удивительного о системе, которая, как предполагалось, преимущественно метаболизирует лекарства в печени.

Оказалось, что цитохромы P-450 действуют на многие эндогенные субстраты, осуществляя окислительные, перекисные и восстановительные превращения в молекулах различных химических субстратов. Сегодня к ним относят насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, эйкозаноиды, стеролы и стероиды, желчные кислоты, производные витамина B, ретиноиды, уропорфириногены.

Наряду с этим, многие цитохромы P-450 могут метаболизировать различные экзогенные соединения, включая лекар-

ства, химикаты и загрязняющие внешнюю среду вещества, естественные растительные продукты. Метаболизм чужеродных химических соединений часто приводит к их успешной детоксикации, но, к сожалению, действие ферментов P-450 может также вызывать образование токсических метаболитов, повышающих риск возникновения рака, врожденных аномалий и других токсических эффектов.

Экспрессия многих ферментов P-450 часто индуцируется накоплением субстрата. Примером может служить увеличение концентрации фермента печени человека CYP3A при приеме рифампицина, назначаемого при бактериальных инфекциях. Такая индукция не только усиливает метаболизм рифампицина, но и ведет к увеличению клиренса других лекарств-субстратов CYP3A. Так как рифампицин также индуцирует некоторые ферменты CYP2C, то это приводит к быстрому возрастанию клиренса субстратов CYP2C. Способность субстрата одного P-450 влиять на концентрацию другого служит основой так называемого межлекарственного взаимодействия, которое может существенно осложнять лечение.

Клонирование генов, биохимические и иммунохимические зонды, полученные с кДНК, позволили по-новому рассматривать биологическую и клиническую роль отдельных цитохромов P-450.

Данные различных исследователей генома человека показали, что у последнего есть более 50 генов, кодирующих ферменты P-450, которые объединяются в 17 семейств (обобщенные функции семейств и число подсемейств представлены в табл. 3.11). Семейства 11, 24, 27 кодируют митохондриальные ферменты P-450, а остальные — микросомальные P-450. Кроме того, было идентифицировано 14 псевдогенов, которые не кодируют функциональные белки.

Полиморфные формы P-450 определены в подсемействах 1A, 1B, 2A, 2C, 2D, 2E и 3A. Обычная замена аминокислоты может существенно влиять на функцию фермента и, тем самым, на способность инди-

Общая характеристика семейств генов P-450 человека [59]

СУР	Выполняемая функция фермента	Количество	
		подсемейств	генов
1	Метаболизм ксенобиотиков	2	3
2	Метаболизм ксенобиотиков	9	14
3	Метаболизм ксенобиотиков и стероидов	1	4
4	$\omega$ -Гидроксилирование жирных кислот и лейкотриена	5	9
5	Тромбоксансинтетаза	1	1
7	Холестерин и стероид $7\alpha$ -гидроксилирование	2	2
8	Синтез жирных кислот ( $12\alpha$ ОН) и простаглицлина	2	2
11	Синтез стероидных гормонов (митохондриальные ферменты)	2	3
17	Синтез стероидных гормонов	1	1
19	Ароматаза (синтез эстрогена)	1	1
21	Синтез стероидных гормонов	1	1
24	$1\alpha$ , 25-дигидроксивитамин D3 инактивация (митохондриальный)	1	1
26	Инактивация ретиноевой кислоты	1	1
27	Активация витамина D3 и синтез желчных кислот	2	2
39	24-гидроксихолестерин $7\alpha$ -гидроксилаза	1	1
46	Холестерин 24-гидроксилаза	1	1
51	Ланостерин $14\alpha$ -деметилаза	1	1

видуума метаболизировать определенное лекарство. Полиморфизм в данном случае характеризуется отличиями в последовательности нуклеотидов, которые наблюдаются в отношении обсуждаемых генов, по крайней мере, у 1 % популяции. Описаны также и другие редкие мутации [78].

*Цитохромы P-450 в метаболизме эндогенных веществ.* Семейства цитохромов P-450 человека включают в себя четыре группы, из которых 1–3-я (СУР1, СУР2, СУР3) метаболизируют чужеродные химические вещества (ксенобиотики), включая ЛС, вторичные метаболиты растений и грибов, поступающие с пищей, тысячи химических веществ, загрязняющих окружающую среду. В меньшей степени это касается четвертой группы (СУР4). Внутри каждого из этих семейств генов существует много аллельных вариантов, что и является причиной фармакогенетической гетерогенности индивидуумов [59].

Исходная последовательность обычно кодирует эффективный метаболический

фенотип. В то же время варианты аллели кодируют слабые метаболические фенотипы с низкой или нулевой активностью по отношению к определенным препаратам. В результате одной или более случайных дупликаций гена вариант генотипа может определять очень высокий ультраметаболический фенотип. Различные аллели генов, метаболизирующих ЛС (СУР2С9, СУР2С19, СУР2D6, СУР3А4, СУР3А5, СУР2А6, СУР2В6), становятся причиной неэффективного лечения, развития токсических эффектов лекарств и даже смерти [79]. Наряду с этим, скорость детоксикации химикатов внешней среды может резко отличаться у индивидуумов с разными СУР гаплотипами. Метаболическая активация наблюдается у ферментов СУР1А1, СУР1А2, СУР1В1, СУР2D6, СУР2Е1, СУР3А4, СУР3А5. Для этих ферментов эффективный метаболизм или высокоактивный фенотип ассоциирован с увеличением риска определенно типа рака или токсического эффекта. Это явление

ние может усиливаться одновременным наследованием других полиморфных систем метаболизма определенного ЛС или химического вещества [80; 81].

**Семейство генов CYP1.** Экспрессия генов семейства CYP1 индуцируется арилуглеводородным рецептором — фактором транскрипции, который активируется присоединением полициклических ароматических углеводородов (промышленные продукты горения, сигаретный дым, пищевые продукты, поджаренные на древесном угле). Выявлено, что CYP1A1 и CYP1B1 экспрессируются в различных количествах в разных тканях и есть наиболее активными метаболиторами полициклических ароматических углеводородов; CYP1A2 метаболизирует преимущественно ариламины и азотистые гетероциклы; CYP1A1 и, возможно, CYP1A2 и CYP1B1 — пока не идентифицированные лиганды для арилуглеводородного рецептора [82]; CYP1A1 инактивирует также простагландин G<sub>2</sub>, а CYP1A2 и CYP1B1 гидроксилируют эстроген во втором и четвертом положении углерода соответственно [83]. Известно, что CYP1A2 окисляет также уропорфириноген и мелатонин, а CYP1A2 метаболизирует 10–20 различных ЛС. В то же время нет данных о действии CYP1A1 и CYP1B1 преимущественно на лекарства. Неизвестны также причины необычайно высокой экспрессии CYP1B1 в некоторых типах солидных опухолей, что может иметь существенное значение при назначении химиотерапии. Все ферменты CYP1 детоксицируют или активируют многие канцерогены, поступающие из внешней среды [84].

У мышей без *Cyp1a1*-, *Cyp1a2*- и *Cyp1b1*-генов описаны отклонения в метаболизме лекарств и канцерогенов, однако такие животные жизнеспособны [85]. Это предполагает, что кодируемые ферменты P-450 или избыточны, или не играют существенной роли в метаболизме эндогенных соединений. В то же время мутации гена *CYP1B1* вызывают у человека первичную врожденную глаукому — бутфталм (табл. 3.12). На основании этого полагают, что развитие передней камеры глаза в эм-

бриогенезе требует метаболизма важных эндогенных соединений с помощью CYP1B1. Тот факт, что CYP1B1 имеет немаловажное значение в биосинтезе и распаде ретиноевой кислоты, в какой-то мере может объяснить причину первичной врожденной глаукомы [86].

**Семейство генов CYP2.** Это самое большое семейство у млекопитающих. Такие гены, как *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C18*, *CYP2C19*, у человека метаболизируют более половины всех наиболее часто назначаемых лекарств, арахидоновую кислоту и некоторые стероиды. По данным биохимических исследований *in vitro*, CYP2D6 метаболизирует более чем 75 лекарственных препаратов. Ферменты CYP2A6, CYP2A13, CYP2B6, CYP2E1, CYP2F1, CYP2J2 также участвуют в метаболизме некоторых ЛС. Однако функции таких членов семейства, как CYP2A7, CYP2R1, CYP2S1, CYP2U1, CYP2W1, до настоящего времени не изучены.

Обычно считают, что ферменты подсемейства CYP2C принимают участие в метаболизме лекарств, но индуцируемый β-нафтофлавоном фермент CYP2C участвует в синтезе 11-, 12-эпоксиэйкозатриеновой кислоты сосудистого эпителия. Этот, как и ряд других факторов, указывают на то, что большинство продуктов генов *CYP* у позвоночных вначале эволюционировали для обеспечения важных жизненных функций, а не для расщепления растительных метаболитов и других ксенобиотиков. Хотя подсемейства CYP2G и CYP2T кодируют функциональные гены у грызунов, у человека они представлены только псевдогенами. Мыши, не имеющие гена *Cyp2e1*, внешне кажутся нормальными, но очень устойчивы к токсическому эффекту бензена, что указывает на роль этого подсемейства в метаболизме ксенобиотиков [87; 88].

**Семейство генов CYP3.** Семейство *CYP3* включает 4 гена. Из них *CYP3A4* и *CYP3A5* обладают наиболее выраженной экспрессией в печени и желудочно-кишечном тракте и метаболизируют более чем 120 часто назначаемых лекарств и эндогенных

Болезни, ассоциированные с мутациями в генах *CYP* [59]

<i>CYP</i> -гены	Болезни
<i>CYP1B1</i>	Первичная врожденная глаукома (бутфгальм)
<i>CYP4A</i> , <i>4B</i>	Дефекты солевого метаболизма и водного баланса, ведущие к артериальной гипертензии
<i>CYP51</i> , <i>8A1</i>	Дефекты, ведущие к нарушениям свертывания крови и воспалительным заболеваниям, ишемической болезни сердца и легочной гипертензии
<i>CYP7A1</i>	Устойчивая к лечению гиперхолестеринемия
<i>CYP7B1</i>	Тяжелая гиперхолестеринемия и неонатальное поражение печени
<i>CYP11A1</i>	Липоидная гиперплазия надпочечников; спорадическая врожденная гиперплазия надпочечников (СВГН)
<i>CYP1B1</i>	СВГН
<i>CYP11B2</i>	Недостаточность кортикостеронметилоксидазы (тип I и II); СВГН
<i>CYP11B1</i> , <i>11B2</i>	Ферментный химеризм, вызывающий глюкокортикоидчувствительный альдостеронизм; СВГН
<i>CYP17A1</i>	Синдром избыточности минералокортикоидов, дефицит глюкокортикоидов и половых гормонов, сочетающийся с повышенным риском развития рака и гипертрофии простаты; СВГН
<i>CYP19A1</i>	Мутация с потерей функции: вирулизация женщин, гипервирилизация мужчин, СВГН. Мутация с приобретением функции: гинекомастия молодых мужчин
<i>CYP21A2</i>	Более чем 90 % всех врожденных гиперплазий надпочечников
<i>CYP24A1</i>	Гипервитаминоз D
<i>CYP27A1</i>	Сухожильно-мозговой ксантоматоз
<i>CYP27B1</i>	Витамин В-зависимый рахит (тип 1)

субстратов, таких как стероиды и желчные кислоты.

Клиническое значение имеет то, что метаболизм некоторых противогрибковых и иммуносупрессорных препаратов ферментами *CYP3A4* и *CYP3A5* может привести к снижению их уровня у пациентов с усиленным метаболизмом и избыточной их концентрации — у пациентов с замедленным метаболизмом.

Функция *CYP3A43* еще не установлена, а *CYP3A7* экспрессируется в печени плода и эндометрии матки, однако его роль в этих тканях неизвестна [89].

Для подсемейства *CYP3A* описан важный регуляторный путь контроля экспрессии этих генов в печени и пищеварительном тракте. Разнообразные химические соединения могут индуцировать гены этого подсемейства, а выраженность индук-

ции варьирует между видами. Молекулярные основы индукции были прослежены до лиганд-активируемого фактора транскрипции, который известен как прегнан X-рецептор (прегнан-активируемый рецептор или стероид- и ксенобиотик-рецептор, PXR). Этот белок — член суперсемейства гормональных ЯР, который присоединяет небольшие молекулы и тем самым активирует транскрипцию генов *CYP3A*, содержащих определенный ДНК-мотив или соответствующую последовательность в их регуляторном районе. Различия между видами в индукции ферментов *CYP3A* определенными лекарствами показывает способность соединений взаимодействовать с лиганд-присоединяющими доменами PXR.

Наличие таких регуляторных систем и их фармакологические свойства объясня-

ют способность определенных ЛС длительно защищать организм от токсического эффекта других соединений. Так, производные прегненолона могут снижать гепатотоксичность индометацина и дигитоксина. Соединения, родственные прегненолону, служат лигандами для PXR и индуцируют синтез членов подсемейства CYP3A, которые, в свою очередь, инактивируют вещества, вызывающие поражение печени. Возможность предвидеть в будущем последствия взаимодействия лекарств и создавать новые может быть облегчена скринингом с использованием PXR и их генов-мишеней CYP3A [90–92].

Некоторые из CYP3A- и CYP2B-генов индуцируются фенобарбиталом или другими лекарствами посредством иных членов суперсемейства гормональных ЯР — конститутивными андростановыми рецепторами (CAR), а также PXR. Хотя элементы ДНК-мотивов, реагирующие с CAR и PXR в регуляторных участках этих генов, различны, тем не менее установлено, что CAR могут активировать CYP3A-гены через PXR реагирующие элементы, а PXR могут регулировать CYP2B-гены через CAR и фенобарбитал-реагирующие элементы. Предполагается, что этот перекрест между рецепторами факторов транскрипции защищает от вредного воздействия растительных метаболитов или лекарств и, в то же время, расширяет предрасположенность к межлекарственному взаимодействию [93].

*Семейство генов CYP4.* Семейство CYP4 включает в себя 12 генов. Из них CYP4A11, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3 метаболизируют некоторые лекарства, но основная их роль состоит в метаболизме жирных кислот, арахидоновой кислоты, лейкотриенов, простагландинов, эпоксиэйкозатриеновой кислоты (EETs), гидроксиэйкозатетраеновой кислоты (HETEс) и гидроксипероксиэйкозатетраеновой кислоты (HPETEс). Есть данные об участии CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22 в метаболизме арахидоновой кислоты и жирных кислот. Функция CYP4A20, CYP4A22, CYP4V2, CYP4X1 не установлена. Актив-

ированные рецепторы пролиферации (PPAR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  и  $\delta$  классов), которые также являются членами суперсемейства ЯР, играют определенную роль в регуляции генов CYP4A и CYP4B.

Некоторые ферменты CYP4A и CYP4B экспрессируются в дистальных отделах извитых канальцев почек, а дефект некоторых генов CYP4 вызывает нарушение обмена соли, водного баланса, артериального давления. Несмотря на то, что большая часть экспериментов по изучению артериального давления была проведена на крысах, вместе с тем установлено, что CYP4A11 и CYP4F2 почек человека также превращает арахидоновую кислоту в 20-НЕТЕс [94; 95].

*Ферменты P-450 в обмене арахидоновой кислоты и эйкозаноидов.* Вероятно, цитохромы P-450 выполняют в организме одну или несколько эндогенных функций, кроме метаболизма внешних химических веществ и растительных соединений, из которых получают почти все ЛС. Такой двойкой функцией обладают ферменты цитохромов P-450, метаболизирующие арахидоновую кислоту, которая превращается в более чем 100 метаболитов эйкозаноидов (рис. 3.3). Установлено участие 14 цитохромов семейств CYP1, CYP2, CYP3 и CYP4 в эпоксидации, восстановлении и окислении этих молекул. Простагландины D2, F2a, E2 и EETs, HETEс, HPETEс принимают участие во многих жизненно важных процессах (сужение сосудов почек, сужение и расширение бронхов, отек, расширение сосудов кишечника, сокращение гладких мышц, аллергические реакции, гемостаз, угнетение агрегации тромбоцитов, резорбция костной ткани, лихорадка, модуляция ионного транспорта, усиление секреции пептидов и др.). Пока не описаны болезни, вызванные мутацией ферментов P-450, участвующих в метаболизме арахидоновой кислоты, однако вероятность их существования высокая.

Гены тромбосан-А2-синтазы (CYP5A1) и простаглицинсинтазы (CYP8A1) кодируют ферменты P-450, роль которых в свертывании крови прямо противополож-

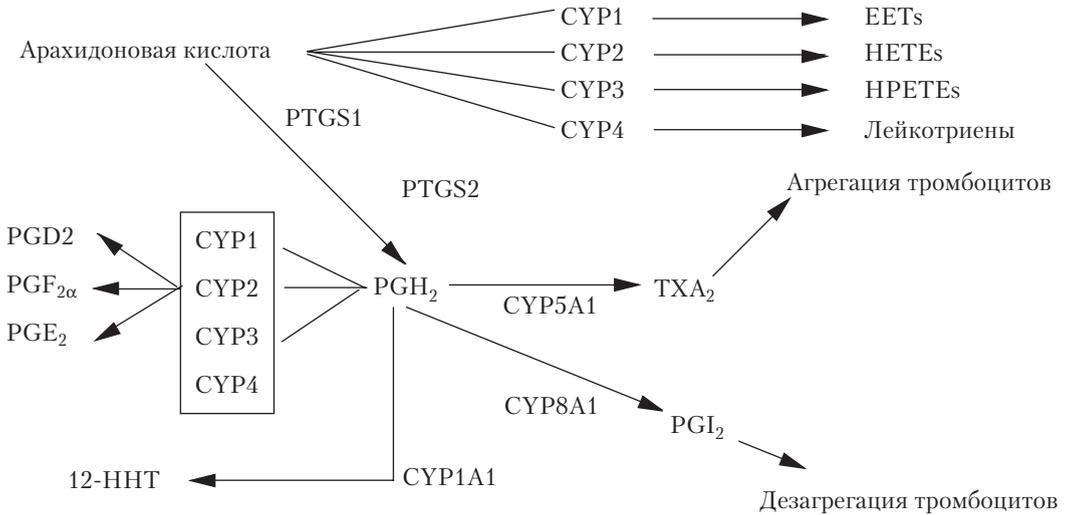


Рис. 3.3. Ферменты цитохрома P-450, участвующие в каскаде арахидоновой кислоты: PTGS1 — простагландин G/H-синтетаза-1; PTGS2 — простагландин G/H-синтетаза-2; PGH<sub>2</sub> — простагландин H<sub>2</sub>; PGE<sub>2</sub> — простагландин E<sub>2</sub>; 12-ННТ — 12(S)-12-гидрокси-5,8,10-гептадекатриеновая кислота; TXA<sub>2</sub> — тромбоксан A<sub>2</sub>; PGI<sub>2</sub> — простагландин I<sub>2</sub>; PGD<sub>2</sub> — простагландин D<sub>2</sub>; PGF<sub>2α</sub> — простагландин F<sub>2α</sub>

ная. Тромбоксан A<sub>2</sub> — продукт фермента CYP5A1 — это метаболит жирных кислот. Он снижает содержание циклической АМФ в тромбоцитах и тем самым стимулирует их способность к агрегации. CYP8A1, наоборот, формирует простагландин J<sub>2</sub> (простагландин I<sub>2</sub>), который повышает концентрацию цАМФ внутри клетки и угнетает агрегацию тромбоцитов. Предполагается, что мутации генов CYP5A1 или CYP8A1 ведут к повышенной свертываемости и воспалительным процессам, таким как ИБС и легочная гипертензия [96; 97].

**Метаболизм холестерина и биосинтез жирных кислот.** В превращении ацетата в стероиды и жирные кислоты участвуют от 7 до 9 ферментов цитохромов P-450 (рис. 3.4). Ланостерин — 14α-деметилаза, которая кодируется геном CYP51A1, — основная в синтезе холестерина, так как удаляет две метильные группы через окислительные реакции у промежуточного ланостерина. Фермент CYP51A1 служит мишенью для противогрибковых лекарств (кектоконазол) и эволюционно выступает од-

ним из самых консервативных среди всех цитохромов P-450. Гены, кодирующие данный фермент, обнаружены у растений, грибов, животных и даже у примитивных прокариот *Mycobacterium tuberculosis*. Гены CYP51 были утрачены у некоторых филогенетических ветвей (нематоды, насекомые). Тем не менее, широкое распространение этого фермента в различных царствах живой природы позволило предположить, что он — предшественник всех цитохромов эукариот [98].

Синтез желчных кислот из холестерина — основной катаболический путь удаления холестерина у млекопитающих. Гидроксилирование циклических структур холестерина, затем окисление и укорочение восьмиуглеродной боковой цепи приводят к образованию водорастворимых желчных кислот с детергентным действием. Метаболизм холестерина катализируется, как минимум, шестью различными ферментами (CYP3, CYP7, CYP8, CYP27, CYP39, CYP46).

Синтез жирных кислот из холестерина и оксихолестерина CYP7A1, CYP7B1,



Рис. 3.4. Ферменты цитохрома Р-450, участвующие в синтезе холестерина и желчных кислот

CYP39A1 инициируют путем внедрения гидроксильной группы в  $\alpha$ -положение седьмого углеродного атома В-кольца. Фарнезоид – X-рецептор (рецептор желчных кислот) – член суперсемейства ЯР гормонов, участвует в регуляции гена *CYP7A1*. Мыши, лишённые гена *Fxr*, имеют повышенную концентрацию желчных кислот, холестерина, триглицеридов и проатерогенных сывороточных липопротеинов. Стероид-12 $\alpha$ -гидроксилаза CYP8B1 необходима для синтеза первичной желчной кислоты, холата. Фермент стероид-27-/26-гидроксилаза CYP27A1 участвует в синтезе окистероидов и окислении боковой цепи стерина, а CYP46A1 катализирует также образование окистероидов [99; 100].

Необычный член суперсемейства Р-450 – CYP46A1, экспрессирующийся практически только в нейронах ЦНС. В этих клетках он превращает холестерин в оксистерин, 24S-гидроксихолестерин, который в отличие от холестерина легко проникает через гематоэнцефалический барьер. Таким образом, в ткани мозга холестерин

превращается в 24S-гидроксихолестерин, который выходит в кровоток и в печени превращается в желчные кислоты.

Описаны мутации трех из пяти генов Р-450, вовлеченных в синтез желчных кислот. Нарушение функции CYP7A1 приводит к гиперхолестеринемии и ассоциируется с устойчивостью к холестеринснижающим препаратам. Мутация в гене *CYP7B1* вызывает тяжелую гиперхолестеринемия у мальчиков. Известно более 50 мутаций у больных цереброксантоматозом, который клинически протекает с прогрессирующим атеросклерозом и тяжелым неврологическим синдромом. Дефицит CYP27A1 лечится холевой кислотой, которая восстанавливает пул жирных кислот и предупреждает синтез токсических промежуточных стероидов в превращении желчных кислот [59].

*Синтез и метаболизм стероидов.* Шесть цитохромов Р-450 участвуют в обмене стероидов (рис. 3.5). На ранних этапах эмбриогенеза, во время дифференцировки генитального гребня, фактор транскрипции (стероидфактор-1) – член семейства ЯР

гормонов — главный в активации генов P-450, участвующих в синтезе стероидных гормонов, в том числе относящихся к семействам CYP11, CYP17, CYP19, CYP21. По локализации митохондриальные ферменты — это CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2.

Для синтеза кортизола, тестостерона и эстрогена необходим CYP17A1, а CYP19A1 превращает андрогенные предшественники в эстрогены. Оба они локализируются в эндоплазматической сети [101].

Фермент CYP17A1 выполняет двойную роль, катализируя  $17\alpha$ -гидроксилирование стероидных субстратов, расщепляя и окисляя их боковые цепи. Мутации гена *CYP17A1*, нарушающие обе функции фермента, сопровождаются недостаточной продукцией глюкокортикоидов и половых гормонов. Нарушение окисления и укорочения боковых цепей ведет к дефициту только половых стероидов.

Мутация CYP11A1 становится причиной липоидной гиперплазии надпочечни-

ков, а дефект CYP11B1 ведет к недостаточности  $11\beta$ -гидроксилазы. Аллельспецифическая мутация CYP11B2 приводит к недостаточности кортикостерон-метилоксидазы как типа I, так и типа II. Рекомбинация между двумя тесно сцепленными генами *CYP11B1* и *CYP11B2* в 8-й хромосоме, которые кодируют функциональные химерные ферменты, обуславливает подающийся лечению глюкокортикоидами альдостеронизм [102].

В синтезе эстрогенов путем ароматизации А кольца андрогенного стероидного субстрата участвует CYP19A1. Мутации с потерей функции в CYP19A1 вызывают избыток андрогенов, что ведет к недостаточной вирилизации у женщин и гипервирилизации у мужчин. У таких больных наблюдаются нарушения в скелете, указывающие на важную роль эстрогенов в образовании костной ткани. Редкая мутация вызывает гинекомастию у мужчин.

Фермент CYP21A1 гидроксилирует стероидный предшественник в углеводе-

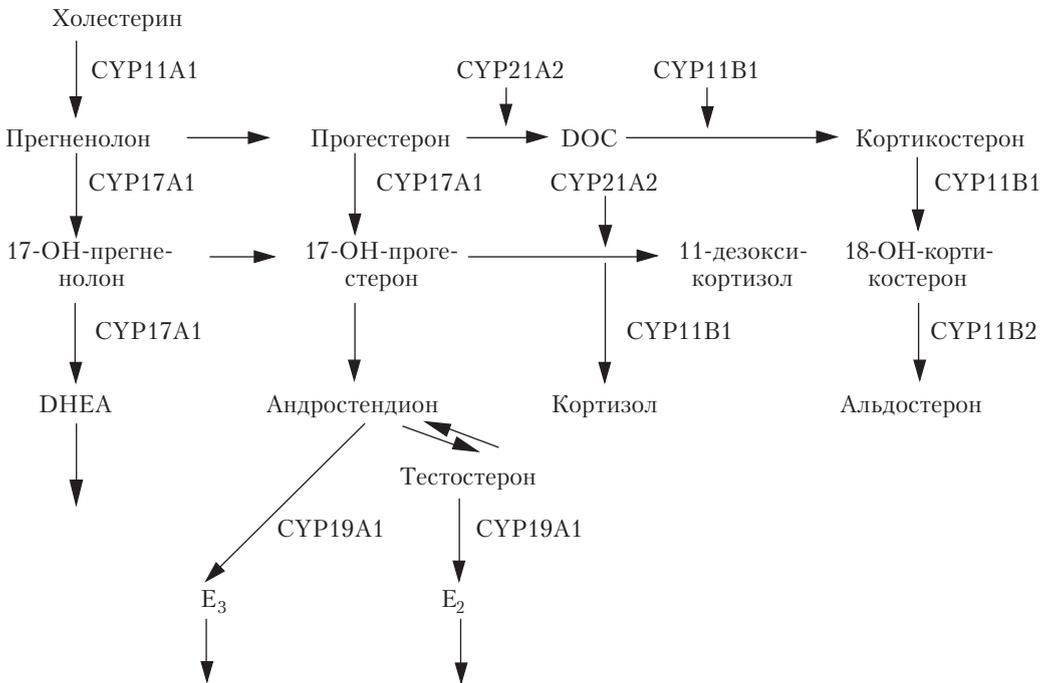


Рис. 3.5. Пути метаболизма стероидов

21, что является определенным этапом в биосинтезе глюкокортикоидов и минералокортикоидов. Мутации, нарушающие 21-гидроксилирование, более чем в 90 % случаев становятся причиной врожденной гиперплазии надпочечников — довольно частой наследственной болезни. Различают три варианта заболевания: сольтеряющая форма с маскулинизацией у женщин и угрозой для жизни в результате очень низкого уровня натрия и высокого уровня калия, гиповолемическая (классическая форма); простая вирильная врожденная гиперплазия коры надпочечников; нетипичная форма с легким нарушением активности CYP21.

Врожденная гиперплазия коры надпочечников может быть также вызвана мутацией в CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2, CYP17A1, CYP19A1 [103].

**Синтез и метаболизм витамина D.** Четыре фермента, три из которых находятся в митохондриях, а один в эндоплазматической сети, участвуют в синтезе и расщеплении  $1\alpha,25$ -дигидроксивитамина D<sub>3</sub> — лиганда рецептора витамина D<sub>3</sub>. Этот рецептор относится к суперсемейству ЯР гормонов. Система рецептор-лиганд отве-

чает за усиление выхода кальция из костей и поглощение его в желудочно-кишечном тракте (рис. 3.6).

Ферменты CYP27A1 человека (митохондриальный) и CYP2B25 свиньи (микросомальный) катализируют образование 25-гидроксивитамина D<sub>3</sub> из предшественника витамина D<sub>3</sub> холекальциферола. Оба фермента экспрессируются в печени, где CYP27A1 также играет важную роль в синтезе желчных кислот. Мутации у человека, выключающие активность CYP27A1, приводят к фенотипической недостаточности желчных кислот (цереброксантоматозу). Однако они не оказывают влияния на метаболизм витамина D<sub>3</sub> [104].

У мышей и крыс было описано пять генов CYP2D, известно их количество у свиней, один был описан и у человека (CYP2D6). Ядерный рецептор фактора транскрипции (печеночный ядерный фактор-4 $\alpha$  — HNF4 $\alpha$ ) контролирует экспрессию гена CYP2D6 у человека. Описано многократное повышение уровня сывороточных желчных кислот у мышей, лишенных гена *Hnf4a*, что ассоциируется с потерей активности фермента CYP2D. Возможно, это связано со взаимоотношением

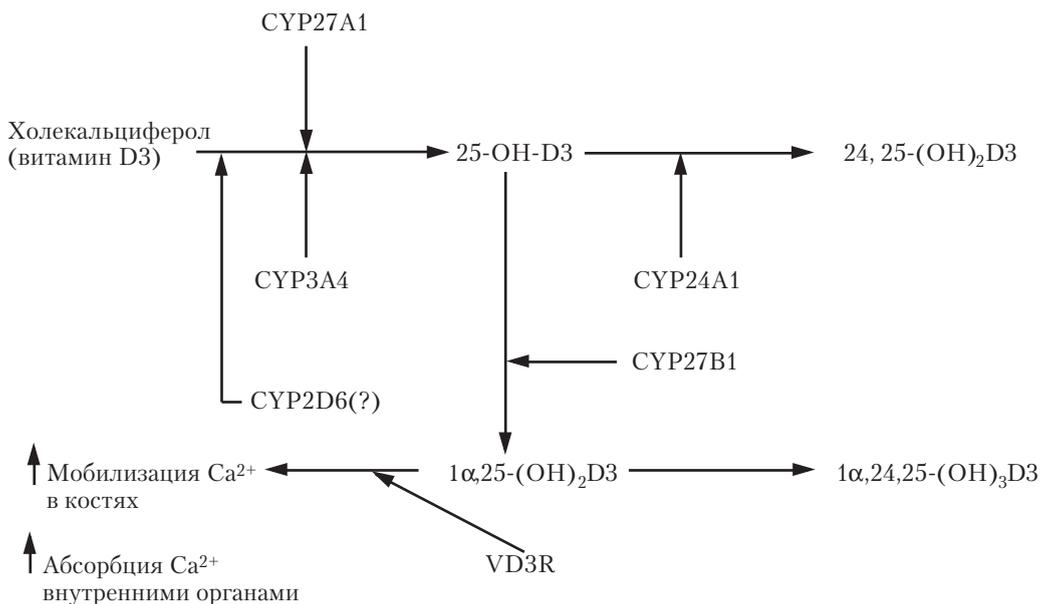


Рис. 3.6. Участие ферментов цитохрома P-450 в метаболизме витамина D<sub>3</sub>

между генами *CYP27A1* и *CYP2D6*, а именно, утрата экспрессии гена *CYP2D6* может нарушить это равновесие и ведет к сверхэкспрессии *CYP27A1* и увеличению образования желчных кислот. Потеря активности *CYP27A1*, наоборот, вызывает недостаток желчных кислот. Предполагается, что изучение концентрации метаболитов желчных кислот и 25-гидроксивитамина D3 может быть информативным при сравнении пациентов с фенотипами (*CYP2D6*) эффективного метаболизма, слабого метаболизма и ультраметаболизма. Это дает возможность установить, могут ли нарушения фермента *CYP2D6*, влияющие на метаболизм лекарств, изменять образование желчных кислот, 25-гидроксивитамина D3 в отдельности или вместе [60].

Члены семейства *CYP3A* могут выполнять ту же роль, что и *CYP2D25* у свиней. Установлено, что *CYP3A4* — это 25-гидроксилаза и 26-гидроксилаза 5 $\beta$ -холестерин-3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ , 12 $\alpha$ -триола и 23R-гидроксилаза, 24S-гидроксилаза и 27-гидроксилаза 5 $\beta$ -холестерин-3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ , 12 $\alpha$ -триола. У мышей эквивалентная активность *CYP3A* и иРНК увеличена у *Cyp27a1*<sup>-/-</sup>-«нокаутных» животных. У пациентов с цереброксантоматозом не отмечалось увеличения активности микросомальных *CYP3A1* печени. Видовые различия могут объяснить, почему у *Cyp27a1*<sup>-/-</sup>-«нокаутных» мышей не выражены симптомы цереброксантоматоза [105].

Фермент *CYP27B1* катализирует 1 $\alpha$ -гидроксилирование 25-гидроксивитамина D для активного лиганда витамина D3-рецептора. Мутация *CYP27B1*, кодирующего этот митохондриальный фермент, лежит в основе витамин D-зависимого рахита типа I. Как 24-гидроксилирование витамина D3, так и его промежуточных продуктов, которое катализируется митохондриальными ферментами *CYP24A1*, предупреждает лиганд-зависимое присоединение к рецептору и представляет главный путь катаболизма витамина D3. Транскрипция гена *CYP24A1* человека увеличивается ионами кальция и избыточным количеством 1 $\alpha$ ,25-

дигидроксивитамина D3. Дефект гена *Cyp24a1* мышей ведет, с одной стороны, к образованию витамина D3, с другой — ассоциирован с фенотипом гипервитаминоза D [106].

*Гидроксилирование ретиноевой кислоты.* Семейство генов *CYP26* включает три гена (по одному в каждом из подсемейств). Предполагают, что эти гены произошли от общего предшественника примерно 150–200 млн лет назад. Все они катализируют гидроксилирование ретиноевой кислоты (витамина A); *CYP26A1* — гидроксилаза всех типов трансретиноевой кислоты. Он не действует на 9-цис или 13-цис ретиноевую кислоту. Ретиноевая кислота — важный фактор в развитии позвоночных и действует через несколько рецепторов ретиноевой кислоты и X-ретиноид рецепторы. Как и в случае с другими цитохромами P-450 или иными метаболизирующими лекарства ферментами, *CYP26A1* может катаболизировать витамин A, разрушая лиганд для рецепторов ретиноевой кислоты, и тем самым выключает мощные сигналы для развития организма, посылаемые ретиноидами [86].

Предполагается, что *CYP26B1* участвует в метаболизме ретиноевой кислоты или ее производных, но биологическая роль этих ферментов пока не ясна.

*Цитохромы P-450 с неизвестными функциями.* Роль некоторых цитохромов P-450 (в том числе *CYP20A1*, *CYP27C1*, *CYP4A20*, *CYP4F12*, *CYP4F22*, *CYP4V2*, *CYP4X1*, *CYP26B1*, *CYP26C1*) не установлена. Скорее всего, нет информации об этих белках, что связано с методами их идентификации. Надежды возлагаются на дальнейшие результаты исследования генома человека.

Кроме того, некоторые из генов могут иметь весьма ограниченную тканеспецифическую или клеточно-специфическую локализацию, экспрессироваться на определенных этапах онтогенеза. Не исключено, что все эти причины отличаются в процессе эмбрио- или фетогенеза.

Исходя их вышеизложенных фактов, свидетельствующих о значении ферментов

цитохромов Р-450 в метаболических процессах эндогенных веществ, следует отметить, что их роль в различных биологических системах будет расширяться по мере анализа продуктов генов СYP с помощью современных методов исследований [107].

*Цитохромы Р-450 в метаболизме лекарственных средств.* Гены суперсемейства СYP высокополиморфны. С генетическими различиями Р-450 связаны индивидуальные вариации фенотипа. В ближайшее время ожидается выяснить связь между вариантами аллелей СYP и генетическими болезнями, а также токсическими эффектами факторов среды, раком или другими мультифакториальными болезнями.

По различным данным, в организме человека насчитывается около 100 ферментов семейства цитохрома Р-450. Следует подчеркнуть, что хотя многие из них обладают возможностью метаболизировать определенные ЛС, превалирующая часть Р-450-опосредованного лекарственного метаболизма у человека протекает с участием двух ферментов: СYP3A4 и полиморфного СYP2D6. В табл. 3.13 представлены данные, отражающие относительное содержание различных цитохромов в печени и их вклад в метаболизм лекарственных препаратов.

Причина того, что присутствующий в относительно малом количестве фермент СYP2D6 принимает участие в метаболизме только 1/4 всех ЛС, заключается в том, что эти препараты в основном нейротропные (табл. 3.14). Фермент СYP2D6 обнаруживается в головном мозге и, возможно, возник для защиты его клеток от нейротоксинов окружающей среды [109]. Его субстратами являются нейролептики, трициклические антидепрессанты, антиаритмические средства, β-блокаторы, наркотические анальгетики. Фермент СYP3A4 метаболизировать многие естественные антибиотики, что может объяснить его центральную роль в метаболизме лекарств. Хотя СYP3A4 и СYP2D6 катализируют большинство реакций окисления лекарственных препаратов у человека, другие фер-

Таблица 3.13

**Ферменты семейства цитохромов Р-450 человека [108]**

Фермент	Относительное содержание в печени, %	Относительный вклад в метаболизм лекарственных средств, %
СYP3A	28,8	51,0
СYP2D6	1,5	24,0
СYP1A2	12,7	5,0
СYP2A6	4,0	—
СYP2C	18,2	19,0
СYP2B6	0,2	—
СYP2E1	7,0	1,0
Другие	28,0	—

менты Р-450 могут играть стержневую роль в метаболизме за счет других механизмов. Так, СYP2C19 метаболизировать транквилизаторы, противосудорожные препараты, ингибиторы протонной помпы. Цитохром СYP2C9 участвует в метаболизме антидиабетических средств, непрямых антикоагулянтов, нестероидных противовоспалительных средств, антигипертензивного препарата лозартан.

Комплекс цитохрома Р-450 — это система первичной защиты от поглощенных ксенобиотиков. Она определяет биологический период полувыведения большинства лекарств, которые применяют в клинической практике.

В результате цитохром Р-450-опосредованных реакций окисления происходит превращение предшественников в активные формы лекарств, как, например, активация противоопухолевого препарата циклофосфида в его основной цитостатический метаболит или превращение кодеина в морфин.

Ферменты лекарственного метаболизма могут играть и отрицательную роль, способствовать развитию злокачественных опухолей. Большинство канцерогенов поступают в организм человека в неактивной форме. Однако под действием ферментов лекарственного метаболизма они подвер-

**Нейротропные ЛС, метаболизирующиеся одним или несколькими полиморфными энзимами Р-450 у человека [108]**

Лекарственные препараты	Гены, контролирующие их метаболизм
Алпразолам	<i>CYP3A</i>
Амитриптилин	<i>CYP2C19, CYP2D6, CYP1A2, CYP3A</i>
Бусипрон	<i>CYP3A</i>
Кофеин	<i>CYP1A2, CYP2E1</i>
Карбамазепин	<i>CYP3A, CYP2C8</i>
Хлорпромазин	<i>CYP1A1, CYP2B6, CYP3A</i>
Кломипразин	<i>CYP2C19, CYP2D6, CYP3A</i>
Клозапин	<i>CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A</i>
Диазепам	<i>CYP2C18, CYP2C19, CYP3A</i>
Дезипрамин	<i>CYP2D6</i>
Флуоксетин	<i>CYP2C19, CYP2D6, CYP3A, CYP2C9, CYP2E1</i>
Флуфеназин	<i>CYP2D6</i>
Флувоксамин	<i>CYP1A2, CYP2C19, CYP3A, CYP2D6, CYP2C9</i>
Галоперидол	<i>CYP2D6, CYP3A, CYP1A2, CYP3A</i>
Имипрамин	<i>CYP2D6, CYP1A2, CYP3A4, CYP2C19</i>
Левопромазин	<i>CYP2D6</i>
Миансерин	<i>CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A</i>
Мидазолам	<i>CYP3A, CYP4B1</i>
Моклобемид	<i>CYP2C19</i>
Нортриптилин	<i>CYP2D6</i>
Пароксетин	<i>CYP2D6</i>
Перфеназин	<i>CYP2D6</i>
Фенитоин	<i>CYP2C19, CYP2C9, CYP3A</i>
Рisperидон	<i>CYP2D6</i>
Сертралин	<i>CYP2C9, CYP2D6, CYP3A</i>
Темазепам	<i>CYP2C8, CYP2C19, CYP3A</i>
Транилципромин	<i>CYP2D6</i>
Тразодон	<i>CYP3A</i>
Триазолам	<i>CYP3A</i>
Трифлуперидол	<i>CYP2D6</i>
Тримипрамин	<i>CYP2D6</i>
Циклопентиксол	<i>CYP2D6</i>

гаются биоактивации и приобретают канцерогенные свойства.

Важная роль системы цитохромов и ее выраженный полиморфизм определяют следующие возможные варианты развития терапевтического влияния ЛС:

— отсутствие ожидаемого действия из-

за сверхбыстрого метаболизма и выведения препарата из организма;

— отсутствие активации пролекарства;

— токсические эффекты вследствие кумуляции;

— биотрансформация в токсические метаболиты.

Есть данные, свидетельствующие о том, что при химиотерапии опухолевых заболеваний в индивидуальном ответе на лечение важное значение может иметь разнообразие уровня ферментов лекарственного метаболизма в опухолевых клетках-мишенях.

Модуляция функции цитохрома Р-450 может быть причиной нежелательных реакций взаимодействия медикамент/медикамент, которые развиваются, когда один лекарственный препарат угнетает Р-450-опосредованный метаболизм другого препарата, принятого одновременно. Например, фуранокумарин, бергамотин и флавиноид нарингерин, которые содержатся в соке грейпфрута, способны угнетать активность СУР3А4. Это может вызывать нежелательные реакции при приеме таких ЛС, как ингибитор протеаз ВИЧ – саквинавир, гипохолестеринемического препарата ловастатина и иммуносупрессора циклоспорина [110; 111].

Система цитохрома Р-450 обеспечивает адаптивный ответ на «вызов» внешней среды, поэтому действие химического вещества часто приводит к индукции Р-450-изофермента, активного в метаболизме этого вещества. Такой механизм был впервые описан А. Н. Соппеу (1967) [112], ко-

торый установил, что некоторые лекарства, в том числе и фенилбутазон, способны усиливать свой метаболизм. Такой эффект приводит к большой индивидуальной изменчивости в экспрессии изофермента цитохрома Р-450 печени. Генетически детерминированная изменчивость в реакции на лекарства часто накладывается на выраженную изменчивость метаболизма и нередко бывает замаскированной, особенно если индивидуальные аллельные варианты незначительно отличаются по их кинетическим свойствам. Несмотря на эти факторы, генетический полиморфизм системы цитохрома Р-450 может четко влиять на исход терапии.

В настоящее время установлено, что значительное число генов цитохрома Р-450 – полиморфные (табл. 3.15).

Наиболее хорошо изученный из них – СУР2D6. Полиморфизм этого гена впервые был обнаружен в 1977 г. в Англии. При использовании дебрисохина у больных гипертонической болезнью было отмечено, что обычные дозировки препарата иногда вызывают развитие нежелательных побочных эффектов или были вообще неэффективными. В последующем выявили существование быстрых и медленных метаболитаторов. Медленные метаболитаторы

Таблица 3.15

**Полиморфизм генов Р-450, метаболизирующих ЛС [108]**

Ферменты	Локализация в хромосоме	Номер аллеля	Множественные аллели
СУР1А1	15q 22-pter	4	
СУР1В1	2q 22-21	6	
СУР2А6	19q 13.1-13.3	3	17 % v1, Т→А экзон 3, 78 % v2, С→А экзон 3, 7 %
СУР2С9	10q 24.1-24.3	3	79 % СУР2С9*2, С→Т экзон 3, 12,5 % СУР2С9*3, А→С экзон 7, 8,5 %
СУР2С19	10q 24.1-24.3	10	75-79 % СУР2С19*2, G→А экзон 5, 22-29 %
СУР2D6	22q 11.2-pter	>18	СУР2С19*3, G→А экзон 4, 65-70 % СУР2D6*3, делеция А2637, апрокс. 4 %
СУР2Е1	10	3	СУР2D6*4, G1934А, 10-20 % СУР2D6*5, делец., апрокс. 4 %

встречаются с частотой от 5 до 10 % среди населения Европы, а среди арабского населения с частотой 1–2 %. Ген *CYP2D* локализуется в хромосоме 22 (q 13.1) и включает в себя два псевдогена (*CYP2D7* и *CYP2D8*) и полиморфный *CYP2D6*. Активность *CYP2D* варьирует от полного отсутствия до сверхбыстрого метаболизма, что зависит от комбинации, по крайней мере, 30 различных аллелей. Около 6 % популяции белых людей несет два нулевых аллеля в локусе *CYP2D6*. В Великобритании примерно 3,6 млн людей не экспрессируют этот фермент (медленные метаболизаторы) и, как следствие, у них нарушен метаболизм широкого круга лекарственных препаратов, являющихся субстратами *CYP2D6* (табл. 3.16) [113].

Дефектные аллели могут возникнуть в результате делеции гена, появления точечных мутаций, сдвига рамок считывания. С нуль-генотипом *CYP2D6* связаны различные фенотипические последствия (табл. 3.17), такие как редкие аномальные летальные исходы от ЛС, например, назначение при стенокардии перфексила; безрезультатность терапевтического эффекта вследствие сверхбыстрого метаболизма или отсутствия активации предшественника (пролекарства).

Среди дефектных аллелей наиболее распространенные у европейцев – *CYP2D6\*4* (0,1–0,2 %), *CYP2D6\*3* (0,07–0,14 %), *CYP2D6\*5* (0,01–0,08 %), *CYP2D6\*6* (0,013–0,018 %). Кроме полностью дефектных аллелей, есть такие, кото-

Таблица 3.16

Лекарственные препараты – субстраты *CYP2D6* [108]

Алпренолол	Амиодарон	Апигенин
Буфуралол	Хлоргидрат	Клонидин
Клозапин	Циклобензаприн	Дексфенфлурамин
Дибукаин	Доласетрон	Энкаинид
Этилморфин	Флекаинид	Флюоксетин
Гуаноксан	4-гидроксиамфетамин	Индорамин
Лауданозин	Лоратадин	Мефлогун
Метоксифенамин	Метисергид HCl	Метопролол
Моклобемид	Мексилетин	Нимодипин
Нортриптилин	Ондансетрон	Пароксетин
Перфеназин	Фенилпропаноламин	Прометазин
Пропафенон	Пириметамин	Рифампицин
Рокситромицин	Спартаин	Такрин
Тиоридазин	Томокситин	Тропизетрон
Амифлавин	Амитриптилин	Будесонид
Бупранолол	Кломипрамид	Клотримазол
Кодеин	Десипрамин	Декстрометорфан
Дигидроэрготамин	Доксорубицин	Этинилэстрадиол
Фенотерол	Флювоксамин малеат	Формотерол
Галоперидол	Имипрамин	Кетоконазол
Левомепразин	MDMA	Метоксамин HCl
Метоксипзорален	Метоклопрамид	Минаприн
МРТР	Никерголин	Нитрендипин
Оланзапин	Оксипренолол	Перексиллин
Фенформин	Прокаинамид	N-пропиламалин
Пропранолол	Кверцитин	Ритонавир
Серотонин	Сульфазалин	Тамоксифен
Тимолол	Транилципрамин	Цуклофентиксол

Последствия сочетания двух неактивных аллелей *CYP2D6* [113]

<i>Снижение элиминации — кумуляции родственных компонентов, которые приводят к токсичности</i>	
β-адреноблокаторы Противоаритмические Трициклические антидепрессанты Нейролептики	Метопролол, тимолол, буфуранол Спартеин, мексилетин, флекаинид Нортриптилин, кломипразин  Перфеназин, циклофентиксол
<i>Снижение активности пролекарств</i>	
Энкаинид Кодеин	Метаболит: О-деметиленкаинид Метаболит: морфин
<i>Снижение выведения активных метаболитов</i>	
Имипрамин	Метаболит: дезимипрамин
<i>Снижение выведения родственных препаратов и активных метаболитов</i>	
Амитриптилин	Метаболит: нортриптилин

рые вызывают незначительное снижение или изменение лекарственного метаболизма. Например, аллель *CYP2D6\*10* часто встречается среди китайского населения. Он кодирует синтез фермента со сниженной функциональной активностью. Аналогично аллель *CYP2D6\*17* распространен среди представителей африканской расы.

В дополнение к обозначенным нулевым аллелям *CYP2D6* существует несколько аллелей с заменой одной аминокислоты. Некоторые из них также ассоциируются с измененным фенотипом. Однако для многих аллелей четко не установлен фенотип, что затрудняет возможность определения чувствительной группы людей, а целесообразность выявления этих аллелей в прогнозировании ответа на соответствующую терапию остается неясной [114].

Наблюдения за некоторыми индивидуумами — «сверхбыстрыми» метаболизаторами, нечувствительными или дающими слабый ответ на терапию лекарственными препаратами-субстратами *CYP2D6*, показали выраженный полиморфизм данного

гена. Причиной этого оказалась амплификация гена *CYP2D6*. Иногда наследуется от 2–3 до 13 тандемно расположенных копий *CYP2D6*. Для таких людей требуется значительное увеличение доз препаратов, метаболизируемых *CYP2D6*, чтобы достичь выраженного терапевтического эффекта [115].

Мультикопии *CYP2D6* наиболее часто встречаются среди жителей Эфиопии и Саудовской Аравии. Около 30 % населения этих стран — сверхбыстрые метаболизаторы. Наличие мультикопий функционально активного гена *CYP2D6* приводит к тому, что у их носителей метаболизм определенных лекарств происходит более интенсивно. Вследствие этого уровень препарата в циркулирующей крови при обычных дозировках не достигает терапевтических концентраций. Впервые такое явление было описано у больного, которому трехкратно увеличили дозу нортриптилина для достижения терапевтического уровня препарата в плазме. Оказалось, что он носитель трех активных генов *CYP2D6*.

Исследованиям полиморфизма CYP2D6 придается важное значение в клинической практике. Как было показано выше, этот фермент метаболизирует ряд часто назначаемых ЛС, имеющих низкий терапевтический индекс, в связи с чем увеличение дозы этих препаратов, приводящее к повышению их концентрации в крови, не приводит к возрастанию терапевтического эффекта. Нередко такая тактика ведет к возникновению нежелательных токсических эффектов (табл. 3.18).

Так, например, у медленных метаболизаторов как побочные эффекты при лечении различных видов аритмий пропафеноном и мексилетином отмечали тошноту, рвоту и аритмии.

Из-за замедления активации пролекарств цитохромом CYP2D6 у медленных метаболизаторов наблюдается их низкая эффективность, в частности, снижается анальгезирующее действие трамадола. Еще известно, что при приеме кодеина, кото-

рый также является субстратом для CYP2D6 и преобразует его в морфин, у быстрых метаболизаторов наблюдается развитие характерного побочного эффекта морфина — абдоминальные боли. У медленных метаболизаторов не обнаруживается морфин в плазме крови и не наблюдается анальгезирующий эффект кодеина. Предполагается, что замедление метаболизма, контролируемого CYP2D6, может быть одним из защитных факторов в развитии опиоидной зависимости.

Некоторые препараты (аймалин, примахин, хинидин) обладают способностью ингибировать активность фермента CYP2D6.

Другие гены P-450 также генетически полиморфны. Наиболее заметный из них CYP2C9. Он имеет неактивный или нулевой аллель с известными фенотипическими проявлениями; метаболизирует меньшее число лекарств, однако его субстраты, в том числе диазепам, омепразол, пропра-

Таблица 3.18

**Возможные нежелательные эффекты ЛС-субстратов ферментов полиморфного P-450 у медленных метаболизаторов [116]**

Полиморфные гены, кодирующие соответствующие ферменты	Наблюдаемые явления		
	Снижен клиренс ЛС /побочный эффект		Снижена активация пролекарства
<i>CYP2D6</i>	Трициклические антидепрессанты Галоперидол Антиаритмические препараты	Кардиотоксический паркинсонизм Аритмии	Трамадол Кодеин Этилморфин
<i>CYP2C9</i>	S-варфарин Фенитоин Лозартан Толбутамид НПВС	Кровотечения Атаксия  Гипогликемия Гастроинтестициальные кровотечения	Лозартан
<i>CYP2C19</i>	Омепразол Диазепам	Сонливость	Прогуанил

нолол, прогуанил, толбутамид относятся к часто назначаемым ЛС [117; 118].

Гомозиготные носители дефектных аллелей гена *CYP2C9* составляют группу людей с высоким риском развития побочных эффектов ЛС, являющихся субстратом для данного гена. Эти люди составляют 2–4 % европейской популяции и 10–25 % азиатского населения. У гомозигот по дефектным аллелям *CYP2C9* наблюдается многократное увеличение концентрации омепразола у больных с язвенной болезнью желудка по сравнению с больными — быстрыми метаболиторами. У медленных метаболиторов возрастает период полувыведения препарата, что указывает на изменение его фармакокинетических параметров. У гетерозигот по дефектному аллелю, при применении стандартных доз омепразола, отмечается повышение интрагастрального рН и уровня гастрина в плазме по сравнению с гомозиготами нормального гена *CYP2C9*.

Клинически обусловленный фенотип может быть связан с аллелями, отличающимися только по одной аминокислоте, как у гена *CYP2C9*. Наглядным примером служит клиническое наблюдение, в котором описана тяжелая варфариновая интоксикация при лечении инфаркта миокарда у пациента, гомозиготного по редкому аллелю *CYP2C9* с малой активностью.

Кроме варфарина, *CYP2C9* метаболизирует лозартан, нестероидные противовоспалительные средства [119]. Этот ген имеет один немутантный (*CYP2C9\*1*) и два мутантных аллеля (*CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* с очень низкой активностью. Частота встречаемости последних в европейской популяции составляет 10,7 и 7,4 % соответственно. Исследования показали, что клиренс варфарина у носителей мутантного аллеля *CYP2C9\*3* составлял у гомозигот 66 %, у гетерозигот — 90 % по отношению к доминантным гомозиготам [120].

Описаны случаи, когда доза варфарина 0,5 мг/сут вызывала у гомозигот рецессивного аллеля *CYP2C9\*3* клинический эффект. В то же время для достижения такого же эффекта у доминантных гомозигот

суточную дозу следует увеличивать в 10–16 раз.

Носители мутантных аллелей *CYP2C9* также входят в группу риска в отношении приема непрямых антикоагулянтов. У них существует большая вероятность развития кровотечений как побочных эффектов препаратов данной группы. Генотипирование таких пациентов перед лечением позволит снизить дозировку препарата и предотвратить развитие осложнений [121].

Известно, что фермент *CYP2C9* превращает гипотензивный препарат лозартан в фармакологически активную форму — карбоксиметаболит E-3174. У рецессивных гомозигот *CYP2C9\*3*, по сравнению с доминантными, преобразуется в его активную форму всего лишь 5 % лозартана [122].

Полиморфизм этого гена имеет значение и для индивидуализации терапии нестероидными противовоспалительными средствами. Показано, что фармакокинетические параметры теноксикама достоверно выше у здоровых добровольцев с генотипами *CYP2C9\*1/CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*2/CYP2C9\*3* по сравнению с лицами, имеющими генотип *CYP2C9\*1/CYP2C9\*1*. Аналогичные данные получены в отношении клиренса ибупрофена. Возможно, различия в генотипах больных могут быть причиной повышенного риска развития нежелательных реакций указанных ЛС у пациентов определенных групп [123].

Осуществляет *CYP2C9* также биотрансформацию флувастина — одного из эффективных гипополипидемических ЛС. Не исключается, что при длительном применении генетический полиморфизм *CYP2C9* может влиять как на гипополипидемическое действие препарата, так и на развитие его нежелательных реакций [124].

У человека относительно недавно выделен еще один ген P-450 — *CYP1B1*. Он также оказался полиморфным, хотя фенотипические последствия аллельной изменчивости гена пока мало изучены. Этот ген привлекает особое внимание тем, что, кроме метаболизма лекарств и ксенобиотиков

*CYP1B1*, играет заметную роль в превращении эстрогена, катализируя 4-гидроксилирование эстрогена в эстрадиол. Установлена также ассоциация мутаций *CYP1B1* с развитием первичной врожденной глаукомы [125; 126].

**Ферменты фазы II лекарственного метаболизма.** Многие ферменты фазы II превращения ЛС также относятся к полиморфным, в частности, семейств глутатион-S-трансферазы, N-ацетилтрансферазы, УДФ-глюкуронилтрансферазы и сульфотрансферазы. Гены глутатион-S-трансферазы *GSTM1* и *GSTT1* часто имеют делеции, а ген *GsTP1* — аллельные варианты с заменой одной аминокислоты, которые влияют как на стабильность белка, так и субстратную специфичность.

В экспериментах на трансгенных мышях, из генома которых был удален ген *Gstp*, регистрировалась значительно большая частота папиллом кожи, вызванных химическими веществами, по сравнению с мышами «дикого» типа, полученными от той же пары родителей.

**N-ацетилтрансферазы.** Генетическая основа полиморфизма ацетилирования хорошо изучена. Она связана с присутствием множественных аллелей локуса гена *NAT2*. Фермент этого гена отвечает за метаболизм широкого круга часто употребляемых лекарств, включая противотуберкулезный препарат изониазид, стимулятор кофеин и гетероциклические амины канцерогенов. Полиморфная изменчивость приводит к тримодальному распределению фенотипов ацетилирования. Несмотря на то, что прямой эффект полиморфизма ферментов фазы II чаще менее выражен, чем генетически обусловленная изменчивость в экспрессии специфических изоферментов P-450, эффект наследственных изменений в обеих фазах метаболизма может быть синергичным [127].

О значении полиморфизма NAT как для эффективности химиотерапии, так и для качества жизни в зависимости от степени детоксикации свидетельствует накопленный в литературе обширный материал. Установлено, что NAT детерминиру-

ется двумя генами — *NAT1* и *NAT2* [128].

Полиморфизм N-ацетилирования лекарств был открыт при использовании изониазида в лечении больных туберкулезом. Оказалось, что изониазид, гидралазин, ряд сульфаниламидных препаратов ацетируются с участием полиморфного фермента ариламин N-ацетилтрансферазы 2 (*NAT2*). Ацетилярный полиморфизм связан с мутациями в локусе *NAT2*.

В литературе постоянно описываются новые варианты аллелей NAT. Методом полиморфизма длины рестрикции фрагментов ДНК идентифицированы 15 аллелей гена *NAT2* для изониазидного полиморфизма. У человека вариабельна также экспрессия *NAT1*, в котором описано 9 аллелей [129].

Установлено, что *NAT1\*14* и *NAT1\*15* продуцируют дефектный *NAT1* белок, который задерживает метаболизм *NAT1*-зависимых субстратов *in vivo* и *in vitro*; наоборот, *NAT1\*10*-вариант ассоциируется с повышенной активностью *NAT1* и возрастанием риска возникновения рака кишечника и мочевого пузыря.

Ген *NAT2* локализуется в 8-й хромосоме и контролирует выработку фермента ариламин N-ацетилтрансферазы 2 (*NAT2*). Этот фермент синтезируется, в основном, в печени, но определяется в незначительных количествах в других тканях: коже, легких, почках. Участвует *NAT2* в ацетилировании ряда ЛС, а также большого числа ариламинов и ксенобиотиков, вызывающих в организме человека многие неблагоприятные эффекты, в том числе и развитие злокачественных новообразований.

Для удаления из организма токсических продуктов необходима их метаболическая активация. Важный этап в метаболической активации и дезактивации ариламинов — это ацетилирование.

В результате N-конъюгации ариламинов (в процессе участвуют N-ацетилтрансферазы 1 и 2, УДФ-глюкуронилтрансфераза, сульфотрансфераза) образуются нетоксичные стабильные продукты: N-ацетаты, N-глюкурониды, N-сульфаты (рис. 3.7).

Ариламины могут также подвергаться и активации (под воздействием цитохрома CYP1A2 или простагландин Н-синтетазы) с образованием гидроксиламинов и гидроксаминных кислот, которые в дальнейшем активируются в производные ариламинов (реакция катализируется NAT1 и NAT2), спонтанно распадающиеся с образованием реактивного арилнитрениум иона. Этот ион обладает мутагенным и канцерогенным свойствами.

Преобладание того или иного пути метаболизма ксенобиотика зависит от активности ферментов NAT, сульфотрансферазы, глюкуронилтрансферазы, а также от вида ксенобиотика и его количества.

Исследования показали, что NAT2 полиморфизм связан с комбинацией, по крайней мере, восьми точечных мутаций в пределах региона NAT2 гена с локализацией его в 8p 21.3–23.1. Пять мутаций NAT2 определяют замену одной аминокислоты. Из них четыре приводят к уменьшению ацетилирующей способности (медленному ацетилярному полиморфизму) в гомозиготном рецессивном состоянии.

Установлено, что NAT 2\*4 и редкий NAT 2\*2 аллели определяют быстрое ацетилирование, а \*5B, \*6B и более редкие аллели \*5A, \*5C, \*6B, \*7B, \*14B кодируют медленное ацетилирование.

Ацетилирующая способность гомозигот с быстрым типом ацетилирования — *wild-tipe/wild-tipe* (*wt/wt*) — значительно выше, чем у гетерозигот — *wild-tipe/mutation* (*wt/mut*). Следует отметить, что медленные ацетиляторы значительно отличаются друг от друга. Так, \*6A, \*7B и \*13 аллели кодируют ферменты, обладающие меньшей ацетилирующей активностью, чем аллели \*5 группы. Предполагается, что с аллелями группы \*5 связано уменьшение количества NAT2 фермента в печени из-за нарушения процесса трансляции, а \*6A аллель обеспечивает синтез нестойкого фермента [130].

В различных человеческих популяциях частота встречаемости аллелей ускоренного метаболизма NAT 2\*4 разная: у японцев — 69 %, китайцев — 51 %, а среди европей-

цев — 23 %. Такие аллели медленного метаболизма, как NAT 2\*14A и \*14B, встречаются исключительно у представителей негроидной расы. Распространение аллелей NAT2 и частота их встречаемости у европейцев представлены в табл. 3.19.

Гомозиготные мутанты слабо ацетируют субстраты NAT2 ферментов, поэтому фармакотерапия у таких гомозигот должна быть направленной на снижение дозы ЛС и контроль за появлением возможных нежелательных эффектов. В литературе освещены проблемы применения тех или иных ЛС при различных заболеваниях с учетом вариантов генотипа NAT2. Так, исследования показали, что назначение сульфасалазина больным системной красной волчанкой (СКВ) может приводить к различным эффектам. Пациенты, у которых наблюдался хороший терапевтический эффект, были быстрыми ацетиляторами. В то же время у медленных ацетиляторов отмечали неэффективность такого лечения. На основании полученных данных было сделано заключение о связи NAT2 полиморфизма с различной восприимчивостью больных СКВ к сульфасалазину [131].

Интересные результаты были получены при изучении генотипа NAT2 у больных контактной аллергией. Среди таких пациентов преобладали быстрые ацетиляторы. Исходя из этого, сделано предположение о том, что ускоренное ацетилирование может повышать сенсibilизацию организма. Не исключается, что тип фермента NAT2 может служить маркером повышенной чувствительности к контактным аллергенам.

Полиморфизм NAT2 обуславливает также разнообразие метаболизма потенциальных канцерогенов, что служит одной из причин предрасположенности к развитию химически индуцированных нежелательных эффектов. К настоящему времени имеются многочисленные публикации, в которых указывается на взаимосвязь между типом ацетилирования и повышенным риском развития злокачественных опухолей (рак мочевого пузыря, пищевода, прямой кишки, легких, молочной железы).

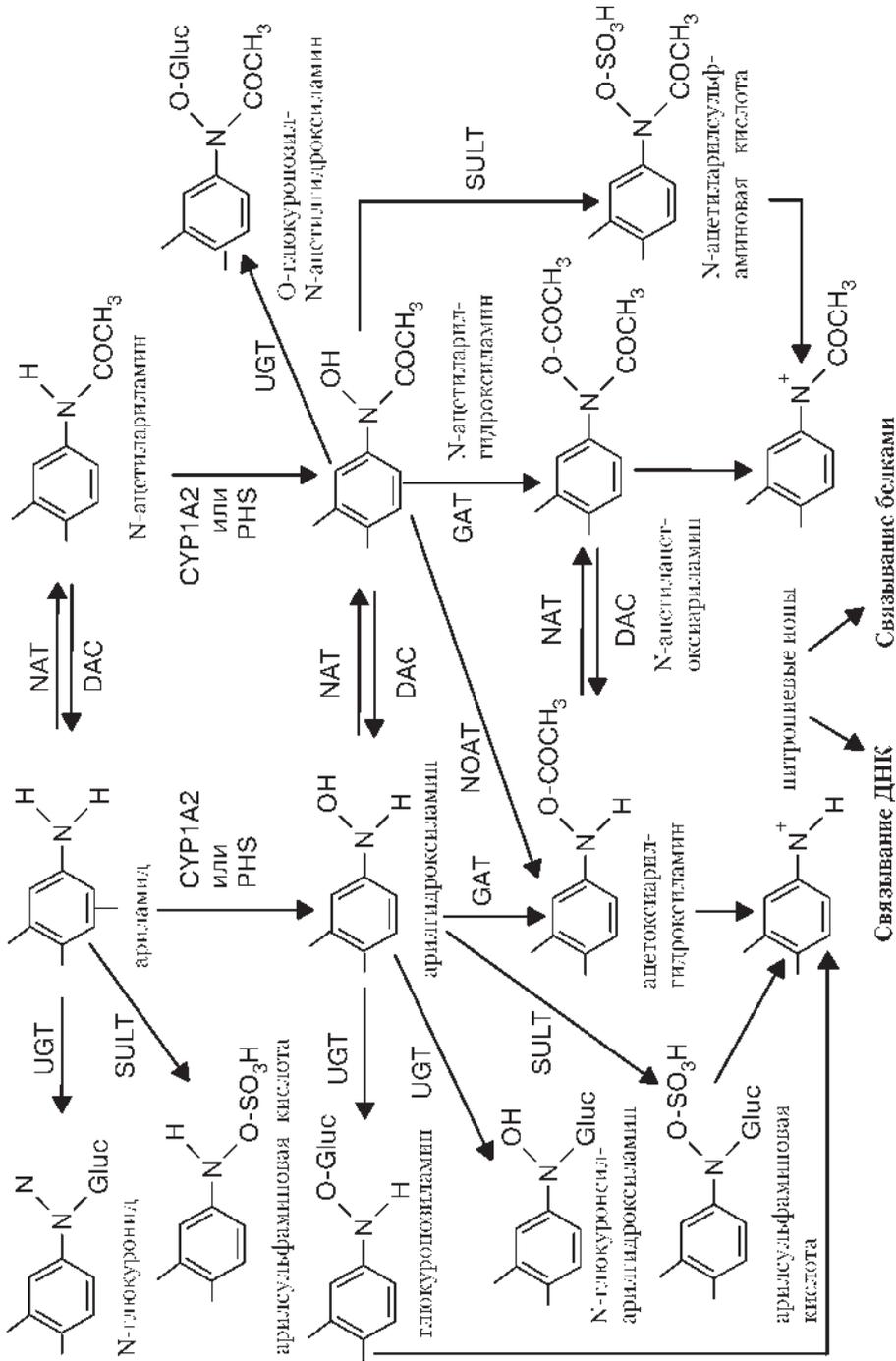


Рис. 3.7. Преобразование ариламинов с образованием в организме токсичных и нетоксичных метаболитов [116]

Распространение аллелей *NAT2* и частота их встречаемости у европейцев [116]

Аллель	Позиция замены нуклеотида								Частота встречаемости, %	Фенотип
	111	191	282	341	481	590	803	857		
*4 ( <i>wt</i> )	T	G	C	T	C	G	A	G	22,69	Ускоренный
*5A	T	G	C	C	T	G	A	G	4,15	Замедленный
*5B	T	G	C	C	T	G	G	G	38,33	Замедленный
*5C	T	G	C	C	C	G	G	G	4,03	Замедленный
*6A	T	G	T	T	C	A	A	G	27,84	Замедленный
*7B	T	G	T	T	C	G	A	A	1,30	Замедленный
*14A	T	A	C	T	C	G	A	G	1,54	Замедленный
*14B	T	A	T	T	C	G	A	G	0,12	Замедленный

Данные некоторых исследований противоречивы, но, в целом, они позволяют заключить, что определенные генотипы ферментов лекарственного метаболизма в сочетании с другими факторами (характер питания, вредные привычки, профессиональные вредности) играют существенную роль в канцерогенезе.

Эти ферменты имеют немаловажное значение в обеспечении детоксикации при конъюгации-ацелировании различных amino- и гидроксиламиногрупп с участием ацетил-КоА, особенно важных для токсикологии гомо- и гетероциклических ариламинов и гидразиновых ксенобиотиков [128].

Накопление данных молекулярной эпидемиологии, касающихся изучения аллельных вариантов генов лекарственного метаболизма, необходимо для их дальнейшего внедрения в практику здравоохранения.

Неоднородность фенотипических проявлений активности NAT объясняет противоречивость опубликованных данных и указывает на то, что анализа фенотипов недостаточно для определения его прогностической значимости относительно возможной токсичности и переносимости, например изониазида. Так, по данным индийских исследователей, не установлено влияние фенотипа NAT на выраженность гепатотоксичности изониазида, рифампицина и пиразинамида. Это заключение сле-

дует из результатов определения скорости ацелирования в группах больных туберкулезом с лекарственной гепатотоксичностью (1-я группа) и больных туберкулезом без поражения печени (2-я группа). В 1-й группе соотношение быстрых и медленных ацелираторов составляло 70 и 30 %, а во 2-й — 67,1 и 33,1 %. Не установлено зависимости концентраций гидралазина и изониазида в крови от уровня ацелирования у 34 здоровых людей, 18 больных туберкулезом и 25 детей с туберкулезным менингитом, хотя у 4 больных туберкулезом и алкоголизмом концентрация этих препаратов была в 3 раза выше, чем у остальных больных, причем у 1 из них выявлена гепатотоксичность [132].

Результаты исследований, проведенных в Южной Африке, наоборот, указывают на то, что медленный фенотип ацелирования способствует развитию токсичности при фармакотерапии, особенно при сочетании применения противотуберкулезных препаратов. На фоне 50%-й распространенности медленных ацелираторов сочетание применения антитуберкулезных средств (изониазида) приводило к интоксикации фенитонином. У 16 % больных установлен токсический уровень препарата в крови, у 70 % возникли эпилептиформные расстройства. При настороженности в отношении предполагаемой токсичности и соответствующем контроле уже через 12 нед лечения изониазидом у 16 % боль-

ных обнаруживались симптомы неврологических нарушений, причем чаще они наблюдались у медленных метаболизаторов. Молекулярно-генетические методы исследования подтверждают, что изониазидная нейропатия характерна для лиц с медленным метаболизмом [133].

Серьезные осложнения у больных могут возникать в результате биотрансформации гидралазина, который широко применяется в клинической практике как вазодилататор при гипертензии (депрессин, адельфан). В фазе II превращения этого препарата образуется ацетилированный гидралазин, который спонтанно циклизуется в стабильный продукт 3-метил-S-триазоло-[3,4-альфа]-фталазин. К его специфическим побочным эффектам относят индуцированный волчаночноподобный синдром. Медленные ацетиляторы в большей мере, чем быстрые, подвержены развитию этой интоксикации [134].

На модели бактериальных культур с различной активностью NAT подтвержден дозозависимый мутагенез гидралазина. Характер мутации был связан с Г:Ц к Т:А-трансверсии и при индуцировании препаратом возрастал до 54 %. Для сравнения — спонтанные мутации при Ц:А-трансверсиях наблюдались всего у 25 %.

Субтоксические дозы гидралазина (0,32–1 мМ) вызывают дозозависимую ДНК-фрагментацию и стимуляцию в культуре гепатоцитов крыс репаративного синтеза. Предварительное введение индометацина в целях угнетения синтеза простагландинов при неизменной активности NAT снижало выраженность этих эффектов на 13–50 %. Более низкие дозы гидралазина (0,1–0,3 мМ) под действием 6-тиогуанина в 2,1–2,8 раза повышали частоту мутаций в культуре клеток V79. Даже однократная доза 80 мг/кг вызывала в печени крыс бластогенный эффект. Многократное введение гидралазина (14 дней) в дозе 46 мг/кг также усиливало эффект печеночных нарушений, инициированных канцерогеном диэтилнитрозамином [135].

У больных с гипертензией, принимающих гидралазин, в 82 % случаев определя-

лись Z-ДНК-антитела, которые отсутствовали у больных контрольной возрастной группы. Предполагается, что сходный механизм образования аутоантител реализуется и при волчаночноподобном синдроме. Данное предположение подтверждается на модели бактериальных плазмид, в которых гидралазин изменял конформацию ДНК.

Описанное нежелательное свойство гидралазина, которое зависит от NAT, не ограничивается только этим ферментом. Он одновременно модифицирует и другие детоксикационные группы ферментов. В частности, установлено повышение активности глутатион-S-трансферазы-альфа и белка CYP2E1.

От уровня активности NAT зависит действие лекарственных препаратов, которые относятся и к другим группам фармакологических средств. Так, фармакокинетическая оценка концентраций прокаида и его ацетилированного метаболита у добровольцев показала, что уровень препарата в сыворотке крови был выше у медленных ацетиляторов, а его ацетилированная форма — ниже. У быстрых фенотипов наблюдалась обратная зависимость. В рандомизированном перекрестном исследовании у добровольцев с быстрым фенотипом NAT с помощью иммунофлуоресцентного метода и жидкостной хроматографии изучали концентрацию ацетилированного прокаида с целью оценки его влияния на кинетику парааминобензойной кислоты. Введение этой кислоты в течение 5 дней не влияло на клиренс, площадь под кривой, экскрецию с мочой и объем распределения препарата. Однако парааминобензойная кислота угнетала его ацетилирование и почечный клиренс. Соответственно можно сделать вывод, что сочетание этих ЛС не безопасно для больных [136].

На характер ответной реакции организма влияет не только полиморфизм ферментов биотрансформации ЛС, но и применяемый препарат, который способен модифицировать активность ферментов детоксикации. Классический ингибитор цитохрома P-450 циметидин и его аналоги,

блокаторы H<sub>2</sub>-рецепторов гистамина новых поколений, неодинаково влияют на активность NAT. Введение в течение 7 дней крысам циметидина, ранитидина достоверно угнетало активность NAT в печени, а низатидин такого эффекта не вызывал, фамотидин в низких дозах несколько снижал, а в высоких — повышал активность NAT. Циметидин, ранитидин и фамотидин угнетали активность NAT2 на 9, 48 и 75 % соответственно. При соотношении препарата с субстратом (прокаинамидом) 2:1 отмечалось незначительное угнетение активности NAT1 (субстрат — парааминобензойная кислота). Добавление ацетил-КоА не усиливало ингибирующие эффекты этих ЛС.

Генотипирование дает возможность не только регулировать дозы тех или иных лекарственных препаратов, но и давать рекомендации лицам, относящимся к группам риска по развитию злокачественных опухолей. В частности, медленным ацетиляторам не рекомендуется выбор профессий, предполагающих контакт с ариламинами. Эти люди должны быть информированы о высоком риске развития рака мочевого пузыря у них при курении, а также рака толстого кишечника при употреблении жареного мяса в больших количествах.

Около 20 лет назад были впервые отмечены генетически детерминированные различия в чувствительности к алкоголю. Было предложено много механизмов для учета различных фенотипов после приема алкоголя, в том числе генетически детерминированные различия в его метаболизме. Кроме метаболизма полиморфными Р-450 (СYP2E1), этанол метаболизируется множеством других также полиморфных ферментов. Сначала, под влиянием димерного фермента цитозоля алкогольдегидрогеназы (АДГ), этанол превращается в ацетальдегид, который имеет выраженную каталитическую активность. Молекулярный механизм столь повышенной активности фермента в настоящее время установлен. Связан он с единичной заменой аргинина на гистидин в β-субъединице

(ген *ADH2*). Ацетальдегид в дальнейшем метаболизируется другим полиморфным ферментом цитозоля — альдегиддегидрогеназой (АлДГ). Известна довольно низкая активность АлДГ для некоторых популяций. Эти данные, хотя и требующие дополнительных исследований, все же указывают на связь между генетическими различиями в метаболизме алкоголя и вероятностью алкоголизма и алкогольным поражением печени [137–139].

*Тиопуринометилтрансфераза* (ТПМТ) катализирует присоединение метильной группы S-аденозилметионина к ароматическим и гетероциклическим сульфгидрильным субстратам [140]. К таким субстратам относятся антилейкемические (6-меркаптопурин, 6-тиогуанин) препараты, азатиоприм — иммуносупрессант, используемый для предотвращения отторжения трансплантата и лечения аутоиммунных заболеваний, в том числе ревматоидного артрита и рассеянного склероза. Проявляется ТПМТ трехмодальным распределением фенотипов, которое объясняется многочисленными аллельными вариантами в локусе гена *ТПМТ*, а также наличием неактивного псевдогена.

Насчитывается несколько *ТПМТ*-аллелей, содержащих инактивирующий ген мутаций. Наследование этих форм фермента становится причиной неудачной лекарственной терапии, например, лечение детской лейкемии ЛС, которые являются субстратами ТПМТ [141].

Считается, что *ТПМТ* — это идеальный ген-претендент на тесты, основанные на ДНК-генотипировании, которые могут быть рутинным скринингом популяций на чувствительность пациентов к лекарственной терапии.

*Уридиндифосфат-5'-глюкуронилтрансферазы* (УГТ — англ. UGT) — суперсемейство ферментов, метаболизирующих ЛС. Они локализируются с внутренней стороны мембраны эндоплазматической сети. Катализируют простые биохимические реакции, превращающие липофильные соединения (компоненты пищи, токсины, поступающие из внешней среды, ЛС) в водора-

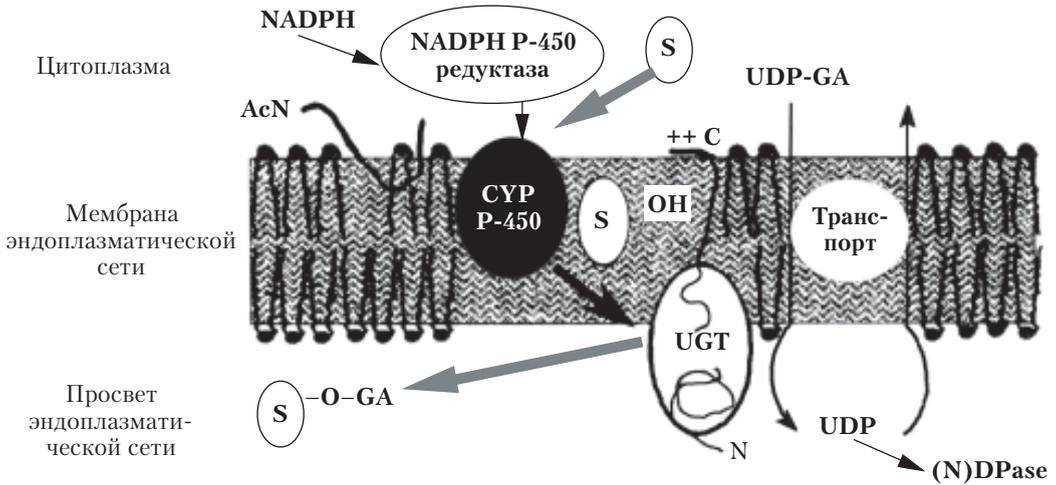


Рис. 3.8. Расположение UGT в мембране эндоплазматической сети и выполняемая ферментом функция [143]

створимые глюкурониды. Конъюгация этих веществ с глюкуроновой кислотой почти всегда ведет к образованию неактивных метаболитов, облегчает их выведение с мочой и желчью [142].

Эволюционировали UGT в процессе развития живой природы, и у позвоночных число идентифицированных изоформ превышает 50. Образование глюкуронидов продолжает утилизацию различных химических групп ( $-O-R$ ;  $-S-R$ ;  $-N-R'R''$ ;  $-C-R$ ). Такая неразборчивость ведет к тому, что разнообразные химически различающиеся ксенобиотики и эндогенные соединения служат мишенями для процесса глюкуронизации. Обладая способностью метаболизировать окисленные соединения, UGT дополняет функцию ферментов фазы I, включая цитохромы P-450 (CYP), которые также локализируются с наружной стороны эндоплазматической мембраны (рис. 3.8).

Многочисленность и чрезмерная функциональная активность суперсемейства генов *UGT* указывают на важность процесса глюкуронизации для гомеостаза. На сегодняшний день идентифицированы и клонированы 16 *UGT* человека. Учитывая данные о гомологии последовательностей нуклеотидов, *UGT* делят на два семейства: *UGT1* (8 генов) и *UGT2* (7 генов) [142].

Локус *UGT1A* содержит более 150 тыс. п. н. во второй хромосоме (2q37) и кодирует *UGT1A1*, *UGT1A3*, *UGT1A4*, *UGT1A5*, *UGT1A7*, *UGT1A8*, *UGT1A9*, *UGT1A10*. Этот локус характеризуется уникальной генетической организацией, которая сочетает блоки индивидуального первого экзона на 5'-конце и общие экзоны (2–5) на 3'-конце локуса (рис. 3.9). Индивидуальные формы трансфераз — это продукты вариантов *UGT1A1* гена, состоящие из общего для них карбоксильного концевой домена и отличающихся аминоконцевых участков. Несмотря на наличие общего концевой карбоксильного участка из 245 аминокислот, продукты *UGT1A* гена регулируются и транскрибируются индивидуально [144–146].

В отличие от локуса *UGT1A*, гены *UGT2B* были картированы в 4-й хромосоме (4q13 и 4q27 соответственно). Гены *UGT2B* кодируются индивидуально и содержат 6 экзонов. В настоящее время идентифицированы транскрипты *UGT2B4*, *UGT2B7*, *UGT2B10*, *UGT2B11*, *UGT2B15*, *UGT2B17*. Кроме того, клонирован ген *UGT2A1*, локализующийся в обонятельных тканях [147].

Как известно, UGT человека содержит 529–534 аминокислоты. Аминокислотная

последовательность включает в себя консервативный участок на С-конце цепи, который фиксирует белок в мембране эндоплазматической сети. Все UGT, кроме UGT1A10, содержат N-концевой сигнальный белковый домен, который направляет белок в эндоплазматическую сеть.

На начальном этапе исследования физиологической роли глюкуронизации в организме человека были основаны на выделении и очистке белков UGT из печени. Внедрение новых технологий молекулярной биологии привело к идентификации новых изоформ фермента, установлению каталитических функций UGT и освещению их роли в развитии различных патологий у человека, в том числе и неконъюгированных гипербилирубинемий, канцерогенеза, аутоиммунных процессов [144].

Открытие в 1991 г. UGT билирубина человека послужило предпосылкой к открытию локуса *UGT1A*. С тех пор идентифицировано 33 аллеля *UGT1A1* и стало понятно, что неконъюгированная гипербилирубинемия — результат гомозиготной или компаундной гетерозиготной мутации этой изоформы. То, что *UGT1A1* является

единственным эффективным ферментом глюкуронизации билирубина у человека, было доказано после обнаружения мутаций исключительно экзон 1-кодирующего участка *UGT1A1*, которые приводят к полному отсутствию глюкуронизации билирубина у больных людей. Из-за этого все остальные продукты гена *UGT1A1* интактны. Полное отсутствие активности UGT1A1 ведет к летальному исходу болезни Криглера — Найяра 1-го типа. Снижение активности билирубина меньше чем на 30 % характерно для болезни Криглера — Найяра 2-го типа. Также установлено, что причина болезни Гилберта кроется в мутации промотора *UGT1A1*, приводящей к уменьшению экспрессии продуктов этого гена. Анализ известных 32 полиморфных аллелей *UGT1A1* показал, что мутантные аллели как при 1-м, так и 2-м типе болезни Криглера — Найяра могут затрагивать все пять экзонов. Различные комбинации мутаций промотора и гомозиготной или компаундной гетерозиготной комбинации кодирующих участков мутантных аллелей могут привести ко всем описанным выше патологическим процессам (рис. 3.10). На

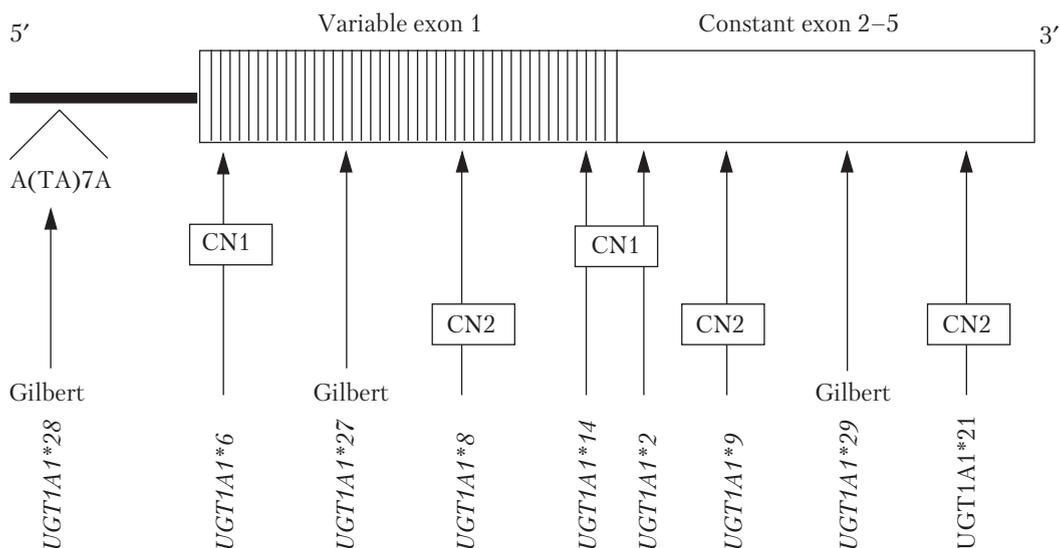


Рис. 3.9. Мутации гена *UGT1A1*, изменяющие функцию фермента UGT1A1, что приводит к различным типам неконъюгированной гипербилирубинемии [143]

основании этих исследований полагают, что неконъюгируемая билирубинемия наследуется скорее по аутосомно-рецессивному типу [148; 149].

Первоначально, основываясь на открытии UGT билирубина, считали, что глюкуронизация характерна для метаболических процессов печени. Это было доказано путем клонирования *UGT1A1*, *UGT1A3*, *UGT1A4*, *UGT1A6*, *UGT1A9* из кДНК библиотек печени.

Принимая во внимание предположение о том, что UGT может функционировать как метаболический барьер, необходимый для тканей, взаимодействующих с ксенобиотиками, например желудочно-кишечного тракта, была разработана методология, основанная на ПЦР, для определения индивидуальных *UGT1A* экзонов с высокой гомологией.

Исследования показали, что активность UGT определяется в почках, тонкой и толстой кишке. Анализ тканей пищевода, желчного пузыря и толстой кишки подтвердил присутствие активности фермента и экспрессию иРНК *UGT1A* в этих органах, которые непосредственно контактируют с веществами, поглощенными человеком. При этом были выделены новые UGT иРНК, не присутствующие в печени: *UGT1A7* — в пищеводе и желудке, *UGT1A8* — в пищеводе и толстой кишке;

*UGT1A10* — во всем желудочно-кишечном тракте, кроме печени. Внепеченочные продукты гена *UGT1A* были подвержены молекулярно-генетическим исследованиям, что позволило выявить типичные транскрипты *UGT1A* с отличающимся первым экзоном. Как *UGT1A7*, так и *UGT1A10* обладали каталитической активностью; они глюкуронировали и простые, и сложные фенольные субстраты и печеночные *UGT1A6*, *UGT1A9* [150].

Также *UGT1A10* проявлял каталитическую активность по отношению к стероидным гормонам ( $\beta$ -эстрадиол, эстрон, андростерон), но все они не метаболизируются *UGT1A7*. Есть и другие особенности этих изоформ. Таким образом, существует качественное и количественное отличие в регулировании UGT в печени и других органах желудочно-кишечного тракта, что составляет биохимическую основу тканеспецифической глюкуронизации у человека.

Исследование ферментативной активности в печени и толстой кишке человека показало отличие каталитических профилей этих органов. Скорость активности в печени по отношению к фенольным субстратам была в 96 раз, а к 4-изопропилфенолу — в 64 раза выше, чем в толстой кишке. Однако скорость конъюгирования группы химических соединений, включа-

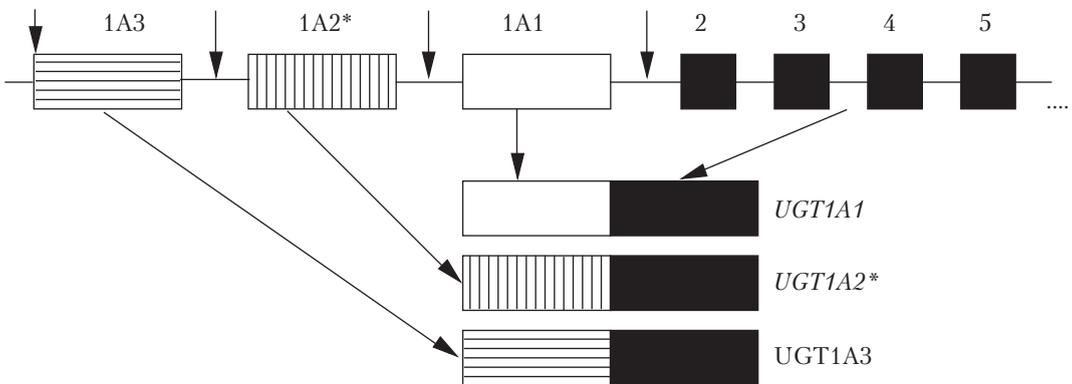


Рис. 3.10. Схема строения локуса *UGT1A*, локализованного в хромосоме 2 [143]:

\* — псевдоген

ющих амитриптилин, дезимипрамин, эсрон, имипрамин, ацетаминофен, была сравнима в обоих органах. Это указывает на тканеспецифическое распределение глюкуронизации в тканях человека и позволяет считать толстую кишку местом активного метаболизма [142].

При анализе желудочного эпителия был определен полиморфный характер экспрессии продуктов гена *UGT1*. Установленный регуляторный полиморфизм, который отличается от бимодального распределения генетического полиморфизма, обнаруженного у других ферментов метаболизма ЛС, может быть биохимической основой межиндивидуальных отличий во внепеченочном микросомальном метаболизме ЛС.

В 1973 г. у человека были выявлены аутоантитела против эндоплазматической сети клеток печени и проксимальных почечных канальцев (печень-почки микросомальные — ЛКМ-аутоантитела). В настоящее время их рассматривают как антитела против микросомальных ферментов, метаболизирующих ЛС. С помощью ЛКМ-аутоантител (анти-СУР2D6) как серологических маркеров клинически идентифицировали различимую вторую форму аутоиммунного гепатита (аутоиммунный гепатит 2-го типа). Другой тип ЛКМ-аутоантител был открыт в 1983 г. у больного с хроническим гепатитом D. Их обозначили как ЛКМ-3 и установили, что эти антитела направлены против семейства *UGT1*. Как серологические маркеры они были обнаружены у 10 % больных с гепатитом D. Кроме того, ЛКМ-3 выявлялись у 10 % больных аутоиммунным гепатитом 2-го типа. У человека антигенами для ЛКМ-3 были определены *UGT1A1*, *UGT1A6*, *UGT1A4*, а у кролика — *UGT1A6*.

В-клеточный иммунный ответ при гепатитах С и D специфичный и неперекрестный. ЛКМ-3-анти-*UGT1A*-аутоантитела не определены при аутоиммунном гепатите 1-го типа, а также при вирусном гепатите С. В то же время ЛКМ-1-анти-СУР2D6-аутоантитела не определяются при гепатите D, но обнаруживаются при гепатите С [151].

На основании этого высказывается мнение, что белки СУР и *UGT* могут становиться мишенями иммунной системы при взаимодействии вируса и специфической эндогенной иммунологической дисрегуляции. Эти аутоантигенные мишени могут служить моделью для изучения механизма потери аутоагрессии, составляющей основу аутоагрессии.

Ферменты лекарственного метаболизма человека филогенетически развивались не для химического превращения назначаемых препаратов. Большое разнообразие токсических, мутационных и канцерогенных веществ было идентифицировано как их субстраты, что связано с большой субстратной специфичностью каждого фермента.

Учитывая вышеизложенное, можно предположить, что аллельные варианты этих ферментов — важный фактор ответной реакции на действие окружающей среды, формирующий индивидуальную восприимчивость к различным заболеваниям, в том числе таким, как болезнь Паркинсона, разнообразным формам рака и др. Степень выраженности этих ассоциаций для многих болезней еще предстоит изучить.

*Этнические различия в лекарственном метаболизме.* Сегодня не вызывает сомнений, что расовые, этнические и другие различия человека зависят от генотипа. Достоверно установлены четкие этнические различия в распространении аллельных вариантов многих ферментов, участвующих в метаболизме лекарств. Эти различия необходимо принимать во внимание при рутинном скрининге новых ЛС, и особенно при назначении лекарств, которые являются субстратом полиморфного метаболизма, пациентам, имеющим различные этнические корни.

Одновременно выявлено, что аллели, отсутствующие или с очень малой частотой встречающиеся у лиц европейской популяции, могут быть ведущими в реакциях на препараты в других популяциях, организующих специфические этнические группы, более чувствительные или более устойчивые к определенной лекарствен-

ной терапии. С увеличением уровня этнической гетерогенности внутри популяции, вероятно, любой фармакогенетический скрининг будет включать тестирование каждого пациента на все известные аллели определенного полиморфного гена в соответствии с их этническим распространением, если известны его фенотипические следствия.

На примере *CYP2D6* полиморфный генотип установлен у 6 % белой популяции, у 2 % афроамериканцев, менее чем у 1 % представителей восточных популяций [152]. Генетические основы этого различия были исследованы в восточных популяциях, что связано с относительно низкой распространенностью в них частого «европейского» *CYP2D6* нулевого аллеля. И наоборот, другие аллели *CYP2D6*, которые очень редко встречаются в «западных» популяциях, относительно частые на Востоке. Эти «восточные» аллели не имеют инактивирующих ген мутаций, но отличаются сниженной активностью. Поэтому вследствие высокой частоты этих аллелей в восточных популяциях антидепрессанты, являющиеся субстратами для *CYP2D6*, обычно назначаются в более низких дозах по сравнению с белой популяцией [11].

Сходная картина складывается и относительно субстратов *CYP2C19*. Нулевой фенотип *CYP2C19* встречается у 3–5 % лиц белой популяции и более чем у 20 % китайцев. Поэтому на востоке значительно уменьшена дозировка препаратов, являющихся субстратами для *CYP2C19*, включая диазепам.

Существует также значительное межэтническое различие в частоте «сверхбыстрых» метаболиторов гена *CYP2D6*. Частота их встречаемости составляет 20 % в Эфиопии, 7 % в Испании и 1,5 % в скандинавских странах [153].

Выраженные этнические различия наблюдаются в других разнообразных ферментах лекарственного метаболизма, включая NAT2. Так как многие из этих аллелей в настоящее время ассоциируются с восприимчивостью к лекарствам, они имеют отношение к восприимчивости к раз-

личным заболеваниям в этнически далеких популяциях.

### 3.7. Биотрансформация лекарственных средств и ее нежелательные эффекты

Биотрансформация чужеродных химических веществ — это биохимический процесс, в ходе которого под действием ферментных систем организма они трансформируются. Этот процесс называют также метаболизмом или детоксикацией. Однако необходимо отметить, что под «метаболизмом», в первую очередь, подразумевают усвоение организмом веществ в качестве продуктов питания или источника энергии. Большинство чужеродных химических веществ не могут играть эту роль, хотя их биотрансформация осуществляется в результате тех же химических реакций и с участием тех же ферментных систем, что и продуктов питания и эндогенных веществ.

В течение длительного времени процесс превращения веществ в организме рассматривался только как позитивное явление, направленное на уменьшение токсичности, а случаи ее увеличения считались исключением и получили условное название «летальный синтез». В связи с этим, применение термина «детоксикация» оказалось вполне оправданным.

В последнее десятилетие накопилась достаточная информация о том, что на отдельных стадиях биохимических превращений образование определенных продуктов или промежуточных соединений, более токсичных, чем исходные вещества, — скорее правило, чем исключение.

Учитывая изложенное, следует полагать, что термин «биотрансформация» более точен, чем «метаболизм» или «детоксикация».

Биотрансформация — сложный многостадийный процесс. Суть его заключается в следующем. Большинство чужеродных

веществ липофильны и без превращения в растворимые в воде соединения не могут быть легко удалены из организма. В результате биотрансформации они переводятся в форму, облегчающую их выведение из организма. Процесс состоит из двух фаз.

Основные ферменты реакций фазы I — ферменты монооксигеназной системы цитохрома P-450. Для некоторых субстратов ферментные превращения в этой фазе могут осуществляться и другие ферментные системы: флавиносодержащие монооксигеназы, алкогольдегидрогеназы, простагландинсинтаза и др. Под действием этих ферментов происходит внедрение полярных групп в молекулу чужеродного вещества. В результате эти вещества становятся субстратами реакций фазы II биотрансформации, в ходе которой они превращаются в более гидрофильные.

В ходе реакций фазы II под действием различных цитозольных или связанных с мембранами ферментов (эпоксидгидролазы, глутатион-S-трансферазы, глюкурозилтрансферазы, сульфотрансферазы и ацетилтрансферазы) происходит конъюгация (присоединение) гидрофильных, хорошо растворимых в воде, групп к полярным группам.

Во время реакций фазы I и фазы II биотрансформации возможно превращение химических веществ в более реакционно-способные соединения, которые могут формировать ковалентные связи с биомолекулами. Этот процесс получил название «биоактивация». В литературе важность биоактивации подтверждается на примере веществ, которые образуются в процессе биотрансформации канцерогенов. Биоактивация, связанная с образованием высокорекреационных продуктов или промежуточных соединений, может происходить в ходе фазы I и фазы II биотрансформации. Взаимодействие химических веществ или продуктов их трансформации с биомолекулами, которое определяется как ключевая реакция механизма токсического действия, запускает ряд биохимических и фенотипических изменений, приводящих к токсическому эффекту. Выяснение того,

какой продукт трансформации или какое исходное вещество участвует в этой ключевой реакции, позволяет теоретически обосновать механизм токсического действия.

Таким образом, в результате фазы I биотрансформации ксенобиотиков, поступающих в организм извне, при активном участии монооксигеназной ферментной системы цитохрома P-450 могут формироваться токсические продукты. Степень проявления токсического эффекта, обусловленного реакциями фазы I, зависит от следующих обстоятельств:

- вероятности (легкости) образования продуктов;
- вероятности или скорости наступления фазы II биотрансформации;
- дозы вещества, поступившей в организм, и времени его нахождения в нем.

При высоких дозах вещества или высокой скорости образования токсичных продуктов биотрансформации, которые преобладают над скоростью конъюгации, эти продукты будут связываться с нуклеофильными центрами белков, ДНК, РНК, что приведет к определенным повреждениям в организме.

Следовательно, обезвреживание промежуточных или конечных продуктов фазы I в значительной мере зависит от фазы II биотрансформации. Действительно, чужеродные вещества, содержащие гидроксильную, карбоксильную, эпоксидную группы, аминогруппу или галоген, а также продукты фазы I биотрансформации и многие эндогенные соединения, подвергаются реакциям конъюгации под действием ферментов фазы II биотрансформации. Продукты конъюгации более полярны и легче выводятся из организма.

Реакции фазы II направлены на детоксикацию. Однако в последние годы установлено, что в этой фазе также может происходить образование более активных метаболитов, чем исходные вещества. Эти метаболиты могут индуцировать канцерогенез. Предполагается, что «ошибки» в детоксикации ферментов фазы II — результат несоответствия скорости изме-

нения генетических факторов этой системы резко возрастающему многообразию химических соединений в окружающей среде.

В качестве примера приведем образование соединений, более реакционноспособных и более опасных, чем исходные, которые образуются в результате фазы II биотрансформации.

Под действием группы ферментов — глутатион-S-трансфераз происходит конъюгация с глутатионом токсичных электрофильных чужеродных веществ, которые образовались в фазе I. Конъюгаты обычно менее реакционноспособны и более полярны, поэтому они легко выводятся с желчью или, попадая в почки, превращаются в меркаптуриновые кислоты, выводящиеся с мочой.

Субстраты глутатион-S-трансфераз — эпоксиды, соединения с ненасыщенными связями, органические гидроперекиси, альдегиды, нитрозосоединения. Однако в результате их конъюгации с глутатионом могут также образовываться высокоактивные промежуточные соединения, способные алкилировать ДНК (эписульфониновые ионы). Образование таких ионов обуславливает мутагенность, например, 1,2-дибромэтан и 1,2-дихлорэтан.

В реакциях с участием сульфотрансфераз осуществляется сульфатная конъюгация. В ходе реакции конъюгации группа  $\text{SO}_3$  переносится с аденозин-3'-фосфат-5'-фосфосульфата на субстрат, что приводит к образованию сульфозэфиров. К субстратам также относятся первичные, вторичные и третичные спирты, фенолы и ариламины. Установлено, что N-сульфозэферы некоторых ариламинов проявляют более высокую биологическую активность (канцеро- и мутагенность), чем исходные вещества.

Под действием ацетилтрансфераз эндогенные и чужеродные соединения, содержащие amino-, гидроксид- и сульфгидрильную группы, подвергаются ацетилированию. Этот процесс представляет собой перенос ацетильной группы с коэнзима А на субстрат. N-ацетилирование происходит, в

основном, в печени. Оно вносит существенный вклад в биоактивацию ароматических аминов (присоединение ацетильной группы непосредственно к атому азота), что приводит к детоксикации соединений. При этом образование активных метаболитов (нитрениевых ионов) затрудняется.

Сегодня достоверно установлено, что рак мочевого пузыря чаще возникает у медленных ацетиляторов. Возможно, это связано с пониженной способностью к детоксикации через N-ацетилирование.

В этиологии многих новообразований человека значительную роль играют пищевые канцерогены, а также канцерогены окружающей среды (выбросы промышленного производства, выхлопные газы, табачный дым). Желудочно-кишечный тракт — место частой локализации рака, например, 9,7 % всех впервые диагностированных опухолей находят в толстой кишке. В связи с этим, высказывается гипотеза о генопротекторной и цитопротекторной роли UGT. От их экспрессии в пищеварительной системе зависит степень глюкуронизации веществ и связанная с ней неопластическая трансформация. Генетически регулируемый баланс микросомального окислительного метаболизма цитохромом P-450 и монооксигеназами, а также конъюгации предупреждает накопление дериватов активного кислорода, которые могут приводить к повреждению ДНК и других белков и, в конечном счете, инициирует канцерогенез (рис. 3.11). Например, фенольные субстраты могут быть окислены до следующих радикалов: эпоксиды, полифенолы, полухиноны и хиноны. Последние поступают в хинол/хинон окислительный цикл, что приводит к накоплению кислородных радикалов. Глюкуронизация фенолов продуктами гена *UGT1A* предупреждает образование реактивных нуклеофилов и электрофилов [154; 155].

Белки *UGT1A* также найдены в эпителии других органов, подверженных канцерогенезу и развитию рака желудочно-кишечного тракта, а именно пищевода, желудка, печени и желчных путей, дисталь-

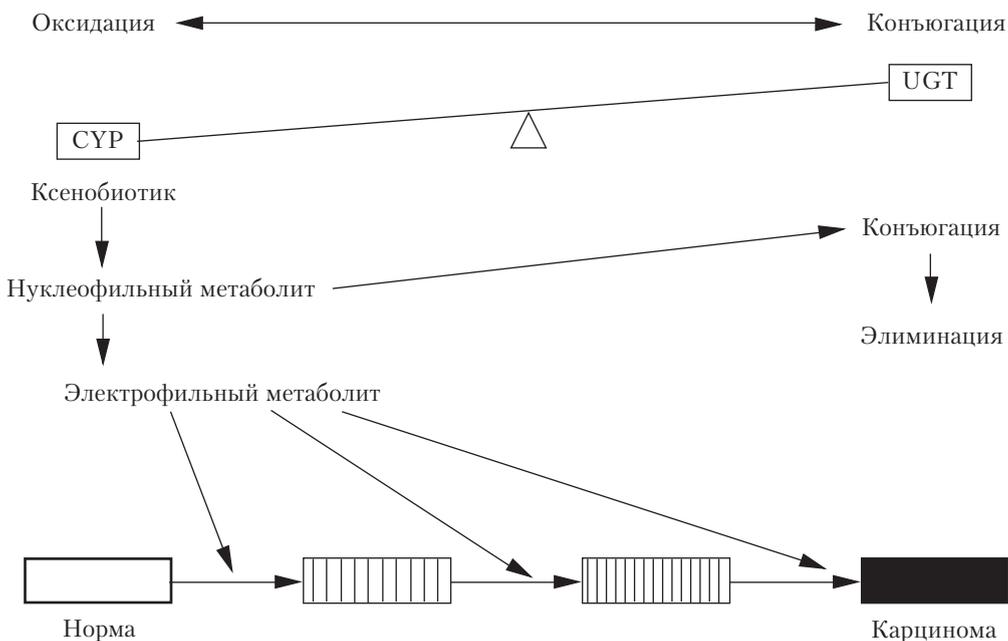


Рис. 3.11. Возможный механизм химически индуцированного канцерогенеза

ного отдела толстой кишки. Как уже отмечалось выше, выявлены значительные различия в активности UGT в печени и толстой кишке человека. Так, в сигмовидной кишке наблюдалось снижение в 214 раз скорости глюкуронизации 8-гидроксибензо( $\alpha$ )пирена по сравнению с печенью, а эффективность глюкуронизации ( $V_{\max}/K_m$ ) снижалась в 70 раз. При этом следует отметить, что низкая скорость глюкуронизации реактивных метаболитов в толстой кишке совпадает с анатомической локализацией канцерогенной неопластической трансформации. Каталитический анализ рекомбинантных UGT белков показал, что такие канцерогены, как первичные амины, бензо( $\alpha$ )пирен и канцероген табачного дыма 2-гидроксиамино-1-метил-6-фенил-имидазо-(4,5- $\beta$ )пиридин (N-гидроксил PhIP), выступают субстратами различных UGT, включая новые идентифицированные внепеченочные изоформы UGT1A7; 1A8; 1A10 [142].

Исследования гепатоцеллюлярной, холангиоцеллюлярной, желудочной и пищеводной карцином человека показали диф-

ференциальное подавление транскрипции *UGT1A* в опухолях по сравнению с таковой в нормальных тканях. Общим является значительное снижение каталитической активности UGT в отношении канцерогенов.

Выше было отмечено, что в тканях желудка установлена полиморфная регуляция изоформ UGT1A. Изменчивость глюкуронизации четырехкратно варьирует между индивидами. Следовательно, полиморфная экспрессия изоформ UGT — это не только биохимическая основа индивидуального лекарственного метаболизма, но и фактор риска канцерогенеза.

В пищеводе человека выявлена ограниченная экспрессия четырех высокомолекулярных продуктов гена *UGT*: UGT1A7; UGT1A8; UGT1A9; UGT1A10. Этот орган стал моделью для изучения каталитического эффекта данных энзимов, в основном, внепеченочных изоформ при отсутствии продуктов генов печени (UGT1A1; 1A3; 1A4; 1A6). Установлено, что в тканях карциномы пищевода подавлена регуляция *UGT1A7* и *1A10*. Из этого следует, что по-

теря глюкуронизационной активности в отношении 7-гидрокси-бензо( $\alpha$ )пирена указывает на возрастание роли в метаболизме канцерогенов внепеченочной UGT. Последнее особенно важно для пищевода, который эпидемиологически связан с канцерогенами [144].

Вышеизложенное подтверждает специфическую экспрессию уникального паттерна UGT в тканях с канцерогенассоциированным раком; специфическую локализацию UGT в эпителиальной ткани, контактирующей с ксенобиотиками; сниженный уровень активности UGT в дистальном и проксимальном отделах желудочно-кишечного тракта, где развитие злокачественных опухолей наиболее частое; наконец, возможность UGT1A-изоформ конъюгировать и тем самым подвергать детоксикации канцерогены окружающей среды. Можно предположить, что UGT выполняют генопротекторную роль в канцерогенезе человека.

Фармакологические, токсикологические и биохимические исследования показали, что в процессе биотрансформации ксенобиотиков могут формироваться более опасные для организма вещества, чем исходные продукты. При превышении скорости образования высокорекреационноспособных продуктов трансформации над скоростью конъюгации, что в значительной мере зависит от генотипа индивидов, эти токсические вещества могут взаимодействовать с белками, РНК, ДНК, индуцируя, в первую очередь, процессы канцерогенеза и мутагенеза.

Важное значение для клиники имеет гепатотоксический эффект ксенобиотиков, в том числе и лекарств, для подавляющего большинства которых этот орган служит главной ареной метаболических процессов.

Гепатотоксичность ЛС имеет несколько механизмов. Основные из них следующие:

1) прямая дозозависимая токсичность характерна для многих ЛС, когда они попадают в организм в больших количествах;

2) у некоторых больных ряд препаратов, даже в терапевтических дозах, вызывают поражение печени (идиосинкразия, связанная с вовлечением в патологический процесс иммунной системы);

3) генетически детерминированные изменения профиля системы метаболизма ксенобиотиков у пациента, в том числе и ЛС, могут быть предрасполагающими факторами к развитию гепатотоксичности. В этих случаях она возникает по двум причинам:

— ЛС само по себе гепатотоксично и в случае нарушения его детоксикации или элиминации развивается токсическое поражение печени. Прямой гепатотоксичностью (по первому типу) обладают многие ЛС, такие как изониазид, фурадонин, тетрациклин, оральные контрацептивы и др.;

— нетоксическое ЛС метаболизируется цитохромом Р-450 в реактивный или потенциально токсичный метаболит (наиболее часто встречающаяся причина гепатотоксичности). Наглядным примером гепатотоксичности, развивающейся по второму типу, может быть передозировка парацетамола (ацетаминофена) [156].

Как известно, парацетамол в силу своей эффективности — один из наиболее широко применяемых анальгетиков/антипиретиков. Однократный же прием большой дозы парацетамола, в основном с целью суицида, приводит к развитию гепатотоксичности с централобулярными некрозами, локализующимися в зоне 3, где наибольший пик концентрации в гепатоцитах цитохрома Р-450, превращающего парацетамол в его реактивный метаболит. Гепатотоксический эффект парацетамола связан именно с действием его нестабильного метаболита — N-ацетил-p-аминобензохинона (NAPQJ), который инактивируется глутатионом. При обычных дозах парацетамола лишь небольшая часть его превращается в NAPQJ, который связывается с глутатионом и затем выводится из организма в виде меркаптопуриновой кислоты. При больших дозах парацетамола повышается образование его активного метаболита. Когда истощаются запасы глутатиона,

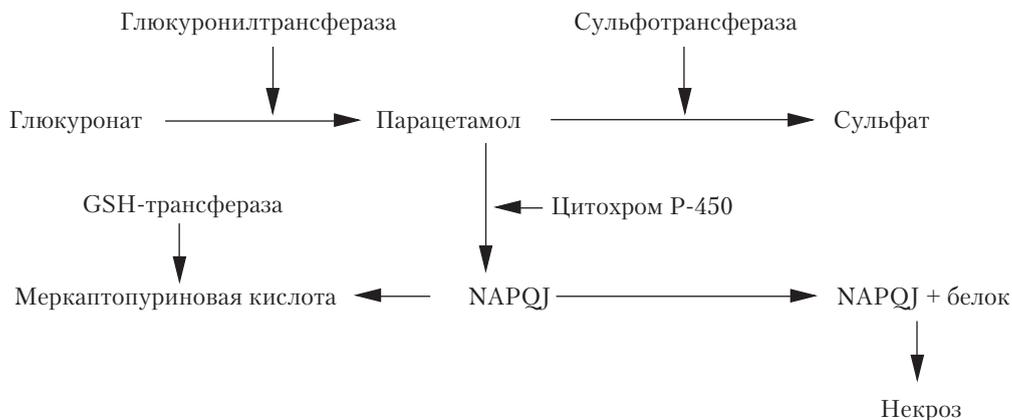


Рис. 3.12. Схема метаболизма парацетамола [156]

связывающего NAPQI, этот метаболит ковалентно связывается с белками плазмы, а образующиеся комплексы вызывают некроз (рис. 3.12).

Обобщая изложенное, можно заключить, что гепатотоксичность парацетамола зависит от дозы препарата, скорости его трансформации, запаса глутатиона в тканях, агентов, способных индуцировать цитохром Р-450 или истощать запасы глутатиона (хронический алкоголизм, прием противоэпилептических препаратов).

Раскрытие механизмов биотрансформации ксенобиотиков, в том числе и молекулярно-генетических, позволяет объяснить и прогнозировать характер их токсического эффекта, действенность фармакотерапии в каждом конкретном случае. Кроме того, изучение этих механизмов дает возможность разрабатывать теоретически обоснованные модели для прогноза токсичности и опасности нежелательных эффектов новых ЛС.

### 3.8. Клинические проблемы фармакогенетики

Информативность и прогностическая убедительность результатов фармакогене-

тических исследований определяются факторами, которые можно объединить в несколько групп [157].

Во-первых, данная группа базируется на концепции взаимодействия «субстрат — фермент». Вариабельность большинства известных на сегодня ферментов, метаболизирующих лекарства, определяется специфичностью тест-вещества, используемого для оценки активности фермента. При этом возможно использование смеси тестов (коктейль-подход), а также анализ нескольких метаболитов единичного теста (метаболические аналоги отпечатков пальцев, например, метаболитов кофеина с участием ферментов CYP1A2, ацетилтрансфераз и ксантиноксидазы).

Во-вторых, решающую роль играет методический уровень лабораторий, где применяются современные биохимические методы исследований или высокочувствительная жидкостная хроматография, позволяющая определить концентрации препарата и его метаболитов в крови и тканях, а также иммунологические, молекулярно-биологические и другие методы оценки содержания и активности ферментов.

В-третьих, следует отметить, что на генетически детерминированную активность ферментов существенное влияние оказывают: а) функциональное состояние организма и отдельных его систем (пол, возраст, масса тела, состояние эндокринной,

сердечно-сосудистой и других систем); б) патологические процессы (нарушение метаболизма, кровотока в печени и почках, болезни печени); в) внешние влияния (вредные факторы среды, профессиональные вредности, вредные привычки — табакокурение, алкоголизм, характер пищи, наличие витаминов).

Вместе с тем, при сопоставлении с этими факторами фенотипа наблюдается четкая зависимость. При анализе взаимосвязи между генотипом NAT и перечисленными выше физиологическими и патологическими факторами самого организма, а также окружающей среды не установлено зависимости активности NAT от пола, возраста, курения, употребления кофе, способа обработки употребляемого мяса и др. В то же время эти влияния четко прослеживаются для фенотипов цитохрома P-450.

К настоящему времени из-за ограничения возможности применения дорогостоящих методов генетического контроля происходило преимущественно накопление данных о фенотипических проявлениях. Они крайне неоднозначны. На примере монголоидной расы разнообразие результатов исследований позволило избежать ошибок посредством метаанализа. Частота фенотипов медленных ацетиляторов у 3516 здоровых лиц составляет от 15,8 до 25,5 %, то есть  $(19,9 \pm 4,0)$  %. У 1842 представителей 17 китайских меньшинств этот показатель существенно колеблется — от 3,2 до 50,6 % —  $(20,6 \pm 12,9)$  %.

В большинстве случаев фенотипические проявления активности фермента коррелируют с генотипом. У представителей европейской популяции (Швейцария) генотип соответствовал фенотипу быстрого метаболизма дебрисохина у всех 74 обследованных и у 6 из 8 медленных метаболитаторов; у всех 48 быстрых ацетиляторов и у 33 из 36 медленных ацетиляторов. В целом результаты ДНК-анализа совпадают с фенотипом в 97,5 % случаев. Это свидетельствует о том, что накопление атипичных (мутантных) аллелей в популяции, и даже в отдельных семьях, увеличивает разрыв связей между вариабельностью гено-

ма и проявлениями фенотипа. Как известно, существует последовательность вариаций структуры ДНК, фенотипический эффект которых проявляется от нулевого до незначительного, малого, умеренного, значительного и сверхвыраженного. В подавляющем большинстве случаев гены взаимодействуют друг с другом и с факторами внешней среды, таким образом воздействуя на фенотип. Эти взаимоотношения касаются и функционирования ферментов. Их фенотипические свойства оказываются гетерогенными, так как на них влияют варьирующие факторы внешней среды на фоне свойств основного гена, определяющего генотип данного признака [158].

Успехи в области биохимической генетики во второй половине XX ст. позволили выявлять гетерозиготных носителей многих заболеваний, особенно тех, которые обусловлены дефектами ферментов, определяемых в фибробластах или клетках крови. Как правило, активность ферментов у гетерозигот снижена примерно вдвое по сравнению с нормальными гомозиготами. И тем не менее, во многих случаях провести четкую грань между этими двумя группами невозможно. Следует помнить, что некоторые индивидуумы даже при прямом измерении активности фермента имеют промежуточные параметры. Это вполне объяснимо, если учитывать, что разные мутации в составе одного и того же локуса вызывают изменения активности фермента различных типов.

Выявление гетерозигот представляет не только научный интерес, связанный с изучением механизмов действия ферментов, но и имеет большое практическое значение. Гетерозигот целесообразно выявлять среди людей, родственники которых страдают болезнями, сцепленными с X-хромосомой или аутосомно-рецессивными заболеваниями. В перспективе также необходимо выявлять гетерозиготных носителей генов, у родственников которых наблюдаются выраженные побочные реакции на ЛС [1].

В исследованиях, проведенных с помощью близнецового метода, было показано,

что генетические факторы играют важную роль в определении времени полувыведения ЛС. Введение определенного препарата дизиготным близнецам гораздо меньше влияло на время его полувыведения, чем при введении монозиготным близнецам. Изучение коэффициента наследуемости показало, что генетические факторы вносят более значительный вклад в период полувыведения препаратов. В некоторых случаях он доходит до 99 % (табл. 3.20).

Для каждого индивидуума время полувыведения ЛС постоянно и, как было отмечено выше, контролируется генетическими факторами. Для большинства ЛС варианты времени полувыведения в популяции могут быть представлены в виде кривой Гаусса. У определенной части людей (по обе стороны от моды) после введения среднетерапевтической дозы препарата в организме устанавливается либо слишком высокий, либо слишком низкий уровень ЛС (рис. 3.3). При высоком уровне препа-

Таблица 3.20

**Результаты измерения скорости метаболизма лекарственных препаратов или стационарного уровня препаратов у близнецов [1]**

Препарат	Число пар близнецов	Измеренный параметр	Диапазон измерений	$r_{M3}$	$r_{D3}$	$h_2^2$
Антипирин	9МЗ, 9ДЗ	Время полураспада в плазме, ч	5,1–16,7	0,93	-0,03	0,99
Фенилбутазон 6 мг/кг (одной дозой, перорально)	7МЗ, 7ДЗ	Время полураспада в плазме, дни	1,2–7,3	0,98	0,45	0,99
Дикумарол 4 мг/кг (одной дозой, перорально)	7МЗ, 7ДЗ	Время полураспада в плазме, ч	7,0–74,0	0,99	0,80	0,98
Галотан 3,4 мг (одной дозой, внутривенно)	5МЗ, 5ДЗ	Выделение с мочой трифторацетата натрия за 24 ч	2,7–11,4	0,71	0,54	0,63
Этанол 0,5 г/кг (одной дозой, перорально)	10МЗ, 10ДЗ	$\beta_{60}$ мг/(мл · ч) СДЭ мг/(кг · г)	0,051–0,141 50,00–109,63	0,64 0,77	0,16 0,77	0,63 0,67
	1 мл/кг (одной дозой, перорально)	7МЗ, 7ДЗ	$\beta_{60}$ мг/(мл · ч)	0,11–0,24	0,98	-0,38
1,2 мл/кг (одной дозой, перорально)	19МЗ, 21ДЗ	Скорость всасывания, мг/(мл · 30 мин)	0,20–1,12	0,56	0,27	0,57
Дифенилгидантоин 100 мг (одной дозой, внутривенно)	7МЗ, 7ДЗ	Время полураспада в сыворотке, ч	7,7–25,5	0,92	0,14	0,85
Литий 300 мг/12 ч (в течение 7 дней, перорально)	5МЗ, 5ДЗ	Концентрация в плазме, м-экв/л	0,16–0,38	0,94	0,61	0,86
		Концентрация в эритроцитах, м-экв/л	0,050–0,102	0,98	0,71	0,83
		Соотношение концентраций эритроцитов в плазме (через каждые 3 дня после введения)	0,18–0,56	0,84	0,62	0,92

Препарат	Число пар близнецов	Измеренный параметр	Диапазон измерений	$r_{M3}$	$r_{D3}$	$h_2^2$
Амобарбитал 125 мг (одной дозой, внутривенно)	7M3, 7D3	Скорость осветления плазмы, мл/мин	16,0–67,2	0,87	0,55	0,83
		Скорость очистки в пересчете на вес, 1/(кг · ч)	1,76–6,16	0,92	0,60	0,80
		Константа скорости выведения, ч <sup>-1</sup>	2,09–8,37	0,93	0,03	0,91
Нортриптилин 0,6 мг/кг в день (в течение 8 дней, перорально)	19M3, 20D3	Стационарный уровень в плазме, нг/мл	8–78			
Салицилат натрия 40 мг/кг (одной дозой, внутривенно)	7M3, 7D3	Скорость распада салицилата в сыворотке, мг/(дл · ч)	-1,02	0,64	0,32	0,86
Аспирин 65 мг/кг в день (в течение 3 дней, перорально)		Уровень салициловой кислоты в сыворотке	11,9–36,4	0,90	0,33	0,98
		Стационарная скорость выделения салицилмочевой кислоты, мг/(кг·ч)	0,84–1,91	0,94	0,76	0,89

- Примечания: 1.  $\beta_{60}$  – скорость исчезновения из крови. 2. СДЭ – скорость деградации этанола. 3.  $r_{M3}$ ,  $r_{D3}$  – внутригрупповой коэффициент корреляции для M3 и D3 близнецов соответственно. 4.  $h_2^2$  – наследуемость:  $h_2^2 = \frac{V_w(D3) - V_w(M3)}{V_w(D3)}$ , где  $V_w$  – дисперсия внутри пар близнецов.

рата в организме может развиваться его токсичность, при низком – терапевтического эффекта не будет.

Для широко распространенных признаков характерно отсутствие четкого распределения фенотипов по двум классам. При этом не каждого индивидуума можно с уверенностью отнести к какому-то определенному классу из-за возможных перекрытий (наслоений) признаков. Даже если область перекрытия фенотипических значений относительно небольшая, то все равно общее распределение остается бимодальным. Это явление обычно иллюстрируют ставшим классическим в фармакогенетике примером распределения противотуберкулезного препарата изониазида (гидразида изоникотиновой кислоты – INH) в плазме крови [1]. После приема одинаковой дозы изониазида его концент-

рация в плазме крови различных больных оказывается разной, а общее распределение имеет бимодальную конфигурацию (рис. 3.14). В связи с этим, было высказано предположение, что биотрансформация изониазида детерминирована одним геном. Данная гипотеза была подтверждена в семейных исследованиях. Так, у гомозигот  $Acs/Acs$  ( $Acs$  – аллель медленной трансформации) выявлялся высокий уровень лекарства в крови. У гетерозигот  $Acr/Acs$  ( $Acr$  – аллель быстрой инактивации) выявлялся низкий уровень лекарства. На основании этого был сделан вывод о том, что фенотипические различия в биотрансформации изониазида связаны с генетически обусловленными вариантами фермента N-ацетилтрансферазы. Подтверждение этой генетической гипотезы было получено благодаря открытию закономерности

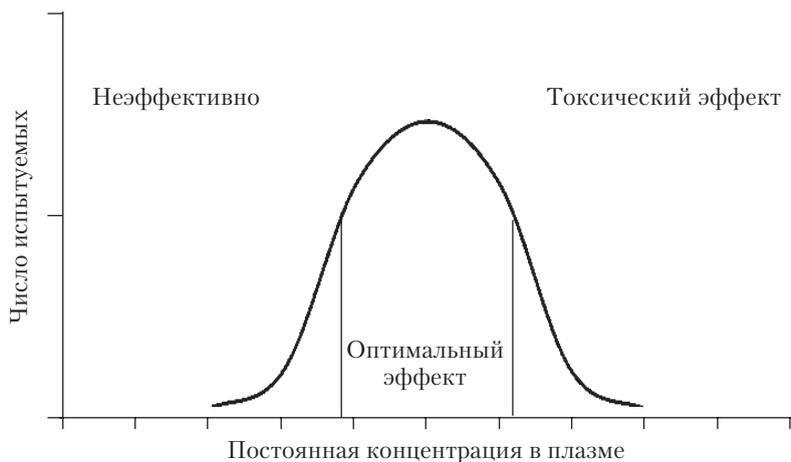


Рис. 3.13. Постоянная концентрация лекарственного вещества в плазме крови и его биологический эффект [156]

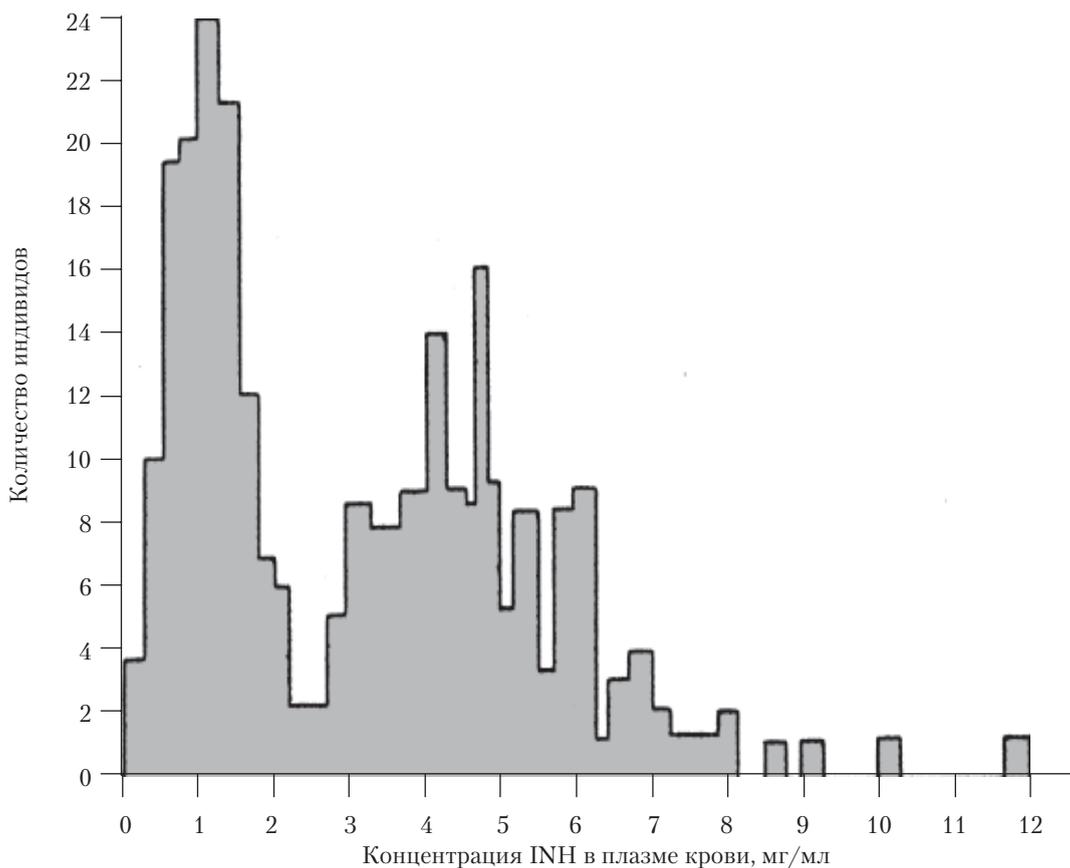


Рис. 3.14. Концентрация изониазида в плазме крови 267 людей из 53 семей [1]

бимодального распределения ЛС в крови.

Таким образом, при моногенном типе наследования должны наблюдаться качественные различия состава нормального и мутантного генов. Графическая обработка результатов измерения на уровне продукта гена обычно позволяет идентифицировать на кривой распределения различные генетические классы в виде отдельных мод. Так, кривая распределения активности Г-6-ФДГ у мужчин с нормальной активностью и с дефектом этого фермента имеет две неперекрывающиеся моды. Другой пример. Все три генетических класса вариантов псевдохолинэстеразы можно определить в опытах со специфическим ингибитором. При измерении уровня псевдохолинэстеразы в крови, а не характера ее ингибирования, эти различия не столь выражены, так как между нормальными гомозиготами, гетерозиготами и мутантными гомозиготами соответственно происходит перекрывание спектров (рис. 3.15).

Изложенные данные свидетельствуют, что бимодальная (мультимодальная) кривая распределения может рассматриваться как наличие моногенного наследования признака. В случаях, когда об активности мутантного гена судят не по его первичному продукту (составу), следует учитывать, что на результаты исследований могут влиять другие генетические причины или факторы внешней среды. Это обуславливает мономодальный характер кривой распределения. Мономодальная кривая обычно свидетельствует о полигенной детерминации признака. Исходя из этого, судить о механизме наследования только на основании распределения частот следует с осторожностью.

Большие затруднения вызывают интерпретация и сопоставление результатов, полученных различными исследователями, так как во многих случаях для ферментов применялись разные субстраты (тест-препараты). При анализе этих данных следует учитывать возможные различия субстратов. В наибольшей мере это проявляется при использовании одного тест-препарата для оценки его биотрансформации

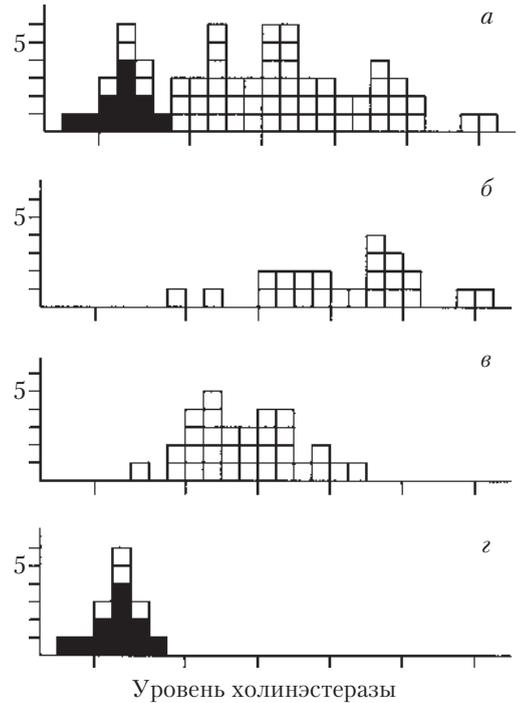


Рис. 3.15. Распределение уровней активности холинэстеразы сыворотки крови у людей с высокой чувствительностью к суксаметониуму и их родственников [1]:

*а* — все обследованные; *б* — обычный; *в* — промежуточный; *г* — атипичный; по оси ординат — число индивидов

с учетом образующихся метаболитов. Примером могут служить результаты исследований на 60 добровольцах (Испания) после приема 250 мг амидопирина. Характерно, что в метаболизме этого ЛС принимают участие ферменты цитохрома Р-450 и NAT. В результате установлено, что у исследуемых добровольцев экскреция метаболитов амидопирина в течение 24 ч составляла: неизмененного амидопирина ( $0,2 \pm 0,2$ ) мг; метиламидопирина ( $4,5 \pm 2,8$ ) мг; формиламидопирина ( $18,5 \pm 10,1$ ) мг; аминокамидопирина ( $9,2 \pm 6,6$ ) мг; ацетилированного амидопирина ( $31,8 \pm 21,1$ ) мг. При этом отмечены значительные индивидуальные различия от 12 до 200-кратных величин. Ацетилирование подчинялось допустимому полиморфному распределе-

нию и не коррелировало с другими метаболическими путями. Метаболиты цитохромов имели высокую степень корреляции между собой [159].

При сравнении метаболизма амидопирина и кофеина установлено, что активность фенотипов медленных ацетиляторов была ниже более чем в 3,8 раза. Показатели деметилирования амидопирина, осуществленного цитохромами, так же, как и метаболиты кофеина, имеют высокую степень корреляции.

Сходные результаты применения разных тестов активности NAT получены при оценке метаанализа у выходцев из Китая. Исследования не выявили значительных отличий между результатами тестов с изониазидом, сульфадимезином и сульфаметазиним. Частота медленных ацетиляторов составляла 24,5 %, совпадая с таковой у коренных жителей Китая. При этом частота медленного генотипа совпадала с частотой фенотипа NAT2. Наиболее распространенными были аллели \*4/\*4 (29,9 %); \*4/\*6A (27,4 %); \*4/\*7A (12 %); \*6A/\*6A (11,3 %) [116].

В японской популяции (140 человек) при использовании изониазида и дапсона, а также кофеина частота медленных ацетиляторов составляла 10,7 %, быстрых — 89,3 %. В Дании (335 обследованных), по данным теста с кофеином, быстрые ацетиляторы составили 47 %, а медленные — 53 % [130].

Особо следует подчеркнуть, что нередко экспериментальные данные, полученные на обезьянах и других животных, используемых для тестирования и оценки ферментозависимой фармакокинетики, экстраполируют на человека без учета коррекции с клиническими наблюдениями, тогда как сравнительные исследования свидетельствуют о существенных различиях. Например, установлено, что внутривидовые различия активности восьми цитохромзависимых ферментов субклеточных фракций печени у обезьян мало выражены, однако их метаболическая активность у человека значительно выше. Значительные отличия активности этих ферментов отме-

чены и у собак. Генетический полиморфизм ацетилирования изониазида наблюдается только у человека, причем с 200-кратным различием между индивидуумами.

В печени собак, например, не образуются ацетилированные метаболиты промутагенного ароматического аминобензидина с формированием канцерогенных продуктов ДНК, в отличие от мышей, хомячков или крыс [160]. Ацетилирование бензидина у человека в 3 раза интенсивнее осуществляется полиморфным *NAT1*, чем *NAT2*. В соответствии с экспериментально заданным 20-кратным увеличением содержания ацетил-КоА в образцах печени, кинетические параметры ацетилирования менялись, однако в них не наблюдалось корреляции с генотипом *NAT2*. Вместе с тем, результаты ацетилирования были сопоставимы с *NAT1*\*4 аллелем. Следовательно, и бензидин, и ацетилбензидин — субстраты преимущественно для *NAT1*. Таким образом, разнообразие активности ферментов биотрансформации может быть причиной уязвимости ЛС. Так, например, при сравнительном исследовании содержание основного метаболита нитразепама — 7-ацетил-аминонитразепама в 8,5 раза выше в цитозоле печени беременных крыс, чем у мышей, а уровень диацетилированного метаболита, наоборот, в 9 раз выше в микросомах печени мышей, чем у крыс. Поэтому 7-ацетиламинонитразепам и вызывал множественные пороки развития у крыс, вместе с тем, они отсутствовали у мышей. У этих же животных отмечена различная чувствительность к нитразепам-индуцированному тератогенезу, которая находится в прямой зависимости от активности NAT [161].

Органная вариабельность активности ферментов влияет на прогноз фармакотерапии. В большинстве исследований оценивается ферментативный метаболизм печени, что совершенно недостаточно, так как активность процессов детоксикации в организме определяется также комплексом ферментных систем легких, слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, почек, мозга, кожи. Эти обстоятельства дик-

туют необходимость оценки метаболических профилей и локализации ферментов для каждого ЛС в разных органах, особенно при нарушениях функций печени. При этом в разных тканях роль NAT1 и NAT2 отличается. Например, мономорфное распределение NAT1 представлено только в мононуклеарах с большой тропностью к метаболизму сульфаметоксазола, что влияет на его терапевтические концентрации в плазме крови, хотя и NAT2 гепатоцитов, в определенной мере, модифицирует его токсичность.

Перечисленные выше причины в какой-то степени объясняют отсутствие надежных превентивных мер для оптимизации фармакотерапии в медицинской практике. В научной литературе высказывается мнение о сдержанном применении тестовых препаратов. Оно основывается на результатах оценки активности ферментов биотрансформации ЛС, которые являются следствием простого сочетания перечисленных факторов с их разнонаправленной векторностью и удельным весом у разных индивидуумов.

Успешное развитие фармакогенетики в последние годы позволило установить принципиальные положения в химиотерапии, которые обязательно следует учитывать для контроля и прогноза эффективности, а также безопасности ЛС. К установленным проявлениям генетического полиморфизма относится метаболическая активность NAT, изоэнзимов гена *CYP2D6* — дебрисохин-спартеиновый полиморфизм или гена *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C10* — мифентоиновый полиморфизм.

### 3.9. Методы, применяемые в фармакогенетике

К настоящему времени разработаны методы для исследования дифференциальной экспрессии генов.

К сожалению, они в полной мере не соответствуют задачам фармакогенетического анализа. При их применении трудно рассчитывать на полную идентификацию

всех генов, экспрессирующихся в ответ на действие определенного лекарственного препарата, и, соответственно, на понимание механизмов его действия. В то же время они дают возможность создания кДНК-библиотек, с помощью которых можно выявлять новые гены.

Достижения геномики послужили толчком к развитию новых технологий в области молекулярной биологии, в том числе и к созданию технологии микрочипов. Теория их создания основана на гибридизации олигонуклеотидов известной последовательности, иммобилизованных на твердой поверхности в строго определенных местах, с различными способами меченой пробой. В данной технологии учитываются последние достижения информатики, химии полупроводников, микроэлектронной промышленности, а также обилие информации, которая накопилась за годы работы над программой «Геном человека».

ДНК-чип представляет собой миниатюрную пластину с микроячейками. Каждая микроячейка содержит искусственно синтезированные олигонуклеотиды, соответствующие фрагментам определенных генов, которые выступают в качестве матрицы. В этих ячейках происходит комплементарное взаимодействие матрицы и пробы (кДНК исследуемых образцов). В настоящее время существует два направления в создании ДНК-чипов, которые различаются способом синтеза и нанесения матричных олигонуклеотидов [162].

Первое направление основано на предварительном синтезе олигонуклеотидов либо химическим путем, либо с помощью ПЦР (длина от 500 до 5 тыс. оснований), которые затем специальным образом наносят на обработанную стеклянную поверхность с помощью роботов. Такие типы чипов получили название кДНК-микрочипов (cDNA-microarray). В ПЦР амплифицируются последовательности кДНК определенных генов. Данный тип чипов дорогостоящий, так как необходимо создавать собственную кДНК-библиотеку или приобретать ее у крупных исследовательских центров [163].

Как оказалось, кДНК-микрочипы непригодны для проведения исследований полиморфизма (генетической изменчивости отдельного локуса в определенной популяции), мутационного анализа, сравнительного изучения экспрессии большого количества генов, так как плотность размещения матричных олигонуклеотидов очень ограничена (число ячеек составляет около 1000 на чип). Кроме того, применение длинных фрагментов ДНК (кДНК) снижает специфичность гибридизации с исследуемой пробой и приводит к появлению ложноположительных сигналов, которые не соответствуют реальной экспрессии генов [164].

Несмотря на перечисленные недостатки, основное преимущество кДНК-микрочипов заключается в возможности варьирования качественным и количественным составом фрагментов генов. Компании “Incyte” и “Synteni” изготавливают кДНК-микрочипы на заказ, исходя из целей и возможностей исследователя.

Более перспективное направление в создании чипов — использование фотолитографических технологий, которые дают возможность одновременно интегрировать огромное количество олигонуклеотидов любой последовательности непосредственно на поверхности чипа. Плотность размещения таким образом синтезированных нуклеотидов может достигать 1 млн на 1 см<sup>2</sup>. Такие ДНК-чипы (DNA-chips) производятся фирмой “Affymetrix” Матрица ДНК-чипа — короткая (20–25-мерная) олигонуклеотидная последовательность, в которой каждому гену соответствует 15–20 олигонуклеотидов, что значительно повышает точность и воспроизводимость результатов исследования. С помощью ДНК-чипов можно одновременно оценивать экспрессию практически неограниченного количества генов, проводить исследование полиморфизма, в том числе и однонуклеотидных замен (SNP). В этом случае синтезируются специфические для каждой последовательности конкретного гена олигонуклеотиды с учетом возможных вариантов взаимного расположения нуклеотидов [165].

При проведении исследований чип гибридизуется с различными способами меченой пробой. При сравнительных исследованиях пробой, как правило, служит кДНК, полученная из контрольного и сравниваемого образцов. В качестве метки используются как радиоактивно меченные молекулы, так и флуоресцентные красители, непосредственно присоединенные к исследуемым образцам. При проведении сравнительного анализа обычно применяют двухцветную детекцию, при которой контрольная и опытная кДНК метятся разными красителями. Результаты регистрируют по интенсивности гибридизационных сигналов тех ячеек чипа, в котором произошла гибридизация, с последующей компьютерной обработкой данных.

Выпускаются и упрощенные варианты чипов с небольшим набором генов (в пределах 1000–2000). На нейлоновой мембране фиксируются короткие последовательности известных генов. Они гибридизуются с радиоактивно меченой пробой. Гибридизация детектируется методом радиоавтографии.

Следует отметить, что работа с чипами для проведения гибридизации требует специального дорогостоящего оборудования. Ожидается, что в ближайшие годы цены на комплекты оборудования для производства чипов и работы с ними будут снижены в связи с насыщением рынка.

Разработка и внедрение в науку и практику новых технологий, как правило, — движущий момент в развитии медико-биологических исследований, как это было, например, с разработкой технологии ПЦР. В настоящее время развитие молекулярной биологии многим обязано внедрению ПЦР, а теперь и микрочипов. Освоение технологии микрочипов принципиально и для фармакологии. Разработка новых ЛС уже сейчас основывается на информации о функциональной роли определенных генов в развитии патологии. Поэтому сроки разработок лекарств могут сократиться с 10–15 до 5–8 лет.

Из данных литературы последнего десятилетия следует, что большинство болез-

ней характеризуется определенным профилем экспрессии генов. Сравнение их профилей в норме и при патологии позволит выявить гены, вовлеченные в этиологию и патогенез того или иного заболевания. Так, R. A. Heller et al. (1997) использовали чип, который содержал около 100 генов, предположительно участвующих в развитии воспаления. При сравнении кДНК из тканей больных ревматоидным артритом и колитом было показано качественное сходство профилей экспрессии большинства генов, в том числе интерлейкина-3, хемокина G<sub>roa</sub>, матричной металлоэстеразы и др. Это подтвердило единый принцип развития воспаления при разных заболеваниях. Одновременно были выявлены гены, специфически экспрессирующиеся лишь при ревматоидном артрите (тканевый ингибитор металлопротеазы I-ферритин, Mn-супероксиддисмутаза), которые могут стать мишенями для ЛС.

При мониторинговании генной экспрессии культуры клеток интактных и зараженных цитомегаловирусом фибробластов были идентифицированы вовлеченные в патогенез вирус-индуцированные гены, на которые может быть направлено действие ЛС.

Проведенный с помощью микрочипов анализ иРНК продуктов различных опухолей позволил установить около 50 тыс. генов, дифференциально экспрессирующихся при различных формах рака. В частности, для клеток рака молочной железы была выявлена повышенная активность 280 генов. Предполагается, что поиск ЛС, направленных именно на эти гены, представляется наиболее перспективным для лечения рака молочной железы.

Также разрабатывается еще одно направление — применение микрочипов с целью выявления лекарственного полиморфизма, лежащего в основе разнообразия индивидов на один и тот же лекарственный препарат. Один из наиболее часто встречающихся видов полиморфизма — это SNP (однонуклеотидные замены): в среднем, через каждые 300–400 п. н. Он

отличается высокой стабильностью и служит надежным фармакогенетическим маркером.

Так, обнаружены полиморфные варианты по SNP гена-рецептора дофамина: D<sub>2</sub> — 3 варианта, D<sub>3</sub> — 1, D<sub>4</sub> — 2, D<sub>5</sub> — 5 вариантов SNP. Полиморфизм по SNP гена *AnoE* ассоциирован с болезнью Альцгеймера. Только 40 % носителей мутантного аллеля *E4* этого гена чувствительны к лечению такрином (ингибитор ацетилхолинэстеразы). Препарат S12024, который используется для лечения этой болезни, более эффективен у больных, несущих аллель *E4*.

К настоящему времени картировано более 60 тыс. SNP, что соответствует 1 SNP на 1,08 тыс. п. н. Как было отмечено выше, SNP широко представлены в геноме человека. Оптимальной считается их детекция на ДНК-чипах. Сейчас идет интенсивная разработка чипов такого типа, которая связана с усовершенствованием существующих фотолиитографических технологий и систем детекции. Например, фирма "Affymetrix" предлагает *CYP2C6/CYP2D19* GeneChip® для тестирования медленных метаболиторов ЛС, которые подвергаются действию ферментов этих генов.

Специалисты в области фармакогенетики в настоящее время интенсивно работают в перспективном направлении применения микрочипов для массового скрининга биологической активности вновь синтезированных химических соединений. Потенциальные ЛС можно отбирать на основе сопоставления характера экспрессии с известными, сходными по механизму действия ЛС («эталоны»). В таких случаях информация обо всех химических соединениях, обладающих характерным профилем экспрессии, суммируется в компьютерных базах данных. В качестве примера могут служить результаты экспериментальных данных, полученных S. Braxton et al. (1998). Авторы моделировали воспаление, подвергая культуру клеток U937 обработке различными агентами (комбинация липосахаридов с фактором некроза опухоли) в присутствии 10 стероидных препа-

ратов, обычно используемых в терапии воспаления. Данные о дифференциальной экспрессии генов были получены с помощью чипа на 10 тыс. генов. Для сопоставления эффектов различных стероидов была создана матрица на основе корреляции тех генов, дифференциальная экспрессия которых более чем в 3 раза отличалась в любом из экспериментов. Кластеризацию рассчитывали с помощью программы КИТСН. Как показал кластерный анализ, такие стероиды, как флуоцинолон, дексаметазон, преднизолон и гидрокортизон, дали сходную картину экспрессии. Формирование кластеров ЛС на основе информации о профиле экспрессии генов идентично подходу с анализом «структура-активность».

Таким образом, описанные выше, а также другие современные молекулярно-биологические технологии, которые начинают широко внедряться в изучение экспрессии генов и их полиморфных вариантов, очевидно, послужат основным рычагом в переходе фармакотерапии от «средней дозы для всех» к «эффективной индивидуальной дозе». Переход к строго индивидуальному фармакологическому подходу в лечении различных болезней — один из важнейших итогов практического воплощения программы «Геном человека».

### 3.10. Перспективы развития фармакогенетики

Генетическое тестирование в практическом здравоохранении — сложная проблема. Прогресс достигнут в отношении обследования лиц, которые могут нести гены, предрасполагающие к высокой степени семейного наследования, как, например, некоторые нейродегенеративные болезни, семейные опухоли и др. Использование генетических методов в тех случаях, когда аллели с относительно низкой пенетрантностью могут быть маркерами определенного фенотипа (болезни), весьма затруднительно.

Фармакогенетика уже определила область практического здравоохранения, где генетический скрининг может быть использован для эффективного выбора ЛС, что имеет важное медицинское, социальное и экономическое значение. Выдвинуто предположение, что в ближайшем будущем участковый врач сможет определять генетический профиль каждого пациента и соответственно этому назначать те или иные лекарства. Достижения в области технологий генотипирования позволяют считать, что решение этой проблемы находится уже не в границах фантастических размышлений.

В развитии фармакогенетики весьма заинтересованы такие отрасли знаний, как фармация и биотехнология. Исходя из этого, основные задачи современных исследований — это скрининг полиморфизма генов, ответственных за поступление и выведение лекарств; других генов, которые участвуют в метаболизме лекарств, а также генов, регулирующих экспрессию первичных мишеней для ЛС, каковыми являются клеточные и ЯР.

Крайне заинтересована в результатах фармакогенетических исследований фармацевтическая промышленность. Все большее число фармацевтических фирм проводят генотипирование различных популяций для клинических испытаний. Связано это с тем, что знания о генетической изменчивости чувствительности к ЛС — важный компонент процесса их регистрации. Кроме того, это дает возможность благоразумно исключать потенциально чувствительных лиц фазы I испытаний. Таким образом, генетические факторы, участвующие в метаболизме лекарств, имеют также коммерческое значение.

Скринирование новых соединений *in vitro* с целью определения участвующих в их поступлении и метаболизме ЛС генов позволит выявить возможность причастности полиморфных ферментов к метаболизму лекарств. Это дает основание конструировать молекулы лекарства таким образом, чтобы избежать определенных метаболических путей при сохранении

фармакологической активности. Правда, такой подход имеет и явные недостатки, поскольку ведет к значительному увеличению времени создания новых лекарств. Кроме того, не совсем ясно, будет ли полиморфизм в других нераспознанных сайтах влиять на индивидуальность лекарственной чувствительности.

На этом фоне высказываются предположения о том, что обнаружение полиморфных причин метаболизма некоторых ведущих ЛС скомпрометирует применение их в практике здравоохранения. Такое мнение, по крайней мере, голословно. Решение данного вопроса сложное и его необходимо принимать на основе не только клинических, но и коммерческих подходов.

Полиморфизм точек приложения лекарств в организме неизбежен, так как он запрограммирован природой. Все люди генетически различны, поэтому невозможно убрать наследственно-обусловленную изменчивость ответа на лекарственную терапию.

Фармакологический скрининг определения чувствительности к ЛС будет, без сомнения, играть важную роль, если удастся уйти от эмпирического назначения лекарств и, тем самым, избежать межиндивидуальной изменчивости в лекарственной чувствительности и побочных эффектах, что сейчас компрометирует многие лекарства.

Анализ результатов исследований в области фармакогенетики показывает, что в настоящее время изучены наиболее важные различия метаболизма широко применяемых ЛС, которые связаны с генетическим полиморфизмом ферментов, ответственных за их биотрансформацию.

Дальнейшие исследования в этом направлении важны для оптимизации фармакотерапии, что может выражаться как в подборе эффективных доз, так и в предсказании возможных нежелательных реакций. Генотипирование действительно способно значительно облегчить подбор доз препаратов. Так, сверхбыстрые метаболизаторы должны получать суточную дозу препарата, в десятки раз превышающую рекомендованную. Гомозиготам по мутантному ал-

лелю, имеющим сниженную ферментативную активность, дозу необходимо соответственно снижать по сравнению с рекомендованной.

Благодаря генотипированию людей по основным полиморфным ферментам лекарственного метаболизма, в частности цитохромов Р-450 (СYP2C9, СYP2C19, СYP2D6) и ариламин-N-ацетилтрансферазы, становится возможным уже на первых этапах подбора фармакотерапии рекомендовать пациентам дозировку препаратов с целью получения оптимального клинического эффекта, так как средние терапевтические дозы, рекомендуемые фирмами-производителями ЛС, могут оказаться недостаточными для сверхбыстрых метаболизаторов и весьма завышенными — для медленных. В табл. 3.21 обобщены данные литературы о некоторых препаратах, широко применяемых в клинической практике, с указанием доз для различных групп, выделенных в зависимости от способности метаболизировать ЛС. Эти данные дают представление о зависимости величины дозы от генотипа пациента по ферментам лекарственного метаболизма.

Характер поведения ЛС в организме довольно сложный. Наряду с интенсивным изучением генотипов индивидуумов по ферментам лекарственного метаболизма, необходимы исследования генотипов транспортных белков и рецепторов ЛС. Такие исследования могут послужить базисом для составления индивидуальных генетических карт и назначения индивидуальной лекарственной терапии.

Как было отмечено выше, ферменты лекарственного метаболизма имеют важное значение в детоксикации и биоактивации канцерогенов. Изучение полиморфизма ферментов, участвующих в этих процессах, необходимо для определения риска развития злокачественных новообразований. Установление несомненных биомаркеров генетической восприимчивости к раковым заболеваниям и интоксикациям позволит идентифицировать людей с высоким риском их возникновения и принимать превентивные меры профилактики.

Дозировка лекарственных препаратов  
в зависимости от генотипа ферментов цитохрома Р-450 [116]

Лекарственный препарат	Средняя доза, мг	Рекомендованные дозы различным метаболитам (% от средней дозы)*								
		CYP2D6			CYP2C9			CYP2C19		
		ММ	ИМ	БМ; СМ	ММ	ИМ	БМ	ММ	ИМ	БМ
Флекаинид	50–200	80	90	110						
Пропафенон	400–700	40	80	130						
Амитриптилин	50–150	50	90	120				50	80	110
Клопирамид	100–200	50	90	120				70	90	100
Галоперидол	4–15	80	90	110						
Метопролол	20–200	30	60	140						
Кодеин	60–100	Не реко- менду- ется		Низ- кие						
Омепразол	20–40							20	50	110
Толбутамит	500				40	80	120			
Варфарин	1,5–3				20	50	130			

Примечания: 1. \* — Относительные дозы препаратов основываются на обобщении данных литературы, они не могут носить рекомендательного характера.

2. ММ — медленные метаболиты (гомозиготы — носители двух неактивных аллелей).
3. ИМ — интенсивные метаболиты (гетерозиготы с одним неактивным аллелем).
4. БМ — быстрые метаболиты (гомозиготы по двум активным аллелям).
5. СМ — сверхбыстрые метаболиты (носители трех и более активных аллелей).

Этому способствуют современные достижения в выявлении мутаций и генотипировании человека, что снижает трудности в проведении скрининга больших популяций для составления индивидуальных «геномных отпечатков», которые можно использовать для рационального назначения препаратов. Для проведения такого исследования достаточно одной капли крови, можно также исследовать клетки Buccalного эпителия, волосные фолликулы, а большинство ДНК-технологий автоматизировано.

Итоги основных достижений фармакогенетики, имеющие значение для медицинской практики, можно суммировать следующим образом.

1. Побочное действие лекарств — большая клиническая проблема, которая занимает важное место в структуре смертности.

2. Фармакогенетика — наука о генетических основах индивидуальной реакции на лекарственные препараты.

3. Фармакогенетическая гетерогенность популяций объясняет возможное отсутствие клинического эффекта фармакотерапии и наличие идиосинкразии к лекарственным препаратам.

4. Индивидуальная реакция на препараты обусловлена генетически детерминированными различиями во всасывании, распределении, метаболизме и выведении лекарств, а также полиморфизмом рецепторов-мишеней препаратов.

5. Наиболее изучен фармакогенетический полиморфизм генов семейства цитохромов Р-450.

6. Один из ключевых полиморфных цитохромов — это фермент CYP2D6, который участвует в метаболизме более чем

25 % всех применяемых в практике здравоохранения лекарственных препаратов.

7. Наследственные аллельные варианты многих полиморфных ферментов могут служить маркерами чувствительности к препаратам.

8. Углубленное изучение генетических основ индивидуальных реакций на препараты имеет важное клиническое и экономическое значение и в ближайшей перспективе может стать базой для рационального назначения препаратов и подбора их доз.

Очевидны следующие пути развития и практического применения достижений фармакогенетики.

Необходимо дальнейшее изучение полиморфизма специфических генных локусов и фармакологического значения этого полиморфизма. Такие исследования позволят выявить, в какой степени индивидуальная чувствительность к специфическим классам лекарств определена генетически.

Важность генетической изменчивости чувствительности к ЛС, к сожалению, не находит применения в практическом здравоохранении, тогда как ДНК-технологии уже разработаны для рутинного скрининга и их применение возможно в клинике. Многие ЛС, метаболизируемые CYP2D6, например, действующие на ЦНС и имеющие узкие терапевтические показания, при передозировке и кумуляции могут вызвать симптомы, сходные с самой болезнью. Генетическая изменчивость может быть главной причиной различной концентрации ЛС в плазме крови. Если пациент получает лечение по поводу психического заболевания, могут возникнуть трудности в распознавании отсутствия ответа на терапию, несмотря на передозировку препарата.

Одна из целей медицинской генетики — детальная разработка «маркерных профилей», которые позволят выявлять «группы высокого риска» относительно определенных болезней. Это актуально в тех случаях, когда уже существуют профилактические меры, способные предупредить или сдержать проявление вредных эффектов генетической предрасположенности. Та-

кой подход перспективен, так как развитие болезни зачастую детерминировано взаимодействием факторов генетической восприимчивости и факторами среды. В таких случаях профилактическая медицина будет учитывать уникальность генотипа индивидуума, а не характеристику популяции в целом. Ее обязанности весьма широки: предупреждение развития наследственных заболеваний; индивидуализация дозы вакцины, индивидуальный подход к фармакотерапии.

Научные основы разработки таких рекомендаций должны формировать экогенетику, в том числе и фармакогенетику. В будущем теория болезней обязана трансформироваться в теорию сохранения здоровья. В конечном итоге, родится новая область — персонализированная медицина (personalized medicine), предполагающая назначение конкретного лекарства конкретному больному (индивидууму) с учетом данных фармакокинетики и фармакогеномики. Для обозначения индивидуализации лечения применяют и другие термины, например, “tailored medicine” (медицина под заказчика), которая подразумевает использование генотипирования пациентов с целью улучшения качества медицинского обслуживания.

Цель персонализированной медицины — поиск необходимых лекарств для конкретного больного, обоснование схемы лечения в соответствии с его генотипом. В широком смысле слова, персонализированная медицина — интегральная, так как включает в себя разработку персонализированных средств лечения на основе генетики, тестирования на предрасположенность к болезням, профилактику, сочетание диагностики с лечением и мониторинг терапии [166].

Основу персонализированной медицины составляют следующие технологии и подходы:

- 1) молекулярная диагностика, в особенности определение полиморфизма по единичным нуклеотидам (SNP);
- 2) интеграция диагностики и лечения;
- 3) мониторинг лечения;

- 4) фармакогеномика;
- 5) фармакогенетика;
- 6) фармакопротеомика [167].

В связи с частым употреблением последних трех терминов в научной литературе следует уточнить их определения.

Фармакогенетика — наука, исследующая влияние генетических факторов на действие лекарств.

Фармакогеномика — наука, применяющая методы геномики для разработки новых лекарств. Она включает в себя исследование механизмов действия лекарств на клетки на основе изучения изменения экспрессии генов.

Фармакопротеомика — наука о применении протеомики для разработки новых лекарств. Анализ белков у пациентов может выявить маркер для определенной группы больных, соответствующий лечению, которое направлено на конкретную мишень. Фармакопротеомика расширяет фармакогеномику и частично пересекается с фармакогенетикой.

В некоторых работах эти термины используют как синонимы. Однако они име-

ют определенные разграничения (табл. 3.22).

Молекулярный диагноз — определение генотипа по единичным заменам нуклеотидов в геноме, установление гаплотипов, исследование экспрессии генов с помощью биомикрочипов, а также протеомики.

Значение молекулярной диагностики для персонализированной медицины заключается в следующем:

- раннее выявление болезни и выбор адекватного лечения;
- лечение препаратом, который на основании молекулярной диагностики считается безопасным и эффективным;
- интеграция молекулярной диагностики и терапии;
- мониторинг лечения и определение прогноза.

Молекулярная диагностика используется для генетического тестирования и может применяться в генетическом скрининге больших популяций, а также как вспомогательный метод в клинических исследованиях. Самыми важными технологиями молекулярной диагностики, которые

Таблица 3.22

**Отличительные особенности фармакогенетики и фармакогеномики [167]**

Отличительный признак	Фармакогенетика	Фармакогеномика
Направленность исследований	Изучает различия между пациентами	Изучает различия между лекарствами
Область исследований	Изучение вариаций в нуклеотидных последовательностях генов, которые (предположительно) влияют на действие ЛС	Исследование всего генома
Методы исследования	Методы, позволяющие изучить влияние вариаций в генах на действие лекарства	Методы, позволяющие определить профиль экспрессии генов при действии лекарства
Соотношение между сочетанием ЛС и геномов	Одно лекарство и несколько (много) геномов (пациентов)	Несколько ЛС и один геном
Проверка действия лекарства	Исследование одного лекарства <i>in vivo</i> на нескольких пациентах с наследственными вариантами одного гена	Исследование специфических эффектов разных ЛС на экспрессию генов <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>
Применение в персонализированной медицине	Лечение, специфичное для данного больного с данным заболеванием	Разработка и отбор новых ЛС

имеют отношение к персонализированной медицине, считаются генотипирование полиморфизма по единичным нуклеотидам (SNP) и биологические микрочипы [168].

*Виды персонализированного лечения.* Уже в настоящее время для индивидуализации лечения больных применяются геномные технологии, эффективность которых резко возрастает. Наиболее убедительны следующие примеры.

В первую очередь, клеточная/генная терапия. Некоторые виды клеточной/генной терапии построены на строго индивидуальном подходе.

1. Инкапсулированные клетки, подвергнутые генноинженерной модификации, имплантируют для выработки ими инсулина в соответствии с потребностями конкретного больного.

2. Генетическая модификация клеток пациента *in vitro* (с помощью вирусных векторов) и последующая имплантация этих клеток в ткани пациента.

3. Изготовление аутовакцины из клеток опухоли больного, которая вводится ему же для лучшего распознавания и уничтожения раковых клеток.

Персонализированное лечение с успехом применяется в терапии гипертонической болезни, где используется множество фармакологических средств: диуретики,  $\beta$ -адреноблокаторы, антагонисты ангиотензин-конвертирующего фермента (АКФ), антагонисты рецепторов к ангиотензину II, блокаторы кальциевых каналов. Установлено, что препараты этих типов лекарств оказывают разную эффективность в различных популяциях людей. В частности, было обнаружено, что реакция на фозиноприл — ингибитор АКФ у больных гипертонией — зависит от полиморфизма гена АКФ. Компанией “Segnepom” разработан апробированный тест для идентификации больных гипертонией (примерно 30 % всех больных), у которых следует применять ингибиторы АКФ в качестве первого средства. Такие же тесты разработаны и для эффективного использования  $\beta$ -блокаторов и ингибиторов АКФ. В конечном итоге значительно по-

вышается качество лечения и снижается его стоимость.

Персонализированный подход с успехом разрабатывается для лечения гиперлипидемии. Ярким примером здесь может быть исследование STRENGTH (реакции на статины, исследуемые маркерами гаплотипов Genetic) компании “Jenaissance”.

Применение специфических генетических маркеров гаплотипов позволило разделить больных на отдельные группы и значительно повысить эффективность лечения статинами, которая определялась по липопротеинам высокой и низкой плотности и триглицеридам [167].

Внедрение персонализированной медицины, конечно, зависит от коммерческих аспектов деятельности фармацевтических корпораций. Выигрышным моментом здесь является снижение стоимости испытаний с использованием фармакогеномики. Испытания на группе больных, прошедших генотипирование, с большой долей вероятности будут давать положительные результаты и снизят неблагоприятные исходы. Кроме того, фармакогенетика позволит исключить из испытаний и последующего лечения нежелательные побочные эффекты [168].

Маловероятно бытующее мнение об удорожании персонализированной медицины, так как повышение эффективности лечения, отсутствие нежелательных реакций и сокращение сроков госпитализации компенсируют удорожание лекарственных средств.

### Список литературы

1. Фогель Ф., Мотульски А. Генетика человека: В 3-х т.: Пер. с англ. — М.: Мир, 1990.
2. Фармакогенетика. — Женева: ВОЗ, 1975. — 52 с.
3. Абилев С. К., Порошенко Г. Г. Ускоренные методы прогнозирования мутагенных и blastомогенных свойств химических соединений // Итоги науки и техники. Сер.

«Токсикология». — Т. 14. — ВИНТИ, 1986. — 174 с.

4. *Руководство* по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ // Гигиенические критерии состояния окружающей среды. — № 51. — Женева: ВОЗ, 1989. — 212 с.

5. *Williams G. M.* Methods for evaluating chemical genotoxicity // *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* — 1989. — Vol. 29. — P. 189-211.

6. *Ames B. N., Mc Cann J., Yamasaki E.* Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* / mammalian microsome mutagenicity test // *Mutat. Res.* — 1975. — Vol. 31. — P. 347-364.

7. *Radack K. L., Penney S. M., Livingston G. K.* Sources of variability in the human lymphocyte micronucleus assay: a population-based study // *Environ. Mol. Mutagen.* — 1995. — Vol. 26. — P. 26-36.

8. *Angelosanto F. A.* Tissues other than bone marrow that can be used for cytogenetic analyses // *Environ. Mol. Mutagen.* — 1995. — Vol. 25. — P. 338-343.

9. *Дурнев А. Д., Серединин С. Б.* Мутагены. — М.: Медицина, 1998. — 328 с.

10. *Garrod A. E.* Inborn errors of metabolism. — London: H. Frowe, 1923 (Reprinted by Oxford University Press, London).

11. *Kalow W.* Pharmacogenetics — Heredity and the Responses to Drugs. — Philadelphia: W. B. Saunders, 1962.

12. *Prolonged* apnoea following injection of succinylcholine / A. Forbat, M. B. Lond, H. Lehmann, E. Silk // *Lancet.* — 1953. — Vol. ii. — P. 1067-1068.

13. *Phenotypical* and molecular biological analysis of human butyrylcholinesterase variants / B. N. LaDu, C. F. Bartels, C. P. Nogueira et al. // *Clin. Biochem.* — 1990. — Vol. 23. — P. 423-431.

14. *Pharmacogenetics* // Report of a WHO scientific group / WHO technical report series, N 524. — Geneva, 1973.

15. *Toxicity* of primaquine to Negroes / R. S. Hockwald, J. Arnold, C. B. Clayman,

A. S. Alvin // *JAMA.* — 1952. — Vol. 149. — P. 1568-1570.

16. *Bönike R., Lisboa B. P.* Über die Erbbedingtheit der intraindividuellen Konstanz der Isoniazidausscheidung beim Menschen (Untersuchungen an eineiigen und zweieiigen Zwilling) // *Naturwissenschaften.* — 1956. — Vol. 44. — P. 314.

17. *Brodie B. B., Axelrod J.* The fate of antipyrine in man // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* — 1950. — Vol. 98. — P. 97-104.

18. *Marzolini C., Tirona R. G., Kim R. B.* Pharmacogenomics of the OATP and OAT families // *Pharmacogenomics.* — 2004. — Vol. 5. — P. 273-282.

19. *Dean M., Allikmets R.* Complete characterization of the human ABC gene family // *J. Bioenerg. Biomemb.* — 2001. — Vol. 33. — P. 475-479.

20. *Sequence* diversity and haplotype structure in human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene / D. L. Kroetz, C. Pauli-Magnus, L. M. Hodges et al. // *Pharmacogenetics.* — 2003. — Vol. 13. — P. 481-494.

21. *Schwab M., Eichelbaum M., Fromm M. F.* Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* — 2003. — Vol. 43. — P. 285-307.

22. *St. John's wort* induces intestinal P-glycoprotein / MDR1 an intestinal and hepatic CYP3A4 / D. Dürr, B. Steiger, G. A. Kullak-Ublick et al. // *Clin. Pharmacol. Ther.* — 2000. — Vol. 68. — P. 598-600.

23. *Krusenkopf S. Roots I.* St. John's wort and constituent hyperforin concordantly regulate expression of genes encoding enzymes involved in basic cellular pathways // *Pharmacogenetics and Genomics.* — 2005. — Vol. 15, N 11. — P. 817-829.

24. *Серединин С. Б.* Лекции по фармакогенетике. — М.: МИА, 2004. — 303 с.

25. *Induction* of human CYP2C9 by rifampicin, hyperforin, and phenobarbital is mediated by the pregnane X receptor / Y. Chen, S. S. Ferguson, M. Negishi, J. A. Goldstein // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* — 2004. — Vol. 308. — P. 495-501.

26. *Conseil G., Deeley R. G., Cole S. P. C.* Polymorphisms of MRP1 (ABCC1) and related ATP-dependent drug transporters // *Pharmacogenetics and Genomics*. — 2005. — Vol. 15, N 8. — P. 523-533.
27. *Overexpression* of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line / S. P. C. Cole, G. Bhardwaj, J. H. Gerlach et al. // *Science*. — 1992. — Vol. 258. — P. 1650-1654.
28. *The MRP-related* and BCRP/ ABCG 2 multidrug-resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation / A. Haimour, G. Conseil, R. G. Deeley, S. P. C. Cole // *Curr. Drug. Metab.* — 2004. — Vol. 5. — P. 21-53.
29. *Differential* involvement of multidrug resistance-associated protein 1 and P-glycoprotein in tissue distribution and excretion of grepafloxacin in mice / H. Sasabe, Y. Kato, M. Itose et al. // *J. Pharmacol. Exp. Therap.* — 2004. — Vol. 310. — P. 648-655.
30. *Leslie E. M., Deeley R. G., Cole S. P. C.* Multidrug resistance proteins in toxicology: Role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2 and BCRP (ABCG 2) in tissue defense // *Tox. Appl. Pharmacol.* — 2004. — Vol. 204. — P. 216-237.
31. *Interactions* of the human multidrug resistance proteins MRP 1 and MRP 2 with organic anions / E. Bakos, R. Evers, J. A. Sinkule et al. // *Mol. Pharmacol.* — 2000. — Vol. 57. — P. 760-768.
32. *Analysis* of the contribution Mrp3 to in vivo chemosensitivity using knock out mice / M. G. Belinsky, I. L. Schaveleva, Z. S. Chen et al. // *Proc. Am. Assoc. Cancer. Res.* — 2004. — Vol. 45. — P. 24-56.
33. *The potential* impact of drug transporters on nucleoside-analog-based antiviral chemotherapy / P. Borst, J. Balzarini, N. Ono et al. // *Antiviral. Res.* — 2004. — Vol. 62. — P. 1-7.
34. *Jedlitschky G., Burchell B., Keppler D.* The multidrug resistance protein 5 function as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides // *J. Biol. Chem.* — Vol. 275. — P. 30069-30074.
35. *Interactions* between hepatic Mrp4 and Sult2a as revealed by the constitutive androstane receptor and Mrp4 knockout mice / M. Assem, E. G. Schuetz, M. Leggas et al. // *J. Biol. Chem.* — 2004. — Vol. 279. — P. 22250-22257.
36. *Polymorphism* of the ABC transporter genes, MDR1, MRP1 and MRP2/ cMOAT, in health Japanese subject / S. Ito, I. Jeiri, M. Tanabe et al. // *Pharmacogenetics*. — 2001. — Vol. 11. — P. 175-184.
37. *Identification* of human MRP1 mutations and characterization of a G671V substitution / S. Conrad, H.-M. Kauffmann, K. Ito et al. // *J. Hum. Genet.* — 2001. — Vol. 46. — P. 656-663.
38. *Genomic* structure of the canalicular multispecific organic anion-transporter gene (MRP2/cMOAT) and mutations in the ATP-binding cassette region in Dubin-Johnson syndrome / S. Toh, M. Wada, T. Uchiumi et al. // *Am. J. Hum. Genet.* — 1999. — Vol. 64. — P. 739-746.
39. *Functional* and structural consequences of cysteine substitutions in the NH2-proximal region of the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) / E. M. Leslie, I. L. Letourneau, R. G. Deeley, S. P. C. Cole // *Biochemistry*. — 2003. — Vol. 42. — P. 5214-5224.
40. *Trafficking* defect and function defect by mutations of the ATP-binding domains in multidrug resistance protein 2 in patients with Dubin-Johnson syndrome / K. Hashimoto, T. Uchiumi, T. Konno et al. // *Hepatology*. — 2002. — Vol. 36. — P. 1236-1245.
41. *Genetic* polymorphisms in the multidrug resistance-associated protein 3 (ABCC3, MRP3) gene and relationship to its mRNA and protein expression in human liver / T. Lang, M. Hitzl, O. Burk et al. // *Pharmacogenetics*. — 2004. — Vol. 14. — P. 155-166.
42. *Handschin C., Meyer U. A.* Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors // *Pharmacol. Rev.* — 2003. — Vol. 55. — P. 649-673.

43. *Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer* / D. W. Nebert, T. P. Dalton, A. B. Okey, F. J. Gonzalez // *J. Biol. Chem.* — 2004. — Vol. 279. — P. 23847-23850.
44. *Genomic analysis of the nuclear receptor family: new insights into structure, regulation, and evolution from the rat genome* / Z. Zhang, P. E. Burch, A. J. Cooney et al. // *Genome Res.* — 2004. — Vol. 14. — P. 580-590.
45. *Okey A. B., Boutros P. C., Harper P. A.* Polymorphisms of human nuclear receptor that control expression of drug-metabolizing enzymes // *Pharmacogenetics and Genomics.* — 2005. — Vol. 15, N 6. — P. 371-379.
46. *Chang T. K., Bandiera S. M., Chen J.* Constitutive androstane receptor and pregnane X receptor gene expression in human liver: interindividual variability and correlation with CYP2B6 mRNA levels // *Drug. Metab. Dispos.* — 2003. — Vol. 31. — P. 7-10.
47. *Hepatic CYP2B6 expression: gender and ethnic differences and relationship to CYP2B6 genotype and CAR (constitutive androstane receptor) expression* / V. Lamba, J. Lamba, K. Yasuda et al. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* — 2003. — Vol. 307. — P. 906-922.
48. *Grant D. M.* Pharmacogenetics and the regulation of gene transcription // *Pharmacogenetics.* — 2004. — Vol. 14. — P. 391-393.
49. *Van Rossum E. F., Lamberts S. W.* Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their association with metabolic parameters and body composition // *Recent. Prog. Horm. Res.* — 2004. — Vol. 59. — P. 333-357.
50. *Mutation in the E-domain of RAR* portion of the PML/RAR chimeric gene may confer clinical resistance to all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia / M. Imaizumi, H. Suzuki, M. Yoshinari et al. // *Blood.* — 1998. — Vol. 92. — P. 374-382.
51. *Polymorphisms in the human AH receptor* / P. A. Harper, J. Y. Wong, M. S. Lam, A. B. Okey // *Chem. Biol. Interact.* — 2002. — Vol. 141. — P. 161-187.
52. *Sequence variation and phylogenetic history of the mouse Ahr gene* / R. S. Thomas, S. G. Penn, K. Holden et al. // *Pharmacogenetics.* — 2002. — Vol. 12. — P. 151-163.
53. *Identification of polymorphisms in the promoter region of the human NRF2 gene* / T. Yamamoto, K. Yoh, A. Kobayashi et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2004. — Vol. 321. — P. 72-79.
54. *A common polymorphism in the upstream promoter region of the hepatocyte nuclear factor-4 alpha gene on chromosome 20q is associated with type 2 diabetes and appears to contribute to the evidence for linkage in an Ashkenazi jewish population* / L. D. Love-Gregory, J. Wasson, J. Ma et al. // *Diabetes.* — 2004. — Vol. 53. — P. 1134-1140.
55. *Головенко Н. Я., Карасева Т. Л.* Сравнительная биохимия чужеродных соединений. — К.: Наук. думка, 1983. — 200 с.
56. *Levis D.* Cytochrome P-450: structure, function and mechanism. — N.-Y.: Taylor and Francis, 1996. — P. 450.
57. *Головенко Н. Я.* Некоторые аспекты биохимии, химии, молекулярной биологии и генетики цитохрома P-450 (обзор литературы) // *Современные проблемы токсикологии.* — 2001. — № 3. — С. 17-23.
58. *The P450 superfamily: update on new sequence, gene mapping, accession numbers, early trivial names, and nomenclature* / D. Nelson, T. Kamataki, D. I. Waxman et al. // *DNA Cell. Biol.* — 1993. — Vol. 12. — P. 1-15.
59. *Nebert D. W., Russel D. W.* Clinical importance of the cytochromes P450 // *Lancet.* — 2002. — Vol. 360. — P. 1155-1162.
60. *Cytochrome P-450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature* / D. Nelson, L. Koymans, T. Kamataki et al. // *Pharmacogenetics.* — 1996. — Vol. 6. — P. 1-42.
61. *Nelson D. R., Strobel H. W.* Evolution of cytochrome P-450 proteins // *Mol. Biol. Evol.* — 1987. — Vol. 4, N 2. — P. 572-593.

62. *Nebert D. W., Gonzalez F. J.* P-450 genes: Structure, evolution and regulation // *Annu. Rev. Biochem.* — 1987. — Vol. 56, N 3. — P. 572-593.
63. *Gonzalez F. J., Idle J. R.* Pharmacogenetic phenotyping and genotyping. Present status and future potential // *Clin. Pharmacokinet.* — 1994. — Vol. 1. — P. 59-70.
64. *Griffin K. J., Johnson E. F.* The cytochrome P-450 supergene family: genetic organization and function // *Immunology and liver*. Ed.: M. P. Manns, G. Paumgartner, U. Leuschner. — Kluwer Acad. Publ., 1999. — P. 167-179.
65. *Boobis A. R., Fawthrop D. J., Davies D. S.* Mechanisms of cell death // *TIPS.* — 1989. — Vol. 10. — P. 275-280.
66. *Cytochrome P 450 2E1 hydroxyethyl radical adducts as the major antigen in auto-antibody formation among alcoholics* / P. Clot, E. Albano, E. Eliasson et al. // *Gastroenterology.* — 1996. — Vol. 111. — P. 206-216.
67. *Acetone catabolism by cytochrome P 450 2E1: studies with CYP2E1 — null mice* / F. Y. Bondoc, Z. Bao, W. Y. Hu // *Biochem. Pharmacol.* — 1999. — Vol. 58. — P. 461-463.
68. *Hardwick J. P., Gonzalez F. J., Kasper C. B.* Transcriptional regulation of rat liver epoxide hydratase, NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase, and cytochrome P-450b genes by phenobarbital // *J. Biol. Chem.* — 1983. — Vol. 258. — P. 8081-8085.
69. *Induction of cytochrome P-450 by phenobarbital is mediated at the level of transcription* / S. F. Pike, E. A. Shephard, B. R. Rabin, I. R. Phillips // *Biochem. Pharmacol.* — 1985. — Vol. 34. — P. 2489-2494.
70. *Simmons D. L., McQuiddy P., Kasper C. B.* Induction of the hepatic mixed-function oxidase system by synthetic glucocorticoids // *J. Biol. Chem.* — 1987. — Vol. 262. — P. 326-332.
71. *Regulation of the rabbit cytochrome P-450 3c gene: age dependent expression and transcriptional activation by rifampicin* / C. L. Potenza, U. R. Pendurthi, D. K. Strom et al. // *I. Biol. Chem.* — 1989. — Vol. 264. — P. 16222-16228.
72. *SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor* / B. Blumberg, W. J. Sabbagh, H. Juguilon et al. // *Genes. Dev.* — 1998. — Vol. 12. — P. 3195-3205.
73. *Savas B., Griffin K. J., Johnson E. F.* Molecular mechanisms of cytochrome P-450 induction by xenobiotics: an expanded role for nuclear receptors // *Mol. Pharmacol.* — 1999. — Vol. 56. — P. 851-887.
74. *Reyes H., Reisz-Porszasz S., Hankinson O.* Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor // *Science.* — 1992. — Vol. 256. — P. 1193-1195.
75. *Burbach K. M., Poland A., Bradfield C. A.* Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1992. — Vol. 89. — P. 8185-8189.
76. *Nebert D. W., Dieter M. Z.* The evolution of drug metabolism // *Pharmacology.* — 2000. — Vol. 61. — P. 124-135.
77. *Schuetz E. G.* Induction of cytochromes P450 // *Curr. Drug. Metab.* — 2001. — Vol. 2 — P. 139-147.
78. *Nelson D. R.* Cytochrome P-450 and the individually of species // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1999. — Vol. 369. — P. 1-10.
79. *Meyer U. A.* Pharmacogenetics and adverse drug reactions // *Lancet.* — 2000. — Vol. 356. — P. 1667-1671.
80. *Nebert D. W.* Pharmacogenetics and pharmacogenomics: why is this relevant to the clinical geneticist? // *Clin. Genet.* — 1999. — Vol. 59. — P. 247-258.
81. *Clapper M. L.* Genetic polymorphism and cancer risk // *Curr. Oncol. Rep.* — 2000. — Vol. 2. — P. 251-256.
82. *Role of the aromatic hydrocarbon receptor and (Ah) gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis* / D. W. Nebert, A. L. Roe, M. Z. Dieter et al. // *Biochem. Pharmacol.* — 2000. — Vol. 59. — P. 65-85.

83. *Xenobiotic-metabolizing* cytochromes P450 convert prostaglandin endoperoxide to hydroxyheptadecatrienoic acid and the mutagene, malondialdehyde / J. P. Plataras, F. P. Guengerich, D. W. Nebert, L. J. Marnett // *J. Biol. Chem.* — 2000. — Vol. 275. — P. 11784-11790.
84. *Tumor-specific* expression of cytochrome P450 CYP1B1 / G. I. Murray, M. C. Taylor, M. C. McFadyen et al. // *Cancer Res.* — 1997. — Vol. 57. — P. 3026-3031.
85. *Gonzalez F. J., Kimura S.* Understanding the role of xenobiotic-metabolism in chemical carcinogenesis using gene, knockout mice // *Mutat. Res.* — 2001. — Vol. 477. — P. 79-87.
86. *Roles* of cytochrome P-450 in development / I. Stoilov, I. Jansson, M. Starfarazi, J. B. Schenkman // *Drug. Metabol. Drug. Interact.* — 2001. — Vol. 18. — P. 33-55.
87. *Meyer U. A., Zanger U. M.* Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* — 1997. — Vol. 37. — P. 269-296.
88. *Twenty* years of biochemistry of human P450s: expression, mechanism, and relevance to drug / F. P. Guengerich, N. A. Hosea, A. Parikh et al. // *Drug. Metab. Dispos.* — 1998. — Vol. 26. — P. 1175-1178.
89. *Araya Z., Wikvall K.* 6 $\alpha$ -Hydroxylation of taurochenodeoxycholic acid and lithocholic acid by CYP3A4 in human liver microsomes // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1999. — Vol. 1438. — P. 47-54.
90. *Goodwine B., Redinbo M. R., Kliewer S. A.* Regulation of CYP3A gene transcription by the pregnane X receptor // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* — 2002. — Vol. 42. — P. 1-23.
91. *Humanized* xenobiotic response in mice expressing nuclear receptor SXR / W. Xie, J. L. Barwick, M. Downes et al. // *Nature.* — 2000. — Vol. 406. — P. 435-439.
92. *The human* nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity / R. E. Watkins, G. B. Wisely, L. B. Moore et al. // *Science.* — 2001. — Vol. 292. — P. 2329-2333.
93. *Nuclear* receptors and lipid physiology opening the X-files / A. Chawla, J. I. Repa, R. M. Evans, D. J. Mangalsdorf // *Science.* — 2001. — Vol. 294. — P. 1866-1870.
94. *Simpson A. E.* The cytochrome P450-4 (CYP4) family // *Gen. Pharmacol.* — 1997. — Vol. 28. — P. 351-359.
95. *Formation* of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid, a vasoactive and natriuretic eicosanoid, in human kidney: role of CYP 4F2 and CYP4A11 / J. M. Lasker, W. B. Chen, I. Wolf et al. // *J. Biol. Chem.* — 2000. — Vol. 275. — P. 4118-4126.
96. *Effects* of selective cyclooxygenase-2 inhibition vascular responses and thrombosis in canine coronary arteries / J. K. Hennan, J. Huang, T. D. Barrett et al. // *Circulation.* — 2001. — Vol. 104. — P. 820-825.
97. *The patho-biology* of pulmonary hypertension: the endothelium / R. M. Tuder, C. D. Cool, M. Yeager et al. // *Clin. Chest. Med.* — 2001. — Vol. 22. — P. 405-418.
98. *Streol* 14-demethylase P450 (CYP51) provides a breakthrough for the discussion on the evolution of cytochrome P450 gene superfamily / Y. Yoshida, Y. Aoyama, M. Noshiro, O. Gotoh // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2000. — Vol. 273. — P. 799-804.
99. *Targeted* disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis / C. J. Sinal, M. Tohkin, M. Miyata et al. // *Cell.* — 2000. — Vol. 102. — P. 731-744.
100. *Lund E. G., Guileyardo J. M., Russel D. W.* cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1999. — Vol. 96. — P. 7238-7243.
101. *Ryner L. C., Swain A.* Sex in the '90s // *Cell.* — 1995. — Vol. 81. — P. 483-493.
102. *Nebert D. W., McKinnon R. A.* Cytochrome P-450: evolution and functional diversity // *Progr. Liv. Dis.* — 1994. — Vol. 12. — P. 63-67.
103. *White P. C.* Congenital adrenal hyperplasias // *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2001. — Vol. 15. — P. 17-41.

104. *Wikvall K.* Cytochrome P-450 enzymes in the bioactivation of vitamin D to its hormonal form // *Intl. J. Mol. Med.* — 2001. — Vol. 15. — P. 201-209.
105. *The CYP2D6 humanized mouse: effect of the human CYP2D6 transgene and HNF4a on the disposition of debrisoquine in the mouse* / J. Corchero, C. P. Granvil, T. E. Akiyama et al. // *Mol. Pharmacol.* — 2001. — Vol. 60. — P. 260-267.
106. *Norman A. W., Ishizuka S., Okamura W. H.* Ligands for the vitamin D endocrine system: different shapes function as agonists for genomic and rapid response receptors or as a ligand for the plasma vitamin D binding protein // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* — 2001. — Vol. 76. — P. 49-59.
107. *Nebert D. W.* Suggestions for the nomenclature of human alleles: relevance to ecogenetics, pharmacogenetics and molecular epidemiology // *Pharmacogenetics.* — 2000. — Vol. 10. — P. 279-290.
108. *Wolf C. R., Smith G.* Pharmacogenetics // *British. Med. Bull.* — 1999. — Vol. 55. — N 2. — P. 366-386.
109. *Debrisoquine hydroxylase gene polymorphism and susceptibility to Parkinson's disease* / C. A. D. Smith, A. C. Gough, P. N. Leigh et al. // *Lancet.* — 1992. — Vol. 339. — P. 1365-1372.
110. *Fuhr U.* Drug interactions with grapefruit juice. Extent, probable mechanism and clinical relevance // *Drug. Safety.* — 1998. — Vol. 18. — P. 251-272.
111. *Ameer B., Weintraub R. A.* Drug interactions with grapefruit juice // *Clin. Pharmacokinet.* — 1997. — Vol. 33. — P. 103-121.
112. *Conney A. H.* Pharmacological implications of microsomal enzyme induction // *Pharmacol. Rev.* — 1967. — Vol. 19. — P. 317-366.
113. *Tucker G. T.* Clinical implications of genetic polymorphisms of drug metabolism // *J. Pharmacol.* — 1994. — Vol. 46. — P. 417-424.
114. *Nomenclature for human CYP2D6 alleles* / A. K. Daly, J. Brockmuller, F. Broly et al. // *Pharmacogenetics.* — 1996. — Vol. 6. — P. 193-201.
115. *Molecular basis for rational prescribing in ultra-rapid hydroxylators of debrisoquine* / L. Bertilsson, M. L. Dahl, F. Sjoquist et al. // *Lancet.* — 1993. — Vol. 341. — P. 341-363.
116. *Чернов Ю. Н., Роотс И., Чайкович Е. А.* Метаболизм лекарственных средств: индивидуальные генетически детерминированные особенности // *В мире лекарств.* — 2001. — № 1. — С. 24-31.
117. *Miners J. O., Birkett D. J.* Cytochrome P450C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism // *Br. J. Clin. Pharmacol.* — 1998. — Vol. 45. — P. 525-538.
118. *Genetic analysis of the human cytochrome P450 CYP2C9 locus* / M. J. Stubbins, L. W. Harres, G. Smith et al. // *Pharmacogenetics.* — 1996. — Vol. 6. — P. 429-439.
119. *Кукес В. Г.* Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты. — М.: Реафарм, 2004. — С. 18-27, 40-47.
120. *Influence of CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms on warfarin maintenance dose and metabolic clearance* / M. G. Scordo, V. Pengo, E. Spina et al. // *Clin. Pharmacol. Ther.* — 2002. — Vol. 72. — P. 702-710.
121. *Differential effects of 2C9\*3 and 2C9\*2 variants of cytochrome P-450 CYP2C (on sensitivity to acenocoumarol)* / J. Hermida, J. Zarza, I. Alborea et al. // *Blood.* — 2002. — Vol. 99. — P. 4237-4239.
122. *Genetic association between sensitivity to warfarin and expression of CYP2C9\*3* / D. J. Steward, R. L. Haining, K. R. Henne et al. // *Pharmacogenetics.* — 1997. — Vol. 7. — P. 361-367.
123. *Interindividual variability in ibuprofen pharmacokinetics is related to interaction of cytochrome P450 2C9 amino acid polymorphism* / A. Garcia-Martin, N. Martinez, C. Tabares et al. // *Clin. Pharmacol. Ther.* — 2004. — Vol. 76. — P. 119-127.
124. *Pharmacokinetics and cholesterol-lowering activity of (-)-3S, 5R-fluvastatin and (+)-3R, 5S-fluvastatin in healthy volunteers* / J. Kirchheiner, D. Kudlicz,

C. Meisel et al. // Clin. Pharmacol. Ther. — 2003. — Vol. 74.

125. *17 $\beta$ -Estradiol* hydroxylation catalysed by cytochrome P4501B1 / C. L. Hayes, D. C. Spink, B. L. Spink et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1997. — Vol. 93. — P. 9776-9781.

126. *Sequence* analysis and homology modeling suggest that primary congenital glaucoma on 2p21 results from mutations disrupting either the hinge region or the conserved core structures of cytochrome P4501B1 / I. Stoilov, A. N. Akarsu, I. Alojzic et al. // Am. J. Hum. Genet. — 1998. — Vol. 62. — P. 573-584.

127. *Molecular* mechanism of slow acetylation of drugs and carcinogens in human / M. Blum, A. Demierre, D. M. Grant et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1991. — Vol. 88. — P. 5237-5241.

128. *Human* acetyltransferase polymorphisms / D. M. Grant, N. C. Hushes, S. A. Janezic et al. // Mutat. Res. — 1997. — Vol. 1-2. — P. 61-70.

129. *Prediction* of phenotype for acetylation and for debrisoquine hydroxylation by DNA — test in healthy human volunteers / F. J. Graf, F. Broly, F. Hoffman et al. // Europ. J. Clin. Pharmacol. — 1992. — Vol. 4. — P. 399-403.

130. *Hashiguchi M., Ebihara A.* Acetylation polymorphism caffeine in a Japanese population // Clin. Pharmacol. Ther. — 1992. — Vol. 3. — P. 274-276.

131. *Meta-analysis* of phenotype and NAT2 deficiency in Chinese populations / H. G. Xie, Z. H. Xu, D. S. Ou-Yang et al. // Pharmacogenetics. — 1997. — Vol. 7. — P. 503-514.

132. *Factors* in hydrazine formation from isoniazid paediatric and adult tuberculosis patients / W. L. Gent, H. I. Seifart, D. P. Parkin et al. // Europ. J. Clin. Pharmacol. — 1992. — Vol. 2. — P. 131-136.

133. *Walubo A., Aboo A.* Phenytoin toxicity due to concomitant antituberculosis therapy // Soc. Afr. Med. J. — 1995. — Vol. 11. — P. 1175-1176.

134. *Lemke L. E., McQueen C. A.* Acetylation and its role in the mutagenicity of the antihypertensive agent hydralazine // Drug. Metab. Dispos. — 1995. — Vol. 5. — P. 559-565.

135. *Martelli A., Allavena A., Campart G. D.* In vitro and in vivo testing of hydralazine genotoxicity // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 1995. — Vol. 1. — P. 113-120.

136. *Inhibition* of N-acetylation of procainamide and renal clearance of N-acetylprocainamide by p-aminobenzoic acid in humans / J. E. Tisdale, M. I. Rudis, I. D. Padhi et al. // J. Clin. Pharmacol. — 1995. — Vol. 9. — P. 902-910.

137. *Vessell E. S., Page J. G., Passanti G. T.* Genetic and environmental factors affecting ethanol metabolism in man // Clin. Pharmacol. Ther. — 1971. — Vol. 12. — P. 192-201.

138. *Human* alcohol dehydrogenase: structural differences between the  $\beta$  and  $\gamma$  subunits suggest parallel duplication in isozyme evolutions and predominant expression of separate gene descendants in livers of different mammals / R. Bühler, J. Hempel, J. P. von Warburg, H. Jörnvall // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1984. — Vol. 81. — P. 6320-6324.

139. *Goedde H. W., Argawal D. P.* Pharmacogenetics of aldehyde dehydrogenase (ALDH) // Pharmacol. Ther. — 1990. — Vol. 45. — P. 345-371.

140. *Woodson L. C., Weinshilboum R. M.* Human kidney thiopurine methyltransferase: purification and biochemical properties // Biochem. Pharmacol. — 1983. — Vol. 32. — P. 819-826.

141. *Lennard L.* The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine // Eur. J. Clin. Pharmacol. — 1992. — Vol. 43. — P. 329-339.

142. *Strassburg C. P., Manns M. P., Tukey R. H.* Uridine diphosphate 5'-glucuronosyltransferases (UGT): genetic organization and function // Immunology and liver / Ed.: Manns M. P., Paumgartner G., Leuschner U. — Kluwer Acad. publ., 1999. — P. 180-191.

143. *Strassburg C. P., Manns M. P., Tukey R. H.* Differential down-regulation of the

- UDP-glucuronosyltransferase 1A locus is an early event in human liver and biliary cancer // *Cancer Res.* — 1997. — Vol. 57. — P. 2979-2985.
144. *Strassburg C. P., Manns M. P., Tukey R. H.* Expression of the UDP-glucuronosyltransferase 1A locus in human colon. Identification and characterization of the novel extrahepatic UGT1A8 // *J. Biol. Chem.* — 1998. — Vol. 273. — P. 8719-8726.
145. *Mojarrabi B., Mackenzie P. I.* The human UDP glucuronosyltransferase, UGT1A10, glucuronidates mycophenolic acid // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1997. — Vol. 238. — P. 775-778.
146. *A novel complex locus UGT1 encodes human bilirubin, phenol, and other UDP-glucuronosyltransferase isozymes with identical carboxyl termini / J. K. Ritter, F. Chen, Y. Y. Sheen et al. // J. Biol. Chem.* — 1992. — Vol. 267. — P. 32573-32579.
147. *Characterization of a cloned human dihydrotestosterone/androstenediol UDP-glucuronosyltransferase and its comparison to other steroid isoforms / F. Chen, J. K. Ritter, M. G. Wang et al. // Biochemistry.* — 1993. — Vol. 32. — P. 10648-10657.
148. *Genetic variation in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome / G. Monaghan, M. Ryan, R. Sddon et al. // Lancet.* — 1996. — Vol. 347. — P. 578-581.
149. *The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome / P. J. Bosma, J. R. Chowdhury, C. Bakker et al. // N. Engl. J. Med.* — 1995. — Vol. 333. — P. 1171-1175.
150. *McDonnell W. M., Hitomi E., Askari F. K.* Identification of bilirubin UDP-Gts in the human alimentary tract in accordance with the gut as a putative metabolic organ // *Biochem. Pharmacol.* — 1996. — Vol. 51. — P. 483-488.
151. *Recognition of uridine diphosphate glucuronosyltransferases by LKM-3 antibodies in chronic hepatitis D / T. Philipp, M. Durazzo, C. Trautwein et al. // Lancet.* — 1994. — Vol. 344. — P. 578-581.
152. *Kalow W., Bertilsson L.* Intryethnic factors affecting drug response // *Adv. Drug Res.* — 1994. — Vol. 25. — P. 1-53.
153. *Frequency distribution of ultra-rapid metaboliser of debrisoquine in black African population carrying duplicated and multi-duplicated CYP2D6 alleles / E. Aklilla, I. Person, L. Bertilsson et al. // J. Pharmacol. Exp. Ther.* — 1996. — Vol. 278. — P. 441-446.
154. *Lilienblum W., Bock-Hennig B. S., Bock K. W.* Protection against toxic redox cycles between benzo(α)pyrene-3,6-quinol by 3-methylcholanthrene-inducible formation of the quinol mono- and diglucuronide // *Mol. Pharmacol.* — 1985. — Vol. 27. — P. 451-456.
155. *Bock K. W.* UDP-glucuronosyltransferase and their role in metabolism and disposition of carcinogens // *Ad. Pharmacol.* — 1994. — Vol. 27. — P. 367-383.
156. *Основные принципы метаболизма лекарств и безопасное применение парацетамола / В. Т. Ивашкин, В. П. Фисенко, М. В. Маевская, М. Л. Макарьянц // Провизор.* — 2002. — № 6. — С. 1-11.
157. *Прогностические фармакогенетические аспекты индивидуальной лекарственной переносимости — нерешенные проблемы и перспективы / О. А. Яковлева, А. И. Косован, В. В. Царук, О. В. Дякова // Укр. хіміотерапевт. журнал.* — 2000. — № 1. — С. 63-70.
158. *Бажора Ю. И.* Клинические проблемы фармакогенетики // *Вісник психіатрії та психофармакотерапії.* — 2003. — № 1. — С. 82-87.
159. *Amidopyrine metabolism in man: the acetylation of aminoantipyrene cosegregates with acetylation of caffeine / J. A. Aghndez, J. A. Carrilloo, C. Marthnez, J. Benhtez // Ther. Drug. Monit.* — 1995. — Vol. 1. — P. 1-5.
160. *Whysner J., Verna L., Williams G. M.* Benzidine mechanistic data and risk assessment: species- and organspecific metabolic activation // *Pharmacol. Ther.* — 1996. — Vol. 1-2. — P. 107-126.
161. *Comparative developmental toxicity and metabolism of nitrazepam in rats and mice / S. Takeno, Y. Hirano, A. Kitamira,*

T. Sakai // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* — 1993. — Vol. 2. — P. 233-238.

162. Бажора Ю. И. Значение расшифровки генома человека для медицины // Юбилейный сборник трудов, посвященный столетию Одесской городской больницы № 11. — Одесса, 2002. — С. 43-45.

163. Головенко М. Я. Високопродуктивні технології дослідження та створення лікарських засобів. Фармакогеноміка і інформатика // Вісник фармакології та фармацевції. — 2002. — № 1. — С. 2-8.

164. Farr S. Concise review: gene expression applied to toxicology // *Toxicol. Sci.* — 1999. — Vol. 50. — P. 1-9.

165. Green C. D. Open system: panoramic views of expression // *J. Immunol. Meth.* — 2001. — Vol. 2. — P. 73-79.

166. Ginsburg G. S., McCarthy J. J. Personalized medicine: Revolution drug discovery and patient care // *Trends. Biotechnol.* — 2001. — Vol. 19. — P. 491-496.

167. Jain K. K. Personalized medicine // *Currens Drugs.* — 2002. — Vol. 4. — P. 548-558.

168. Augen J. The evolving role of information technology in the drug discovery process // *Drug. Discov. Today.* — 2002. — Vol. 7. — P. 315-323.

---

Modern information on genetic toxicology, starting from definition of the subject for this science and its objectives up to its contribution to protection of hereditary substrate from damaging action of xenobiotics, which are able to render genotoxic action in a cell, is given in the article. Stages of genotoxic effect in a cell are discussed, from penetration and binding of a toxin to a genome, induction of genotoxic damages, up to elimination of genotoxically damaged cells from population. Special attention is paid to free-radical mechanisms of genotoxic action, approaches and methods for pharmacological defence of nuclear genome with medicinal agents — antioxidants.

---

### 4.1. Предмет генетической токсикологии и ее задачи

Украина, выполнявшая в бывшем Советском Союзе роль одного из военно-промышленных придатков, где на относительно небольшой территории было сосредоточено огромное количество предприятий разного профиля и военных складов с боеприпасами, а также запасов удобрений и ядохимикатов, после его развала оказалась в сложном положении. С одной стороны, она не имела достаточных средств для перевода данной ситуации в безопасное с токсикологической точки зрения русло, а также на приведение производственных условий в соответствие с международными нормами, требованиями и стандартами. С другой стороны, Украина вынуждена была срочно решать проблемы, возникающие в связи с загрязнением окружающей среды и неординарными ситуациями, представляющими опасность токсикологического заражения.

С апреля 1986 г. положение чрезвычайно осложнилось из-за аварии на Чернобыльской АЭС. В этих условиях, кроме повреждающего действия на организм радиации, многократно возрос «токсический фон» вредных веществ: йода, тяжелых металлов, других ядовитых соединений, присутствующи-

щих в радиоактивных выбросах четвертого энергоблока. В особенности это касается повреждающего действия стронция и цезия, представляющих особую опасность из-за их отсроченной генотоксичности. По сути, население, пребывающее в радиационно неблагоприятных регионах, подвергается хроническому воздействию радионуклидов-токсикантов. С тех пор прошло более двадцати лет, но целый ряд насущных токсикологических проблем так и не нашел своевременного медицинского решения.

В этой связи, с учетом современных реалий, развитие токсикологической науки, и прежде всего ее генетической ветви, достижения в плане разработки мощных и эффективных методов и средств токсикологической профилактики и защиты особенно актуальны. Состоявшийся в Киеве II Съезд токсикологов Украины подвел итоги ряда актуальных исследований и наметил перспективы развития этой науки. Во многом исследования в этой области были осуществлены благодаря идеям видных представителей украинской токсикологической школы [1–5].

Токсикология — наука о ядах и противоядиях — одна из важнейших отраслей современной медицинской науки [6]. Повышающаяся в современных условиях нагрузка на организм чужеродных для него, патогенных факторов, прежде всего, хими-

ческой природы — ксенобиотиков — вынуждает человечество вкладывать огромные средства в изучение механизмов их повреждающего действия на организм и разработку средств фармакологической защиты от них, то есть противоядий (антидотов) [7–9].

Классификация отраслей токсикологии основывается на нескольких принципах: тканевом (токсикология печени — гепатотоксикология, почек — нефротоксикология, нервной системы — нейротоксикология и т. д.), классификации ядов (токсикология пестицидов, тяжелых металлов, органических растворителей, пластических масс, микроорганизмов и т. д.), отраслевой деятельности человека (промышленная, сельскохозяйственная, военная токсикология и т. д.). Что касается принципа, основанного на мишени непосредственного действия ядов на внутриклеточные биосубстраты, то в данном случае определена только такая ветвь токсикологии, как генетическая токсикология (с большими оговорками можно выделить токсикологию мембран, не существует токсикологии митохондрий, лизосом, вакуолей и т. д. — не потому, что такие отрасли токсикологии не могут существовать в принципе, но исключительно в силу недостатка данных в этих отраслях знаний) [9–12].

Согласно классическому определению, генетическая токсикология — это один из разделов биохимической и молекулярной токсикологии, объектом изучения которой стали события, разворачивающиеся в клетке на биохимическом и молекулярном уровнях после прямого или опосредованного действия на нее яда (токсиканта, токсина, в данном случае — генотоксина, генотоксиканта). К этим событиям относятся ферментативные реакции, в результате которых происходит метаболизм чужеродных веществ — ксенобиотиков, генерация реактивных интермедиатов, взаимодействие ксенобиотиков и их метаболитов с макромолекулами, механизмы генной экспрессии в условиях их метаболизма, а также состояние сигнальных систем клетки при действии токсикантов [10; 13].

Вопросы генетической токсикологии регулярно обсуждаются на международных съездах токсикологов [3; 11; 12].

На одном из последних международных конгрессов, посвященных развитию генетической токсикологии, состоявшемся в 2003 г., было дано такое определение этой науки: «Генетическая токсикология представляет собой науку, занимающуюся исследованием генетических повреждений, которым может подвергнуться клетка, агентов, вызывающих подобные повреждения, механизмов ответа на эти повреждения, способных вырабатываться клеткой и организмом, а также потенциальных последствий подобных повреждений» [13].

Как часть биохимической и молекулярной токсикологии генетическая токсикология изучает, прежде всего, механизмы повреждающего действия токсикантов на генетический аппарат клетки, то есть на ее ядерную дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) (в клетках эукариотов — хроматин), а также патологические последствия подобного действия (к которым относятся генная патология и, прежде всего, канцерогенез) [10–15]. Согласно другому определению, генетическая токсикология, будучи одним из ответвлений токсикологии, включает идентификацию и анализ агентов, обладающих токсическим действием на компоненты наследственного аппарата клеток живых организмов [15]. Известно, что большинство заболеваний человека обусловлено генетической дисфункцией. Многие токсические агенты способны вызывать повреждения генетического материала клетки в широком диапазоне концентраций, индуцируя острые, неспецифические цитотоксические эффекты на целый ряд клеточных процессов. Однако основная цель генетической токсикологии — обнаружение и оценка генетической опасности агентов, обладающих высоким сродством к ядерной ДНК и способных вызывать генетические повреждения в субтоксических концентрациях. Именно такие агенты классифицируются как генотоксические [10–15].

## 4.2. Краткие сведения о структуре и основных функциях хроматина — субстрата действия генотоксикантов

Как известно, основной субстрат наследственности в клетках эукариот — это хромосомы. В их состав входят ядерная ДНК, белки (гистоновые, негистоновые, ферменты и др.), небольшое количество липидов, металлов и других ингредиентов. Биохимическими методами генетический субстрат клетки выделяется в виде хроматина (видимые под микроскопом окрашенные тельца). Основные сведения о структурной организации ДНК клеток эукариот были получены после появления классических работ Дж. Уотсона и Ф. Крика, опубликованных в 1953 г. [16].

Однако ДНК в виде изолированной структуры в клетке не существует. В составе ядер эукариотических клеток она формирует основу реальных структурных носителей генетической информации — хромосом, которые при использовании классических морфологических и биохимических методов видны и выделяются в виде хроматина («окрашенных телец») [17–28]. В составе хроматина ДНК находится в связи, прежде всего, с белками, которые могут оказывать влияние на возможность ее перехода из неактивного в активное состояние и наоборот (В- и Z-формы). Например ДНК, связанная с гистонами (один из основных компонентов хроматина), не переходит из одной формы в другую в тех условиях, в которых это наблюдается для свободной ДНК [25; 26]. Таким образом, одно из условий, необходимое для образования Z-формы ДНК *in vivo*, — присутствие особых белков, стабилизирующих ее структуру.

Необходимо отметить, что, кроме ДНК, к главным компонентам хроматина относятся белки. Основные их классы — это гистоновые и негистоновые белки хроматина [22; 25; 26].

Гистоны — это ядерные белки с четко выраженными основными свойствами. Они встречаются во всех видах тканей, кроме сперматозоидов некоторых видов животных, и составляют значительную часть ядерного материала. В молекулах гистонов нет триптофана и содержится значительное количество основных аминокислот (аргинина и лизина) [21–26]. Для гистонов характерна изоэлектрическая точка, расположенная в щелочном рН (10,5–11,0), и относительно невысокая молекулярная масса (18–20 кДа). В составе хроматина гистоны находятся в прочном электростатическом комплексе с ДНК. Образование подобных комплексов возможно вследствие отрицательного электрического заряда, образуемого на молекулах ДНК, и положительно заряженных молекулах гистонов (в результате содержания в них большого числа положительно заряженных аминокислот) [27–29].

Входящие в состав хроматина негистоновые белки, в отличие от гистонов, очень богаты и разнообразны по количественному и качественному составу [22–29]. Их общее число в ядре эукариот, по данным электрофоретического разделения, превышает несколько сотен. Они могут входить, кроме хроматина, также в состав других субъядерных структур, в частности, ядерной оболочки и матрикса. Негистоновые белки весьма разнородны. Их молекулярная масса колеблется от 5 до 800 кДа, изоэлектрическая точка равна 7,0–10,0. По сравнению с гистонами, они обладают высокой метаболической активностью. В целом, эти белки активируют транскрипцию, хотя среди них имеются представители, ингибирующие этот процесс [19; 28].

Среди негистоновых белков наиболее изучены белки с высокой электрофоретической подвижностью (НМГ-белки). По молекулярной массе и некоторым другим свойствам эти белки близки к гистонам, но отличаются от них более кислыми свойствами [22]. Подобно гистону Н1, они содержат большое количество лизина, но, кроме того, богаты дикарбоновыми аминокислотами — глутаминовой и аспарагино-

вой. Негистоновые белки составляют кислую группу белков; отношение кислых аминокислот к основным в их молекуле составляет 1,2–1,9. В отличие от гистонов, эти белки содержат триптофан. Кроме того, если синтез гистонов тесно сцеплен с синтезом ДНК, то негистоновые белки синтезируются на всем протяжении клеточного цикла [29]. Негистоновые белки интенсивнее гистонов подвергаются постсинтетическим модификациям. Наиболее изучены постсинтетические модификации этих белков — фосфорилирование и метилирование [22; 25]. Кроме НМГ-белков, в состав негистоновых белков входят многочисленные ферменты хроматина, осуществляющие важнейшие реакции матричного синтеза (репликацию, репарацию, транскрипцию) и отдельные регуляторные функции (например АТФ-азы) [22]. Установлено, что фосфорилирование некоторых представителей негистоновых белков, в частности, упомянутых выше ДНК-полимераз, тесно связано с их функциональной активностью. Фосфорилирование других групп этих белков необходимо для регуляции транскрипции ДНК [26; 27]. Этой же цели служат процессы метилирования и ацетилирования негистоновых белков. Поли-АДФ-рибозилирование этой группы белков рассматривается как необходимый этап в процессах репарации ядерной ДНК [22; 25; 26]. Кроме того, эта постсинтетическая модификация рассматривается также в качестве фактора, регулирующего репликацию и транскрипцию.

Наряду с основными компонентами хроматина — ДНК и белками, в его состав входит небольшое количество РНК, а также ряд минорных компонентов — ионы металлов и липиды [30]. Роль ионов кальция, циклических нуклеотидов и липидов в структурно-функциональной организации хроматина будет рассмотрена в части, посвященной регуляции генетической активности. Здесь же кратко изложены сведения о роли ионов металлов в формировании структуры хроматина. Хроматин содержит ряд одно- ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) и двухвалентных ионов металлов ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ). К тому же, в

хроматине обнаружены ионы металлов переменной валентности (меди, железа, цинка, свинца, кобальта). Более подробно роль этих металлов будет освещена в разделе, рассказывающем о свободнорадикальном повреждении хроматина.

В ядре содержатся разнообразные катионы и анионы. Большинство их находится в связанном состоянии, и только незначительное количество растворено в нуклеоплазме [26]. Концентрация ионов натрия в ядрах печени крыс на порядок выше, чем в цитоплазме, и близка к таковой в сыворотке крови [25]. В ядрах обнаружено также высокое содержание ионов калия [28]. Несмотря на отсутствие  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азной активности в ядрах, одновалентные катионы этих металлов, вероятно, влияют на регуляцию генетической активности в хроматине [27]. Определенная роль в организации и стабилизации его структуры отводится также ионам кальция и меди [22; 31]. Этот аспект действия данных ионов связан с их структурообразующей функцией в хроматине, и его нельзя смешивать с их регулирующим влиянием на генетическую активность, а также на процессы ПОЛ и повреждения хроматина.

Важная роль в структурообразовании и функционировании хроматина, в особенности в связи с рассматриваемой проблемой генотоксичности, отводится ионам двух- и трехвалентного железа. Еще в ранних работах Б. И. Гольдштейна и соавторов была установлена определенная роль ионов железа в регуляции процессов функционирования генома, в частности, репликации ДНК [32–34]. Эта гипотеза основывалась на обнаружении относительно высоких концентраций железа в молекулах ДНК [22; 25].

Известно, что ионы магния необходимы для функционирования ферментов репликации и репарации ДНК, локализованных в хроматине [26]. Ионы кальция и магния служат необходимыми кофакторами нуклеаз, ассоциированных с хроматином [28]. Опыты по инкубации изолированных ядерных компонентов с нуклеазами показали, что магний связан главным

образом с ДНК, тогда как кальций образует комплексы преимущественно с белками.

Столь значительная структурно-функциональная роль ионов металлов в хроматине представляет исключительный интерес с точки зрения места тяжелых металлов в токсикологии вообще [6] и генотоксичности — в частности [11].

Таким образом, представленные данные доказывают, что ядерный хроматин по своему составу — чрезвычайно сложное гетерогенное образование. Наряду с основными компонентами, формирующими его структуру — белками и ДНК, он содержит также ряд минорных компонентов, принимающих участие в процессах стабилизации-дестабилизации этой структуры, а также оказывающих непосредственное влияние на его функциональную активность. Локализация компонентов в хроматине подчиняется строгим закономерностям, которые вытекают из их физико-химических характеристик. На основании этих характеристик формируется взаимодействие составных частей хроматина, в результате чего образуются структурные уровни организации последнего. Существует несколько таких уровней: нуклеосомный, наднуклеосомный и др., включающие несколько подтипов [25–38]. Схематически эти уровни организации ядерного хроматина показаны на рис. 4.1–4.3.

Детальная характеристика этих уровней организации выходит за рамки этого обзора. Отметим только, что данный вопрос влияет на решение проблемы генотоксичности. Во-первых, более высокая структура хроматина предполагает более высокий уровень спирализации ДНК и образование структурных комплексов, доменов и т. д. Это имеет непосредственное отношение к доступности генотоксикантов к основному объекту их генотоксического действия — уникальным последовательностям ДНК. Во-вторых, уровень структурной организации хроматина оказывает непосредственное влияние на доступность генепротекторов — ферментов репарации ядерной ДНК и физиологически активных соединений, обладающих подобной актив-

ностью, к поврежденным участкам, что непосредственно сказывается на успешности реализации гено- и геномпротекторного действия [37].

В связи с этим необходимо хотя бы кратко остановиться на структурно-функциональной организации репрессированного (РХ) и транскрипционно активного хроматина (ТАХ) [27; 30].

Структурная и функциональная организация ядерного хроматина (и, соответственно, хромосом) неоднородна на всем протяжении нитей ДНК. Основная часть хроматина функционально неактивна, прежде всего, в отношении транскрипции [26; 36]. Этот хроматин имеет конденсированную структуру и называется репрессированным. Небольшая часть хроматина

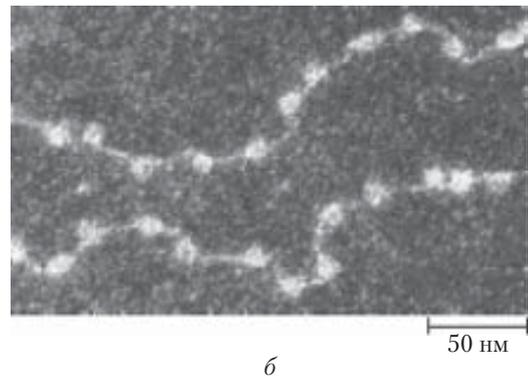
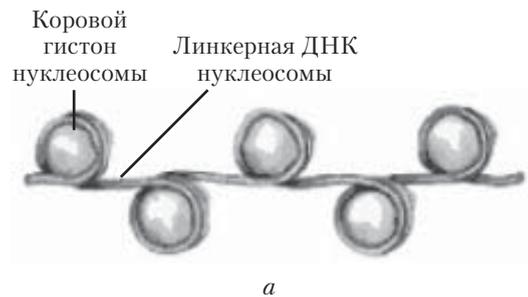


Рис. 4.1. Нуклеосомы. Регулярно расположенные нуклеосомы состоят из гистоновых комплексов, связанных с ДНК:

а — схематическое представление; б — электронная микрофотография [36]

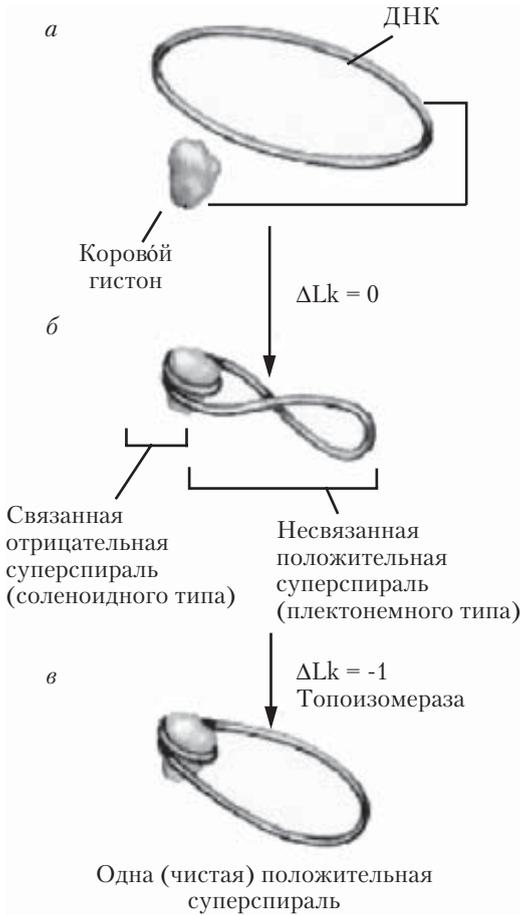


Рис. 4.2. Сборка хроматина:

*a* – релаксированная, закрытокольцевая ДНК; *б* – связывание коровых гистонов (гистоновой сердцевины) с нуклеосомой индуцирует образование одной негативной суперспирали. При отсутствии разрывов в цепи положительная суперспираль должна быть сформирована в любом другом сайте ДНК; *в* – релаксация этой положительной спирали ферментом топоизомеразой оставляет одну чистую суперспираль [36]

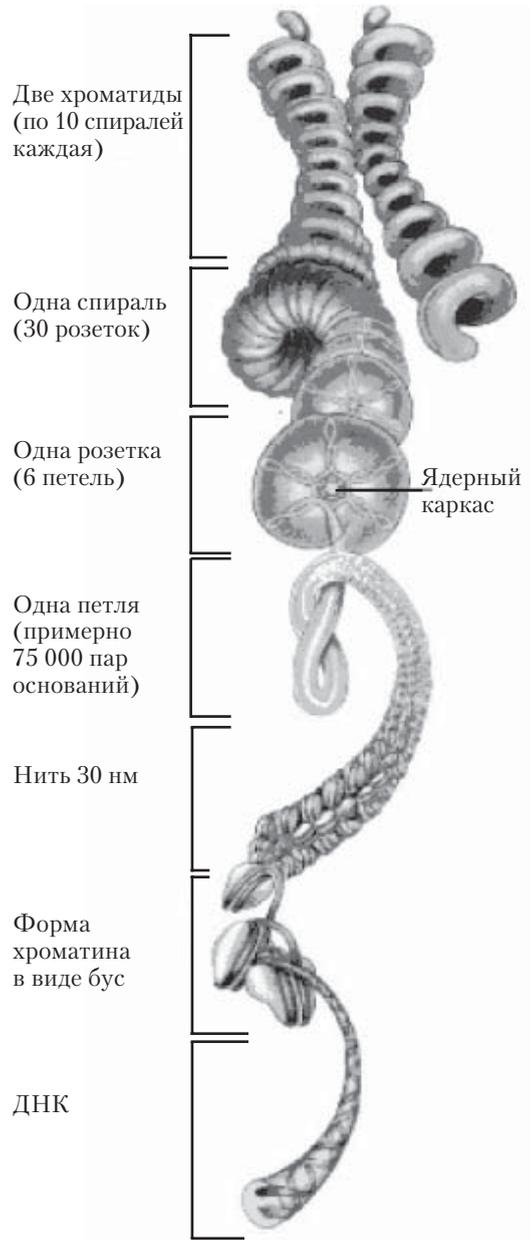


Рис. 4.3. Компактная структура ДНК в хромосоме эукариотов. Схематическое представление уровней организации в хроматине, которое обеспечивает компактизацию ДНК в хромосоме эукариот. Эти уровни заключаются в формировании суперспиралей (наложением спирали на спираль) [36]

(5–10 %) содержит активно транскрибируемые гены и называется транскрипционно активным. Упрощенная схема строения репрессированных и активных участков хроматина и хромосомы приведена на рис. 4.4.

При активации хроматина наблюдается его деконденсация, и он становится более рыхлым (релаксированным). Разрыхление хроматина происходит на всех уровнях его структурной организации — от су-

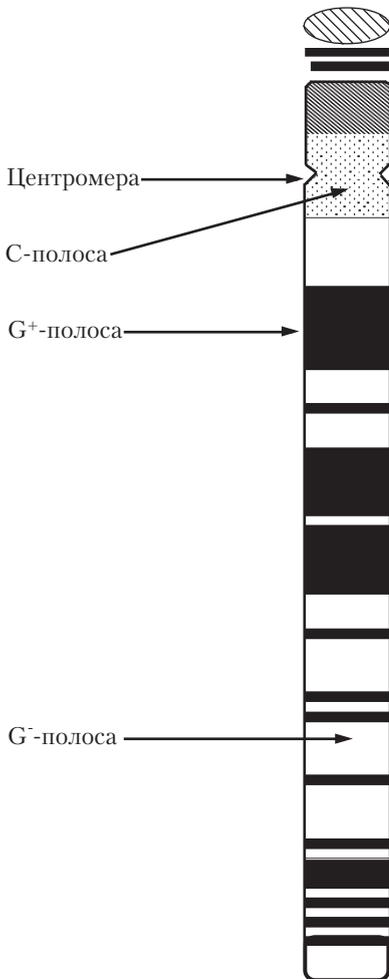


Рис. 4.4. Схематическое строение типичной хромосомы с указанием активных (неокрашенных) и неактивных (окрашенных) участков [26]

перспирализованных петель до нуклеосом — при участии определенных факторов белковой природы [39]. Схематически эти процессы показаны на рис. 4.5.

Что касается ТАХ, то вопрос о том, сохраняется ли в нем нуклеосомный уровень организации, не совсем ясен. Первоначально полагали, что ТАХ лишен нуклеосомной структуры и транскрипция происходит на чистой ДНК. Однако исследования последних лет подтверждают мнение о существовании сходства в первичной организации конформации нуклеосом на транскрибируемых и неактивных участках генома [30]. Тем не менее, нуклеосомы ТАХ отличаются несколько большей длиной ДНК и некоторыми особенностями электрофоретической подвижности. Поэтому предполагается, что особенности структуры ТАХ (в частности, его повышенная чувствительность к нуклеазам) в основном определяются измененной наднуклеосомной структурой, а не изменениями в структуре нуклеосом [35]. Исследования структуры ТАХ дают сложную и противоречивую картину его организации. Наиболее простым объяснением ее отличия от таковой РХ является представление о более низкой компактности ТАХ по сравнению с РХ, связанной, очевидно, с более низким содержанием гистона H1 и других гистонов. Не исключено, что гистоны при этом удаляются РНК-полимеразой [39]. Выделенные из транскрипционно активных генов нуклеосомы имеют повышенное сродство к негистоновым белкам HMG 14/17 и РНК-полимеразам. Возможно, они имеют повышенную чувствительность к ДНК-азе I и обогащены специфической (убихинилированной) формой гистона H2A [39]. Существенное различие между РХ и ТАХ — большая длина линкерной ДНК в структуре последнего [39–41]. Совокупность имеющихся в настоящее время данных свидетельствует о том, что основной фактор, определяющий повышенную чувствительность ТАХ к нуклеазам, — изменение наднуклеосомной структуры хроматина, связанное, в частности, удалением гистона H1.

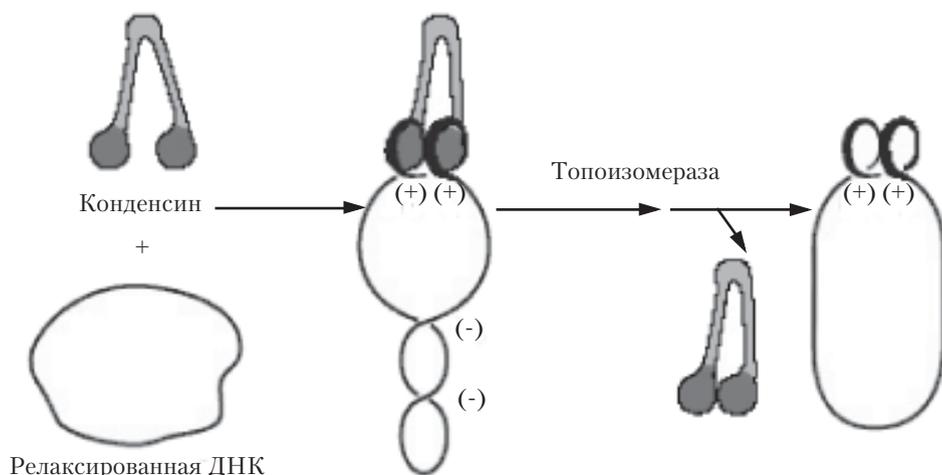


Рис. 4.5. Схематическое представление влияния конденсина на суперспирализацию ДНК. Связывание конденсина с закрыто-кольцевой ДНК в присутствии фермента топоизомеразы I приводит к образованию положительных суперспиралей (+). «Завертывание» ДНК вокруг конденсина вводит в структуру положительные суперспирали. Возникающие в других участках компенсирующие отрицательные суперспирали (-) затем релаксируются топоизомеразой I. В хромосоме «завертывание» ДНК вокруг конденсина может приводить к конденсации (репрессии хроматина) [36]

В связи с этим отдельного рассмотрения заслуживает вопрос о молекулярных механизмах конденсации-деконденсации хроматина, лежащих в основе структурно-функциональных различий между РХ и ТАХ, что вызывает повышенную чувствительность последнего к нуклеазам и повреждающим факторам — генотоксикантам, а также релаксацию его структуры из-за менее упорядоченного уровня нуклеосомной и изменения структурной организации высших уровней упаковки хроматина. Значительная роль в этих механизмах отводится гистону H1. Во-первых, ТАХ содержит существенно меньшее количество этого гистона по сравнению с РХ [39–41]. Далее, изменение его структуры имеет первостепенное значение для процессов компактизации-декомпактизации хроматина, которые, в свою очередь, оказывают влияние на его функциональную активность и изменяются при действии генотоксикантов. Было установлено, что фосфорилирование гистона H1 локализованной в хроматине протеинкиназой G приводит к

конденсации хроматина [39]. Доказано также, что гиперацетилирование гистонов приводит к снижению способности гистона H1 конденсировать хроматин [41]. Еще одним механизмом изменения степени компактности хроматина служит метилирование ДНК. Выявлено, что в ДНК клеток животных от 2 до 7 % цитозиновых остатков метилировано [22]. Экспрессия генов сопровождается деметилированием ДНК, что приводит к декомпактизации хроматина [22–24]. Однако конкретные механизмы этих процессов остаются неизвестными. По-видимому, решающее условие декомпактизации хроматина и увеличения его матричной активности — изначальная специфичность структуры активно транскрибируемых генов, что приводит к возможности взаимодействия последовательностей ДНК с конкретными белками, участвующими в процессах деспирализации ДНК, прежде всего, ДНК-топоизомеразы [38–40]. Еще одним фактором, определяющим механизмы компактизации в хроматине, является изменение внутри-

клеточного рН (в физиологических границах). Установлено, что агрегация хроматина понижается от 86 до 63 % при изменении рН от 5,9 до 6,8 [28]. Диссоциация гистона Н1 из хроматина также в незначительной степени зависит от физиологических колебаний рН.

Заканчивая рассмотрение основных структурных характеристик ядерного хроматина, необходимо отметить их неразрывную связь с регуляторией генетических функций. Кроме того, столь подробный анализ данного вопроса необходим в связи с важным значением данных биохимических процессов для понимания механизмов генотоксического действия ксенобиотиков и принципов фармакологической генопротекции.

Упорядоченность структуры, прежде всего нуклеосомной, а также высших уровней организации хроматина, становится возможной в результате реализации химических особенностей основных и минорных компонентов, составляющих хроматин. Подобная упорядоченность способствует репрессии генетической активности. Неупорядоченность же структуры, выражающаяся в релаксации транскрипционно активных последовательностей, ведет к реализации процессов считывания генетической информации. Необходимо также отметить тот факт, что сборка компонентов в макромолекулярную структуру хроматина завершается приобретением ими специфических структурно-функциональных характеристик, во многом отличных от таковых составных частей хроматина в свободном состоянии. Кроме того, наличие столь сложной организации ядерного генома делает его менее уязвимым для генотоксического действия токсикантов и предоставляет возможность существования системы репарации токсических повреждений ДНК и хроматина.

Итак, структурные переходы (от одних типов структур к другим и наоборот) в хроматине обеспечивают реализацию его молекулярно-генетических функций. К основным функциям хроматина, как уже было упомянуто, относятся: репликация,

репарация и транскрипция ДНК. В результате функционирования генома осуществляется передача генетической информации в ряду поколений (репликация ДНК), починка (репарация) ее структурных повреждений, происходящих в результате воздействия на нее экзо- и эндогенных факторов, а также перевод информации, записанной в последовательности азотистых оснований ДНК, в последовательности оснований матричной РНК (транскрипция) с последующим переводом ее на рибосомах в аминокислотную последовательность белков, в том числе ферментов (трансляция), ибо от их набора зависит специфичность и мобильность внутриклеточного метаболизма, обуславливающего саму возможность и реализацию генетической протекции (защиты).

### **4.3. Классификация генотоксикантов, основные типы генотоксических повреждений и методы их идентификации**

Согласно современным представлениям [10–15], ДНК-повреждающие агенты можно разделить на четыре основных класса:

1) канцерогены прямого действия (высокореакционные соединения, обладающие эндогенным сродством к ДНК, для взаимодействия которых с ДНК не требуется их метаболическая активация клеточными ферментами). К подобным соединениям относятся N-метил-N-нитрозомочевина и N-метил-N1-нитро-N-нитрозогуанин, алкилалкансульфонаты, такие как метансульфонат, лактоны, бета-пропиолактон, а также азотистый и сернистый иприты;

2) канцерогены непрямого действия, для преобразования которых в канцерогены прямого действия, ковалентно связывающиеся с ДНК, необходима активация

клеточными ферментами (диметилнитрозамин, бенз(а)пирен, 7,12-диметилбенз(а)антрацен, афлатоксин В1 и 2-ацетиламинофтор). К ним также относятся генотоксиканты — канцерогены непрямого действия: четыреххлористый углерод (тетрахлорметан) и 1,2-дихлорэтан;

3) агенты, вызывающие радиационные или окислительные повреждения ДНК, которые могут действовать на нее прямо или опосредованно (ионизирующая радиация, вызывающая повреждение ДНК непосредственно через образование разрывов нитей или опосредованно, через ионизацию воды с образованием активных форм кислорода, повреждающих основания ДНК). Ультрафиолетовое излучение солнечного света ответственно за возникновение у человека примерно 1 млн новых случаев в год базального и сквамозного (чешуйчатого) рака кожи (плоскоклеточная карцинома). Реактивные виды кислорода могут быть также образованы различными химическими соединениями и клеточными процессами, включая дыхание и ПОЛ;

4) неорганические соединения, прежде всего тяжелые металлы (хром, никель, кобальт), а также мышьяк рассматриваются в качестве ДНК-повреждающих агентов, хотя во многих случаях точный механизм их генотоксического действия неизвестен [42–44].

Выделяют также эпигенетические агенты, оказывающие влияние на канцерогенез, хотя они не нарушают первичную структуру ДНК, а скорее рассматриваются как соединения, изменяющие экспрессию или репрессию некоторых генов и/или пертурбации в формировании сигналов трансдукции, влияющие на клеточные события, связанные с регуляцией пролиферации (репликация ДНК), дифференцировки (транскрипция) и апоптоза. Многие эпигенетические агенты способствуют пролиферации клеток с измененным генотипом (клетки, содержащие мутантный онкоген или онкогены и/или гены — супрессоры опухоли) и позволяют клональную экспансию этих измененных или «иницированных» клеток.

Эпигенетические агенты можно разделить на четыре основных класса: 1. Гормоны, такие как конъюгированные эстрогены и диэтилстильбэстрол. 2. Иммуносупрессивные ксенобиотики, например, азатиоприн и циклоспорин А. 3. Твердые соединения, включающие пластмассовые имплантаты и асбесты. 4. Опухолевые промоторы, изученные на грызунах, включающие 12-О-тетрадекоаилфорбол-13-ацетат, пролифераторы пероксисом, TCDD и фенобарбитал [45–50].

У человека такие факторы, как диета (в том числе ее калорийность, содержание жира и потребление белка), избыточное потребление алкоголя, а также беременность в зрелом возрасте рассматриваются в качестве функциональных агентов, действующих по механизму промоции (активации опухолеобразования). Подобное влияние на онкогенез оказывают курение и ультрафиолетовый свет — факторы, классифицированные также как промоторы опухолей. По определению, промоторы (активаторы) опухолей не рассматривают в качестве канцерогенов, так как они в отсутствие иницирующих клеток неактивны. Однако измененный генотип или иницирующая клетка могут появляться в результате спонтанных мутаций, возникающих при дефектной (неполной) репликации/репарации ДНК при наличии ее окислительных повреждений или действия канцерогенов окружающей среды [51–57]. Теоретически, в присутствии промотора опухоли эти мутантные клетки могут развиваться клонально с формированием опухоли. Следовательно, данная номенклатура становится предметом обсуждения — относить ли в данном случае промотор опухоли к категории канцерогенов. Некоторые гормоны и иммуносупрессоры классифицируются в качестве канцерогенов, хотя обычно рассматриваются как агенты, не обладающие канцерогенными свойствами в отсутствие иницирующих клеток. Более вероятно, что, подобно промоторам опухолей, они только не препятствуют клональной экспансии или появлению клеток с измененным генотипом.

Установлено, что не генотоксические/эпигенетические агенты индуцируют повреждение ДНК *in vivo*, например, некоторые из них могут в этих условиях индуцировать оксидативное повреждение ДНК посредством прямого или непрямого образования активных форм кислорода. Подобной же активностью могут обладать некоторые эстрогены, и эта активность лежит в основе их канцерогенного действия. Таким образом, при ближайшем рассмотрении этого вопроса мы сталкиваемся с проблемами классификации данных агентов, а именно с перекрыванием различных классов химических канцерогенов.

Генотоксические агенты могут образовывать три основных типа повреждений ДНК [13–15]: 1) генные изменения, включающие точечные мутации (замены одной пары оснований в ДНК, в результате которых происходят аминокислотные замены в транслированных белках), а также мутации со сдвигом рамки (потеря или вставка одной или двух пар оснований), приводящие к значительным изменениям в молекуле транслированного белка; 2) хромосомные aberrации, включая протяженные перестройки хромосом, такие как делеции (выпадения), дупликации (удвоения), инверсии (перестановки), а также транслокации (перенос сегментов хромосом, ведущий к нарушениям их структуры); 3) анеуплоидия и полиплоидия, включающие добавление или потерю одной или больше хромосом. Некоторые примеры типов генотоксических повреждений ДНК приведены на рис. 4.6 и 4.7 [13–15].

В настоящее время существует ряд методов идентификации генотоксических повреждений ДНК [13–15]. Наиболее жесткие требования к тестированию генотоксичности предъявляются при регистрации лекарственных препаратов для человека. В табл. 4.1 приведены методы тестирования генотоксичности, рекомендованные в настоящее время ИСН (Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для человека).

Что касается тест-систем для определения наличия или отсутствия генотоксичности, то применяемые в настоящее время *in vitro* и *in vivo* методики предназначены для тестирования мутагенных свойств с целью демонстрации способности (или неспособности) тестируемого вещества вызывать мутации или повреждения хромосом, или же канцерогенез. Кратко эти данные суммированы в табл. 4.2 [14].

Материал (посуда, оборудование, реактивы), предназначенный для непосредственного контакта и длительной экспозиции, не должен обладать генотоксическими свойствами. Следовые количества непалимеризованного материала и мономеров, олигомеров, добавок или продуктов биодegradации могут вызвать образование мутаций. Это точечные или хромосомные перестройки, обусловленные повреждением ДНК. Следовательно, необходимо тестировать способность вещества (материала) вызывать появление точечных мутаций, хромосомных повреждений или же доказать наличие повреждений ДНК. Как упоминалось выше, существует корреля-

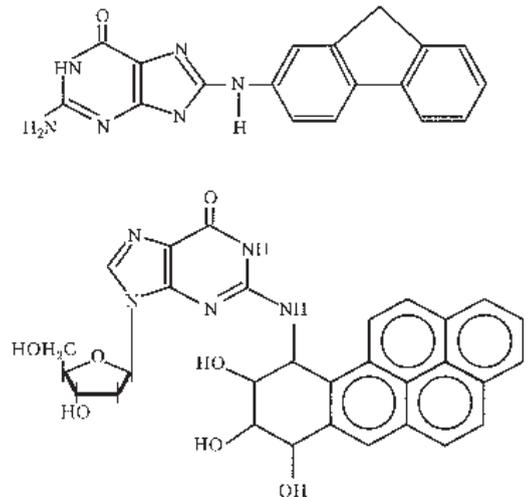


Рис. 4.6. Два примера химических аддуктов (продуктов присоединения) в ДНК. Вверху показано присоединение ароматического амина, а внизу — продукта метаболизма бенз(а)пирена к гуанину ДНК [15]

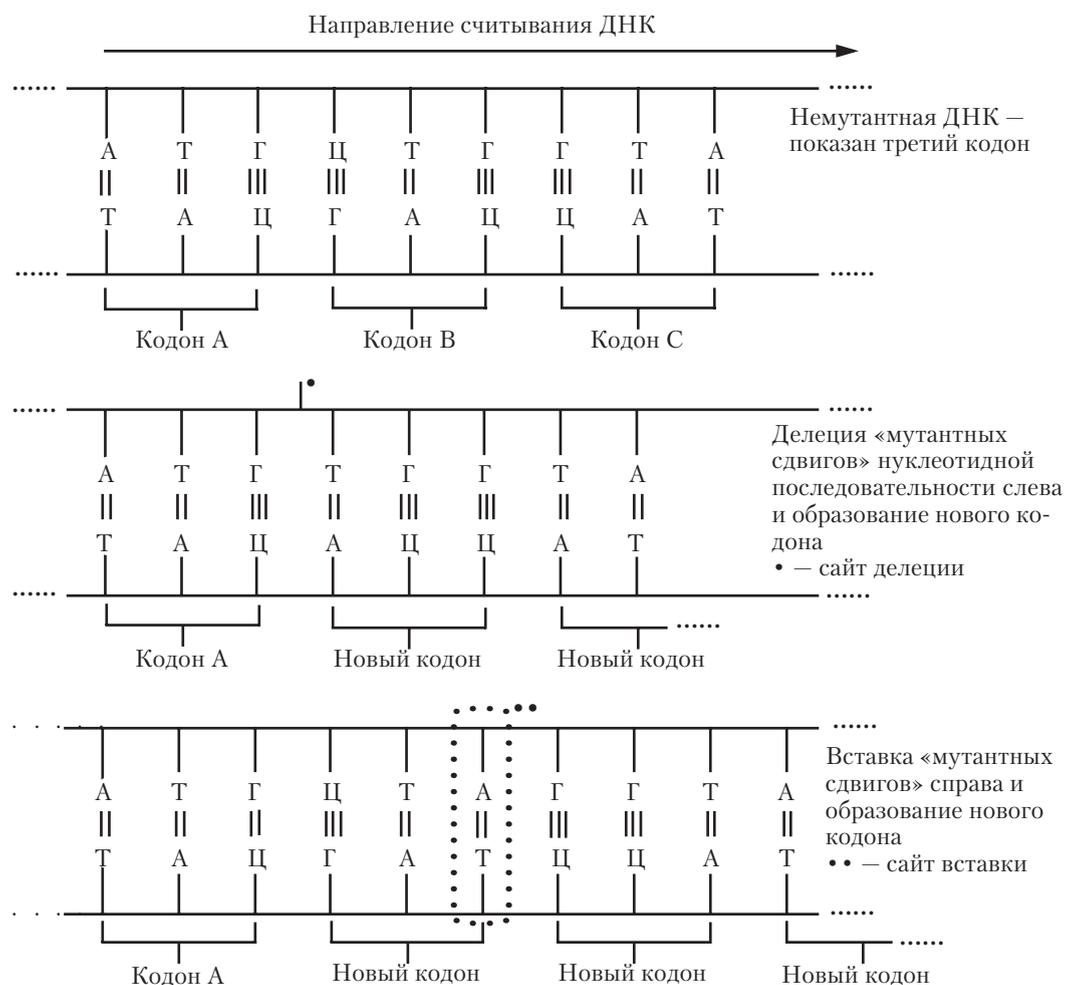


Рис. 4.7. Изменения пар оснований, приводящие к мутации со сдвигом рамки. Вставка или делеция (выпадение) пары оснований приводят к сдвигу положения рамки считывания гена или экзона [13]

ция между мутагенными и канцерогенными свойствами. Большинство канцерогенов — мутагены, но не все мутагены обладают канцерогенными свойствами.

Тест Эймса на микросомах сальмонелл — основной чувствительный тест для скрининга генотоксических повреждений. Соединения тестируют на мутантах *Salmonella typhimurium* для реверсии от требований бактерий к наличию гистидина обратно к состоянию прототрофии. Положительный результат визуализирован по ро-

сту ревертантных бактерий (для которых не требуется источник экзогенного гистидина). В данный анализ необходимо включать систему микросомной активации. Обычно применяют пять бактериальных тест-штаммов. Для подтверждения отсутствия мутагенности или канцерогенного потенциала необходимо выполнение двух тестов на мутагенность на клетках млекопитающих. Среди подобных хорошо известных тестов можно назвать следующие:

Таблица 4.1

## Тесты на генотоксичность, рекомендованные ИСН [14]

Тест на генотоксичность	Объект тестирования мутации	Тип клеточной тест-системы	Метод (условия тестирования)
Тест на генные мутации у бактерий	Ген	Бактерии	<i>In vitro</i>
Цитогенетический анализ <i>in vitro</i> , с использованием клеток мышинной лимфомы	Хромосома	Млекопитающие	<i>In vitro</i>
Тест на хромосомные повреждения <i>in vitro</i> с использованием гемопоэтических клеток грызунов	Ген	Млекопитающие	<i>In vitro</i>

Таблица 4.2

## Наиболее употребительные методы анализа генотоксичности [14]

Методы анализа	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Анализ генных мутаций		
Анализ обратимых мутаций на клетках <i>Salmonella typhimurium</i> (тест Эймса, бактерии)	+	
Анализ обратимых мутаций на клетках <i>Escherichia coli</i> (бактерии)	+	
Анализ генных мутаций на клетках млекопитающих	+	
Анализ сцепленных с полом рецессивных летальных мутаций на <i>Drosophila</i> (плодовая мушка)		+
Анализ генных мутаций на <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (дрожжи)	+	
Spot-тест на мышах		+
Анализ хромосомных и геномных мутаций		
Цитогенетический анализ <i>in vitro</i>	+	
Цитогенетический анализ <i>in vivo</i>		+
Тест на микроядрышках		+
Анализ доминантной летали		+
Анализ наследственной транслокации		+
Цитогенетический анализ половых клеток млекопитающих		+
Анализ ДНК-эффектов		
ДНК-повреждения и репарация: внеплановый синтез ДНК <i>in vitro</i>	+	
Анализ митотической рекомбинации на <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (дрожжи)	+	
Анализ сестринского хроматидного обмена <i>in vitro</i>	+	

— анализ на модели мышинной лимфомы L5178Y (MLA) для мутантов на ТК-локусе;  
 — идукция рецессивных леталей у *Drosophilla melanogaster*;  
 — анализ метафаз в культуре клеток и на животных;

— анализ сестринских хроматидных обменов (SCE);  
 — анализ внепланового синтеза ДНК (UDS);  
 — анализ клеточной трансформации;  
 — анализ системы SOS-репарации;  
 — анализ генных мутаций в культурах

клеток млекопитающих, таких как клетки китайского хомячка V79 — HGPRT-мутационной системе.

В последние десятилетия появились новые подходы и методы оценки генотоксичности [12–15]. Вызваны они тем, что старые, классические методы обладали рядом ограничений, которые выявили в процессе углубленного анализа. В ходе этого анализа, проведенного в 1980 г., данные для более 150 методов определения генотоксичности были переданы для анализа в научные журналы. Оказалось, что многие из тестов дублировали друг друга (например, определяли одни и те же конечные точки в различных организмах или типах клеток). Последующее десятилетие ознаменовалось попытками валидировать и оценить наилучший тест или набор тестов для обнаружения соответствующего генотоксиканта (канцерогена или мутагена для половых клеток). В процессе подобного анализа было обнаружено несколько несоответствий.

Рассмотрим только некоторые, так как детальное их описание выходит за рамки данного обзора. Многие из методов тестирования очень чувствительны и дают позитивный результат на вещества, обладающие канцерогенными свойствами для грызунов. Однако они не позволяют различить агентов, активность которых зависит от реакционной способности ДНК, и при этом дают тот же положительный результат для веществ, не обладающих мутагенными или канцерогенными свойствами. Примеры подобных тестов — определение SCE и определение одно- и двунитовых разрывов ДНК с помощью метода щелочной элюции. Поэтому применение этих тестов в токсикологии было быстро приостановлено. Во-вторых, некоторые методы тестирования хорошо работают в лаборатории их изобретателя, но «отказываются» функционировать в других тест-лабораториях. Наиболее трудно переносимые из лаборатории в лабораторию методы — это анализы морфологической трансформа-

ции клеток. В-третьих, совокупность механизмов генотоксичности, обнаруженная с помощью доступных тестов, может не включать механизмы, относящиеся к генетической опасности для млекопитающих. Примеры подобных несоответствий — тесты, с помощью которых достоверно определяют анеуплоидию, индукцию тандемных повторяющихся ошибок, транспозоны или же эффекты метилирования ДНК [13; 14]. И, наконец, для наиболее часто применяемых тестов, таких как цитогенетический анализ *in vitro* и анализ на клетках мышины лимфомы, свойственно получение ложноположительных результатов, происходящих вследствие: а) нефизиологических условий обработки; б) химически индуцированной токсичности; в) присутствия активных форм кислорода, генерированных S9 mix chemistry [13–15].

В последние годы российскими учеными был разработан оригинальный полиорганный микроядерный метод изучения цитогенетического и цитотоксического действия ряда ксенобиотиков, в частности, диоксида азота, который включает классический микроядерный метод на полихроматофильных эритроцитах (ПХЭ) костного мозга, анализ эффекта в органе мишени — легких и органе выделения — мочевом пузыре [42].

Применение этого метода позволило авторам установить отсутствие цитогенетического действия диоксида азота на клетки легких, костного мозга и мочевого пузыря крыс в условиях проведенных исследований. Также было выявлено цитотоксическое действие вещества на животных всех изученных в эксперименте групп, характеризующееся повышением доли полихроматофильных эритроцитов, частоты двухъядерных клеток и клеток с центральной ядерной перетяжкой в мочевом пузыре и легких крыс и увеличивающееся в зависимости от длительности воздействия [43].

В связи с возникшими проблемами были разработаны некоторые новые

Технологии, применение которых привело к разработке и внедрению новых методов генетического тестирования [13]

Метод (новая технология)	Характеристика	Разработанный на его основе тест <i>in vivo</i>
Полимеразная цепная реакция (PCR)	Специфическая генная амплификация, позволяющая выделить, амплификацию (многократное копирование) и анализ специфических эндогенных генов млекопитающих	Определение генной мутации в гене HGPRT у мышей и крыс
«Челночные векторы» (shuttle vectors)	Полученные с помощью генной инженерии специфические последовательности ДНК в освобожденном векторе, которые могут быть интегрированы в геномную ДНК организма—хозяина	Определение генных мутаций на трансгенных моделях мышей и крыс
Гель-электрофорез ДНК	Применение различных гелей для разделения ДНК на основе ее размера или состава оснований	СОМЕТ-анализ для определения разрывов нитей ДНК, а также мутации гена с использованием конформационного полиморфизма одной нити
Флуоресцентное иммунохимическое окрашивание в комбинации с гибридизацией <i>in situ</i>	Применение флуоресцентных красителей, прикрепленных к специфическим нуклеотидным последовательностям, с целью идентификации локализации генов	Высокоспецифичное хромосомное картирование и тесты с целью обнаружения небольших делеций (выпадений) и перестановок

подходы к тестированию. В табл. 4.3 приведен перечень появившихся в последние годы новых технологий, ставших теоретическим обоснованием и фундаментом для создания новых методов тестирования в генетической токсикологии. Специфические тесты были разработаны именно на основе этих технологий. Эти новые методы в настоящее время валидированы и оценены в качестве альтернативных или дополнительных к уже существующим тестам на генотоксичность.

Детальное изложение этих методов выходит за рамки данного обзора. Их подробное описание можно найти в соответствующих руководствах [12–15].

#### 4.4. Основные механизмы генотоксического действия ксенобиотиков: роль свободнорадикальных реакций в механизмах ДНК-повреждающего действия ксенобиотиков

Выше уже было отмечено, что введение генотоксических повреждений различными агентами осуществляется с помощью двух основных механизмов: за счет непосредственного взаимодействия генотоксиканта со структурами хроматина и опосредованно — вследствие индукции генотоксикантом реакций свободнорадикального окисления с образованием свободных радикалов, которые оказывает непосредственное повреждающее действие на ком-

поненты хроматина [37; 38; 44]. Кроме того, хотя общепринятой является точка зрения, что генотоксичность определяется как повреждение именно ДНК, повреждение других компонентов структуры хроматина, прежде всего белков и липидов, может оказывать косвенное генотоксическое действие, нарушая матричные процессы считывания генетической информации с ДНК на РНК и белки [55; 56].

Механизмы непосредственного (прямого) взаимодействия генотоксиканта с хроматином излагаются в разделе, посвященном механизмам химического канцерогенеза. Рассмотрим более подробно данные, касающиеся свободнорадикального повреждения ДНК и хроматина.

На рис. 4.8 изображена общая схема процессов свободнорадикального окисления [13]. Возникающие в результате по-

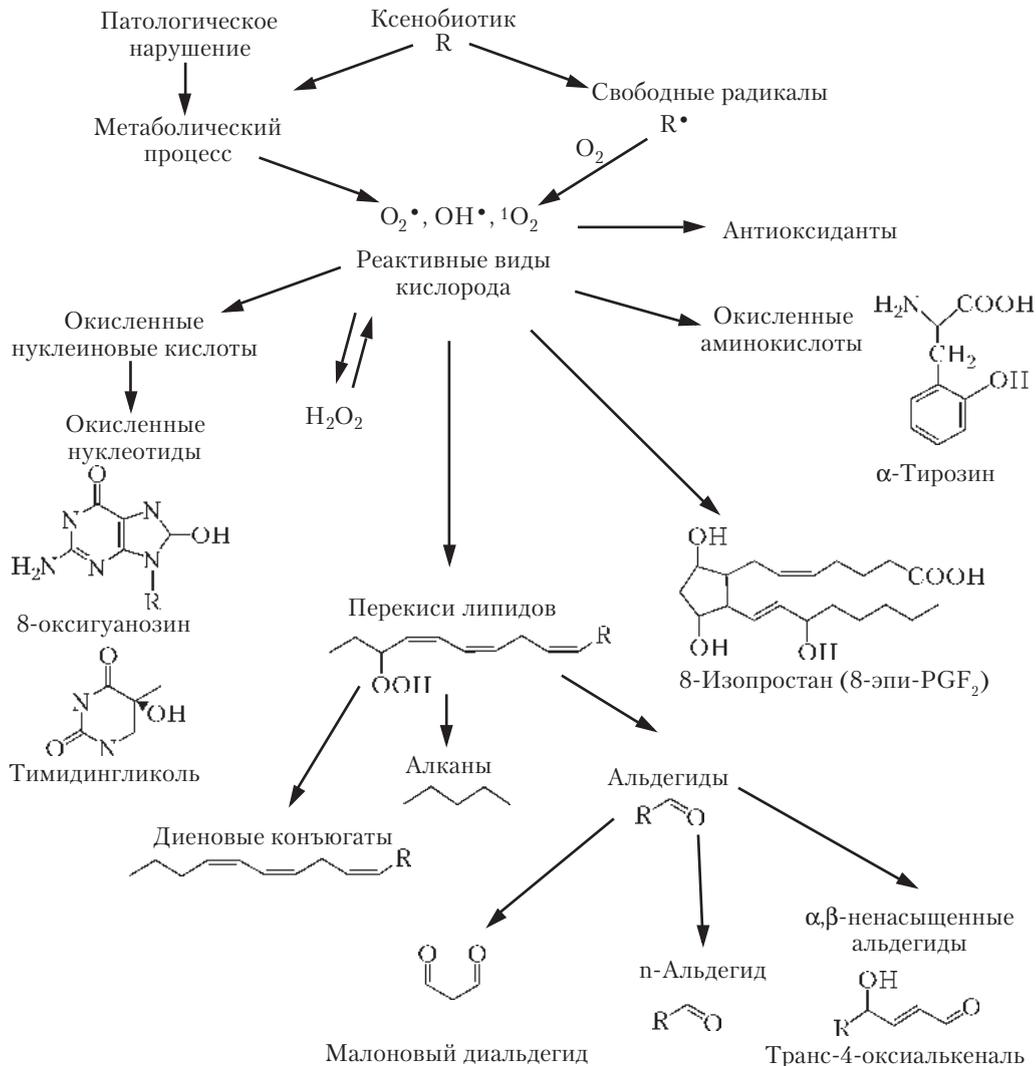


Рис. 4.8. Продукты свободнорадикального повреждения. Свободные радикалы могут реагировать со многими клеточными макромолекулами, такими как ДНК, клеточные мембраны и белки, что в итоге приводит к образованию различных продуктов

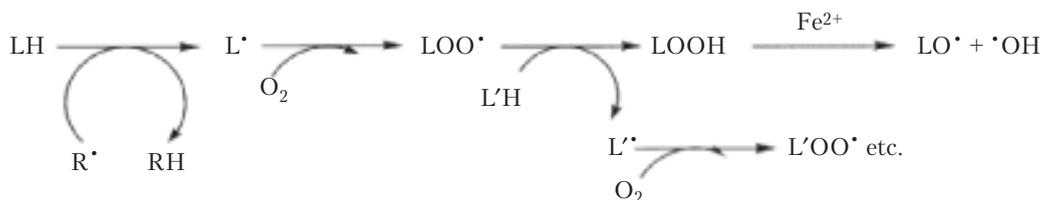


Рис. 4.9. Схема процесса перекисного окисления липидов, цепных реакций, в результате которых образуются многие радикалы липидных перекисей [56]

добных реакций продукты могут обладать генотоксическим действием [57].

Наиболее важными с точки зрения генетической токсикологии являются свободнорадикальные реакции ПОЛ [44]. Схематическое представление этих процессов приведено на рис. 4.9 [56].

Как уже было упомянуто выше, ядерный генетический аппарат клетки структурно оформлен в виде нуклеиново-белкового комплекса — хроматина (см. рис. 4.1–4.3). Помимо основных структурных компонентов хроматина — ДНК и белков, в состав ядерного генома входят также минорные компоненты — РНК, липиды, ионы металлов и т. д. В последнее время особое внимание уделяется изучению липидного компонента хроматина в связи с возможностью протекания в хроматине процессов ПОЛ [59], что имеет принципиальное значение для выяснения молекулярных механизмов его повреждения.

До недавнего времени большинство экспериментальных и клинических исследований, в которых изучали реакции свободнорадикального ПОЛ и их роль в развитии патологических процессов в организме животных и человека, касались мембранных структур разных клеток (возникновение радиационной, химической патологии, ишемических процессов, патогенез злокачественного роста и т. д.), а также транспортных липопротеинов сыворотки крови (некоторые современные теории возникновения атеросклероза) [13; 14; 44]. При этом не принималась во внимание возможность образования свободных радикалов и, соответственно, их взаимодействие со структурными элементами ядерного хроматина, который по своему строению — сложный

супрамолекулярный нуклеиново-белково-липидный комплекс [44; 57–60]. Несмотря на то, что количество липидных компонентов в ядерном хроматине клеток, в частности клеток печени, незначительное (то есть они являются минорными компонентами хроматина), постулирована их существенная роль как в структурировании хроматина, так и в реализации молекулярных функций ферментных белков хроматина, следовательно, и в регуляции функционирования ядерного генома [58].

Ранее было установлено, что липидный компонент хроматина, по сравнению с мембранными липидами, имеет специфический химический состав [60–62]. Кроме того, как было известно ранее, липиды хроматина быстро реагируют на действие повреждающих факторов, в частности, ионизирующей радиации [63]. Тем не менее, один из неясных аспектов, касающийся природы факторов, определяющих механизмы и регуляцию функциональной активности ядерного хроматина в интактных клетках, — участие в этих процессах входящих в его состав липидов. Имеющиеся в литературе сведения позволяют отнести липидам хроматина значительное место в определении структурно-функциональной организации ядерного генома [64]. Показано, что эндогенные липиды могут вызывать изменения в структуре ДНК хроматина, в частности, влиять на степень ее денатурации, тем самым обеспечивая протекание или торможение процесса транскрипции [58]. Липиды могут также изменять активность ферментов синтеза ДНК и РНК посредством влияния на процессы их фосфорилирования. Проведенные нами исследования определения флуоресцен-

ции липидного зонда пирена при его взаимодействии с РХ и ТАХ позволили выяснить, что липиды в составе фракций хроматина находятся в упорядоченном состоянии, вероятно, в виде липидного бислоя, сходного с таковым в биомембранах [60; 61]. Микровязкость этого образования в структуре хроматина несколько ниже в ТАХ по сравнению с РХ. Скорее всего, большая «разрыхленность» липидного компонента в ТАХ играет не только существенную роль в дифференциальной транскрипционной активности этих фракций, но и их чувствительности к действию генотоксикантов и антиоксидантов [62]. Различия в характере структурной упаковки липидных компонентов РХ и ТАХ определяются также спецификой их состава [30]: ТАХ содержит несколько больше фосфолипидов по сравнению с РХ. Входящие в состав ядерного хроматина остатки жирных кислот липидов распределены неравномерно вдоль его структуры; в составе ТАХ выше относительное содержание остатков ненасыщенных жирных кислот, прежде всего, арахидоновой и линолевой. Таким образом, большее содержание фосфолипидов и их ненасыщенных жирно-кислотных остатков в составе липидного компонента, а также его большая «разжиженность» в составе ТАХ, возможно, один из факторов, повышающих уровень его функциональной активности и чувствительность к прооксидантам (генотоксикантам) и антиоксидантам (экзо- и эндогенным).

Итак, входящие в состав хроматина липиды отличаются по ряду свойств от липидов биомембран. Прежде всего, это касается их жирно-кислотного состава, а также процессов свободнорадикального окисления хроматин-связанных липидов [58].

Нами в отделе биохимической фармакологии под руководством члена-корреспондента АМН Украины Ю. И. Губского был проведен комплекс исследований, в которых впервые описана и охарактеризована биохимическая система реакций ПОЛ во фракциях РХ и ТАХ печени интактных крыс, а также в условиях токсического повреждения печени целым рядом

генотоксикантов, прежде всего гепатотоксином тетрахлорметаном (ТХМ). Эта автономная система переокисления хроматин-связанных липидов была нами изучена ранее [62].

Необходимо отметить, что ТХМ — единственный представитель генотоксикантов в этой группе органических соединений. В последнее время подобное действие обнаружено у полициклических ароматических углеводородов (РАН) [59]. Комплексные смеси полициклических углеводородов повсеместно распространены в окружающей среде. Наиболее частые источники этих соединений — сигаретный дым и жареная пища. Исследования, проведенные в Азербайджане и Китае, свидетельствуют о существовании зависимости между уровнем смесей данных соединений в сыворотке крови и количеством ДНК-аддуктов в лимфоцитах. В связи с возникшей проблемой, в Соединенных Штатах были начаты исследования по разработке новых усовершенствованных методов обнаружения этих соединений и профилактики вызванных ими заболеваний человека.

Одной из предпосылок для существования подобной системы пероксидации в хроматине и ее регуляции было выявление в составе хроматина ионов переменной валентности — железа и меди, которые необходимы для протекания и регуляции свободнорадикальных реакций ПОЛ в биоструктурах [30–33]. Кроме установленно ранее ряда специфических свойств системы ПОЛ в хроматине по сравнению с биомембранами [64], наиболее показательны данные о действии некоторых антиоксидантов на интенсивность ПОЛ в мембранах эндоплазматического ретикулаума и фракций хроматина печени крыс в условиях *in vitro* [65]. В частности, было установлено, что если в биомембранах наибольшей активностью в этих условиях обладают альфа-токоферол и ионол, то во фракциях хроматина — восстановленный глутатион. Кроме того, еще одним важным положением является обнаружение того факта, что во фракции ТАХ процессам ПОЛ свойственна большая интенсивность и лабиль-

ность по отношению к действию экзогенных факторов [65–71]. Возможно, что данные различия в жирно-кислотном составе липидного компонента и его структурной организации лежат в основе обнаруженных различий в процессах ПОЛ во фракциях РХ и ТАХ.

Можно допустить, что активность этой системы ПОЛ в хроматине может регулироваться в условиях как интактного состояния (нормы), так и патологии (в данном случае, прежде всего, химической) под влиянием эндогенных про- и антиоксидантов (токсикантов и фармакологических препаратов соответственно).

Ранее нами была предложена регуляция активности хроматина с помощью перекисно-антиоксидантного механизма [72]. Наличие этого механизма регуляции функциональной активности хроматина через систему перекисления липидов, входящих в его состав, показано в условиях химической патологии при отравлении крыс рядом генотоксикантов, в частности кадмия хлоридом (5 мг/кг) или хлорофосом (260 мг/кг). При этом определяли функциональную активность ТАХ и РХ клеток печени. Выявлен прямо пропорциональный характер зависимости процессов репарации и транскрипции ДНК хроматина от уровня индуцированного НАДФН или аскорбатом перекисления хроматин-связанных липидов. Для репликативного синтеза ДНК в хроматине подобная зависимость имеет обратно пропорциональный характер. Этот регуляторный механизм реализуется за счет влияния на липиды хроматина экзо-, эндогенных про- и антиоксидантов, в том числе токсинов и лекарственных препаратов. Было постулировано наличие подобного механизма также в клетках интактных животных.

В последние годы накапливается все больше доказательств наличия подобных механизмов регуляции, в частности, участия свободных радикалов — активных форм кислорода, в регуляции клеточных функций [73–76]. Один из таких примеров приведен на рис. 4.10, где показано участие свободных радикалов кислорода в ре-

гуляции сигнальной трансдукции [75].

Тем не менее, цель нашей работы — анализ доступных данных, касающихся молекулярных механизмов генотоксического действия свободных радикалов. Под свободным радикалом принято понимать часть молекулы, имеющую неспаренный электрон на внешней (валентной) атомной орбите [77]. С химической точки зрения, возникновение неспаренного электрона есть ни что иное, как появление у молекулы свободной валентности. Наличие неспаренного электрона обуславливает высокую химическую активность свободных радикалов, которые, вступая в химические реакции, приобретают недостающий электрон. В биохимических системах можно выделить несколько типов свободных радикалов. Одни из них образуются в каче-

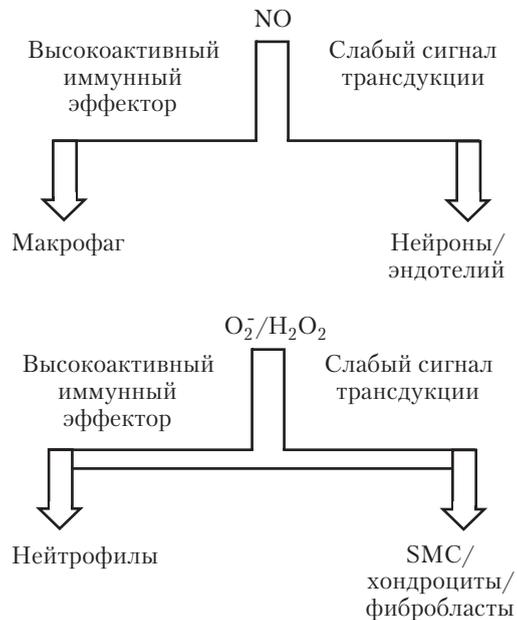


Рис. 4.10. Потенциальная аналогия между оксидом азота и активными формами кислорода. В обоих случаях их значительные количества используются клеточными иммунными эффекторами, тогда как незначительная часть — другими типами клеток для сигнальной трансдукции [75]

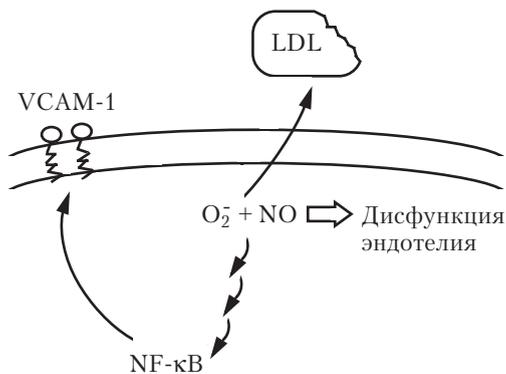


Рис. 4.11. Предполагаемая роль супероксидных анионов в развитии атеросклероза. Увеличение концентрации этих радикалов ( $O_2^-$ ) может приводить к взаимодействию с оксидом азота (NO), вызывая инактивацию последнего с развитием клинического синдрома, известного как дисфункция эндотелия. Подобным образом эти радикалы могут окислять холестерин липопротеидов низкой плотности [10]

стве нормальных продуктов обмена веществ, другие возникают при патологических процессах, в частности, при действии на клетку различных типов облучения, токсических ксенобиотиков, а также при ряде заболеваний. Их роль постулируется и в возникновении и развитии атеросклероза (рис. 4.11) [10].

В настоящее время активно изучают роль свободных радикалов, в частности, реакций ПОЛ и индуцированных ими генотоксических повреждений, в возникновении и развитии синдрома стресса. В качестве маркеров оксидативного стресса, наряду с такими общеизвестными показателями, как концентрация малонового диальдегида, используются критерии генотоксичности: разрыв нитей ДНК, концентрация 8-OhdG, M1G [66].

На модели стресса нами были изучены механизмы его возникновения и протекции. При этом была доказана роль активных форм кислорода в механизмах возникновения и развития синдрома стресса, в частности, повреждений ядерных белков, а также разработаны подходы фармаколо-

гической протекции генотоксических повреждений S- и N- производными хиनाзолина [67–70].

Необходимо иметь в виду, что в организме постоянно протекают свободнорадикальные процессы аутоокисления органических молекул, причем их интенсивность наиболее высока в липидах, в особенности в фосфолипидах. Согласно имеющимся сведениям, свободные радикалы составляют значительную часть реакционноспособных соединений в живых клетках, что обусловлено непрерывным протеканием в них реакций свободнорадикального окисления. Однако свободнорадикальные процессы осуществляются и при патологических состояниях, причем тому или иному типу заболевания свойственны закономерные изменения интенсивности их протекания с участием набора видов свободных радикалов, специфичных для данного заболевания. Вообще, многообразие биохимических реакций в большей степени обусловлено способностью свободных радикалов при взаимодействии с различными веществами превращать последние также в свободные радикалы. В связи с этим особое значение приобретают цепные реакции — химические процессы, осуществляющиеся с участием свободных радикалов [68].

Частный случай свободнорадикальных цепных процессов — это реакции ПОЛ, занимающие ведущее место среди свободнорадикального окисления в живой клетке. Это обусловлено содержанием в молекулах липидов большого количества остатков ненасыщенных жирных кислот, дающих при определенных условиях начало возникновению свободнорадикальных цепных процессов.

Многочисленные данные литературы свидетельствуют о повреждающем действии свободных радикалов, образующихся в результате реакций ПОЛ, на субклеточные структуры [63–72]. Так, например, в одной из последних работ было показано, что длительное пребывание рыб в воде, содержащей токсические вещества фенол и нафталин в низких концентраци-

ях, приводило к активации процессов ПОЛ, истощению антиоксидантных возможностей организма рыб, изменению окислительно-восстановительного баланса [73].

При этом могут повреждаться основные молекулярные компоненты клетки — нуклеиновые кислоты, белки, липиды, углеводы. Однако нас в данном случае больше всего интересуют механизмы генотоксического действия свободных радикалов, то есть повреждающее действие на ДНК хроматина. Длительное воздействие свободных радикалов на субклеточные структуры, прежде всего ДНК, в конечном итоге приводит к патологическим состояниям, в том числе и таким, которые вызывают наибольшую смертность среди населения, — атеросклерозу (см. рис. 4.11) и онкологическим заболеваниям. Кроме перечисленных выше патологий, длительное воздействие свободных радикалов на ядерную ДНК (а также на митохондриальную) приводит к процессу естественного и ускоренного старения и усугубляет его [70–78]. Причем в ряде исследований было установлено, что в условиях окислительного стресса структура митохондриальной ДНК восстанавливается медленнее, чем ядерной (рис. 4.12 [79]).

В связи с этим интересно отметить роль метаболического статуса организма в восприимчивости к генотоксическому и мутагенному воздействию ряда токсикантов, в частности РАН [73]. Так, было выявлено, что мыши линий DBA/2 и C57Black/6 обладают разной чувствительностью к токсическому и мутагенному воздействию бензантрацена и ингибитора эпоксигидратазы — 2,2-дибромо-1-(4)-нитрофенил-этанола, а также к их комбинации. Авторы полагают, что разная восприимчивость мышей может быть связана с метаболическим статусом, прежде всего, с уровнями эпоксидсинтетазной активности цитохрома P-450 и эпоксигидратазы [76].

Однако, в связи со свободнорадикальными повреждениями хроматина, особый интерес в данном случае вызывает природа нарушений структуры ядерной ДНК,

являющейся носителем генетической информации. Действие свободных радикалов вызывает несколько типов повреждений ДНК: одно- и двуниевые разрывы цепей, образование поперечных сшивок белок — ДНК, окислительные модификации оснований, в частности, окислительная модификация гуанина с образованием продуктов его окисления (прежде всего, 7,8-дигидро-8-оксо-2-дезоксигуанозина с участием металла переменной валентности — железа, так называемых реакций Фентона) [75–80].

В связи с этим необходимо подчеркнуть значительный вклад в механизмы генотоксических повреждений ядерного генома тяжелых металлов. Под руководством академика АМН Украины И. М. Трахтенберга в Институте медицины труда АМН Украины был проведен комплекс исследований, посвященных изучению генотоксического действия тяжелых металлов — хрома, никеля, свинца и ртути [81]. В результате было выявлено генотоксическое действие соединений этих металлов, разработаны методы идентификации вызываемых генотоксических повреждений, а также генотоксической протекции.

Эти результаты во многом перекликаются с данными, полученными в отделе биохимической фармакологии Института фармакологии и токсикологии АМН Украины при изучении влияния хлористого кадмия на свойства ядерного хроматина клеток печени крыс [82]. В этой работе исследовали интенсивность реакций спонтанного и индуцированного ПОЛ во фракциях РХ и ТАХ печени крыс, а также некоторые биохимические параметры, характеризующие структурное состояние и функциональную активность этих фракций в условиях внутрибрюшинного введения экспериментальным животным водного раствора хлористого кадмия (1 ЛД<sub>50</sub>, 7,5 мг/кг массы тела).

Интоксикация животных хлористым кадмием практически не изменяла процентное соотношение между РХ и ТАХ, но приводила к достоверному повышению отношения белок/ДНК во фракции ТАХ. По-

А. Нормальная клетка



Б. Клетка в условиях окислительного стресса или старения

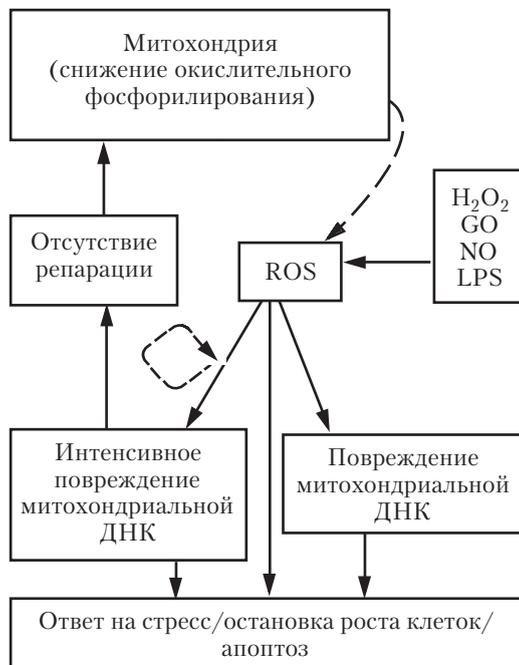


Рис. 4.12. Схематическое представление роли митохондрий в генерации активных форм кислорода (ROS) и окислительного процесса. Митохондрии ответственны за окислительное фосфорилирование, биохимический путь, ведущий к образованию АТФ через дыхательную цепь. Во время этого процесса 1–2 % кислорода, расходуемые на образование ROS, могут повреждать митохондриальную ДНК, которая впоследствии может репарироваться. Однако в условиях окислительного стресса генерация ROS приводит к постоянному повреждению митохондриальной ДНК. Воспроизведение этих повреждений при репликации митохондриальной ДНК и генерации вторичных ROS может снижать окислительное фосфорилирование и искажать саму молекулярную физиологию митохондрий. В ответ на это искажение активируются гены стрессорного ответа в ядерной ДНК, что влечет за собой остановку роста клеток и апоптоз [79]

добное увеличение может быть следствием или уменьшения количества ДНК в этой фракции хроматина, или возрастания количества белка в ней. Такая структурная модификация хроматина может быть обусловлена изменением интенсивности протекания свободнорадикальных реакций ПОЛ во фракциях хроматина. Действительно, при этом было обнаружено, что под влиянием введения хлористого кадмия в фракции ТАХ резко стимули-

руются процессы НАДФН-зависимого ПОЛ. Другие показатели спонтанного (которое оценивали по содержанию диеновых конъюгатов) и индуцированного ПОЛ достоверно не изменяются в условиях интоксикации по сравнению с интактными животными.

Под влиянием данного генотоксиканта возрастает функциональная активность фракционированного хроматина печени. Во фракции РХ достоверно увеличивает-

ся активность фермента транскрипции — РНК-полимеразы I, отвечающего за синтез рибосомной РНК. При этом в данной фракции хроматина также наблюдается повышение активности фракции фермента, синтезирующего матричную РНК — РНК-полимеразы II. Во фракции ТАХ интоксикация приводит к резкой стимуляции активности репликативного фермента — ДНК-полимеразы альфа. Видимо, интоксикация, в ответ на повреждение генома, вызывает резкий всплеск генетической активности — увеличение синтеза ДНК и белка, отражающего пролиферацию клеток — компенсаторную реакцию замещения поврежденных клеток вновь образованными.

Значительно хуже, по сравнению с тремя классическими воздействиями, вызывающими свободнорадикальные повреждения хроматина (радиация, процесс старения, действие ионов тяжелых металлов), изучена роль свободнорадикальных повреждений ядерного генома при интоксикации хлор- и фосфорорганическими соединениями. На большом экспериментальном материале нами была доказана свободнорадикальная природа повреждений ДНК и белков хроматина под воздействием интоксикации животных гепатотропными ядами тетрахлорметаном и 1,2-дихлорэтаном, а также фосфорорганическим ядом — хлорофосом [83; 84]. Наиболее полно в этой связи изучено действие одного из представителей гепатотропных ядов, органического растворителя ТХМ. Известно, что это вещество при попадании в организм интенсивно метаболизируется ферментными системами мембран эндоплазматического ретикулаума печени, в результате чего происходит образование свободнорадикальных метаболитов. В дальнейшем эти метаболиты ТХМ вызывают повреждения липидной матрицы мембран вследствие индукции процессов ПОЛ [85; 86]. Образующиеся при этом многочисленные виды свободных радикалов вызывают значительные повреждения субклеточных структур, в том числе и компонентов хроматина [63]. Подтверждением этому слу-

жит связывание меченых метаболитов ТХМ с компонентами хроматина — белками и ДНК.

Отсутствие связывания меченого ТХМ с ДНК фракций РХ и ТАХ позволяет предполагать участие в процессе связывания липидов хроматина. Об этом свидетельствует также высокая степень связывания  $^{14}\text{C}$  с ТАХ, содержащим относительно большее, по сравнению с РХ, количество липидов [86].

Подытоживая, необходимо отметить, что имеющиеся данные литературы и результаты собственных исследований авторов позволяют постулировать в качестве ведущего молекулярного механизма генотоксичности токсикантов эндо- и экзогенной природы повреждающее действие продуктов реакций свободнорадикального окисления, прежде всего ПОЛ. В результате их действия на компоненты хроматина возникают непарируемые генотоксические повреждения ДНК, являющиеся причиной генотоксических патологий. На рис. 4.13 приведена схема, иллюстрирующая данные выводы [57].

Альтернативные последствия генотоксического действия ксенобиотиков: генетическая патология, химический канцерогенез, восстановление структуры ДНК и удаление генетически поврежденных клеток из популяции (репарация ДНК и апоптоз).

На основании известных из опубликованной литературы фактов следует, что синтез ДНК и, в частности, ее репликация — не безупречные процессы, и это касается, прежде всего, их точности [17; 18]. В редких случаях спонтанно, в ходе нормального процесса клеточного деления, могут происходить генетические изменения в структуре ДНК. Кроме того, в ходе нормального эндогенного окислительного метаболизма возникают реактивные молекулы (свободные радикалы), способные повреждать ДНК. Наличие эндогенных повреждений ДНК — основа «фона генных повреждений» или «частоты спонтанных мутаций». Кроме ошибок в процессах репликации и репарации ДНК, источником

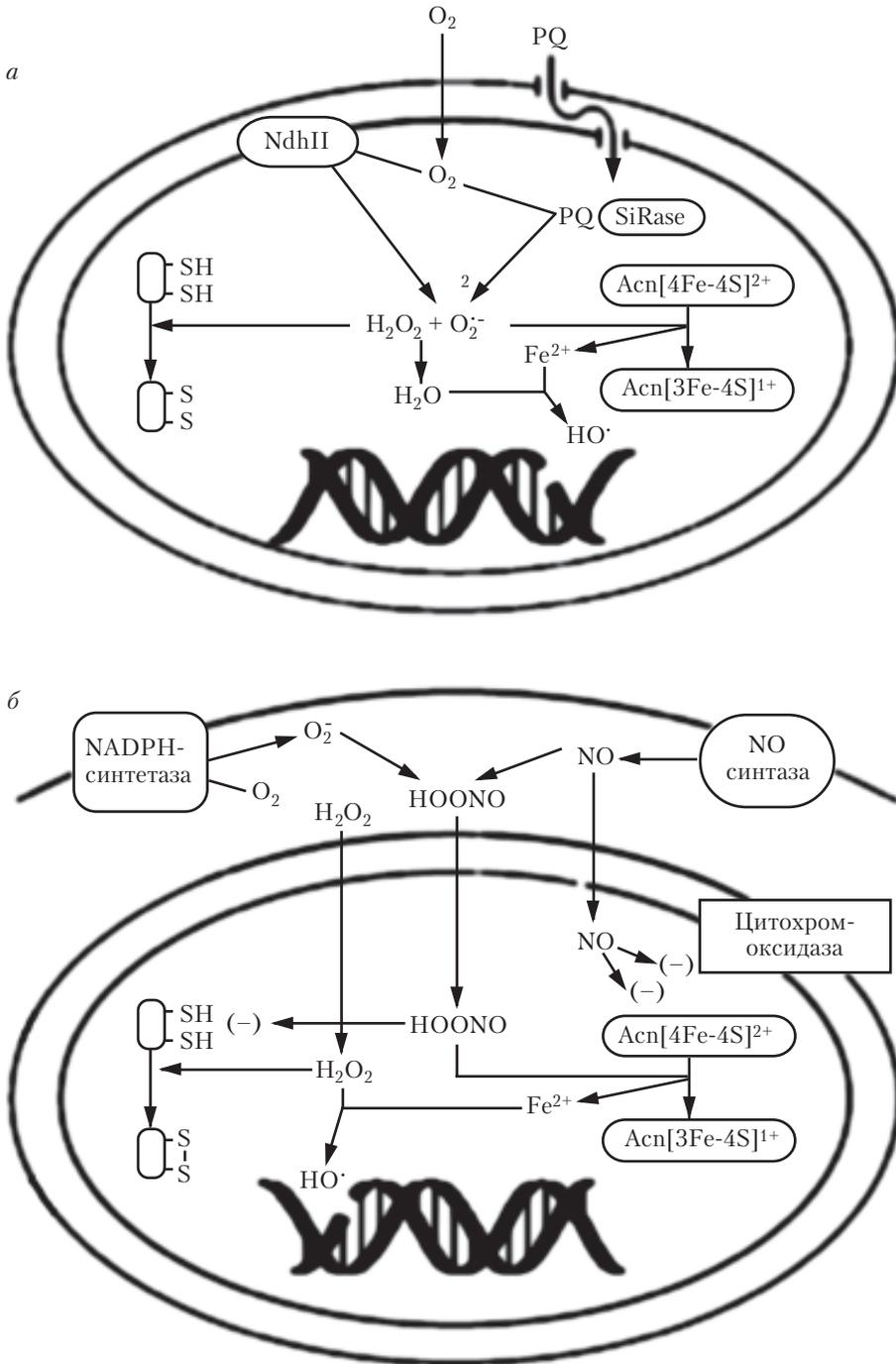


Рис. 4.13. Схематическое изображение генотоксического действия свободных радикалов (а, б)

спонтанных мутаций есть неизбежная экспозиция с неблагоприятными факторами окружающей среды, многие из которых могут обладать генотоксическим действием. В экспериментах на животных было показано, что неблагоприятные факторы окружающей среды способны индуцировать постоянно существующие, наследуемые мутации в соматических или половых клетках и подтверждают мнение о подверженности человека неблагоприятному действию этих факторов среды, являющейся основой генетического риска [77–80; 86–89].

Другие факторы феномена токсичности, по-видимому, определяются генотоксичностью соматических клеток. Патологический итог проявления этого токсического действия — следующие примеры [13; 14]:

- наследственный онкогенез и его индуцируемые формы;
- тератогенез;
- полная или частичная стерильность;
- атеросклероз;
- старение.

Для мониторинга человеческих популяций, предположительно подвергающихся действию генотоксических агентов, с целью доказательства генотоксичности соматических клеток было проведено тестирование связывания генотоксикантов с ДНК и ее репарации, точечных мутаций, а также кластогенности. Во многих исследованиях при этом было доказано наличие взаимосвязи между токсичностью соматических клеток и образованием первичных повреждений ДНК.

Таким образом, на основании изложенного выше становится очевидным, что генотоксические повреждения ДНК реализуются, прежде всего, в образовании мутаций. В дальнейшем мутации могут через ряд этапов реализации токсического действия воплощаться в конкретные генетические патологии (рис. 4.14). Причем природа токсического процесса или конкретного генетически обусловленного заболевания зависит от вида клеток или тканей, измененных в ходе мутаций. Вследствие фундаментальной роли, которую играют гены в обмене веществ всех организмов, в

том числе и человека, мутационная основа многих заболеваний хорошо известна [14].

Подсчитано, что на генетическую патологию приходится примерно 5 % всех заболеваний человека (табл. 4.4). Лечение генетических патологий проводится в наиболее развитых странах, и оно довольно дорогостоящее.

Наиболее биологически значимое последствие генотоксических повреждений — это опухолевое перерождение клетки — канцерогенез [13; 14].



Рис. 4.14. Гипотетический процесс, начинающийся с экспозиции генотоксиканта и заканчивающийся генной патологией человека. Процессы репарации ДНК могут элиминировать образование мутаций, ведущих к появлению генетической патологии (прежде всего, канцерогенеза) [14]

Примеры генетически обусловленных заболеваний человека [14]

Категория генетических изменений	Подсчитанная частота /10 <sup>3</sup> жителей	Типичные примеры
Нарушения структуры хромосом	6,86	Синдром Дауна (трисомия) Синдром Klinefelter (XXY) Синдром Turner (XO) Cri du chat (делеция хромосомы) Многочисленные другие трисомии (XYY)
Доминантные мутации	1,85–2,64	Врожденный семейный полипоз (AD) Нейрофиброматоз (AD) Хорея Huntington (AD) Болезнь Crouzon Черепно-лицевой дизостоз (AD) Ретинобластома (AD) Анитидия (anitidia) (AD) Хондродистрофия (AD)
Рецессивные мутации	2,23–2,54 0,78–1,99	Пигментная ксеродерма (AR) Мышечная дистрофия Duchenne (XR) Гемофилия (XR) Болезнь Lesch–Nyhan (XR) Серповидно-клеточная анемия (AR) Галактоземия (AR) Фенилкетонурия (AR) Сахарный диабет (AR) Синдром Фанкони (AR) Альбинизм (AR) Кистозный фиброз (AR)
Полигенное наследование	26,0–32,0	Расщепленная губа — «заячья губа» Анэнцефалия (врожденное отсутствие головного мозга) Расщелина позвоночника Косолапость Идиопатическая эпилепсия Врожденные дефекты сердца

*Примечание.* AD — аутомная доминанта; AR — аутомный рецессив; XR — X-связанный рецессив.

Детальное описание механизмов химического канцерогенеза, как наиболее значимого последствия генотоксического действия ксенобиотиков, выходит за рамки обсуждаемой проблемы. Тем не менее, на них необходимо остановиться хотя бы вкратце с позиций индуцирующего влияния на этот процесс генотоксических повреждений структуры ДНК (рис. 4.15).

Было накоплено достаточное количество доказательств в пользу теории соматических мутаций канцерогенеза, которая постулирует необходимость для опухоле-

вого перерождения клетки наличия мутаций в ДНК соматических клеток. Опухолевое перерождение клетки (канцерогенез) включает накопление мутаций во многих критических генах. Эти мутации могут быть результатом дефектных репликации или репарации ДНК, оксидативного повреждения ДНК, а также ее повреждения, вызванного канцерогенами окружающей среды. Многие химические канцерогены могут изменять структуру ДНК посредством ковалентного взаимодействия (образование аддуктов ДНК) или же прямого/



Рис. 4.15. Общие аспекты химического канцерогенеза.

В центре показана ключевая стадия в развитии этого процесса, происходящая в результате ковалентного связывания канцерогена с ДНК с образованием генотоксических повреждений [14]

непрямого оксидативного повреждения ДНК. Некоторые химические канцерогены изначально активны и могут непосредственно ковалентно связываться с ДНК, тогда как для активации других необходим их метаболизм посредством цитохрома Р-450, при котором происходит образование реактивных электрофильных интермедиатов, способных ковалентно связываться с ДНК (см. рис. 4.15). Эта теория 50-х

годов прошлого века получила название «электрофильная теория химического канцерогенеза Миллера» [цит. по 13; 14]. Исходя из этой концепции, были введены в обращение термины «родительский», «непосредственный» и «окончательный» канцерогены. Родительский канцероген — это соединение, которое для канцерогенной активности должно быть метаболизировано. Непосредственный канцероген — это

метаболический интермедиат, который, чтобы превратиться в окончательный канцероген, должен подвергнуться последующему метаболизму. И, наконец, окончательный канцероген — это соединение (прямой метаболит), которое ковалентно связывается с ДНК. Клетка может обладать системами защиты, способными детоксицировать канцерогенные соединения, включающие клеточные антиоксиданты и нуклеофилы, а также некоторые ферменты. Кроме того, реактивные канцерогенные соединения могут связываться с некритическими сайтами в клетке, что приводит к детоксикации, или же могут подвергаться спонтанному разрушению. Если эти канцерогены связываются с ДНК, то такая поврежденная ДНК может быть репарирована, в результате чего образуется нормальная клетка. Если же при этом происходит ошибочная репарация ДНК или же аддукт ДНК не может быть репарирован перед клеточной репликацией, то эта ошибка может перейти во вновь синтезированную ДНК, и в этом случае дочерняя клетка будет нести мутацию. Если изменение произошло в критическом гене, то это событие может иметь важное значение для развития онкогенеза.

Мутационно измененная, или инициированная, клетка имеет измененный генотип и может оставаться «покоящейся» (не подвергаться клональной экспансии) в течение всей жизни организма. Однако дополнительные мутации или повреждения критических генов с последующей клональной экспансией могут привести к развитию опухоли. Помимо этого механизма, химический канцерогенез в экспериментальных моделях может быть подразделен на три основные стадии: инициация, промоция и прогрессия (см. рис. 4.15). Как было упомянуто выше, инициированная клетка может оставаться неактивной на протяжении всей жизни организма, но при повторной экспозиции с промотором (активатором) опухоли произойдет преимущественный селективный рост такой клетки, которая, в свою очередь, может давать начало клону и, в конечном счете, началу

роста опухоли. Этот процесс, обозначаемый термином «активация опухоли», эпигенетический, он обеспечивает преимущественный рост клеток с измененным генотипом. Развитие злокачественной опухоли из начальной — третья стадия суммарного процесса, обозначаемая термином «прогрессия», — включает дополнительные генетические изменения.

Существуют два альтернативных пути восстановления поврежденной генотоксическим действием структуры ДНК: «эндогенный» и «экзогенный». Первый из них предполагает «включение» внутренних, существующих в клетке, механизмов удаления повреждений (процесс репарации ДНК). При невозможности удаления этих повреждений (нерепарируемых) с помощью процесса репарации клетки могут быть выведены из популяции посредством генетически запрограммированного процесса — апоптоза [89–92]. Второй путь — это удаление генотоксических повреждений при введении в клетку экзогенных факторов — фармакологических препаратов-генопротекторов.

Важнейшая функция ядерного генома (хроматина), предназначенная для удаления поврежденных участков ДНК, вызванных действием повреждающих факторов, в том числе и генотоксикантов, — процесс репарации ДНК (рис. 4.16).

В отличие от механизмов репликативного синтеза ДНК, которые относительно хорошо изучены, многие детали репаративного синтеза ДНК остаются неясными [13; 14]. Тем не менее, можно наметить некоторые основные положения, лежащие в основе понимания механизмов репарации ядерной ДНК.

Коренное отличие процесса репарации ДНК от ее репликативного (полуконсервативного) синтеза состоит в том, что если второй процесс в интактной клетке служит чисто физиологической цели — передаче наследственной информации от родителей потомству, то главная цель репаративного синтеза — обеспечение структурной целостности ДНК в составе хроматина в ответ на ее повреждение генотоксическими фак-

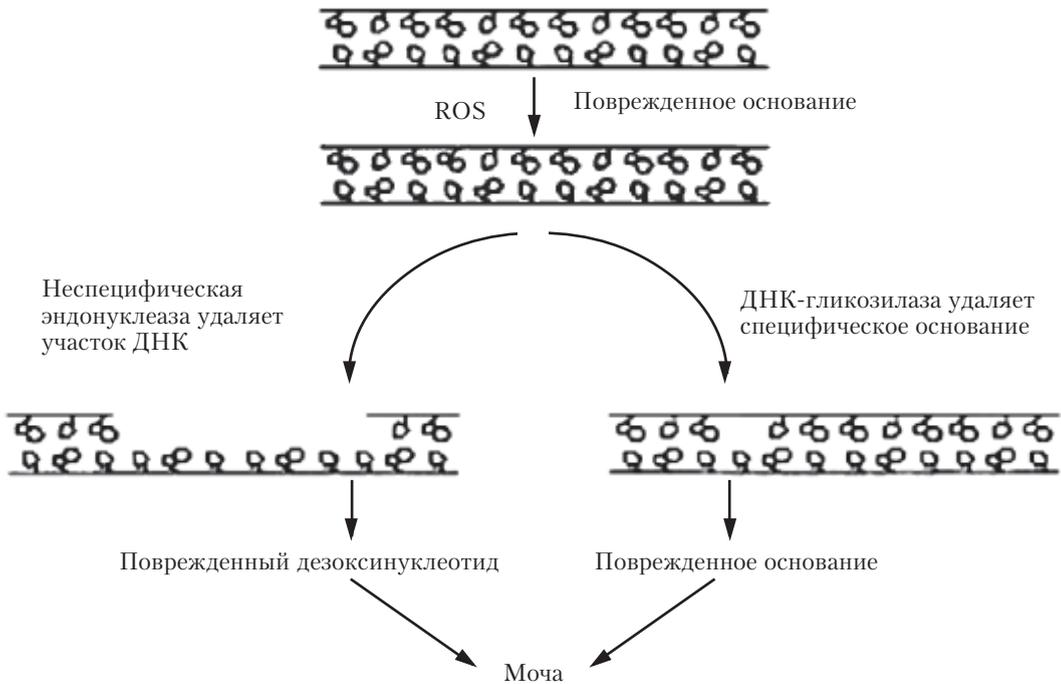


Рис. 4.16. Репарация поврежденного основания ДНК неспецифическими эндонуклеазами или специфическими гликозилазами.  
ROS – реактивные виды кислорода

торами эндо- и экзогенной природы. И все же между этими двумя процессами существует неразрывная связь, выражающаяся, прежде всего, в использовании многих общих ферментативных систем [17; 18].

В отличие от репликации, где синтез происходит на обеих цепях двойной спирали ДНК в полном объеме, в процессе репарации ДНК удаляется поврежденный участок нуклеазами, и на этом сайте происходит ограниченное синтетическое замещение этого участка. При этом синтез совершается только на одной из цепей ДНК.

Репарация осуществляется неоднородно на всем протяжении линейной структуры хроматина. Более интенсивно репаративный синтез происходит на активно транскрибируемых участках хроматина [41]. Предполагается, что репарация поврежденных участков в ТАХ осуществляется ДНК-топоизомеразой I, в то время как

ДНК-топоизомераза II участвует в репарации поврежденной ДНК на всем протяжении генома. Возможно, этот факт лежит в основе дифференциальной чувствительности и степени репарации ДНК ТАХ при повреждении хроматина генотоксикантами [30]. Важнейшая функция ДНК-топоизомераз – расплетение спиральных участков ДНК. В результате этого процесса становится возможным удаление поврежденного участка нуклеазами [38–41]. В дальнейшем происходит заполнение образовавшегося пробела ДНК-полимеразами. Причем, на основании данных последних лет, можно сделать вывод о том, что в этом процессе участвует как истинно репаративный фермент – ДНК-полимераза бета, так и репликативный фермент – ДНК-полимераза альфа [17–18]. Однако при репарации ДНК существует четкое разделение функций между этими двумя ферментами. Если ДНК-полимераза альфа предпочитает

ет заполнение пробелов («брешей») в молекуле ДНК размером 25–50 нуклеотидов, то для ДНК-полимеразы бета этот размер существенно меньший.

Необходимо также отметить, что «запуск» репарационных систем под действием ДНК-повреждающих факторов приводит в некоторых случаях к активации транскрипционной активности в клетках эукариот [18–25].

Таким образом, на основании этого краткого описания процесса репарации ядерной ДНК можно сделать вывод о том, что биохимическая характеристика ДНК-репарационных систем клетки далеко не полная и, в основном, ограничена выделением и изучением некоторых ферментов, свойства которых *in vitro* позволяют предполагать, что они могут быть частью этой ДНК-репарационной системы.

Не имея возможности более подробно остановиться на характеристике процесса репарации ДНК, приведем лишь одну из наиболее распространенных классификаций этого процесса удаления генотоксических повреждений [79]. В табл. 4.5 приведены классификация и основные харак-

теристики различных видов репарации ядерной ДНК.

В случае неэффективной репарации генотоксических повреждений ДНК, в клеточной популяции появляются клетки с измененной ДНК. Эти клетки могут удаляться из популяции в результате реализации механизма генетически запрограммированной клеточной гибели — апоптоза [90–92]. Проблема апоптоза интенсивно разрабатывается на протяжении нескольких последних десятилетий.

Гомеостаз в многоклеточном организме поддерживается не только пролиферацией и дифференцировкой клеток различных тканей, но и клеточной гибелью. В настоящее время общепризнанно существование двух различных, взаимоисключающих типов клеточной смерти — некроза и апоптоза. Если некроз известен давно, то термин «апоптоз» введен в 70-х годах прошлого века для описания процесса запрограммированной клеточной гибели, расшифрованного благодаря успехам молекулярной биологии и генетики [90; 91]. Хотя термины «запрограммированная гибель клетки» и «апоптоз» часто употребляются как си-

Таблица 4.5

**Классификация и основные виды процесса репарации ядерной ДНК [89]**

Вид (этапы) репарации ДНК	Характеристика
Эксцизионная репарация оснований ДНК	Элиминация одного нуклеотида посредством разрыва гликозидной связи, соединяющей измененное основание с сахаром — дезоксирибозой, приводит к образованию сайта в ДНК, лишённого азотистого основания, что предполагает использование для репаративного синтеза противоположной цепи ДНК в качестве матрицы
Эксцизионная репарация нуклеотидов ДНК	Удаление протяженных аддуктов из ДНК. В этот процесс вовлечены 20 белков, удаляющих до 100 нуклеотидов, ассоциированных с поврежденным участком. Процесс включает репаративный синтез ДНК с использованием в качестве матрицы противоположной (неповрежденной) цепи ДНК
Репарация неправильно спаренных нуклеотидов в ДНК	«Второй шанс» для репаративной системы, которая корректирует неправильно спаренные основания постреплицированной ДНК. В этом процессе удаляются повреждения, пропущенные в ходе выполнения двух первых этапов репарации ДНК — эксцизионной репарации оснований и нуклеотидов ДНК
Рекомбинационная разрывов	Этот процесс направлен на удаление поврежденных двунитевых разрывов и/или поперечных сшивок в цепях ДНК

нонимы, между ними существует определенное отличие. Под запрограммированной гибелью клетки понимают механизм ее элиминации из популяции, который активизируется во время формирования органов, тканей и целого организма в период эмбрионального морфогенеза. В то же время при апоптозе гибель клетки не обязательно запрограммирована [91]. И наоборот, запрограммированная гибель клетки не всегда осуществляется путем апоптоза. Поэтому, по всей видимости, многие авторы предлагают использовать термин «физиологическая гибель клетки» в качестве синонима термину «апоптоз» [92].

У взрослых особей млекопитающих апоптоз характерен как для медленно пролиферирующих, так и для постоянно обновляющихся клеток. Апоптотическая гибель клеток отмечается также в период формирования гормонозависимых органов (молочная железа или яичники), при инволюции волосяных фолликулов, реверсии молочной железы после завершения лактации и в ряде других случаев [90–92]. Кроме «физиологического апоптоза», который сопутствует естественному развитию, существует и «патологический апоптоз», ведущий к некрозу тканей и обычно завершающийся развитием воспалительного процесса. Патологический апоптоз может быть обусловлен, например, воздействием на клетки бактериальных токсинов [90–92] при участии нейтрофилов, макрофагов и лимфоцитов (физиологический апоптоз — иммунологически инертный процесс), которые необходимы не только для ликвидации поврежденных клеток, но и для разрушения бактериального патогена. Не вдаваясь в детальное описание молекулярных механизмов обоих видов апоптоза, которые можно найти в специальных руководствах [90–92], отметим лишь, что нами было установлено и доказано наличие подобного механизма элиминации клеток при генотоксическом повреждении клеток печени тетрахлорметаном [92].

#### 4.5. Фармакологические принципы защиты ядерного генома от повреждающего действия генотоксикантов

Альтернативным (экзогенным) подходом (в отличие от эндогенного — репарации ДНК и апоптоза) — механизмом «лечения» генотоксически поврежденных клеток — является фармакологическая коррекция свободнорадикальных повреждений ДНК в составе ядерного хроматина [93–106].

В последние годы резко возрос интерес фармакологов к понятиям: антиоксиданты, антиоксидантное действие лекарств, лекарства-антиоксиданты. Ранее процессам, протекающим в клетке с участием кислорода и имеющим в качестве основного «побочного действия» образование свободных радикалов, в фармакологии не уделяли должного внимания. И только в связи с надвигающейся экологической катастрофой, в особенности на территории Украины, где остро ощущаются последствия аварии на ЧАЭС, химического загрязнения вследствие неоправданного и непродуманного размещения гигантских предприятий на небольшой площади, не имеющих необходимого количества современных очистных сооружений, интенсифицировались поиски препаратов, способных защитить биосубстраты, прежде всего ядерный геном, от генотоксического действия свободных радикалов [105–111]. Подобные препараты условно могут быть названы экопротекторами [94]. В эту группу могут быть включены медикаменты, обладающие в большей или меньшей степени антиоксидантной активностью, то есть способностью тормозить образование свободных радикалов или обезвреживать их [96–104]. Оказалось, что проблема свободно-радикального повреждения клетки, известная довольно давно, стала особенно актуальной в связи с тем, что наиболее распространенные генотоксиканты (тяжелые ме-

таллы, хлор- и фосфорорганические соединения) реализуют свое генотоксическое действие через образование свободных радикалов с участием молекул кислорода, воды и липидов. Кроме того, в последние годы было выяснено, что ряд наиболее распространенных заболеваний человека, в частности патология сердечно-сосудистой системы, дыхательных путей, онкологические болезни, в своем патогенезе имеют достаточно четко очерченную свободнорадикальную фазу [107].

Вследствие этого фармпрепараты — классические антиоксиданты, — прежде всего, альфа-токоферол и его производные, находят все большее применение при лечении, помимо вышеперечисленных патологий, в стоматологии, гастроэнтерологии, офтальмологии, гериатрии [106–112]. В связи с этим фармакологи уделяют более пристальное внимание наличию антиоксидантных свойств у лекарственных препаратов. При этом оказалось, что у известных лекарств ряда фармакотерапевтических групп подобные свойства присутствуют. В частности, эти эффекты были обнаружены у блокаторов кальциевых каналов [100], многих препаратов природного происхождения, содержащих биологически активные вещества, в частности фитостероиды [101]. Один из наиболее типичных препаратов природного происхождения с явно выраженными антиоксидантными свойствами — «Мумие-Витас» [102].

Возможно, полифункциональный характер действия многих антиоксидантов типа адаптогенов, иммуномодуляторов, витаминов, ряда гормональных препаратов обусловлен именно наличием у них антиоксидантных эффектов по отношению к свободнорадикальным реакциям [103–106].

Важнейшая точка приложения действия антиоксидантов в клетке — ядерный геном [68; 106]. Решение данной научной проблемы в последние годы стало возможным благодаря успехам молекулярной биологии, биохимии, токсикологии и фармакологии. Было обнаружено, что данная биоструктура (ядерный хроматин) содер-

жит, как и биомембраны, рецепторы для связывания лекарственных препаратов. В качестве таких рецепторов могут выступать такие компоненты хроматина, как ДНК, гистоновые и негистоновые белки, липиды. Связываясь с этими рецепторными молекулами, лекарства-антиоксиданты могут оказывать на ядерный геном двойное воздействие: либо изменять процессы считывания генетической информации, либо защищать геном от химического повреждения, нормализуя свободнорадикальные процессы ПОЛ в хроматине [103]. Не исключено, что при этом данные процессы могут накладываться друг на друга. На примере классического антиоксиданта — альфа-токоферола — показано его влияние на интенсивность протекания процессов репликации и транскрипции в изолированном ядерном хроматине [99–102]. Кроме того, этот препарат при введении животным способен нормализовать процессы ПОЛ в хроматине, модифицированные в результате химического повреждения рядом генотоксикантов [98]. Известно, что значительная часть внутриклеточного альфа-токоферола связана с негистоновыми белками хроматина, что находит подтверждение в модельных исследованиях изучения взаимодействия этого препарата с компонентами хроматина [109]. Каким образом реализует альфа-токоферол свой антиоксидантный эффект в хроматине — либо защищая его лабильные элементы, прежде всего липиды, от действия свободных радикалов, либо непосредственно нейтрализуя эти радикалы на поверхности хроматина — остается неизвестным.

Взаимодействие антиоксидантов с компонентами хроматина было выявлено также и для ряда других фармпрепаратов и комплексов биологически активных веществ: «Мумие-Витас», БТК-8Л, «Кальмофил», «Флараксин» [96–111]. В результате этих исследований обнаружено, что специфичность подобного взаимодействия определяется транскрипционно активной частью хроматина, в то время как взаимодействие лекарственных препаратов с репрессированным хроматином носит неспе-

цифический характер [106]. Подобная закономерность — еще одно доказательство целенаправленного действия антиоксидантов на ядерный геном, в результате чего строго определенным образом в нем изменяется течение основных молекулярно-генетических процессов — репликации и транскрипции. Можно предположить, что эндогенные антиоксиданты (альфа-токоферол, восстановленный глутатион и ряд других) — необходимое звено в сложной цепи регуляторных элементов, контролирующих процессы реализации генетической информации в клетке. На этом основании нами был предложен перекисно-антиоксидантный механизм регуляции хроматина [72]. Обнаружение в составе хроматина небольшого количества липидов, в том числе прочно связанных с ДНК, для которых постулируются регуляторные функции, во многом объясняет подобный аспект геномотропного действия антиоксидантов.

Другое приложение механизмов действия антиоксидантов на ядерный геном — их нормализующее влияние на модифицированные под влиянием генотоксического повреждения процессы ПОЛ в хроматине. По ряду свойств (временная кинетика накопления продуктов реакций ПОЛ, чувствительность к активаторам и ингибиторам) процессы ПОЛ в хроматине отличаются от аналогичных процессов в биомембранах. Подобные особенности действия антиоксидантов необходимо учитывать при выборе препаратов, защищающих ядерный хроматин от генотоксического воздействия.

Наши исследования, посвященные решению этой проблемы, показали, что существует зависимость между антиоксидантной активностью препарата по отношению к процессам ПОЛ в хроматине и величиной геномозащитного эффекта. С этой целью был изучен ряд препаратов, обладающих различной антиоксидантной активностью в хроматине: препараты природного происхождения с высокой антиоксидантной активностью («Мумие-Витас», настойки розы дамасской и репейника), сред-

ней (ацетилсалициловая кислота) и отсутствием таковой («Нормазе», нифедипин). Было обнаружено, что, несмотря на то, что все испытанные препараты в той или иной степени взаимодействуют с хроматином, геномозащитная активность в условиях генотоксического действия тетрахлорметана присуща только тем из них, которые обладают антиоксидантным эффектом на реакции ПОЛ в хроматине. При этом величина генопротекторного эффекта определенным образом зависит от степени антиоксидантной активности препарата [106].

Нами были также изучены генопротекторные свойства ряда фармакологических препаратов в условиях генотоксического действия хлорофоса [83; 84]. Для коррекции структурно-функционального статуса хроматина в условиях интоксикации животных фосфорорганическим пестицидом хлорофосом были испытаны известные фармакологические препараты — верапамил (блокатор тока ионов кальция) и атропин (М-холинолитик). Было установлено, что эти препараты оказывают разное влияние на ядерный хроматин в условиях его повреждения хлорофосом. Если атропину была присуща довольно выраженная генопротекторная активность с частичной коррекцией структурно-функциональных характеристик хроматина, то верапамил усиливал генотоксический эффект хлорофоса. Особенно важным было обнаружение прооксидантного действия на процессы ПОЛ в хроматине у верапамила и антиоксидантного — у атропина. Это подтверждает предположение о том, что один из основных механизмов генопротекторного действия изученных препаратов — антиоксидантное влияние на процессы ПОЛ в хроматине.

В последние годы нами проведены исследования, в которых были выявлены перспективные соединения — генопротекторы среди новых производных пиридинкарбоновых кислот, хиनाзолина, а также некоторых других физиологически активных веществ. Перспективным направлением для целенаправленного скрининга новых антиоксидантов с генопротектор-

ным механизмом действия оказалось выявление коррелятивных соотношений между антирадикальной активностью вновь синтезированных соединений и их квантово-химическими свойствами [111].

Таким образом, проведенные исследования позволили установить перспективность разработки генопротекторных фармакологических средств на основе препаратов с антиоксидантным механизмом действия. Взаимодействие подобных препаратов с основными компонентами хроматина (ДНК, белками, липидами) может стать необходимой предпосылкой реализации их антиоксидантного эффекта как вследствие профилактики окисления хроматин-связанных липидов, так и связывания генотоксического агента на поверхности хроматина. Нельзя также исключить возможность защиты компонентов хроматина от повреждения в результате связывания генотоксиканта с препаратом, а также активации препаратом (непосредственно или опосредованно) защитных репаративных систем хроматина [95–111].

Итак, приведенные данные литературы и результаты собственных исследований о состоянии и перспективах развития генетической токсикологии позволяют, с одной стороны, сделать вывод о явно недостаточном потенциале этой молодой, бурно развивающейся науки для решения стоящих перед ней неотложных задач. Прежде всего, это касается разработки перспективных методов профилактики и лечения генетически обусловленных патологий, вызванных повреждающим действием токсикантов, тропных к ядерному геному. С другой стороны, нужно отметить те явно оптимистические сдвиги, осуществленные в развитии этой науки в последние годы, в связи с внедрением в ее научный потенциал новых подходов и методов молекулярно-биологических и молекулярно-генетических исследований.

### **Список литературы**

1. *Тези доповідей II з'їзду токсикологів України.* — К., 2004. — 196 с.

2. *Трахтенберг И. М., Проданчук Н. Г., Левицкий Е. Л.* Приоритетные проблемы токсикологии (К итогам I съезда токсикологов Украины) // *Токсикол. вестник.* — 2002. — № 3. — С. 34-39.

3. *Проданчук Н. Г., Левицкий Е. Л.* Приоритетные проблемы токсикологии (К итогам I съезда токсикологов Украины) // *Совр. пробл. токсикол.* — 2001. — № 4. — С. 85-88.

4. *Трахтенберг И. М.* Токсикология в реалиях времени // *Здоров'я України.* — № 1. — 2004. — С. 28-29.

5. *Тези доповідей VI міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні проблеми токсикології. Безпека життєдіяльності людини», присвяченої 100-річчю з дня народження Льва Івановича Медведя.* 1-3 жовтня 2005 р. — К., 2005. — 134 с.

6. *Трахтенберг И. М.* Книга о ядах и отравлениях (очерки токсикологии). — К.: *Наук. думка*, 2000. — 368 с.

7. *Левицкий Е. Л.* Наука про отрути на зламі тисячоліть // *Вісник фармакол. та фармації.* — 2001. — № 5–6. — С. 12-14.

8. *Левицкий Е. Л.* З чим прийшли у нове століття? Від з'їзду до з'їзду // *Вісник фармакол. та фармації.* — 2001. — № 9. — С. 10-15.

9. *Левицкий Е. Л.* Пріоритетні проблеми лікарської токсикології // *Вісник фармакол. та фармації.* — 2001. — № 10. — С. 37-39.

10. *Principles and Methods of Toxicology* / Ed. by A. Wallace Hayes. — 4th ed. — 1887 p.

11. *Левицкий Е. Л., Трахтенберг И. М.* Проблема генотоксичности на VIII Международном конгрессе токсикологов // *Совр. проб. токсикол.* — 1999. — № 1. — С. 58-61.

12. *Symposium: "Current and Future Challenges in Environmental Health. Development of Toxicology and Food Safety in Eastern and Central Europe".* May 2-5, 2006. Kyiv, Ukraine. — 76 p.

13. *Genetic Toxicology*: August 10–15, 2003, Queen's College Oxford, UK.
14. *Shayne C. Gad*. Drug safety evaluation. — A John Wiley & Sons, Inc., N.-Y., 2002. — 1007 p.
15. *A Textbook of Modern Toxicology*. Third edition / Ed. Ernest Hodgson. — John Wiley & Sons, Inc., 2004. — 557 p.
16. *Уотсон Дж.* Молекулярная биология гена. — М.: Мир, 1978. — 720 с.
17. *Корнберг А.* Синтез ДНК. — М.: Мир, 1977. — 359 с.
18. *Левицкий Е. Л.* Механизмы и возрастные особенности репликации ядерной ДНК // Укр. биохим. журнал. — 1984. — Т. 56, № 4. — С. 460–472.
19. *Льюин Б.* Гены. — М.: Мир, 1987. — 544 с.
20. *Гаузе Г. Г.* Митохондриальная ДНК. — М.: Наука, 1977. — 278 с.
21. *Хемс Н., Хиггинс С.* Транскрипция и трансляция. Методы. — М.: Мир, 1987. — 399 с.
22. *Храпунов С. Н., Драган А. И., Бердышев Г. Д.* Структура и функции хроматина. — К.: Выща шк., 1987. — 167 с.
23. *Synthesis of human insulin gene V*. Enzymatic assembly, cloning and characterization of the human proinsulin DNA / R. Brousseau, R. Scarpulla, W. Sung et al. // *Gene*. — 1982. — Vol. 17. — P. 279-289.
24. *Kleinhofs A., Behki R.* Prospects for plant genome modification by nonconventional methods // *Ann. Rev. Genet.* — 1977. — Vol. 11. — P. 79-101.
25. *Кучеренко Н. Е., Цудзевич Б. А., Блюм Я. Б.* Биохимическая модель регуляции активности хроматина. — К.: Наук. думка, 1983. — 248 с.
26. *Босток К., Самнер Э.* Хромосома эукариотической клетки. — М.: Мир, 1981. — 600 с.
27. *Baserga R., Nicolini C.* Chromatin structure and function in proliferating cells // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1976. — Vol. 458, N 1. — P. 129-134.
28. *Збарский И. Б.* Организация клеточного ядра. — М.: Медицина, 1988. — 368 с.
29. *Rosenthal A. L., Lacks S. A.* Detection of histones by DNA binding. Ability after polyacrilamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate // *J. Biol. Chemistry.* — 1978. — Vol. 253, N 24. — P. 8674-8676.
30. *Биохимическая характеристика фракций транскрипционно активного и репрессированного хроматина печени крыс* // Е. Л. Левицкий, Ю. И. Губский, В. Н. Чабаный и др. // Биополимеры и клетка. — 1993. — Т. 9, № 6. — С. 13-21.
31. *Левицкий Е. Л., Губский Ю. И.* Регуляторное влияние ионов кальция и циклических нуклеотидов на синтез ДНК в клетках млекопитающих // Биохимия животных и человека. — К.: Наук. думка, 1990. — № 14. — С. 33-44.
32. *Гольдштейн Б. И.* Клеточный митоз и регуляция биосинтеза ДНК в клетке // Вопросы биосинтеза, структуры и функции биополимеров. — К.: Наук. думка, 1967. — С. 84-105.
33. *О денатурации и дефрагментации дезоксирибонуклеиновой кислоты в клетках с интенсивной митотической активностью в зависимости от возраста* / Б. И. Гольдштейн, В. В. Герасимова, С. Г. Рудь и др. // Механизмы старения. — К.: Гос. мед. из-во УССР, 1963. — С. 31-42.
34. *Гольдштейн Б. И.* Возрастные изменения молекулярных структур клетки // Основы геронтологии. — М.: Медицина, 1969. — С. 38-49.
35. *Гратаров А. М., Миркин С. М.* Влияние сверхспирализации ДНК на основные генетические процессы у прокариот // Молекул. биол. — 1980. — Т. 14, № 1. — С. 8-34.
36. *Leninger T. Yu.* The Principles of Biochemistry. — 2004. — 1119 p.
37. *Изменение структурного состояния фракционированного хроматина печени при активации перекисного окисления липидов* / Ю. И. Губский, Е. Л. Левицкий, Р. Г. Примак, А. Н. Величко // Биополимеры и клетка. — 1991. — Т. 7, № 3. — С. 89-94.
38. *De Lange T.* Activation of telomerase in human tumor // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 1994. — Vol. 91. — P. 2882-2885.
39. *Weintraub H.* The assembly of new replicated DNA into chromatin // *Cold*

- Spring Harbor Symp. — 1974. — Vol. 38. — P. 247-256.
40. *Weintraub H.* DNA replication and construction chromosome // *Mech. Reg. DNA Replicat.* — 1974. — N 1. — P. 327-337.
41. *Weintraub H., Graudine M.* Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation // *Science.* — 1976. — Vol. 193, N 6. — P. 848-856.
42. *Сычева Л. П., Журков В. С., Рахманин Ю. А.* Новый подход к диагностике мутагенных и канцерогенных свойств факторов окружающей среды // *Гигиена и санитария.* — 2003. — № 6. — С. 87-90.
43. *Изучение* цитогенетического и цитотоксического действия диоксида азота полиорганним микроядерным методом / *Л. П. Сычева, С. М. Шереметьева, М. А. Коваленко и др.* // *Токсикол. вестник.* — 2006. — № 4. — С. 23-27.
44. *Левицкий Е. Л., Губский Ю. И.* Свободнорадикальные повреждения ядерного генетического аппарата клетки // *Укр. биохим. журнал.* — 1994. — Т. 66, № 4. — С. 18-30.
45. *Costa D. L.* Air pollution // *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons.* 6th ed. / *C. D. Klaassen, ed.* — N.-Y.: McGraw-Hill, 2001. — P. 979-1012.
46. *Air Pollution and Health* / *S. T. Holgate, J. M. Samet, H. Koren, R. Maynard, eds.* — San Diego: Academic Press, 1999.
47. *Abel P. D., ed.* *Water Pollution Biology.* — London: Taylor and Francis, 1996.
48. *Handbook of Ecotoxicology* / *D. J. Hoffman, B. A. Rattner, G. A. Burton, J. Cairns, eds.* — 2nd ed. — Boca Raton: Lewis, 2002.
49. *Pesticides in Surface Waters* / *Eds.: S. J. Larson, P. D. Capel, M. S. Majewski.* — Chelsea, MI: Ann Arbor Press, 1998.
50. *Thorne P. S.* Occupational toxicology // *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons.* — 6th ed. / *C. D. Klaassen, ed.* — N.-Y.: McGraw-Hill. — 2001, P. 1123-1140.
51. *Doull J.* Recommended limits for occupational exposure to chemicals. *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons.* — 6th ed. / *C. D. Klaassen, ed.* — N.-Y.: McGraw-Hill, 2001. — P. 1155-1176.
52. *Ames B. N.* Dietary carcinogens and anti-carcinogens // *Clin. Toxicol.* — 1984. — A 22. — P. 291-301.
53. *Ames B. N.* Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer // *Science.* — 1979. — Vol. 204. — P. 587-593.
54. *Carcinogens* are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection / *B. N. Ames, W. E. Durston, E. Yamasaki, F. D. Lee* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1973. — Vol. 70. — 2281 p.
55. *Ames B. N., Kammen H. L., Yamasaki E.* Hair dyes are mutagenic: Identification of a variety of mutagenic ingredients // *Proc. Nat. Acad. Sci.* — 1975. — USA, Vol. 72. — P. 2423-2427.
56. *Ames B. N., McCann J., Yamasaki E.* Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella mammalian microsome mutagenicity test // *Mutation Res.* — 1975. — Vol. 31. — P. 347-364.
57. *Barbacid M.* Mutagens, oncogenes and cancer // *Oncogenes and Growth Factors* / *Ed. by R. A. Bradshaw and S. Prentis.* — Elsevier, Amsterdam, 1987. — P. 90-99.
58. *Принципи* фармакологічного захисту ядерного геному // *Ю. І. Губський, Є. Л. Левицький, Р. Г. Примак та ін.* // *Ліки.* — 1994. — № 4. — С. 15-19.
59. *Genotoxicity* of complex PAH mixtures in animals and humans / *K. C. Donnelly, T. D. Phillips, L. Cizmas et al.* // *Symposium: "Current and Future Challenges in Environmental Health. Development of Toxicology and Food Safety in Eastern and Central Europe".* May 2-5, 2006. Kyiv, Ukraine. — P. 34-35.
60. *Фракції* транскрипційно активного та репресованого хроматину клітин печінки як експериментальна модель вивчення регенеративної та антиоксидантної активностей ліків / *Є. Л. Левицький, Р. Г. Примак, Г. Г. Горюшко та ін.* // *Ліки.* — 1997. — № 5. — С. 78-81.
61. *Biomarkers* of free radical damage applications in experimental animals and in humans / *L. Loeckie, H. R. Zwart, H. N. John et al.* // *Free Radical Biology & Medicine.* — 1999. — Vol. 26, N 1/2. — P. 202-226.

62. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л. Механизмы перекисного окисления липидов фракций хроматина печени крыс // Биополимеры и клетка. — 1993. — Т. 9, № 5. — С. 34-43.

63. Губський Ю. І. ДНК ядерного хроматину: вільнорадикальні механізми хімічного пошкодження // Мед. хімія. — Т. 1, № 1. — С. 7-14.

64. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Волков Г. Л. Жирнокислотный состав фракций хроматина печени крыс в условиях стимуляции перекисного окисления липидов // Укр. биохим. журнал. — 1991. — Т. 63, № 1. — С. 87-91.

65. Конформационные характеристики и упаковка эндогенных липидов фракций транскрипционно активного и репрессированного хроматина / Ю. И. Губский, Е. Л. Левицкий, Р. Г. Примаков и др. // Укр. биохим. журнал. — 1991. — Т. 63, № 2. — С. 83-89.

66. Kadiiska M. Products of oxidation as measurable indicators of oxidative stress: validation of biomarkers from rodent CCL4 and ozone exposure // Current and Future Challenges in Environmental Health, Toxicology, in Eastern and Food Safety in Eastern and Central Europe. May 2-5, 2006. Kyiv, Ukraine. — 40 p.

67. Роль активных форм кислорода в патогенезе синдрома пренатального стресса / Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев, С. В. Павлов и др. // Совр. пробл. токсикол. — 2006. — № 2. — С. 37-43.

68. Губський Ю. І., Левицький Є. Л. Деякі теоретичні підходи до створення антиоксидантів — мембрано- та генопротекторів // Тези доповідей III Національного з'їзду фармакологів України, 17-20 жовтня 2006 року, Одеса. — С. 49-50.

70. Механизмы развития когнитивного дефицита под действием кислородных радикалов в условиях стресса / Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев, Е. Л. Левицкий и др. // Совр. пробл. токсикол. — 2006. — № 3 — С. 8-12.

71. Левицький Е. Л., Губський Ю. І. Свободнорадикальні пошкодження ядерного

генетического аппарата клетки // Укр. биохим. журн. — 1994. — Т. 66, № 4. — С. 18-30.

72. Изучение компонентов фракций хроматина печени крыс методами флуоресцентного зондирования / Ю. И. Губский, Р. Г. Примаков, А. Г. Горюшко, Е. Л. Левицкий // Биополимеры и клетка. — 1994. — Т. 10, № 6. — С. 92-97.

73. Губський Ю. І., Левицький Є. Л. Перекисно-антиоксидантний механізм регуляції активності хроматину // Журн. АМН України. — 1997. — Т. 3, № 2. — С. 275-281.

74. Силкина Н. И., Микряков В. Р. Состояние процессов перекисного окисления липидов и антирадикальной системы тканей рыб при воздействии фенола и нафталина // Токсикол. вестник. — 2006. — № 3. — С. 19-23.

75. Левицький Е. Л., Марченко А. Н., Губський Ю. І. Механізми генотоксичності фосфорорганічних сполучень // Совр. пробл. токсикологии. — 1998. — № 1. — С. 47-50.

76. Finkel T. I. Oxygen radical and signaling // Cell Regulation. — 2006. — P. 248-253.

77. Роль метаболічного статусу організму в восприимчивости к токсическому и мутагенному воздействию полициклических ароматических углеводов / В. А. Суханов, А. Н. Саприн, Е. В. Калинина и др. // Токсикол. вестник. — 2006. — № 1. — С. 6-11.

78. Губский Ю. И. Регуляция перекисного окисления липидов в биологических мембранах // Биохимия животных и человека. — К.: Наук. думка, 1978. — № 2. — С. 72-84.

79. Перекисное окисление липидов и полимеразные активности фракций хроматина печени крыс при старении / Е. Л. Левицкий, Ю. И. Губский, Н. Б. Гольдштейн, А. Я. Литошенко // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1989. — Т. 57, № 6. — С. 693-695.

80. Yakes F. M., Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in

human cells following oxidative stress // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1997. — Vol. 94. — P. 514-519.

81. DNA oxidation matters: The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine / Н. J. Helbock, K. B. Beckman, M. K. Shigenaga et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1998. — Vol. 95. — P. 288-293.

82. Трахтенберг И. М., Колесников В. С., Луковенко В. П. Тяжелые металлы во внешней среде: современные гигиенические и токсикологические аспекты. — Минск: Наука і техника, 1984. — 285 с.

83. Влияние хлористого кадмия на ДНК, РНК-полимеразную активность и перекисное окисление липидов хроматина печени крыс / Ю. И. Губский, Е. Л. Левицкий, Л. К. Ленчевская, И. Е. Вистунова // Укр. биохим. журнал. — 1993. — Т. 65, № 5. — С. 112-115.

84. Молекулярные механизмы генотоксического действия хлорофоса. Исследования in vivo и in vitro / Е. Л. Левицкий, Ю. И. Губский, Р. Г. Примак и др. // Биополимеры и клетка. — 1996. — Т. 12, № 3. — С. 77-90.

85. Левицкий Е. Л., Марченко А. Н., Губский Ю. И. Механизмы генотоксичности фосфорорганических соединений // Совр. пробл. токсикологии. — 1998. — № 1. — С. 47-50.

86. Губский Ю. И. Химическое повреждение печени. — К., 1987.

87. Молекулярные механизмы повреждения фракционированного хроматина печени тетрахлорметаном / Ю. И. Губский, Е. Л. Левицкий, В. А. Жила, А. Я. Литошенко // Вопр. мед. химии. — 1992. — Т. 38, № 3. — С. 54-58.

88. Тимченко О. І., Сердюк А. М., Омельченко Е. М. Генофонд і здоров'я населення: значення шлюбних міграцій. — К., 2002. — 80 с.

89. Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології / За ред. І. Р. Бариліака // Збірник наукових праць. — Вип. 6 (32). — К.; Луганськ; Харків, 2000.

90. Principles and Methods of Toxicology / Ed. by A. W. Hayes. — Fourth Edition Copyright. — Taylor & Francis, 2001. — 1887 p.

91. Фильченков А. А., Стойка Р. С. Апоптоз (физиологическая гибель клетки). — К., 1995. — 25 с.

92. Фильченков А. А., Стойка Р. С. Апоптоз и рак. — К.: Морион, 1999. — 184 с.

93. Генотекторный эффект препаратов на основе экидистероидов при отравлении крыс тетрахлорметаном и хлорофосом / В. Н. Чабанный, Е. Л. Левицкий, Ю. И. Губский и др. // Укр. биохим. журнал. — 1994. — Т. 66, № 5. — С. 67-77.

94. Левицкий Е. Л. Генетические последствия лекарственной терапии // Журн. практ. врача. — 1996. — № 1. — С. 31-32.

95. Левицкий Е. Л. Экопротекторы в клинической практике // Журн. практ. врача. — 1996. — № 1. — С. 36-37.

96. Левицкий Е. Л., Примак Р. Г. Проможливі генетичні наслідки застосування ліків // Фармакол. вісник. — 1996. — № 4. — С. 52-53.

97. Левицкий Е. Л. Антиоксиданты и питание // Мед. вести. — 1998. — № 2. — С. 16-17.

98. Коррекция поражений ядерного генома антиоксидантами в условиях токсического повреждения печени / Е. Л. Левицкий, Ю. И. Губский, А. Н. Марченко и др. // Совр. пробл. токсикологии. — 1998. — № 2. — С. 40-46.

99. Левицкий Е. Л. Основні напрямки розвитку сучасної фітофармакології // Фармакол. вісник. — 1998. — № 5. — С. 43-50.

100. Губский Ю. И., Левицкий Е. Л. Генном, метаболизм, болезни, лекарства // Лікування та діагностика. — 2000-2001. — № 4-1. — С. 23-29.

101. Лукьянчук В. Д., Савченкова Л. В. Новое в механизмах действия блокаторов кальциевых каналов // Фарм. вісник. — 1996. — № 2. — С. 30.

102. Защитное по отношению к хроматину действие биологически активного комплекса БТК-8Л в условиях интоксикации тетрахлорметаном / Е. Л. Левицкий, Ю. И. Губский, Р. Г. Примак и др. // Укр. биохим. журнал. — 1996. — Т. 68, № 5. — С. 76-84.

103. Фармакологічні ефекти та механізм дії препарату «Мумійо» / С. Г. Бурчинський, Є. Л. Левицький, Б. Г. Корнієнко,

Ю. И. Губський // Ліки. — 1995. — № 5. — С. 103-114.

104. *Коррекция* поражений ядерного генома антиоксидантами в условиях токсического повреждения печени / Е. Л. Левицкий, Ю. И. Губский, А. Н. Марченко и др. // Совр. пробл. токсикол. — 1998. — № 2. — С. 40-46.

105. *Левицький Є. Л.* Основні напрямки розвитку сучасної фітофармакології // Фармакол. вісник. — 1998. — № 5. — С. 43-50.

106. *Левицький Є. Л.* Пріоритетні проблеми лікарської токсикології // Вісник фармакології та фармації. — 2001. — № 10. — С. 37-39.

107. *Левицький Е. Л.* Пути и механизмы реализации антиоксидантного эффекта в клетке // Фармакол. вісник. — 1998. — № 2. — С. 68-71.

108. *Губский Ю. И., Левицкий Е. Л., Примак Р. Г.* Изменение структурного состояния фракционированного хроматина печени при Е-гиповитаминозе // Укр. биохим. журнал. — 1992. — Т. 64, № 5. — С. 89-91.

109. *О возможной* роли альфа-токоферола в функционировании хроматина и ядерного матрикса печени крыс / Г. В. Донченко, Г. В. Петрова, А. А. Капралов и др. // Докл. АН УССР, сер. Б. — 1990. — № 3. — С. 60-62.

110. *Изменения* белкового, липидного состава, ДНК- и РНК-полимеразной активности фракций хроматина и ядерного матрикса печени крыс в условиях Е-гиповитаминоза / Ю. И. Губский, Е. Л. Левицкий, В. Н. Чабанный и др. // Укр. биохим. журнал. — 1990. — Т. 62, № 6. — С. 22-30.

111. *Капралов А. А., Петрова Г. В., Левицкий Е. Л.* Локализация альфа-токоферола в составе клеточного ядра и его возможные функции // Труды конф. «Теоретические и прикладные аспекты молекулярной биологии». — Деп. в ВИНТИ. — № 816-В90. — С. 197-214.

112. *Взаємозв'язок* антирадикальної активності із квантовохімічними та іншими параметрами сірковмісних хіназолінів / Ю. І. Губський, В. О. Нікітін, С. І. Коваленко та ін. // Мед. хімія. — 2005. — Т. 7, № 3. — С. 49-53.

## Глава 5. Клиническая онкогенетика

---

---

Relationships of achievements in genetics and development of oncogenetics and clinical oncology are shown from historical perspective. The role of oncogenes and antioncogenes in the tumour growth origin, mechanisms to detect genes participating in this process for tumours of different localization are examined in detail. The examples demonstrating implementations of oncogenetic achievements in clinical practice and results of epidemiologic research of oncologic pathology in Ukraine are brought.

---

Злокачественные новообразования — важнейшая социально-медицинская проблема современности. Ее актуальность аргументируется, во-первых, ростом онкологической заболеваемости не только в Украине, но и во всем мире, во-вторых, поздней диагностикой опухолевого процесса (у 25–30 % больных опухолевый процесс выявляется в запущенных стадиях), что не позволяет проводить радикальное лечение и приводит к инвалидности и преждевременной смерти больных [1–3]. По данным Национального канцер-регистра Института онкологии АМН Украины, в нашей стране ежегодно злокачественные новообразования регистрируются у 160 тыс. больных, и каждый год умирает от рака около 100 тыс. человек. Наибольшую тревогу вызывает тот факт, что 47 % заболевших — это лица трудоспособного возраста. В структуре онкологической заболеваемости первые ранговые места принадлежат у женщин раку молочной железы, кожи, тела и шейки матки, у мужчин — раку легкого, желудка, кожи и предстательной железы [2].

Природа злокачественного роста считается одной из самых загадочных проблем биологии и медицины. Первые попытки понять ее относятся к 1901 г., когда Гуго де Фриз впервые высказал предположение, что рак возникает в результате изменений наследственного материала клеток. В дальнейшем немецкий эмбриолог Бове-

ри (1914) впервые отметил, что в основе малигнизации лежат необратимые изменения, выражающиеся в виде различных нарушений числа и структуры хромосом в соматических клетках. Уже на начальных этапах фундаментальных исследований изменчивости хромосом при опухолевом росте, проведенных многими исследователями в различных странах мира, было установлено, что хромосомные нарушения являются важной характеристикой опухолевой клетки и могут представлять видимые проявления начальных изменений при раке, и быть как следствием, так и причиной развития рака. Вместе с тем хромосомные изменения могут быть побочным, независимым феноменом (эпифеноменом), который лишь сопровождает злокачественную трансформацию, но не выступает ее инициатором. Было также постулировано, что хромосомные изменения могут отражать генетическую нестабильность герминальных и соматических клеток и поэтому являются predisposing фактором для развития малигнизации [4–8].

Последующие периоды развития генетики были связаны с формированием представлений о дискретных единицах наследственности — генах, разрабатывались также методы изучения хромосом, что позволило в 1956 г. установить их точное число в соматических клетках человека. Это стало переломным моментом в изуче-

нии генетических основ злокачественного роста и фундаментальной основой для развития нового направления — генетики опухолевого роста.

В течение последних 15 лет открытия молекулярной биологии совершили подлинную революцию в представлениях о природе злокачественного роста [9–13]. Наиболее важные достижения — расшифровка генома и разработка новых молекулярно-биологических технологий, позволяющих не только констатировать мутации генов, но и определять функциональное состояние генома, то есть его экспрессионный профиль. Это оказалось наиболее перспективным для онкологии, поскольку особенности структуры и функции генома, молекулярная и протеомная характеристика опухолевых клеток определяют их биологические свойства, степень злокачественности, инвазивные и метастатические потенции и, в целом, клиническое течение опухолевого процесса [6, 14–18].

Согласно современным представлениям о биологии злокачественного роста, злокачественная трансформация рассматривается как болезнь генома, а развитие опухоли — это результат сложного и многоэтапного процесса накопления структурных и функциональных эффектов генов [11, 19, 20]. К процессу роста опухоли можно приложить законы генетики, открытые Грегором Менделем — изменчивость и наследственность (законы единообразия, расщепления и независимого комбинирования).

Не детализируя структуру и функцию хромосом, локализацию генов и характеристику кодируемых ими белков, то есть особенности функционирования генома нормальной клетки, все же нужно отметить неоднородность функции генов. Различают структурные гены (регулируют синтез белка), летальные гены (ведут к смерти клетки), мутабельные гены (подвержены частым мутациям), мутаторные гены (повышают скорость мутаций в других генах), гены-супрессоры (подавляют экспрессию других генов), гены-модуляторы (способствуют распространению опухоли

в организме) — и все они могут быть рецессивными или доминантными.

Гены, непосредственно вовлеченные в онкогенез, делят на онкогены и антионкогены (гены-супрессоры опухолевого роста) [21; 22]. Онкогены представляют собой активированные протоонкогены — нормальные клеточные гены, необходимые для осуществления клеткой ее основных функций. Они определяются в норме, участвуя в передаче регуляторных сигналов к конкретным генам, контролирующим дифференцировку, пролиферацию и запрограммированную гибель клеток (апоптоз). Среди продуктов протоонкогенов выделяют факторы роста и их рецепторы, факторы транскрипции, белки, регулирующие пролиферацию, апоптоз и т. д. [23–26]. С этих позиций, протоонкогены выступают позитивными регуляторами основных функций клеток. Изменение функции этих генов способствует усилению пролиферации, нарушению процессов дифференцировки и апоптоза, что лежит в основе опухолевого роста. Экспрессия генов-супрессоров (антионкогенов) направлена на синтез белков, сдерживающих процессы пролиферации и дедифференцировки клеток, то есть является негативным регулятором основных функций клеток [27–29].

В. Vogelstein и К. W. Kinzler [30] делят гены-супрессоры опухолевого роста на две большие группы — гены-хранители клеточного цикла (gatekeepers) и гены общего контроля (caretakers) и соответственно выделяют два разных пути малигнизации (gatekeeper pathway и caretaker pathway). Экспрессия генов-хранителей клеточного цикла направлена на угнетение процессов пролиферации и опухолевой прогрессии. Наследственная мутация в генах-хранителях клеточного цикла или в генах общего контроля предрасполагает к развитию неоплазии, но для ее развития необходимы дополнительные мутации. В случаях gatekeeper-пути требуется лишь одна дополнительная мутация для развития опухоли, а в случаях caretaker-пути — большее их количество, так как мутации генов общего контроля приводят к нестабильнос-

ти генома и увеличению частоты мутаций в других генах, в том числе и генах-хранителях клеточного цикла. Из этого следует, что gatekeeper-путь злокачественной трансформации оказывается короче.

В семейных случаях развития рака мутация в одном из аллелей гена общего контроля происходит в герминальных клетках и может быть унаследована от родителей, то есть в организме с такой мутацией уже существует предрасположенность к возникновению других мутаций. Для инициации опухолевого процесса требуется соматическая мутация второго аллеля, а также инактивация обоих аллелей какого-либо гена-хранителя клеточного цикла [31; 32].

Онкогены определены почти во всех хромосомах и располагаются наиболее часто в ломких (*fragile* – хрупких) участках хромосом или вблизи них [33]. Одни и те же онкогены экспрессируются во многих опухолях, и наоборот, в опухолях одного геноза экспрессируются разные онкогены [34]. Изменение функции одних онкогенов играет важную роль на начальных этапах малигнизации, других – на этапах прогрессии опухолевого процесса и метастазирования [30; 35; 36]. Это свидетельствует

о кооперативной экспрессии генов, их взаимосвязи и множестве сигнальных путей, характерных для каждого этапа развития опухоли.

Активация протоонкогенов происходит вследствие амплификаций, точечных мутаций генов, хромосомных мутаций (делеций, дупликаций, инверсий, транслокаций) и геномных мутаций – анеуплоидии, полиплоидии, гетероплоидии (табл. 5.1). Увеличение копий генов при амплификации служит одним из признаков генетической нестабильности, которая определяет селективные преимущества опухолевой клетки. Генная амплификация редко наблюдается в неизменной хромосоме, чаще – в aberrантных хромосомах или в гомогенно окрашенных областях хромосом (*homogeneously staining regions* – HSR) или в удвоенных мелких хромосомах (*double minute chromosomes* – DM). Некоторые примеры амплификации онкогенов в опухолях представлены в табл. 5.2.

В здоровом организме человека мутации в клетках происходят с частотой от 1 на 100 тыс до 1 на 1 млн клеток. Доказано, что чем больше в хромосоме участков, в которых может произойти мутация, тем

Таблица 5.1

**Структурные изменения протоонкогенов в опухолях разного геноза [37]**

Протоонкогены	Тип структурных изменений	Опухоль
<i>Abl</i>	Транслокация	Хронический миелоидный лейкоз
<i>ErbB1</i>	Амплификация	Плоскоклеточный рак легкого
<i>ErbB2/neu</i>	Амплификация Амплификация Амплификация Точечные мутации	Рак молочной железы Рак яичника Рак желудка Рак яичника
<i>Gsp</i>	Точечные мутации Точечные мутации	Аденома гипофиза Рак щитовидной железы
<i>Myc</i>	Транслокация Амплификация Амплификация Амплификация	Лимфома Беркитта Рак легкого Рак молочной железы Рак шейки матки
<i>H-ras</i>	Точечные мутации Точечные мутации Точечные мутации	Рак толстой кишки Рак поджелудочной железы Меланома

Таблица 5.2

## Примеры амплификации онкогенов в опухолях разного генеза [24]

Опухоль	Амплифицированный ген	Локус в хромосоме
Рак яичника	<i>AKT2</i>	19q13
Рак молочной железы	<i>FGFR1</i>	8p12
Рак молочной железы	<i>FGFR2</i>	10q25
Рак молочной железы, рак яичника	<i>ERBB2</i>	17q11
Нейробластома	<i>MYCN</i>	2p24
Колоректальный рак	<i>HRAS</i>	11p15
Рак желудка, рак толстой кишки	<i>KRAS</i>	12p13
Саркома	<i>MDM2</i>	12q14

больше вероятность ее возникновения. В хромосомах, имеющих одну мутацию, повторная возникает быстрее, то есть генотип с какой-то мутацией более подвержен возникновению новых мутаций под влиянием различных факторов. При этом может наблюдаться плейотропный эффект гена, реализующийся в различных фенотипических проявлениях от одной генетической причины. С другой стороны, возможно развитие одного фенотипического проявления болезни от влияния многих причин (мультилокусное наследование) [38].

Один и тот же тип мутаций встречается с разной частотой в опухолях разного генеза (табл. 5.3, см. табл. 5.2). В каждой опухоли можно встретить все типы указанных мутаций, которые в своей совокупности определяют ее злокачественный потенциал. Чем больше в клетке произошло мутационных событий, тем больше в ней структурных aberrаций и тем злокачественнее опухолевый фенотип и агрессивнее опухолевый процесс [39]. Что касается специфических для опухолей хромосомных aberrаций, то последние определяют лишь при некоторых неопластических

процессах и не всегда постоянно — хронический миелоидный лейкоз (Ph-хромосома), ретинобластома (3q14), опухоль Вильмса (11p13). Часто при раке разных локализаций наблюдается делеция в области 3p21.3.

Существенную роль в процессе озлокачествления клеток играют и эпигенетические изменения, при которых первичная структура белка не меняется, происходит лишь репрессия гена («выключение»), ведущая к его «молчанию», или дерепрессия гена («включение») под влиянием каких-либо факторов или воздействий [40]. Эти изменения обратимы и могут возникать одновременно во многих клетках. Показано, что при высокой активности ферментов метилирования повреждения ДНК восстанавливаются наиболее полно, и цитогенетические изменения появляются реже.

К таким эпигенетическим событиям и молекулярным регуляторам экспрессии генов относится метилирование ДНК промоторной области генов-супрессоров, которые располагаются в CpG-островках [41]. Этот процесс представляет собой один из механизмов инактивации одного или нескольких генов-супрессоров, наблюдаемой с разной частотой во многих опухолях (табл. 5.4). Так, в 62 % спорадических эндокринных опухолей поджелудочной железы отмечается гиперметилирова-

Таблица 5.3

## Транслокации хромосом клеток опухолей разного генеза [37]

Опухоль	Транслокации
Рак молочной железы	T(1)(q21-23)
Рабдомиосаркома	T(2;13)(q35-37)
Злокачественная гистиоцитома	T(2;5)(p23; q35)
Глиома	T(19)(q13)
Саркома Юинга	T(11;22)(q24; q12)
Липосаркома	T(12;16)(q13; p11)
Рак яичника	T(6;14)(q21; q24)
Рак почки	T(3;8)(p21; q24)
Хондросаркома	T(9;22)(q22; q11)

ние промоторного участка гена TIMP-3 (ген тканевого ингибирования металлопротеиназ), что ведет к нарушению экспрессии этого гена как на начальных этапах опухолевого роста, так и в процессе метастазирования.

Подтверждением роли метилирования генов в развитии опухолевого роста служат результаты изучения уровня метилирования CpG-островков гена-супрессора опухолевого роста *RASSF1A* в опухолевых клетках почки, молочной железы и яичника у больных московской популяции. Частота метилирования этого гена колеблется от 59 до 86 % (по данным ПЦР). При этом отмечен интересный факт, указывающий на наличие метилирования в образцах неизменной ткани, прилежащей опухоли, но оно полностью отсутствует в тех же участках ДНК, выделенной из клеток крови. Частота метилирования CpG-островков гена-супрессора опухолевого роста *RASSF1A* не зависит от стадии опухолевого процесса, степени анаплазии опухолевых клеток и наличия метастазов. Эпигенетические модификации этого гена в опухолях наблюдаются чаще, чем его делеции. Анализ результатов позволил сделать вывод, что метилирование данного гена-супрессора относится к ранним событиям в онкогенезе и представляет один из главных путей инактивации этого гена.

*Таблица 5.4*

**Частота гиперметилирования промотора гена p14 в злокачественных опухолях разного генеза [42]**

Опухоль	Частота, %
Колоректальный рак	28
Рак желудка	26
Рак пищевода	22
Рак эндометрия	16
Рак почки	13
Глиома	9
Рак яичника	5
Рак легкого	5
Лейкемия	5
Опухоли области головы, шеи	4

В сложном процессе малигнизации могут быть задействованы и нестабильные генетические элементы хромосом. Одна из их разновидностей — подвижные последовательности, рассеянные в разных хромосомах. Их перемещение ведет к изменению экспрессии генов, вследствие чего могут возникать различные формы патологии. Мобильные элементы, возможно, ответственны за появление в ряду поколений патологии, наследование которой не подчиняется классическим законам Менделя. Именно к таковой относится развитие большинства злокачественных опухолей человека.

Следовательно, с одной стороны, в онкогенах могут возникать различные генетические изменения, с другой — нарушение регуляции активности структурных генов (их экспрессия или ее отсутствие) определяется наличием вблизи них метилированных оснований и соответствующих белков. Все это указывает на тесную связь нарушений генного баланса клеток с изменениями их функций, появление белков, вследствие экспрессии мутантных генов. Последние выявляются при иммуногистохимическом исследовании опухолей [43–46].

Мутации онкогенов наследуются в ряду клеточных поколений в связи с частыми изменениями генов репарации ДНК. Таким образом, создается клон измененных клеток, в которых закрепляются возникшие мутации и происходят новые мутационные изменения. Наличие одной мутантной клетки неравнозначно появлению опухолевой клетки. Только при ускоренном размножении этой клетки вследствие мутаций в генах, контролирующих деление, дифференцировку клеток и их апоптоз, и при возникновении дополнительных мутаций появляется другой клон атипичных клеток. Следует отметить, что в клетках с одной существующей мутацией последующие возникают легче, чем в клетке без таких мутаций, то есть мутантная клетка более предрасположена к образованию новых мутаций. Вследствие таких процессов первичная генетическая однородность кле-

ток определенной ткани изменяется в сторону гетерогенности. На начальных этапах развития опухоли наблюдается прогрессирующий отбор, поскольку генотипические изменения оказываются благоприятными для преимущественного роста таких клеток. Генетически измененные варианты клеток по сравнению с исходными имеют селективные преимущества для роста, вследствие чего возникает популяция клеток с преобладанием определенных нарушений генотипа, которые формируют модальную линию опухоли. При изменении условий роста или под влиянием разных факторов может возникнуть ростовое преимущество другой генетически измененной линии клеток, то есть наблюдаются стабилизирующий отбор и появление другой или нескольких модальных линий, вследствие чего опухоль становится все более гетерогенной. В ходе прогрессии опухоли ее гетерогенность продолжает изменяться и один из ее клонов может дать начало развитию метастатического очага, опухолевые клетки которого не обязательно принадлежат к модальной линии первичной опухоли [47; 48].

По мнению выдающегося генетика Н. П. Дубинина, инициация малигнизации в клетке представляет собой индивидуальное непредсказуемое событие. Лишь в результате модификации эффектов комплекса генов создаются условия для экспрессии онкогенов, которые в свою очередь модифицируют экспрессию других генов, что ведет к дезорганизации (нестабильности) генома [49; 50]. С современной точки зрения, появление генных мутаций и хромосомных aberrаций на уровне клеточной популяции рассматривается как источник непрерывной и самоподдерживающейся изменчивости генома, которая является потенциально онкогенной [19]. Генные изменения служат сигнальными индивидуальными генетическими проявлениями изменчивости клеток, и их частота в опухоли отражает сложность одновременных изменений многих структурных и функциональных эффектов генов. Если в двухступенчатой модели развития рака, в том

числе и наследственного [51; 52], задействованы, как минимум, мутации двух генов, то на основании результатов современных исследований речь идет о большем количестве мутаций (4–6 генов), поскольку на этапах инициации малигнизации экспрессируются одни ансамбли генов, а на стадии прогрессии и метастазирования опухоли — другие гены [19; 49; 50].

Все эти положения, свидетельствующие о сложной роли генных, хромосомных и геномных нарушений в возникновении и прогрессии опухолевого роста, дали возможность сформироваться и развиваться таким современным направлениям исследований в онкологии, как цитогенетика опухолевого роста, онкогенетика, онкопротеомика, предрасположенность к развитию новообразований, семейный раковый синдром, наследственность и рак.

Достижения в области цитогенетики опухолевого роста позволяют сформулировать ее основные постулаты: а) большинство опухолей человека имеют измененный хромосомный состав, при этом более злокачественные неоплазмы характеризуются более выраженными цитогенетическими аномалиями; б) хромосомные изменения в клетках одной и той же опухоли подобны; в) опухоли имеют клональное происхождение. Следовательно, хромосомные aberrации в опухолях можно считать цитогенетическим маркером генных изменений и генома с нарушенной стабильностью.

Следует упомянуть об интересных фактах, свидетельствующих о существовании достоверных географических различий определенных хромосомных aberrаций в опухолях одного и того же генеза у больных из разных стран мира. В качестве примера приводим данные изучения наиболее часто встречающихся хромосомных aberrаций в 222 случаях фолликулярной лимфомы, 168 случаях менингиомы, 112 случаях плеоморфной аденомы слюнных желез (табл. 5.5–5.7); таблицы заимствованы из работы [53].

Представленная географическая гетерогенность частоты хромосомных aberrаций

ций в опухолях человека может быть связана как с генетическими, так и внешнесредовыми факторами определенных регионов, а возможно — обусловлена разными механизмами развития опухоли в ходе инициации и прогрессии опухолевого роста. По мнению авторов [53], внешние факторы могут иметь значение в генезе первичных аномалий, а генетические, то есть конституциональные факторы могут быть более важными для возникновения вторичных изменений.

Таблица 5.5

**Географические различия частоты транслокации t(14; 18) у больных фолликулярной лимфомой [53]**

Регион	t(14; 18), n (%)	Общее число случаев
Япония	6 (37,5)	16
Северная Европа	8 (30,8)	26
США		
Северо-восток	6 (66,7)	189
Центральная область	14 (77,8)	
Северо-запад	105 (68,6)	153
Всего	139 (62,6)	222

Таблица 5.6

**Географические различия частоты характерных для менингиомы хромосомных aberrаций [53]**

Регион	Хромосомные aberrации		Общее число случаев
	-8 (%)	-22/22q (%)	
Европа	18 (14,8)	111 (91,0)	122
США	1 (2,2)	31 (67,4)	46
Всего	19 (11,3)	142 (84,5)	168

Исследования последних десятилетий свидетельствуют о наличии многочисленных мутаций в геноме опухолевых клеток, которые определяют ее злокачественные свойства — бесконтрольную пролиферацию, инвазию, метастазирование, генетическую нестабильность, иммортализацию, самодостаточность [54–58]. В качестве примера приводим неполный спектр генетических изменений в клетках немелкоклеточного рака легкого и рака яичника, заболеваемость которыми в настоящее время имеет тенденцию к увеличению. Из представленных ниже данных литературы (табл. 5.8 и 5.9) видно, что в развитии и рака легкого, и рака яичника задействован ряд генов с разными функциями и разной частотой встречаемости.

Один из наиболее часто мутирующих генов-супрессоров опухолевого роста — ген *TP53*, который называют хранителем генома. Этот ген локализован в локусе 17p13.1 и кодирует ядерный фосфопротеид, выполняющий регуляторную роль в процессах клеточного деления. В норме его экспрессия приводит к апоптозу клеток с критическими повреждениями ДНК. Инактивация этого гена наблюдается во многих опухолях и приводит к усилению пролиферативного потенциала клеток [59; 60]. Установлена корреляция между инактивацией *p53* и некоторыми другими биологическими особенностями опухолей [61–65]. Например, рак яичника, в клетках которого отмечается мутация гена *p53* и экспрессия других генов (антиапоптотический ген *bcl-2* и онкоген *c-myc*), отсутствует чувствительность рака яичника к препаратам платины [66]. Мутации гена *p53* чаще, чем в контроле, наблюдаются у но-

Таблица 5.7

**Географические различия частоты характерных хромосомных aberrаций у больных плеоморфной аденомой слюнных желез [53]**

Регион	Хромосомные aberrации, %				Общее число случаев
	del(3p) (%)	del(8q)	del(9p)	del(12q)	
Швеция	29 (34,1)	51 (60,0)	11 (12,9)	13 (15,3)	85
ФРГ	7 (25,9)	14 (51,9)	3 (11,1)	9 (33,3)	27
Всего	36 (32,1)	65 (58,0)	14 (12,5)	22 (19,6)	112

Таблица 5.8

**Частота и характер генетических нарушений  
в клетках немелкоклеточного рака легкого [33]**

Ген	Кодируемый белок и его функции	Характер генетических нарушений	Частота нарушений, %
Семейство генов <i>RAS</i>	P21RAS — переносчик внутриклеточного сигнала	Мутации	20–30
<i>c-MYC</i>	c-мус — фактор транскрипции, регулирует клеточный цикл и активность теломеразы	Гиперэкспрессия, амплификация	50
<i>RB</i>	pRb — контролирует вход в S-фазу, регулируя активность фактора транскрипции E2F	Мутации, отсутствие синтеза белка pRb	3 20–30
<i>PRAD1</i>	Циклин B1 — в комплексе с циклинзависимой киназой 4 стимулирует переход клетки из фазы G <sub>0</sub> в фазу G <sub>1</sub> митотического цикла	Гиперэкспрессия, амплификация	47 25
<i>ERBB1</i>	Тирозинкиназный рецептор эпидермального фактора роста	Гиперэкспрессия	>50
<i>ERBB2 (HER2/neu)</i>	P185 — тирозинкиназный рецептор	Гиперэкспрессия, амплификация	25–30
<i>CDKN2</i>	P16INK4 — ингибитор комплекса циклин D1 и циклинзависимой киназы 4	Мутации, делеции	10 20
<i>P53</i>	P53 — фактор транскрипции; регулирует клеточный цикл, апоптоз, контролирует целостность генома	Мутации	50

Таблица 5.9

**Изменения генов при раке яичника [53]**

Ген	Функция гена	Изменения гена	Частота, %
<i>HER2/neu</i>	Относится к семейству факторов роста	Амплификация / сверхэкспрессия	30
<i>K-ras</i>	G-протеин	Мутация	5
<i>G1</i>	G-протеин	Мутация	30
<i>AKT2</i>	Серин-треонин киназа	Амплификация	13
<i>c-myc</i>	Транскрипционный фактор	Амплификация	30
<i>P53</i>	Опухолевый супрессор	Мутация / сверхэкспрессия	60
<i>WT-1</i>	Опухолевый супрессор	Мутация	Редко
<i>MSH2</i>	Репарация ошибок ДНК	Мутация	<1a
<i>MLH1</i>	Репарация ошибок ДНК	Мутация	<1a

сителей мутаций гена-супрессора *BRCA2*. В нижеприведенной табл. 5.10 показана варибельная частота мутаций гена-супрессора *p53* в злокачественных опухолях разного генеза.

Мутации гена *TP53* — это не единственный путь нарушения функции белка p53 в

опухолевых клетках. Для 10–20 % рака молочной железы и нейробластом характерно нарушение транспорта белка p53. В части опухолей наблюдается инактивация белка p53 при амплификации онкогена *MDM2*.

Различные повреждения гена *p53* выявляются во многих злокачественных опухо-

Таблица 5.10

**Частота мутаций гена *p53*  
в злокачественных опухолях  
разного генеза [65]**

Опухоль	Частота мутаций <i>p53</i> , %
Полипозный рак толстой кишки	85
Неполипозный рак толстой кишки	13
Рак поджелудочной железы	40
Немелкоклеточный рак легкого	40
Мелкоклеточный рак легкого	70–100
Рак молочной железы	53–86

лях, при этом частота миссенс-мутаций составляет 74 %, нонсенс-мутаций — 7 %, мутаций сайта сплайсинга — 4 %, сдвига рамки считывания — 11 %. Герминальные миссенс-мутации *p53* приводят к развитию синдрома Ли — Фраумени.

Утрата функциональной активности *p53* — гена, отвечающего за целостность генома, коррелирует с генетической нестабильностью клеток. Белок *p53* обладает огромными регуляторными возможностями благодаря способности образовывать кооперации с большим количеством других генов [8; 67]. О других генах-супрессорах опухолевого роста и их роли будет сказано ниже.

В последние годы много внимания уделяется протоонкогену *c-erbB2/HER-2/neu*, который относится к семейству факторов роста. Основная роль этого гена — участие в процессах пролиферации, дифференцировки и апоптозе. Он часто экспрессируется при раке молочной железы и плоскоклеточном раке. Его активация у больных раком яичника связана с неблагоприятным прогнозом [66]. Ген *AP-2* (20q13.2) выступает регулятором протоонкогена *HER2/neu* и гена рецептора эстрогенов и играет существенную роль в канцерогенезе молочной железы [68]. Значительная роль в процессах пролиферации принадлежит антигену ядер пролиферирующих клеток (PCNA) и Ki-67 [24; 69].

В литературе имеется много сообщений о роли определенных генов в малигнизации опухолей, описаны также их регуляторные функции. Так, в клетках рака молочной железы идентифицирован ген *MCF-7* чувствительный в аутокринной регуляции гормона роста. Другой ген *BRAF* ответственен за развитие злокачественной меланомы и некоторых других опухолей, ген-супрессор *PTEN* (10q23.3) — за развитие остеогенной саркомы и остеохондромы и ряда других опухолей. Инактивация опухолевого гена-супрессора *PTEN*, который регулирует клеточный цикл и апоптоз, относится к ранним событиям онкогенеза при развитии рака эндометрия и яичника [70]. Он также инактивируется в различных ненаследственных опухолях почки, матки, молочной железы, простаты, меланомы, а его герминальные мутации вызывают болезнь Коудена — наследственное предрасположение к развитию гамартом в мозге, молочной железе, щитовидной железе. Ген *CDH1* (*E-кадгерин*); (16q24) экспрессируется в наследственном раке желудка, участвуя в межклеточных взаимодействиях. Белки ряда генов, экспрессирующихся в опухолях, выполняют функции ингибиторов циклинзависимых киназ клеточного цикла (*p21/WAF1*, *p16/INK4A*, *p15/INK4B*) [41; 71].

Неоднородные молекулярные и хромосомные изменения под влиянием различных факторов (химические и физические канцерогены, онкогенные вирусы) наиболее часто возникают в общих (*common*) или редких (*rare*) ломких локусах хромосом, что проявляется большим количеством структурных нарушений в последних. Именно в ломких участках хромосом локализуется большинство онкогенов, экспрессирующихся в опухолях разного генеза (см. табл. 5.10).

Последовательности ДНК- и РНК-содержащих вирусов также интегрируются в геном клеток чаще всего во фрагильные места [72]. В табл. 5.11, 5.12 представлены интеграционные места различных вирусов и известные фрагильные места хромосом, в которых определяются протоонкогены.

Белковые продукты, синтезирующиеся под влиянием экспрессии собственных онкогенов вирусов, способны взаимодействовать с различными клеточными генами или их продуктами, которые осуществляют контроль за пролиферацией клеток [37; 59; 73; 74]. Известно, что продукты генов вируса папилломы человека Е6 и Е7 инактивируют экспрессию генов-супрессоров *p53* и *pRb105* или взаимодействуют с циклинами. Гены вируса герпеса 8-го типа взаимодействуют с циклином D2, интерлейкином 6, с геном резистентности к интерферону.

Подводя итог представленным данным, следует обратиться к двухударной

модели канцерогенеза, предложенной Кнудсоном (1971) [72], согласно которой для малигнизации клетки необходимо по крайней мере два мутационных события. Первое событие — это первая мутация в одном из аллелей гена, приводящая к образованию клетки с нестабильным геномом, для которой риск появления злокачественного генотипа значителен. Такие мутации могут возникать как в герминальных, так и в соматических клетках. Вторая мутация, которая происходит во втором неповрежденном аллеле гена в соматической клетке, способствует превращению клетки с повышенным риском трансформации в злокачественную, кото-

Таблица 5.11

Сопоставление локализации интеграционных мест вирусов и протоонкогенов с ломкими сайтами хромосом [72]

Вирус/ трансформированные клетки	Вирусное интеграционное место	Фрагильные сайты хромосомы	Локализация протоонкогенов
Аденовирус-12 Трансформированные фибробласты	1p35 1q42	1p36 1q42	1p34-36 1q31-42
Вирус Эпштейна – Барр Линия Namalva Линия RAJ1 В-лимфобластоидная клеточная линия	1p35 6p21 1p31 1q31 4q22-25 13q21 14q21	1p36.1 6p22.2 1p31.2 1q25.1 — 13q21 —	1p34-36 6p21 1p31-32 1q31-42 — — —
Вирус гепатита В Печеночно-клеточный рак Линия PLC/RPF/5 Опухолевые узлы печени Гепатома № 7 Нормальные лимфоциты	11p13-14 1p11-12 16p11- 6q11 Yq12 3p22-24 17p11.2-12 18q11.1-2 17q22-25 16q22-25	11p13 1p12 16q11.2 Yq12 3p24.1 17p12 18q22.2 17q23.1 16q22.1 16q23.2	— 1p11-13 ( <i>N-ras</i> ) — — 3p22-24 ( <i>erbA2</i> ) 17p12-13 ( <i>p53</i> ) — 17q12-21 ( <i>erbB2</i> ) — —
Вирус папилломы 18 тип Линия клеток HeLa Линия клеток рака шейки матки C4-1	5p12-13 8q24 9q31-34 22q12-13 3p21 8q21-22.3	5p13 8q24.1 9q32 22q12.2 — 8q22.1-3	5p13-14 8q24 ( <i>myc</i> ) 9q34 ( <i>abl</i> ) 22q12.3-13.1 ( <i>sis</i> ) 3p22-24 ( <i>erbA2</i> ) —

Сопоставление локализации некоторых онкогенов с расположением ломких сайтов хромосом в опухолях разного генеза [72]

Гены	Локализация генов	Ломкие сайты хромосом	Опухоли
<i>N-ras</i>	1p22-32	1p22	РТК семейный и спорадический
<i>Ski</i>	1q21-24	1q21-25.1	РТК семейный и спорадический
<i>HPMS1</i>	2p31-33	2p24.2	РТК наследственный неполипозный
<i>HMSH2</i>	2p22	2p24.2	РТК наследственный неполипозный
<i>Raf1</i>	3p24-25	3p24.2	РТК
<i>VHL</i>	3p25	3p24.2	Синдром Хиппель – Линдау
<i>HMLH1</i>	3p21-23	3p21	РТК наследственный неполипозный
<i>FHIT</i>	3p14	3p14/2	РТК, РМЖ, РШМ, рак легкого, почки, коди
<i>Erba2</i>	3p21	3p21	РМЖ семейный
<i>APC</i>	5q21-22	5q22	Полипоз толстой кишки
<i>P21WAF1/Cip1</i>	6p21	6p23	Опухоли мозга
<i>Syr</i>	6q21	6q21	РТК
<i>Ras</i>	6q21-22	6q21	РТК, РМЖ, РТМ, рак поджелудочной и щитовидной желез
<i>Myb</i>	6q22-23	6q21	РМЖ
<i>ErbB</i>	7p11	7p11.27q22	РМЖ, рак яичника, желудка
<i>HPMS2</i>	7q22	7q22	РТК наследственный неполипозный
<i>Myc</i>	8q24	8q24	РТК, РМЖ, РШМ, рак легкого
<i>MTS1/INK4a</i>	9p21	9p21	Опухоли мозга, меланома
<i>PTEN/MMAC1</i>	10q23	10q23.3	РМЖ, РТМ, рак почки, легкого, предстательной железы
<i>WT1</i>	11p13	11p13.3	Нефробластома
<i>Int2</i>	11p13	11p13.3	РТК, РМЖ, рак яичника
<i>Ha-ras</i>	11p15.5	11p15.1	РМЖ
<i>ATM</i>	11q22.1	11q23.3	Атаксия-телеангиэктазия
<i>RB1</i>	13q14	13q13.2	Ретинобластома, остеосаркома
<i>BRCA2</i>	13q12-13	13q13-32	РМЖ (семейный)
<i>Fos</i>	14q21-31	14q23-24.1	РТК
<i>p53</i>	17p13	17p12	РМЖ, РТМ, рак яичника, РТК наследственный неполипозный
<i>WF1</i>	17q11	17q23.1	Нейрофиброматоз, глиома
<i>BRCA1</i>	17q12-21	17q23.1	РМЖ (семейный), рак яичника (семейный)
<i>DCC</i>	18q21	18q21.3	РТК наследственный неполипозный
<i>NF2</i>	22q12	22q13	Шваннома, менингиома

Примечание. РТК – рак толстой кишки; РМЖ – рак молочной железы; РШМ – рак шейки матки.

рая начинает беспрестанно делиться и формировать опухолевый зачаток. Следовательно, потеря неповрежденной копии гена в другом аллеле, то есть утрата гетерозиготности (loss of heterozygosity –

LOH) лежит в основе второго события по гипотезе Кнудсона [75; 76].

Как показали многочисленные исследования, такая потеря играет важную роль в молекулярно-генетических механизмах

патогенеза злокачественных опухолей. В глиобластомах наиболее частая потеря гетерозиготности обнаружена в области 14q31-32.3 в локусе D14S65 и в области 14q21-24.1 в локусе от D14S63 до D14S74. Обнаруженные локусы могут быть местом локализации новых генов-супрессоров опухолевого роста. В карциномах ротовой полости и ротоглотки потеря гетерозиготности обнаружена в других хромосомах — 9p21, 8p22-23, 3p12, 1p36.1, 12q22, 3q28, 5q23.3, 3p25-26, 3p24, 7q35 с частотой от 50 до 77,8 %.

Потерю гетерозиготности в длинном плече хромосомы 18 в связи с конституциональной делецией 18p часто связывают с развитием рака желудка и интерпретируют эти изменения как один из первых этапов предрасположенности к развитию злокачественного процесса, в котором *Helicobacter pylori* отводится роль кофактора.

Изучение потери гетерозиготности в хромосомных локусах клеток аденокарцином эндометрия и эндометрия и злокачественных аденомах шейки матки показало разную степень проявления и разную повреждаемость хромосом. Так, в аденокарциномах эндометриального типа потеря гетерозиготности выявлена в хромосомах 18p (71 %), 19q (50 %), 19p (38 %), 22q (40 %); в аденокарциномах эндометриального типа — на 10q (43 %), 5q (40 %); в злокачественных аденомах — на 17p (62 %), 1p (33 %), 22q (40 %). По мнению некоторых авторов, вариации потери гетерозиготности в клетках аденом свидетельствуют о ее озлокачествлении [77].

У больных раком желудка потеря гетерозиготности в опухолевых клетках отмечается в области 11p15.5 в локусах D11S1318 и D11S4046 с частотой соответственно 30,9 и 21,7 %. Вместе с тем установлено, что потеря гетерозиготности не коррелирует с полом и возрастом больных, размерами опухоли и наличием метастазов в лимфатических узлах, что свидетельствует о роли гетерозиготности хромосом на определенных этапах развития опухолевого процесса. По данным литературы, ча-

стота потери гетерозиготности в разных хромосомах опухолевых клеток одного генеза различна, что иллюстрируют данные табл. 5.13. Высокая частота потери гетерозиготности подтверждает выраженную гетерогенность хромосомного состава, связанную с повреждениями 1, 3, 5, 6, 8, 11, 13, 16, 17, 22-й хромосом и X-хромосомы [66; 78].

Достоверное увеличение потери гетерозиготности наблюдается при прогрессии цервикальной интраэпителиальной неоплазии (от CIN I до CINII) в локусе D6S276 хромосомы 6p22, где располагаются гены HLA I класса. В локусе D6S273 хромосомы 6p21.3 высокая частота аллельных делеций отмечается при легкой степени дисплазии многослойного плоского эпителия и сохраняется при прогрессии дисплазии в рак шейки матки. Напротив, в локусах хромосом 6p25 и 6q25.1 (области промотора гена *ESR*) наблюдается незначительное возрастание частоты аллельных делеций, что при прогрессии плоскоклеточного рака шейки матки возможно играет меньшую роль [75].

Еще один механизм, который может быть задействован в развитии рака, — это недавно выявленный феномен потери геномного импринтинга (Loss of imprinting — LOI). В норме его можно считать эпигенетической модификацией специфических родительских аллелей гена или хромосом в гаметах или зиготе, что ведет к дифференциальной экспрессии двух аллелей гена в соматических клетках. К болезням, обусловленным аномальным импринтингом, относятся синдромы Прадера — Вилли (Prader — Willi) и Ангельмана (Angelman), которые связаны с дисомией хромосом одного из родителей. Проявления фенотипа зависят от происхождения мутированного гена, полученного от отца или матери. Чаще всего в этот процесс вовлекаются хромосомы 2, 6, 7, 11, 14, 16, 20, X.

Потеря импринтинга может активировать молчание в норме гены, связанные с пролиферацией, и/или нормально транскрибируемые копии генов-супрессоров опухолевого роста. Примерами опухолей,

Локусы потери гетерозиготности у больных раком яичника

Локусы потери гетерозиготности в хромосомах человека	Частота выявления, %	Источник литературы	Локусы потери гетерозиготности в хромосомах человека	Частота выявления, %	Источник литературы
3p, 3p14.2	15,0	Zounis et al., 1998	12p12.3-13.1	24,0	Engel, 1998
5q13.1-21	33,0	Tavassoli et al., 1996	12q23ter	26,0	Hatta et al., 1997
6q27	54,2	Suzuki et al., 1998		30,0	Hatta et al., 1997
6q25.1-25.2		Colitti et al., 1998	13q12-13 <b>BRCA2</b>		Gayther et al., 1997
7q31.1	91,0	Koike et al., 1997	14q12-13, 14q32		Bandera et al., 1997
7q31.2	71,0	Engel et al., 1998 Huang et al., 1999	17p, 17p3.3	62,3	Lee et al., 1995 Wiper et al., 1998
8p22-23.1	51,0	Wright et al., 1998	17p13 <b>p53</b>	55,0	Quezado et al., 1999
9p	18,0	Jiang et al., 1996		62,5	Quezado et al., 1999
9p21	45,0	Shih et al., 1997	17q12-21 <b>BRCA1</b>	66,6	Villeneuve et al., 1999
9p, 9q34	79,0	Watson et al., 1998	17q22-23	84,0	Calugi et al., 1996
10q23	4,8	Yokomizo et al., 1998	19q13.2-13.4	53,0	Bicher et al., 1997
11p13-15		Wilson et al., 1996	22q	23,0	Bryan et al., 1996
11p15.1	48,0	Lu et al., 1997		15,0	Jiang et al., 1996
11p15.5		Phelan et al., 1996			
11q	18,0	Jiang et al., 1996			
11q22-23	44,0	Koike et al., 1999			

возникших вследствие геномного импринтинга, служат пузырьный занос и тератома яичника, развитие которых может быть вызвано диспермией и потерей материнского эквивалента или дупликацией родительских геномов и утратой материнского эквивалента. Установлено, что потеря геномного импринтинга наблюдается в злокачественных опухолях шейки матки, молочной железы, яичника, простаты, яичка, мочевого пузыря, пищевода, толстой кишки, хорионкарциноме, опухоли Вильмса, рабдомиосаркомах, гепатобластомах.

Выше шла речь о генных и хромосомных нарушениях и их роли в развитии неоплазий. Последние характеризуются также геномными нарушениями — анеуплоидией, полиплоидией, гетероплоидией, имеющими клиническое значение для оценки степени злокачественности опухоли и ее прогноза [79; 80]. При изучении плоидности опухоли и ее пролиферативных особенностей установлено, что анеуплоидия и индекс пролиферации более 25 % достоверно связаны со снижением общей и без-

рецидивной заболеваемости больных раком эндометрия [81]. Двухлетняя выживаемость больных раком яичника при диплоидной опухоли составила 93,5 %, при анеуплоидной — 67,7 %. Плоидность опухоли относится к наиболее весомым факторам прогноза не только при раке яичника, но и при дисплазии многослойного плоского эпителия и рака шейки матки, в том числе его начальных форм [79; 82; 83].

Таким образом, приведенные данные литературы свидетельствуют о значительной роли генных, хромосомных и геномных нарушений в процессах, приводящих к нестабильности генома, которая лежит в основе развития малигнизации и обусловлена нарушениями сложных механизмов пролиферации, апоптоза и дифференцировки клеток.

Нестабильность генома отмечается не только в опухолевых, но и соматических немалигнизированных клетках (лимфоциты, фибробласты) у онкологических больных, что доказано многими генетическими и цитогенетическими исследованиями.

Хромосомные изменения в таких клетках могут быть не только конституциональными, они возникают под влиянием различных факторов среды вследствие гиперчувствительности к мутагенам, проявляясь увеличением количества хромосомных aberrаций, сестринских хромосомных обменов. Нашими исследованиями установлено, что количество хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови больных раком матки и толстой кишки увеличено по сравнению с таковым в контроле и зависит от количества больных раком в родословной (рис. 5.1).

На примере рака желудочно-кишечного тракта некоторые исследователи делают оптимистическое заключение относительно раннего выявления злокачественного роста в организме по данным хромосомного анализа соматических клеток (лимфоциты периферической крови) и подкрепляют его результатами собственных исследований в семьях с высокой предрасположенностью к раку. Особую ценность представляют такие исследования в случаях обнаружения специфических для опухоли цитогенетических маркеров.

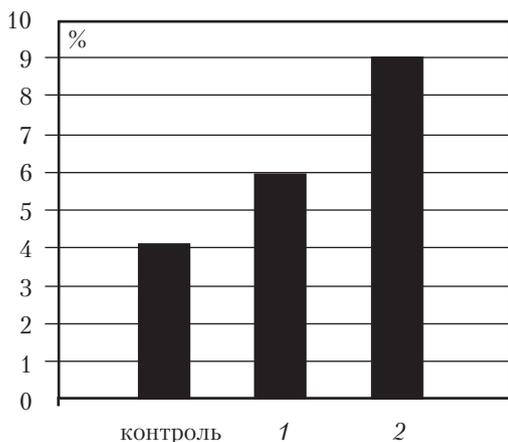


Рис. 5.1. Частота aberrантных лимфоцитов периферической крови больных раком эндометрия с различной отягощенностью семей онкологической патологией: 1 — болен раком один родственник; 2 — больны раком три и более родственников

Наличие генных и хромосомных нарушений в нормальной клетке еще не свидетельствует о неопластическом процессе, а представляет лишь условие (генетическую основу) для возможной малигнизации при наличии или влиянии других факторов [84]. Это дает основание предполагать существование предрасположенности к развитию неоплазий у лиц с имеющимися нарушениями — конституциональными повреждениями хромосом, герминальными мутациями генов, особенно генов-супрессоров и генов репарации ДНК, а также повышенной мутабельностью генов под влиянием факторов внешней и внутренней среды.

Такая связь нарушений хромосомного состава с клиническими проявлениями патологии установлена в медицинской генетике. У лиц с конституциональными хромосомными изменениями (синдром Патау (трисомия хромосом группы D), синдром Эдвардса (трисомия хромосом группы E), синдром Дауна, синдром Клайнфельтера (мужчины с кариотипом XXУ), женщины с конституцией ХУ и др.) обнаружена склонность к развитию злокачественных опухолей. Так, при синдроме Дауна наблюдается повышенный риск развития лейкемии, у мужчин с синдромом Клайнфельтера — рака грудной железы, у женщин с кариотипом или мозаицизмом ХУ повышена частота гонадобластом. Имеются также сообщения о большей подверженности к трансформации клеток у этих пациентов под влиянием вируса SV40 и о высоком повреждающем эффекте рентгеновских лучей на лимфоциты больных синдромом Дауна. С другой стороны, повышенную подверженность к развитию опухолей в представленных группах пациентов можно связать со сниженной иммунологической реактивностью (болезнь Дауна) или с гормональными нарушениями у мужчин с кариотипом XXУ и женщин с кариотипом ХУ.

Среди синдромов, предрасполагающих к развитию рака, выделяют группу заболеваний, для которых характерна повышенная ломкость хромосом (chromosome brea-

kage syndromes). К таким синдромам относятся атаксия-телеангиэктазия (синдром Луи-Бара), анемия Фанкони, пигментная ксероидерма, синдром Блума. Эти редкие заболевания, будучи разными по своему первичному генетическому дефекту и клиническим проявлениям, имеют одну общую черту — они передаются из поколения в поколение по аутосомно-рецессивному типу. Основанием для объединения этих синдромов в одну группу послужили следующие данные: у лиц с такими заболеваниями наблюдается повышенная повреждаемость хромосом и у многих из них возникают злокачественные опухоли.

По данным многих авторов, количество спонтанных хромосомных аномалий у больных с повышенной ломкостью хромосом превышает в несколько раз уровень таковых в общей популяции, составляя от 5 до 70 % против 1,5–3 % в норме. Следует также отметить широкий спектр хромосомных перестроек, фрагментацию участков хромосом, а также большое число клеток с хромосомными aberrациями, например, при анемии Фанкони — до 30 %. При атаксии-телеангиэктазии частота спонтанных хромосомных aberrаций превышает контрольные данные в 8–10 раз, при этом наиболее часто отмечаются одиночные и парные фрагменты хромосом (соответственно 56 и 33 %) и высокая частота (до 10 %) aberrаций обменного типа (хроматидные обмены, дицентрики, кольцевые хромосомы). Чаще всего при атаксии-телеангиэктазии повреждаются хромосомы групп C и D, отмечается также нестабильность хромосомы 14 в локусах 14q13 и 11q22.3.

Следует обратить внимание, что повышенное число aberrаций хромосом характерно также и для больных язвенным колитом (до 26,5 % против 8,3 % в контроле), не имеющих конституциональных нарушений кариотипа. Как и при перечисленных выше синдромах ломкости хромосом, при язвенном колите также отмечается увеличенная склонность к развитию злокачественных опухолей, что позволяет сделать

вывод: повышенная ломкость хромосом может быть общим фактором канцерогенеза при этих заболеваниях. В целом, синдром ломкости хромосом соматических клеток человека — это один из сложных и мало изученных разделов медицинской генетики, что требует более глубокого его исследования с позиций современных достижений молекулярной биологии.

Каждый из перечисленных выше синдромов имеет определенные клинические черты. Так, лица с синдромом атаксии-телеангиэктазии страдают мозжечковой атаксией, у них отмечаются телеангиэктазии и частое возникновение опухолей, в основном, лимфопролиферативной системы, хотя встречаются и неоплазии эпителиальной природы. Больные с этим синдромом и их родственники предрасположены к развитию рака, часто билатерального. Примером может служить анализ онкологической патологии в 44 семьях с атаксией-телеангиэктазией, у кровных родственников которых выявлено 50 опухолей, в том числе рак молочной железы (9), легкого (8), простаты (7), желудка (6), лимфопролиферативные процессы (5), меланомы (4), поджелудочной железы и толстой кишки (4) [85]. Ген атаксии-телеангиэктазии локализуется на 11q22-23. Он участвует в регуляции белков клеточного цикла, процессах репарации и апоптоза [86].

У больных с анемией Фанкони наблюдаются замедление роста, анатомические дефекты (пороки развития сердца, почек, конечностей), пигментные пятна, нарушение кроветворения со склонностью к развитию панцитопении, лейкемии.

Синдром Блума характеризуется задержкой роста и наличием чувствительных к солнечному облучению пятен на лице (телеангиэктатической эритемы). В лимфоцитах периферической крови отмечается особый вид aberrаций хромосом — квадриады, причем изменения настолько характерны для этого заболевания, что оно не диагностируется при отсутствии таких структурных aberrаций. У больных с синдромом Блума наблюдается снижение им-

мунитета, возможно развитие рака или более часто — лейкемии.

Пигментная ксеродерма сопровождается повышенным риском малигнизации ранее развившихся папиллом под влиянием солнечного света.

Наряду с синдромами ломкости хромосом известны и другие онкогенетические синдромы, при которых отмечается повышенная склонность к развитию опухолей разного генеза.

Синдром Хиппель — Линдау характеризуется аутосомно-доминантным типом наследования. Болезнь Линдау сопровождается развитием гемангиобластом в мозжечке, среднем и спинном мозге. Если к этим опухолям присоединяется поражение радужной оболочки, то синдром носит название Хиппель — Линдау. При этой болезни часто развивается почечно-клеточный рак, отмечаются герминальные частичные делеции гена *VHL* с критической делецией в 5'фланкирующей области этого гена. Следует заметить, что частота солидных опухолей почек при частичных делециях гена меньше, чем при полной его делеции, однако эта закономерность негипична для опухолей других органов и тканей. Эти опухоли имеют выраженную анеуплоидию, несбалансированные транслокации, значительную хромосомную гетерогенность, что является показателем их поликлонального происхождения.

Синдром Гарднера характеризуется триадой — аденоматоз (множественный полипоз) толстой кишки, фибромы кожи

и эпидермоидные кисты. Кроме этого, могут развиваться остеомы черепа, костно-хрящевые экзостозы, аномальный прикус. Тип наследования аутосомно-доминантный, вероятность малигнизации аденом составляет около 100 %.

Синдром Nijmegen — редкое заболевание, передающееся по аутосомно-рецессивному типу. Он характеризуется иммунным дефицитом, микроцефалией, повышенной чувствительностью к радиационному облучению, высокой подверженностью к опухолям лимфоидной системы.

Следовательно, имеется ряд синдромов, при которых наблюдается предрасположенность к развитию злокачественных опухолей разного генеза [87]. С другой стороны, опухоли одного генеза, например доброкачественные и злокачественные образования органов желудочно-кишечного тракта, могут развиваться при разных онкогенетических синдромах, примеры которых приведены в табл. 5.14.

Все указанные выше данные дают основание констатировать существование у некоторых лиц подверженности (предрасположения) к развитию злокачественных опухолей. Понятие «подверженность» (*liability*) введено в генетику D. S. Falconer [88] и оно определяет совокупность генетических и средовых причин, которые лежат в основе проявления мультифакторных признаков. Под термином «предрасположение» к развитию неопластического роста D. G. Harnden [89] подразумевает наличие генетических аномалий в клетках

Таблица 5.14

**Генетически детерминированные синдромы, сопровождающиеся развитием рака органов желудочно-кишечного тракта [87]**

Синдром	Тип наследования	Злокачественные и доброкачественные опухоли
Анемия Фанкони	АР	Рак пищевода, желудка, кишечника, аденома печени
Синдром Луи — Бара	АР	Рак желудка, кишечника
Синдром Вермера	АД	Рак поджелудочной железы, аденома
Синдром Гарднера	АД	Рак и аденомы толстой кишки
Синдром Турко	АД	Аденомы толстой кишки

*Примечание.* АД — аутосомно-доминантный, АР — аутосомно-рецессивный тип наследования.

до развития опухолевого роста, что и делает его более вероятным. Эти изменения могут быть либо инициаторами опухолевого роста, либо способствуют прогрессии малигнизированных клеток [90].

В связи с этим следует указать, что с современных позиций онкогенетики термин «наследственность» при развитии опухолевого процесса следует понимать не как унаследованную передачу опухолевого зачатка или готовность его восприятия, а как предрасположенность к его развитию, то есть генетически обусловленное состояние организма, связанное с таким функционированием его систем (иммунной, гормональной и др.), при котором шанс возникновения опухоли под влиянием каких-то факторов экзогенной или эндогенной природы больший, чем при таких же влияниях у другого индивидуума.

В целом, все наследственные и генетически детерминированные болезни могут быть представлены наследственной мутацией единственного гена (точечная мутация или делеция гена) — это моногенно наследуемые болезни или в виде аддитивных мутаций нескольких генов, среди которых одна мутация может быть доминирующей (эффект главного гена по Morton) — это полигенно наследуемые мультифакторные болезни, в которых немаловажную роль играют и неблагоприятные факторы внешней среды.

К синдромам с моногенным аутосомно-доминантным типом наследования, при которых возникают злокачественные опухоли, относят тилоз — гиперкератоз ладоней и подошв. У больных с таким синдромом наблюдается частое развитие рака пищевода. В клиническом отношении различают два типа тилоза — «детский» и «взрослый». «Детский» тилоз проявляет себя уже в первые месяцы жизни ребенка и не сопровождается развитием злокачественных опухолей. «Взрослый» тип тилоза проявляет себя после 35-40 лет и к 65 годам у 100 % больных развивается рак пищевода и другие опухоли.

К опухолевым процессам, в возникновении которых играют роль генетические

факторы, относятся семейный полипоз кишечника, синдромы Гарднера и Пейтца — Егерса, ювенильный полипоз и некоторые другие, наследуемые по аутосомно-доминантному типу с высокой пенетрантностью. При семейном полипозе кишечника и синдроме Гарднера почти в 100 % случаев происходит малигнизация полипов, ведущая к развитию солитарных и первично-множественных злокачественных новообразований пищеварительного тракта. При ювенильном полипозе малигнизация, как правило, не наступает.

При синдроме Пейтца — Егерса полипы представляют собой истинные гамартомы и развиваются в разных отделах желудочно-кишечного тракта. Отмечается также пятнистая пигментация слизистой оболочки ротовой полости или дорзальной поверхности конечностей, влагалища, перианальной области. Чаще малигнизируются полипы желудка и толстой кишки, иногда развивается рак двенадцатиперстной кишки на фоне ее полипов.

К патологии с аутосомно-доминантным типом наследования с предположительно полной пенетрантностью относится нейрофиброматоз I типа — болезнь Реклингаузена. Ген *NF1*, расположенный на 17q11.2, служит геном-супрессором опухолевого роста. Мутации идентифицируются на всем протяжении гена без наличия специфических «горячих точек». Показано, что в одной и той же родословной, все субъекты которой имеют одинаковую наследственную мутацию гена *NF1*, отмечаются различные фенотипические проявления болезни — от доброкачественного до злокачественного фенотипа. Минимальные его проявления — это появление на коже пятен светлокофейного цвета диаметром до 1,5 см, в последующем развиваются периферические нейрофибромы [91]. При нейрофиброматозе типа 2 (ген *NF2*, расположенный в хромосоме 22q11.2) имеется риск развития шванном и менингиом, акустических невром.

Аутосомно-доминантное наследование характерно для туберозного склероза (эпилепсия), при котором развиваются множе-

ственные аденомы слюнных желез и петехиальная сыпь, факомы глазного дна. Заболевание проявляется в старшем возрасте. При туберозном склерозе, как и при болезни Реклингаузена, возможна малигнизация кожи.

Синдром базально-клеточного невуса характеризуется поражениями кожи (пигментные опухоли), нервной системы и скелета. У лиц с этим синдромом часто развиваются фиброзно-кистозная мастопатия, фибромиома матки, одонтогенные кисты, базально-клеточный рак, гемангиома печени и опухоли головного мозга.

В литературе описаны множественные липомы с развитием сарком; множественные цилиндromы — опухоль Шпиглера — Брука, чаще всего встречающаяся у мужчин.

Сочетание аденом эндокринных желез с пептической язвой желудка представляет синдром Эллисона, который наследуется по аутосомно-доминантному типу с варьированием возраста манифестации. К этой группе новообразований относится феохромоцитом — опухоль надпочечника с аутосомно-доминантным типом наследования. В семьях этих больных часто встречаются либо множественные аденомы эндокринных желез, либо нейрофиброматоз, либо синдром Хиппель — Линдау.

Все злокачественные опухоли могут быть наследственными или спорадическими. У детей количество наследственных опухолей значительно выше (50 %) по сравнению с такими у взрослых (5–10 %). Согласно многочисленным данным литературы и клиническим исследованиям, наследственный рак всегда органоспецифический, и риск развития малигнизации в определенном органе при наследственном раке увеличивается до  $10^4$ – $10^5$  раз.

Наследственные опухоли имеют определенные клинические черты. У взрослых они проявляются в более раннем возрасте и часто являются мультифокальными или билатеральными в парных органах.

Одна из наименее изученных проблем онкологии — наследственные особенности опухолевого роста у детей, наиболее четко

прослеживающиеся при развитии эмбриональных опухолей, к которым относятся ретинобластома и нефробластома. Эти опухоли появляются в первые годы жизни или сразу после рождения ребенка.

Ретинобластома — опухоль сетчатки глаза, ассоциированная с презиготной хромосомной мутацией гена *Rb* в хромосоме 13q14, делеция длинного плеча. Мутация одного аллеля гена *Rb* — это гетерозиготное носительство с повышенным риском возникновения заболевания. Критическим моментом для развития ретинобластомы служит потеря неповрежденной копии гена *Rb*. У ребенка, который унаследовал патологический аллель этого гена, заболевание может развиваться в случае потери гетерозиготности за счет возникновения второй соматической мутации в одной из клеток с наследственной мутацией этого гена. Вторая мутация может возникнуть в соматических клетках других органов, в результате чего возникает мелкоклеточный рак легкого, остеосаркома, рак молочной железы, лимфолейкоз. Ген-супрессор *Rb1* играет важную роль в регуляции клеточного цикла, осуществляя негативный контроль. У больных ретинобластомой, которая обычно встречается в первые годы жизни, наблюдаются остеосаркомы в возрасте 6–19 лет и фибросаркомы в возрасте 27–40 лет.

Наследственная форма ретинобластомы характеризуется двусторонностью поражения, ранней манифестацией болезни, наличием аналогичной опухоли у родственников, пороками развития, делецией в области 13q14. Из общего количества ретинобластом 30–40 % — это наследственные варианты опухоли, и риск ее развития у sibсов и детей больных достигает 45–50 % [92].

Еще одна злокачественная опухоль, часто встречающаяся у детей, — это нефробластома (опухоль Вильмса), которая в 30 % случаев имеет наследственную природу. Заболевание ассоциировано с инактивацией гена-супрессора *WT1*, локализованного в хромосоме 11p13. Частота опухоли Вильмса заметно различается у детей

Европы и Восточной Азии. Изучение частоты делеций, мутаций и потери гетерозиготности — в 11p и 11q показало, что у японских детей чаще наблюдается потеря гетерозиготности в 11p13 и реже — в 11p15, чем у европейских детей. Большая гомозиготная делеция гена *WT1* также чаще наблюдалась у японских детей. Представленные данные свидетельствуют о некоторых генетических различиях опухоли Вильмса в разных регионах. Ген *WT1* (Wilms tumor 1) вовлекается в развитие не только опухоли Вильмса, но экспрессируется в ряде других опухолей (десмопластические опухоли, острый лейкоз, мезотелиома, рак молочной железы), однако не играет роли в патогенезе опухолей нервной ткани.

Изучению роли наследственных факторов в развитии неоплазий детского возраста необходимо уделять особое внимание. К сожалению, таких исследований мало, а в имеющихся публикациях указывается, что доля генетически детерминированных опухолей составляет 10–12 % среди нефробластом, 25 % — среди ретинобластом, 6 % — среди меланом. При других опухолях детского возраста (рабдомиосаркома, остеогенная саркома, саркома Юинга, гепатобластома, лимфосаркомы) пропорция семейных случаев не превышает 1 % [93]. В методических рекомендациях сотрудников Всесоюзного онкологического центра АМН СССР [93] указывается, что выделение генетически детерминированных форм опухолей основано на следующих предположениях:

1. Эмбриональные опухоли относятся к этиологически гетерогенным. Почти 40 % неоплазий принадлежат к генетически детерминированным состояниям с аутосомно-доминантным типом наследования. Возникновение этих опухолей обусловлено мутациями в герминальных клетках родителей. У 60 % детей развитие опухоли связано с мутациями в соматических клетках, которые по наследству не передаются.

2. Критериями генетически детерминированной опухоли служат двусторонность поражения, полифокусность опухолевого процесса и наличие в семье еще одного

онкологического больного. Заболевание наследуется по аутосомно-доминантному типу с 60 %-й пенетрантностью для нефро- и нейробластомы и 90 %-й — для ретинобластомы. Риск повторных случаев в таких семьях составляет 30 % при нефро- и нейробластомах и 45 % — при ретинобластомах.

3. Для появления малигнизации необходима вторая мутация в гомологичной хромосоме.

4. Первая мутация приводит к инактивации генов-супрессоров, которые локализованы в определенных хромосомах и являются специфичными для некоторых видов опухолей. Так, ген нефробластомы локализуется в 11p13, ретинобластомы — в 13q14, нейробластомы — в 1p32. Если в этих участках хромосом половых или соматических клеток происходит мутация, то риск развития опухоли повышается.

К предопухолевым заболеваниям с аутосомно-доминантным типом наследования относится семейный аденоматозный полипоз. Он характеризуется множественными полипами аденоматозного строения и почти в 100 % случаев — малигнизацией. Его частота в популяции составляет 1 на 10 000. При этом заболевании возникает большое число (100 и более) полипов, которые при гистологическом исследовании оказываются тубулярными и тубулярно-ворсинчатыми аденомами. Пенетрантность семейного аденоматозного полипоза равна почти 100 % с разной экспрессивностью — от единичных аденом до диффузного аденоматоза толстой кишки. Ген семейного аденоматозного полипоза картирован в хромосоме 5q21-22. Клиническая манифестация болезни зависит от места мутации в гене *APC*. У носителей мутаций гена *APC* риск заболеть составляет 50 %. Аденомы толстой кишки появляются в юношеском возрасте, у большинства носителей гена *APC* они развиваются в возрасте до 40 лет. У таких больных риск развития злокачественного роста в 18 раз выше такового в общей популяции [94]. Сочетание рака и аденомы толстой кишки предлагается рассматривать как один из видов полинеоплазии толстой кишки. Случай-

ный характер мутаций разных генов определяет индивидуальные генетические особенности опухоли, что четко проявляется при использовании микрочиповой технологии.

Установлено, что 5 % больных с аденомами толстой кишки имеют родственников с колоректальным раком. Наряду с этим в родословных отмечаются десмоидные опухоли, остеомы, рак щитовидной железы, тонкой кишки, молочной железы, гепатобластомы, опухоли мозга, однако риск развития этих опухолей значительно ниже, чем рака толстой кишки.

Наряду с наследственным полипозным раком толстой кишки известен наследственный неполипозный колоректальный рак, входящий в синдром Линча I, который составляет 5–10 % всех форм колоректального рака. Основные его признаки — аутосомно-доминантный тип наследования, поражение правой части кишечника, развитие в молодом возрасте, первично-множественные опухоли. Риск заболеть наследственным неполипозным колоректальным раком в 2 раза выше у мужчин, чем у женщин. Кумулятивный риск рака у родственников больных наследственным неполипозным раком толстой кишки до 70 лет составляет 91 % для мужчин и 69 % — для женщин.

У больных наследственным неполипозным колоректальным раком отмечаются первично-множественные опухоли — синхронные (8,4 %) и метакронные (9,5 %). При наследственном неполипозном раке толстой кишки развиваются злокачественные опухоли эндометрия, яичника, желудка и тонкой кишки, что вызывает трудности для точной идентификации этого синдрома.

Характерная генетическая черта синдрома Линча I (наследственный неполипозный рак толстой кишки) — наследственные мутации генов репарации ДНК (mismatch repair — MMR): *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1*, *PMS2* — с наиболее частыми мутациями генов *MLH1*, *MSH2* (табл. 5.15). Существует предположение, что протеины генов репарации ДНК MMR — это сиг-

нальные молекулы, которые функционируют как прямые сенсоры, задействованные в сигнальных путях репарации ДНК или провоцирующие апоптоз.

Белки, кодируемые этими генами, участвуют в процессах репарации ДНК и их инактивация приводит к микросателлитной нестабильности [95]. Реже наблюдаются мутации гена *hMSH6*, с которым связана атипичная характеристика наследственного неполипозного колоректального рака, а именно позднее начало манифестации болезни, и мутации других генов *hMSH3*, *hPMS1*, *hPMS2*. Множество генов репарации ДНК, экспрессия которых ассоциирована как между собой, так и с другими генами, обуславливает клинический полиморфизм этого синдрома и склонность к развитию неоплазий, при этом риск развития метакронного колоректального рака увеличивается в 16–19 раз по сравнению с развитием первичного рака толстой кишки.

Микросателлитная нестабильность как маркер нарушения репарации ДНК чаще отмечается при множественных колоректальных опухолях (81,8 % больных), чем при спорадическом раке толстой кишки (34,3 % больных), что свидетельствует о роли микросателлитной нестабильности в развитии множественных опухолевых поражений толстой кишки [97].

Изучение генетических повреждений клеток в ходе прогрессии наследственно-

Таблица 5.15

**Экспрессия генов в наследственном неполипозном раке толстой кишки (синдром Линча I) [96]**

Гены	Локализация генов в хромосомах	Частота встречаемости в пределах синдрома, %
<i>MLH1</i>	3p21	30–35
<i>MSH2</i>	2p22-p21	30–35
<i>MSH6</i>	2p16-p15	5,0
<i>PMS1</i>	2q31-q38	<1,0
<i>PMS2</i>	7p22	<5,0

го неполипозного рака толстой кишки позволило определить направленность повреждений репарационной системы, представить генетическую схему поэтапного развития опухоли с выделением «взрыва» мутагенеза, связанного с повреждениями генов *hMSH6* и *IGFIIR* в обоих аллелях, постепенное накопление критического числа мутированных генов, способствующих малигнизации и дальнейшей прогрессии опухоли [98].

Для точной клинической идентификации фактора наследственности неполипозного рака толстой кишки разработаны Амстердамские критерии (1991), представленные ниже.

*Амстердамские критерии наследственного неполипозного рака толстой кишки*

- Три или большее количество родственников с гистологически верифицированным колоректальным раком; один из них должен быть родственником первой степени родства по отношению к двум остальным.
- Последовательное поражение родственников двух поколений.
- Один из пораженных родственников моложе 50 лет.
- Семейный полипоз должен быть исключен.

Учитывая частое развитие при синдроме Линча I опухолей внекишечной локализации, особенно генитального тракта, эти критерии в дальнейшем были уточнены (Bethesda criteria).

*Уточненные критерии (Bethesda criteria, 1997) наследственного неполипозного рака толстой кишки*

- Двое больных с наследственным неполипозным раком толстой кишки, в том числе синхронным или метахронным раком (колоректальный, эндометрия, яичника, желудка, тонкой кишки, гепатобилиарной системы, рак почки или мочеочника).

- Больной колоректальным раком и его родственник первой степени родства с колоректальным раком и/или внекишечным раком, связанным с неполипозным раком толстой кишки и/или аденомой толстой кишки. Одна из опухолей диагностирована до 45 лет, аденома — до 40 лет.
- Больные с колоректальным раком или раком эндометрия, развившимися до 45 лет.
- Больные с колоректальным раком правого отдела толстой кишки, развившимся до 45 лет, опухоли низкодифференцированные (солидного или фиброзного типа).
- Больные с перстневидно-клеточным раком толстой кишки, развившимся до 45 лет.
- Больные с колоректальными аденомами, диагностированными до 40 лет.

В последние годы все больше внимания уделяется наследственным формам рака молочной железы и рака яичника, которые связаны с герминальными мутациями генов-супрессоров опухолевого роста: *BRCA1*, расположенного в хромосоме 17q12-21, и *BRCA2*, локализующегося в хромосоме 13q12-13 [99; 100]. Мутации гена *BRCA1* чаще обнаруживаются в наследственном синдроме рак молочной железы — рак яичника (табл. 5.16).

Ген *BRCA1* индуцирует экспрессию генов, кодирующих белки генов репарации ДНК — *RAD21* и *MSH2* и белок, взаимодействующий с геном *ERBB2/HER2*, а также с рядом других генов как с известной (30 генов), так и с неизвестной функцией (16 генов) [101]. С помощью конфокальной и электронной микроскопии установлено, что белок *BRCA1* локализован в микротрубочках митотического веретена и центромерах, то есть его функция задействована в динамике митоза и в процессе сегрегации хромосом.

Продукты гена-супрессора *BRCA2* включаются в контроль клеточного цикла и репарации ДНК. Хотя ген *BRCA2* также относится к генам-супрессорам, однако

Таблица 5.16

**Частота экспрессии генов-супрессоров опухолевого роста в наследственном синдроме рака молочной железы и яичника [92]**

Гены	Локализация генов в хромосомах	Частота встречаемости в пределах синдрома, %
<i>BRCA1</i>	17q21	75-90
<i>BRCA2</i>	13q12-13	10-25

степень риска возникновения опухолей при мутации этого гена несколько ниже, чем при мутациях *BRCA1*. В отличие от последней мутации в гене *BRCA2* могут быть соматическими и встречаться на более поздних стадиях опухолевого процесса. Клетки с мутациями гена *BRCA2* более чувствительны к действию мутагенов.

При анализе мутаций гена *BRCA1* в семьях больных раком молочной железы выявляется не одна, а несколько герминальных изменений. Изучение частоты носителей мутации гена *BRCA1* и *BRCA2* показало, что у значительного количества больных (465 больных раком молочной железы и 148 больных раком яичника — жителей Гродненской области Беларуси) чаще выявлялись мутации гена *BRCA1*, среди которых преобладали три варианта — *538insC*, *415delA*, *4153delA* с частотой соответственно 73, 18, 9 %. В раковых семьях больных (рак молочной железы и/или рак яичника) из Южной Германии обнаружено 15 новых мутаций в гене *BRCA1* и 8 — в гене *BRCA2*, 11 из которых связывают с развитием этих форм рака [102].

При изучении мутаций *BRCA1* и *BRCA2* у женщин Испании обнаружено три устойчивые мутации — *185delAG*, *589delCT*, *A1708E*, которые связывают с развитием рака молочной железы, яичника, билатерального рака молочной железы, рака молочной железы в сочетании с раком яичника. В последние годы все больше появляется исследований, посвященных наследственному синдрому рак молочной железы — рак яичника [103; 104].

При генетическом исследовании рака молочной железы (48 больных) и рака яичника (22 пациента) определены мутации генов *BRCA1* и *BRCA2* соответственно в 35,4 и 54,6 % случаев. У больных раком молочной железы обнаружено 4 типа мутации гена *BRCA1*, среди которых мутация *5382insC* встречалась наиболее часто — в 76,5 %. У больных раком яичника обнаружено только 2 мутации, среди которых мутация *5382insC* выявлена у 91,7 % случаев. В обследованных семьях рак молочной железы наблюдался у родственников пробаанда чаще (57 %), чем рак яичника (8 %) [105].

При раке молочной железы также часто наблюдается делеция области 19p13, в которой картирован ген *STK11*, ответственный за развитие синдрома Пейтца — Егерса — наследственного заболевания, при котором возникают пигментация слизистых оболочек и кожи, гемангиомы желудочно-кишечного тракта, отмечается повышенный риск развития рака, в том числе рака молочной железы. Идентифицированы четыре области делеций в этом гене и потеря гетерозиготности в области 19p13.2-13.3 [106].

Рак молочной железы у женщин молодого возраста чаще связан с герминальными мутациями гена *BRCA1* и имеет определенные клинические черты — большая агрессивность опухолевого процесса в связи с лимфоваскулярной инвазией, низкой степенью дифференцировки опухоли, отсутствием рецепторов эстрогенов, экспрессией гена *HER2/neu*. Более часто при этом возникает билатеральный рак молочной железы. У 73 % больных билатеральным раком молочной железы отмечается отягощенность семей по онкопатологии. При этом частота возникновения злокачественных опухолей разного генеза у больных билатеральным раком молочной железы в 2,3 раза больше, чем у больных односторонним раком.

Расовые и этнические различия оказывают влияние на особенности клинического течения рака молочной железы [68]. Частота появления этого заболевания варьи-

рует в разных странах земного шара. Так, самая высокая заболеваемость в юго-западной Азии, о чем свидетельствуют данные опухолевого регистра в Маниле на Филиппинах. Многие авторы отмечают генетические различия в опухолях (экспрессия белка p53, HER2 и c-met, экспрессии гормональных рецепторов и степени дифференцировки опухолевых клеток) у афроамериканок и белых женщин.

Наследственный рак яичника составляет 10 % среди всех опухолей яичника и встречается в наследственном синдроме рак молочной железы — рак яичника или ассоциирован в составе синдрома Линча I с раком эндометрия и толстой кишки. Характерно, что мутации *BRCA1* чаще выявляются при серозном раке яичника, чем при других гистологических формах опухолей этой локализации.

Появление злокачественных опухолей разного генеза в семьях обусловлено прежде всего наследственным фактором, при этом развитие опухоли разных локализаций — это результат плейотропного действия одного мутантного гена, который наследуется по аутосомно-доминантному типу. У членов семей с высокой частотой возникновения рака, как указывалось выше, отмечается дефектное восстановление повреждений ДНК.

Вместе с тем причины семейной агрегации рака могут быть не только генетическими (мутация одного или нескольких генов), но и негенетическими (одинаковый образ жизни или влияние канцерогенных факторов внешней среды, мутагенов и т. д.). Такие разнообразные причины лежат в основе мультифакторных болезней, которые имеют некоторые общие черты: они довольно часто встречаются и разнообразны за патогенезом, сопряжены не только с грубыми генетическими дефектами, но и с нормальным кариотипом. К мультифакторной патологии относится большинство злокачественных опухолей человека, характеризующихся разной величиной вклада наследственных и внешнесредовых факторов в общую подверженность развитию неоплазий [107; 108].

Клинико-генеалогические исследования у больных раком тела матки, яичника, молочной железы и толстой кишки, проведенные в Институте экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины, позволили установить наследственные варианты опухолей и агрегацию в родословных опухолей разного генеза. Наиболее часто отмечались ассоциации рака толстой кишки с раком органов женской репродуктивной системы, рака молочной железы с раком яичника, ассоциации опухолей разного генеза. Были обнаружены прямая корреляция между злокачественными опухолями у родителей и детей, первично множественные синхронные и метакронные опухоли, феномен антиципации. Выявленные особенности агрегации опухолей в родословных обследованных больных оказались характерными для семейного ракового синдрома (рис. 5.2–5.4).

Проведенный в этом исследовании анализ родословных 500 больных колоректальным раком, 250 больных раком эндометрия, 200 больных раком молочной же-

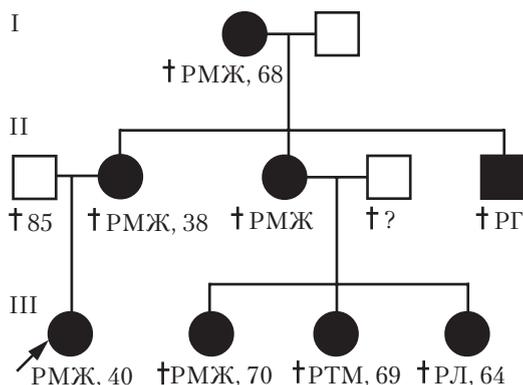


Рис. 5.2. Родословная больной наследственным раком молочной железы (40 лет). Заболевание отмечается у родственников трех поколений

Примечание. I–III — поколения родственников, пробанд указан стрелочкой; РМЖ — рак молочной железы; РТМ — рак тела матки; РГ — рак гортани; РЛ — рак легкого.

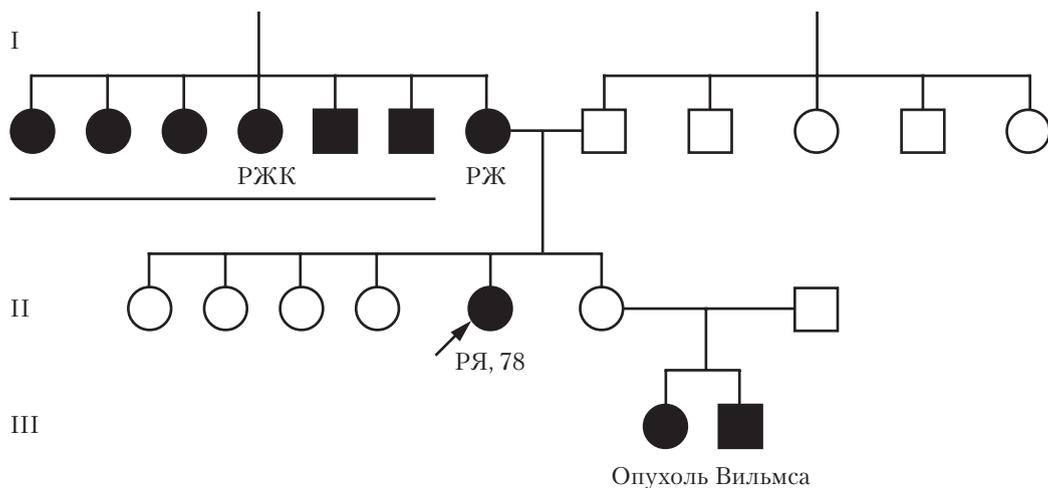


Рис. 5.3. Родословная больной раком яичника (78 лет) с агрегацией злокачественных опухолей желудочно-кишечного тракта в I поколении и опухоли Вильмса в III поколении

Примечание. I–III — поколения родственников, пробанд указан стрелочкой; РЖК — рак желудочно-кишечного тракта; РЖ — рак желудка; РЯ — рак яичника.

лезы и 218 больных раком яичника (все — жители Киевского региона) позволил рассчитать вклад этих факторов в общую подверженность указанным заболеваниям. Доля наследственных и других факторов оказалась равной соответственно 75 и 25 % при колоректальном раке, 54 и 46 % — при раке эндометрия, 56 и 44 % — при раке молочной железы (рис. 5.5). Вклад наследственного фактора в подверженность к развитию рака органов репродуктивной системы у родственников пробандов с раком яичника оказался равным 63 %. Эти данные свидетельствуют, что изученные нами новообразования можно отнести к мультифакторной патологии.

Другими исследователями отмечен значительный наследственный компонент (65,5 %) в общей подверженности заболеванию билатеральным раком, который оказался выше такового в общей популяции и в 2 раза больше, чем у больных односторонним раком молочной железы.

Рак шейки матки также относится к мультифакторной патологии, однако вклад наследственного фактора небольшой — он не превышает 3 %. На примере развития

этой формы онкологической патологии четко прослеживается влияние других факторов, а именно инфекции высокоонкогенными вирусами папилломы человека (16, 18, 31, 33, 34, 35-й типы и др.), гены которых взаимодействуют с другими генами соматических клеток [37]. Среди генетических изменений в предрасположенности к развитию рака шейки матки важная роль отводится олигонуклеотидному полиморфизму.

Агрегация злокачественных опухолей в семьях онкологических больных подтверждена многими клиническими наблюдениями, что стало основанием для выделения семейных форм рака и семейного ракового синдрома (синдром Линча II), который в зависимости от типа ассоциации новообразований в родословных делится на две группы (табл. 5.17) и имеет определенные клинические характеристики.

#### Основные признаки семейного ракового синдрома

- В родословной 2 и больше родственников с опухолями одного и того же генеза.

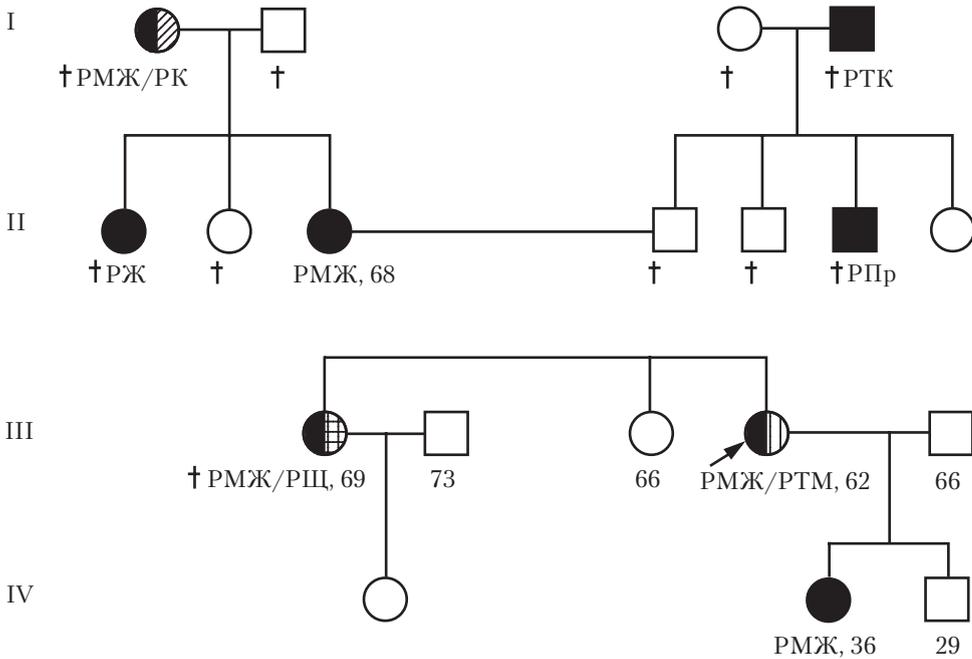


Рис. 5.4. Родословная больной (62 года) с метакронными опухолями молочной железы и тела матки

Примечание. I–IV — поколения родственников, пробанд указан стрелочкой; РМЖ — рак молочной железы; РЖ — рак желудка; РТК — рак толстой кишки; РПр — рак предстательной железы; РК — рак кожи; РЩ — рак щитовидной железы.

В родословной трое больных с множественными злокачественными опухолями, среди которых преобладает рак молочной железы. Агрегация опухолей по типу семейного ракового синдрома — наследственного рака молочной железы.

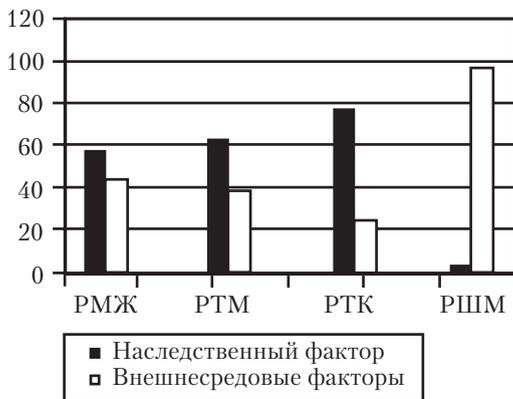


Рис. 5.5. Вклад наследственного и внешне-средового факторов в общую подверженность развитию рака молочной железы (РМЖ), тела матки (РТМ), толстой кишки (РТК) и шейки матки (РШМ) в популяции Киевского региона

Таблица 5.17  
Ассоциация и локализация опухолей при семейном раковом синдроме [96]

Тип I	Тип II
Молочная железа	Молочная железа
Эндометрий	Эмбриональные опухоли
Яичник	Щитовидная железа
Предстательная железа	Кора надпочечников
Толстый кишечник	Мочевой пузырь
Поджелудочная железа	Саркомы
Кожа	Острый лейкоз
Меланома	Болезнь Ходжкина

Таблица 5.18

## Опухоли, характеризующие синдромы МЭН [109]

Тип синдрома, ген и его локализация	Локализация опухоли
МЭН I Ген <i>MEN1</i> 11q	Паращитовидные железы Клетки островков поджелудочной железы Кора надпочечника Гипофиз Щитовидная железа
МЭН II а Ген <i>RET</i> 10q11.2	Щитовидная железа (медулярный рак) Паращитовидные железы (аденома) Надпочечник (феохромоцитомы)
МЭН II б Ген <i>NF1</i> 17q11.2	Щитовидная железа (медулярный рак) Надпочечник (феохромоцитомы) Невромы слизистых оболочек пищеварительного тракта

- Имеется 2 и больше родственников I степени родства с опухолями разного генеза (рак молочной железы, рак надпочечника, саркома, лейкоз).
- В семье 3 и больше родственников с опухолями в «связанных» местах: молочная железа — яичник — матка — толстый кишечник.
- Множественные опухоли в ассоциативных местах: рак щитовидной железы — рак надпочечника.
- У родственников опухоли обычно возникают в одинаковых анатомических областях.
- Частые поражения парных органов.
- Опухоль обычно образуется в более молодом возрасте.
- У близнецов опухоли возникают в одном возрасте и в идентичных местах.
- Течение рака более злокачественное (?).
- Поражение может «перескакивать» генерации в семьях.

Известны также другие семейные синдромы, при которых наблюдаются ассоциации злокачественных опухолей определенного типа. Так, синдром множественной эндокринной неоплазии (МЭН) в зависимости от ассоциации возникающих опухолей делится на два типа — МЭН I и МЭН II, последний в свою очередь — на подтипы а и б. Для этого синдрома характерно развитие опухолей эндокринных желез (табл. 5.18).

Наследственный медулярный рак щитовидной железы — основная составная часть синдрома множественной эндокринной неоплазии. Развитие этого рака связано с наследственными мутациями протоонкогена *RET*, расположенного в хромосоме 10q11.2. При синдроме МЭН с помощью ДНК-технологий в РОНЦ АМН России выявлено 6 типов герминальных мутаций в гене *RET* и показана возможность применения этих маркеров для уточнения диагноза бессимптомных носителей мутаций из отягощенных семей с целью формирования групп риска. В российской популяции с синдромом МЭНIIа наиболее частой мутацией является замена цистеина на аргинин в кодоне 634, которая обнару-

жена у 50 % обследованных, тогда как мутация в кодоне 918 выявлена у всех больных с МЭНIIб [92].

Описан семейный миелодиспластический синдром, характер наследования и клинические проявления которого предполагают наличие генетического дефекта у членов родословной, который способствует развитию миелодиспластического синдрома.

В последние годы активно разрабатываются генетические аспекты и идентифицируются наследственные варианты семейных форм опухолей разного генеза [96; 110; 111]. Результаты исследования свидетельствуют об этиологической и генетической гетерогенности меланомы [112].

В литературе описан синдром семейного аденокарциноматоза — аутомомно-доминантного заболевания с высокой пенетрантностью и вариабельной экспрессивностью и развитием железистого рака в органах желудочно-кишечного тракта, эндометрии, яичнике. У 40 % лиц с этим синдромом

злокачественные опухоли развиваются в молодом возрасте (до 40 лет), а первично-множественные — в 3–4 раза чаще, чем в общей популяции.

Семейный компонент характерен и для больных со злокачественными опухолями уротелия, при этом риск развития рака у родственников первой степени родства увеличен в два раза по сравнению с обычной популяцией.

Известен наследственный синдром рака тела матки — Muir's синдром. Он характеризуется развитием рака тела матки, наличием множественных опухолей кожи (кератоакантомы, базально-клеточный рак), полипов и аденокарцином толстой кишки, желудка и тонкой кишки. Синдром наследуется по аутосомно-доминантному типу с высокой пенетрантностью и вариабельной экспрессивностью.

Другой синдром Touge — Muir также характеризуется развитием рака тела матки и множественных опухолей кожи, которые в семьях ассоциируются с доброкачественными и злокачественными новообразованиями мочеполовой системы (вульва, матка, мочеточник, мочевого пузыря) и желудочно-кишечного тракта (тонкая и толстая кишка, пищевод), а также с раком молочной железы, гортани, бронхов.

У пациентов с семейным синдромом Ли — Фраумени опухоли развиваются как в детском и молодом возрасте, так и после 60 лет; при этом показано, что значительная роль в этих процессах отводится герминальной мутации гена *p53*. При этом синдроме в семьях наблюдается агрегация сарком мягких тканей с раком молочной железы, остеосаркомой, опухолями мозга, адренкортикальными опухолями, лейкозами или отмечаются первично-множественные опухоли у одного больного. Обычно все они, за исключением рака молочной железы, развиваются в детском возрасте. Семейный синдром Ли — Фраумени имеет географические особенности — он чаще встречается в США и Англии, но практически отсутствует в Японии.

К характерным признакам семейного ракового синдрома относятся первично-

множественные опухоли, которые представляют собой очень сложную и многогранную проблему теоретической и практической онкологии. Абсолютными критериями первично-множественных опухолей служат разная анатомическая локализация рака и неодинаковая морфология опухолей [113]. В последние годы интерес к первично-множественным опухолям увеличивается, что связано с загадочным механизмом их развития и окончательно невыясненными особенностями клинического течения.

Первые исследования, посвященные первично-множественным опухолям, были проведены Н. Т. Lynch, R. M. Fusaro, J. Lynch [114]. Согласно результатам этих исследований, 21,5 % родственников больных с наследственным раком толстой кишки и эндометрия имели две и более злокачественных опухолей. В дальнейшем были описаны первично-множественные опухоли эндометрия и яичника, эндометрия и желудочно-кишечного тракта или молочной железы, рака яичника и молочной железы, гортани и пищевода, щитовидной железы [103; 115–117]. Клинико-статистический анализ полинеоплазий у больных раком яичника за 10 лет (1987–1986), проведенный в Институте онкологии АМН Украины, показал, что значительное количество опухолей (45,7 %) составили первично-множественные опухоли тела матки и яичника, среди которых чаще наблюдались метакронные опухоли.

Что касается типа ассоциаций первично-множественных опухолей, то они могут быть различными. Между тем отмечено, что у мужчин с новообразованиями губы, кожи области головы и шеи высока вероятность развития опухоли в легком, желудочно-кишечном тракте и предстательной железе. У женщин с опухолями кожи и щитовидной железы часто возникают опухоли репродуктивных органов и желудочно-кишечного тракта. С помощью генетико-дисперсионного и генетико-корреляционного анализов большого клинического материала показано наличие общих генетических факторов между первично-мно-

жественными злокачественными новообразованиями женской репродуктивной системы и раком толстой кишки, раком тела матки и молочной железы. Это послужило основанием для утверждения о том, что в развитии рака органов женской репродуктивной системы и толстой кишки лежат общие генетические механизмы.

Наименьшая генетическая корреляция (от 1 до 15 %) отмечена между полинеоплазиями и раком шейки матки, в этиологии которого заметную роль, как известно, играют факторы внешней среды (высокоонкогенные вирусы папилломы человека).

Вызывает интерес исследование, в котором в течение 12 лет наблюдали 727 больных с гистологически подтвержденными первично-множественными опухолями, среди которых преобладали женщины. Из общего количества опухолей 72,5 % были метахронными, при этом интервал между развитием первой и второй опухоли равнялся 1,5 годам, а между второй и третьей — 4,6 годам. По данным других исследований, интервал между развитием рака тела матки и молочной железы равняется 6 годам. Критерием синхронного развития второй злокачественной опухоли считается интервал длительностью 6 месяцев — 1 год [113].

Многие исследователи уделяют внимание изучению влияния семейной предрасположенности к развитию рака на выживаемость больных, однако данные литературы неоднозначны. Исследователи семейного ракового синдрома пришли к выводу о более неблагоприятном прогнозе наследственных форм рака. На основании анализа 22 больных с такими опухолями авторы сделали заключение, что 3-летняя выживаемость составляет 75 % и зависит только от стадии опухолевого процесса. Анализ клинического течения опухолевого процесса у 102 больных раком эндометрия показал, что в семьях с агрегацией опухолей чаще отмечается низкая степень дифференцировки новообразований, более глубокая инвазия рака в миометрий и более частое распространение на цервикальный канал, более агрессивное клиническое

течение и уменьшение 3-летней выживаемости больных. В других работах указывается на лучшее выживание больных с семейными формами рака.

Следовательно, представления о выживаемости больных с первично-множественными опухолями противоречивы [118]. Некоторые авторы считают, что первично-множественные опухоли нельзя расценивать как абсолютно неблагоприятный прогностический фактор. С нашей точки зрения, это может быть связано с несовершенной системой учета факторов прогноза, типа агрегации злокачественных опухолей в семьях и, иногда, с некорректной оценкой распространения опухолевого процесса или без ее учета.

Исследователи указывают, что развитие первично-множественных опухолей может быть связано с мутациями в генах-супрессорах *BRCA1* и *BRCA2*, играющих роль в развитии рака молочной железы и яичника [119; 120]. О такой возможности свидетельствуют описанные в литературе клинические наблюдения, и в виде примера мы приводим одно из них. Больная раком молочной железы (54 года) — носительница мутации гена *BRCA2* с отягощенной по онкологии родословной (рак молочной железы у матери и бабушки) обратилась в генетическую службу с целью скрининга рака яичника. Поскольку левые придатки у нее были удалены во время родов по поводу доброкачественной опухоли, больной предложили удалить оставшиеся придатки. Патоморфологическое исследование операционного материала выявило аденокарциному молочной железы в маточной трубе и отсутствие опухолевого роста в яичнике. Приведенное наблюдение иллюстрирует плеiotропное действие одного и того же гена на проявления разных признаков.

Метахронные опухоли могут возникать у онкологических больных после проведения полихимиотерапии. Так, у больных лимфогранулематозом через 3–28 лет развились лимфомы, рак легкого (16,9 % больных), молочной железы (13,2 %), почки (11,3 %), толстой кишки (9,4 %), опухоли

матки и яичника соответственно в 5,7 и 7,5 %. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости пожизненного наблюдения за больными, которые получали полихимиотерапию.

Немаловажное значение имеет экспрессия некоторых генов для оценки прогноза клинического течения опухолевого процесса. Экспрессия гена *c-erbB2/HER2neu* служит показателем плохого прогноза и маркером рецидива опухоли не только у больных раком молочной железы, но и раком эндометрия. Позитивная сверхэкспрессия этого гена обнаружена у 31,6 % больных раком эндометрия, причем его экспрессия наблюдалась преимущественно у больных старше 60 лет. Обнаружена большая частота рецидивов опухоли и снижение 5-летней выживаемости с 73 до 54 % у пациенток, в опухолях которых наблюдалась экспрессия *HER2/neu*. Такой показатель, как изменение метилирования CpG-островков, также можно использовать как биомаркер степени злокачественности опухолевого процесса [42].

Более злокачественное течение рака простаты отмечено у пробандов при наличии такой же болезни у их отцов. В семейных случаях рака простаты, которые составляют 5–10 % от всех ее опухолей, критическую роль играют мутации генов рецепторов андрогенов. Следовательно, генетические изменения имеют кардинальное значение для инициации малигнизации и на последующих этапах опухолевого роста, а также для характеристики клинического течения и прогноза опухолевого процесса.

Как указывалось выше, в развитии мультифакторной патологии задействованы, кроме наследственных, другие факторы. Результаты исследований в области эпидемиологии рака показали, что причина 90–95 % злокачественных опухолей — канцерогенные факторы окружающей среды и образ жизни. Среди них в 30 % наблюдений причиной возникновения опухолевого роста выступает курение; в 35 % — особенности питания; в 10 % — инфекционные агенты; в 4–5 % — канцеро-

гены, связанные с профессиональной деятельностью человека; в 2–3 % — ультрафиолетовое излучение; в 2–3 % — употребление алкогольных напитков, в 1–2 % — загрязнение атмосферного воздуха; в 4–5 % — репродуктивные факторы; в 4–5 % — низкая физическая активность, ионизирующая радиация [121]. Факторы наследственной предрасположенности могут изменять силу влияния канцерогенов на организм и модулировать его ответ на вредные факторы внешней среды.

Взаимодействие ген-среда может оказаться критическим событием в развитии нестабильности генома и малигнизации, поскольку канцерогены способствуют индукции мутаций и вызывают больше мутаций в тех клетках, в которых такая нестабильность уже имеется. Один из механизмов влияния вредных факторов — эпигенетические изменения экспрессии генов, которые могут повышать риск возникновения опухоли. Однако в процессах инициации опухолевого роста большое значение имеет мутационная восприимчивость организма, которая характеризует особенности его генотипа и фенотипа и определяет характеристику мутационного процесса.

Следует также указать, что от наследственной предрасположенности к развитию рака зависят особенности метаболизма канцерогенных веществ и способность репарировать вызываемые ими повреждения ДНК. Суммарным эффектом взаимодействия канцерогена и ДНК есть аддукты ДНК, образование и персистенция которых определяются индивидуальными особенностями организма, в том числе его мутационной восприимчивостью. Маркерами раннего ответа организма на вредные факторы внешней среды служат микроядра, обнаруживаемые в клетках крови, многослойного плоского эпителия и имеющие прогностическую значимость.

Следовательно, с современных позиций, определенный фенотип опухоли — это не только результат экспрессии комплекса мутантных генов, но и следствия влияния факторов внешней среды, поэто-

му соотношение ген — внешняя среда служит критерием индивидуального риска развития опухолевого процесса [38].

Однако реализацию предрасположенности к развитию рака при участии факторов внешней среды нельзя считать фатальной. Население по признаку предрасположенности к развитию рака с участием генов, ответственных за метаболизм канцерогенных веществ, их активацию, детоксикацию и репарацию ДНК, является гетерогенным. Например, по активности N-ацетилтрансферазы — фермента, участвующего в детоксикации канцерогенных веществ, популяцию можно разделить на «быстрых» и «медленных» метаболизаторов [121; 122].

Установлено, что вредные факторы внешней среды могут вызывать изменения генома, заключающиеся в хромосомных нарушениях. Так, воздействие магнитных полей на машинистов локомотивов индуцирует хромосомные aberrации в лимфоцитах периферической крови в 4 раза чаще, чем в контроле (лица без такого воздействия). Повышенный уровень хромосомных aberrаций наблюдается у медицинских сестер, контактирующих с противоопухолевыми препаратами во время лечения онкологических больных. Применение химиотерапии у последних может приводить к возникновению предрасположенности к развитию миелодисплазии.

Не менее важна в онкогенетике оценка риска развития злокачественного процесса. Показано, что семейный онкологический анамнез у больных раком желудка — это фактор риска возникновения такой же болезни у их родственников. Установлен семейный риск поражения раком печени, легкого, пищевода, желудка у родственников больных с семейными формами рака носоглотки, особенно при заболевании до 40 лет. Риск развития рака легкого повышается у носителей мутации гена *CYP1A1*.

Пациенты с мутациями в генах *BRCA1* и *BRCA2* составляют группу риска по развитию рака молочной железы. При мутациях этих генов-супрессоров риск развития злокачественных опухолей разный и колеблется от 6 до 87 % (табл. 5.19). Установлено, что профилактическая мастэктомия уменьшает риск развития рака молочной железы при герминальных мутациях указанных генов на 90 %.

По данным шведского регистра наследственного рака, наиболее высокий кумулятивный риск у родственников онкологических больных характерен для рака молочной и предстательной желез [123].

Наибольший риск развития опухолей наблюдается у родственников первой степени родства. Так, в семьях больных раком яичника такой риск наиболее высокий (4,5 раза) для возникновения у родствен-

Таблица 5.19

**Риск развития злокачественных опухолей при мутации генов-супрессоров опухолевого роста *BRCA* (Breast Cancer) [92]**

Ген-супрессор и его локус	Опухоль	Риск развития, %
<i>BRCA1</i> 17q12-21	Рак молочной железы	80–87
	Рак яичника	40–60
	Рак толстой кишки	8
	Рак простаты	6
	Опухоли в составе семейного ракового синдрома	45
<i>BRCA2</i> 13q12-13	Рак молочной железы	80–85
	Рак яичника	10–25
	Рак грудной железы (мужчины)	8–10
	Рак поджелудочной железы	7

ников такого же заболевания. При этом он наибольший (14,2 раза) для женщин до 45 лет и уменьшается до 3,7 раза после 55 лет.

Риск развития рака толстой кишки для родственников первой степени родства превышает общепопуляционный в 17–20 раз. В семьях, в которых есть один больной ребенок с онкологической патологией, коэффициент наследования злокачественной опухоли составляет для родственников первой степени родства 5,8 %, второй степени – 31,6 % [124].

Риск развития опухоли у детей пробандов зависит от наличия или отсутствия онкологического заболевания у одного или обоих родителей. В качестве примера при-

водим результаты собственных исследований по определению риска развития рака тела матки в семьях пробандов в зависимости от указанных факторов и количества больных сибсов в семье (табл. 5.20). Из данных таблицы следует, что наибольший риск определяется в тех случаях, когда оба родителя больны раком.

Повторный риск для детей в семьях пробандов с нефробластомой зависит не только от семейного анамнеза и отягощенности по онкологии родословной, но и от вида опухоли у родителей, например, поражения одной или двух почек (табл. 5.21).

С семейной историей тесно связан риск развития и колоректального рака. Этот

Таблица 5.20

**Показатели рекуррентного риска развития злокачественных новообразований в семьях больных раком тела матки, %**

Число детей	Риск для следующих сибсов, если среди них больны раком									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Брак здоровых родителей (N × N)										
1	2,2									
2	2,1	3,1								
3	2,1	3,1	4,1							
4	2,1	3,1	4,1	5,1						
5	2,1	3,0	4,0	5,0	6,0					
6	2,0	3,0	4,0	5,0	5,9	6,9				
7	2,0	3,0	4,0	4,9	5,9	6,8	7,8			
8	2,0	3,0	3,9	4,9	5,8	6,8	7,7	8,7		
9	2,0	2,9	3,9	4,8	5,8	6,7	7,7	8,6	9,5	
Брак с одним родителем (отец или мать), больным раком (N × A)										
1	3,7									
2	3,6	5,1								
3	3,6	5,1	6,6							
4	3,5	5,0	6,5	8,0						
5	3,5	4,9	6,4	7,8	9,3					
6	3,4	4,8	6,3	7,7	9,2	10,6				
7	3,4	4,8	6,3	7,6	9,0	10,5	11,9			
8	3,3	4,7	6,1	7,5	8,9	10,3	11,7	13,1		
9	3,3	4,6	6,0	7,4	8,8	10,2	11,6	12,9	14,3	
Брак больного отца и больной матери (A × A)										
1	7,2									
2	7,1	9,6								
3	6,9	9,3	11,8							
4	6,7	9,1	11,5	13,9						
5	6,6	8,9	11,3	13,6	16,0					
6	6,4	8,7	11,0	13,3	15,6	17,9				
7	6,3	8,5	10,8	13,0	15,2	17,5	19,7			
8	6,1	8,3	10,5	12,7	14,9	17,1	19,3	21,5		
9	6,0	8,1	10,3	12,4	14,6	16,7	18,9	21,0	23,2	

риск зависит от числа пораженных членов семьи, наличия первично-множественных опухолей и возраста манифестации злокачественного процесса (табл. 5.22)

Единичные исследования посвящены изучению предрасположенности к развитию доброкачественных опухолей. Так, показано, что среди ближайших родственников пробандов (335 больных с миомой матки) аналогичные опухоли впервые выявлены у 23,4 % обследованных родственников, а риск развития миомы в семьях таких пробандов в 3,9 раза больший, чем в контроле.

Оценка риска появления повторных случаев злокачественных образований возможна при проведении математических расчетов согласно существующим программам обработки клинико-генеалогичес-

ких данных. При этом необходимые этапы таких исследований — проведение сегрегационного анализа, определение корреляции отдельных форм заболеваний, коэффициента наследуемости, который характеризует долю аддитивной компоненты в общей фенотипической дисперсии признака, и оценка повторного риска развития новообразований в течение жизни или к какому-то определенному возрасту [125; 126]. Эти параметры должны учитываться при составлении групп риска по развитию онкологической патологии.

Мы полностью согласны с мнением авторов, которые считают, что риск заболевания не исчерпывается одной генетической компонентой, взятой изолированно, поскольку с увеличением возраста значение индивидуальных наследственных раз-

Таблица 5.21

**Повторный риск для детей в семьях пробандов с нефробластомой в зависимости от вида опухоли и генетической ситуации в семье [93]**

Семейный анамнез	Риск для ребенка, %
У одного из родителей двусторонняя опухоль. У одного из родителей односторонняя опухоль и положительный семейный анамнез. Родители здоровы, но поражены два сибса. Родители здоровы, но поражен один сибс и родственник по боковой линии	30
У одного из родителей односторонняя опухоль и отрицательный семейный анамнез	10
Родители здоровы. Единственный ребенок с односторонней опухолью	5
Родители здоровы. Единственный ребенок с двусторонней опухолью	10

Таблица 5.22

**Показатели риска развития рака толстой кишки в течение жизни (lifetime risk) в зависимости от количества больных родственников в родословной [94]**

Семейная история	Риск развития рака толстой кишки, %
Нет случаев рака толстой кишки в семье	2
Болен один родственник первой степени родства	6
Больны один родственник первой степени родства и два родственника второй степени родства	8
Один родственник первой степени родства заболел до 45 лет	10
Больны два родственника первой степени родства	17
Наследственный неполипозный колоректальный рак	70
Семейный аденоматоз толстой кишки	100

личий снижается за счет влияния разнообразных факторов окружающей среды, а также обменных и регуляторных сдвигов в организме, обусловленных старением. Поэтому необходимо рассчитывать общий риск с учетом факторов трех типов — генетических, онтогенетических (возрастных) и средовых (экологических). Такое определение общего риска с учетом всех этих факторов наиболее корректно для формирования групп лиц с повышенным риском развития опухолевого процесса.

По данным Национального регистра шведских семей с наследственной предрасположенностью к развитию рака установлено, что главная роль в образовании опухолей принадлежит факторам внешней среды, а генетические причины имеют дополнительное значение. В то же время авторы утверждают, что изучение риска развития рака — это исследование межиндивидуальных вариаций и взаимоотношений генетической системы организма и факторов внешней среды. В таких процессах важна роль степени пенетрантности генов, экспрессия которых приводит к злокачественному росту: при высокопенетрантных генах, таких как *BRCA* при раке молочной железы и гены репарации ДНК при наследственном неполипозном раке толстой кишки, факторы внешней среды играют значительно меньшую роль в возникновении опухолей. Но, несмотря на проведенные исследования, роль каждого из указанных факторов, которые безусловно важны в манифестации опухолевого процесса, для большинства злокачественных опухолей остается неизученной.

С позиций представленного, исследование семейной заболеваемости служит ключом к пониманию роли генетических и внешнесредовых факторов в этиологии любых хронических болезней, а изучение семей с агрегацией опухолевой патологии — моделью для определения предрасположенности к развитию злокачественных опухолей. Поэтому целесообразно использовать методы генетического анализа в программах комплексного обследования больных с целью ранней диагностики

предрасположенности к раку, особенно при скрининге заболеваний [127; 128].

Сбор генетических данных для составления родословных требует тщательности и доверия пациента к врачу, поскольку случаи злокачественных заболеваний у родственников часто скрываются. При составлении родословных очень важно учитывать не только количество живых родственников, но и умерших как в детстве, так и в более позднем возрасте с указанием причин смерти. С помощью анализа родословной можно установить тип наследственной передачи мутантного гена в пределах одной семьи. Предполагаемая наследственная болезнь может быть подтверждена при хромосомном или генном анализе клеток пациента. При наследственной природе болезни генный или хромосомный дефект может быть обнаружен во всех соматических клетках (лимфоциты периферической крови, фибробласты).

Учитывая приведенное выше, профилактика рака должна быть комплексной. Во-первых, ее следует направить на разработку подходов к устранению или уменьшению эффектов канцерогенных воздействий на организм человека, и, во-вторых, она обязана включать генетический компонент.

В виде начального этапа профилактики развития злокачественных новообразований предлагается и пропагандируется создание онкогенетических регистров. Пока их количество незначительно, но анализ работы Московского регионального онкогенетического регистра, созданного на базе Российского онкологического научного центра АМН, вселяет уверенность в эффективности такой профилактики рака. В этот регистр введены сведения о 6000 семей раковых больных, проживающих в одном из административных районов Москвы. Из них у 400 семей зарегистрированы различные синдромы наследственного и семейного рака. Установлено, что частота вторичных опухолей в раковых семьях зависит от степени отягощенности семей по онкологической патологии. В течение 5 лет новые случаи рака возникли у 33,3 % раковых семей и выявлено 12 новых раковых

семей. При попарном сравнении групп родственников из раковых и нераковых семей определено, что риск возникновения опухолей у членов раковых семей в данной популяции повышен в 3–11 раз. Семейный раковый регистр в Швеции включает данные почти о 10 млн больных раком и их родителях.

Таким образом, представленные данные указывают на необходимость оказания специализированной помощи членам семей, в которых наблюдается агрегация опухолевой патологии. Поэтому усилия многих исследователей направлены на разработку алгоритмов обследования таких семей с учетом клинико-генеалогических данных. Методом скрининга наследственной предрасположенности к развитию рака служит заполнение пациентами генетических карт, в которых отражаются количество больных раком родственников и локализация рака [109; 129]. На основании полученных результатов создаются группы высокого риска в отношении возможного возникновения злокачественного роста с последующим клинико-генетическим мониторингом, эффективность которого подтверждена исследованиями, проводящимися в Российском онкологическом научном центре АМН.

На необходимость разработки генетического подхода к ранней диагностике и профилактике опухолей с учетом наследственных и средовых факторов и внедрения его в онкологические учреждения указывает ряд исследователей [92; 107; 130; 131]. Однако в Украине подобные исследования находятся на начальном этапе, а регистры семейного или наследственного рака отсутствуют. Это обусловлено многими причинами, в частности отсутствием базы данных, которую можно создать только при клинико-генеалогическом обследовании онкологических больных, и стандартных подходов к проведению таких исследований. Кроме того, не разработаны принципы функционирования регистров семейного и наследственного рака в связи с отсутствием научных разработок по указанным вопросам. Все это свидетельствует о

необходимости расширения в Украине исследований по такой важной проблеме онкологии, как предрасположенность к развитию злокачественных опухолей, определению индивидуального риска его возникновения, ранняя диагностика и профилактика рака у членов семей, в которых наблюдается агрегация онкологической патологии. Опыт работы регистров семейного рака за рубежом свидетельствует об их значительном вкладе в оптимизацию ранней диагностики и профилактики рака.

Знание семейной генеалогии рака, возможность рассчитать риск развития рака у родственников пробандов, углубленное их клиническое обследование и дальнейшее диспансерное наблюдение могут быть положены в основу генетической профилактики рака. Решение таких важных вопросов онкогенетики будет способствовать ранней диагностике новообразований и их профилактике.

Исходя из всего изложенного материала, в котором суммированы данные литературы и результаты собственных исследований, следует выделить основные направления онкогенетики, требующие дальнейшего развития.

#### *Диагностические аспекты*

- Определение молекулярно-генетических признаков малигнизации для ранней диагностики злокачественного роста.
- Изучение взаимосвязи молекулярно-генетической гетерогенности опухоли с ее морфологией и степенью злокачественности.
- Исследование генетического профиля опухоли и ее метастатического фенотипа.
- Обнаружение связи гиперэкспрессии онкогенов и генов-супрессоров опухолевого роста с клинической агрессивностью опухолевого процесса.
- Изучение частоты амплификации генов и риска развития рецидива опухолевого процесса.
- Иммуногистохимическое определение продуктов мутантных генов в опухоли.

левых клетках и изучение их взаимосвязи со степенью злокачественности опухолевого процесса.

- Разработка новых клинических и морфологических классификаций с учетом цитогенетических, молекулярно-генетических характеристик и протеомного профиля опухоли.

#### *Прогностические задачи*

- Уточнение прогноза опухолевой болезни, возможности рецидива на основании изучения генетического профиля опухоли и экспрессии продуктов мутантных генов.

#### *Терапия опухолей*

- Определение молекулярно-генетических основ лекарственной и лучевой резистентности опухолей.
- Разработка препаратов, ингибирующих экспрессию мутантных белков (специфические антитела к продуктам онкогенов, химические препараты, нарушающие функцию белков).
- Трансфекция (перенос) копий неизмененного гена-супрессора в опухолевые клетки с его дефектом.

#### *Профилактика*

- Онкогенетическая консультация членов семей с различной ассоциацией злокачественных опухолей и оценка генетического риска развития злокачественных опухолей у родственников пробанда из семей с агрегацией онкологической патологии.
- Выявление носителей мутантных генов и определение предрасположенности к развитию семейных форм злокачественных новообразований.
- Формирование групп риска среди родственников больных с агрегацией опухолей в семье.
- Использование методов генетического и протеомного анализа для выявления малигнизации, ранней диагностики опухолевого процесса на этапе его доклинического развития.

#### **Список литературы**

1. *Заболееваемость* населения России злокачественными новообразованиями в 2000 г. / В. В. Старинский, Г. В. Петрова, В. И. Чиссов и др. // Рос. онкол. журнал. — 2002. — № 3. — С. 39-44.
2. *Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби* / З. П. Федоренко, Л. О. Гулак, Є. Л. Горох та ін. // Бюл. Нац. канцер-реєстру України № 7. — К., 2006. — 96 с.
3. *Cancer statistics, 2000* / P. T. Greenlee, T. Murray, S. Bolden, P. A. Wingo // *Cancer J. Clin.* — 2000. — Vol. 50. — P. 7-33.
4. *Цитологическая реактивность онкологического больного* / К. П. Ганина, Л. З. Полищук, Н. В. Бородай и др. — К.: Наук. думка, 1995. — 150 с.
5. *Роль генетичної нестабільності у розвитку злоякісних новоутворень* / Л. З. Поліщук, Л. А. Налескіна, Л. Г. Бучинська, І. П. Несіна // Шляхи та перспективи розвитку експериментальної онкології в Україні. — К.: ДІА, 2001. — С. 35-45.
6. *Полищук Л. З., Несина И. П., Новак Е. Е.* Рак яичника: генетические изменения и их связь с клиническими особенностями опухолевого процесса // *Онкология.* — 2002. — Т. 4, № 1. — С. 9-14.
7. *Spontaneous chromosomal instability in breast cancer families* / S. K. Roy, A. H. Trivedi, S. R. Bakshi et al. // *Cancer Genet. Cytogenet.* — 2000. — Vol. 118, N 1. — P. 52-56.
8. *Wahl G., Vafa O.* Genetic instability, oncogenes, and the p53 pathway // *Plainview.* — 2000. — N 3. — P. 511-520.
9. *Бариляк І. Р.* Медична генетика: досягнення і перспективи. — Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. — К.: Логос, 2001. — С. 425-446.
10. *Івахно С. С., Корнелюк О. І.* Мікроарей: огляд технологій та аналіз даних // *Укр. біохім. журнал.* — 2004. — Т. 76, № 2. — С. 5-19.
11. *Киселев Л. Л.* Геном человека и биология XXI века // *Вестник РАН.* — 2000. — Т. 70. — С. 412-424.
12. *Ровенский Ю. А.* Клеточные и молекулярные механизмы опухолевой инвазии

// Биохимия. — 1998. — Т. 63, вып. 9. — С. 1204-1221.

13. *Свердлов Е. Д.* Перспективы использования достижений геномики в медицине: начало эры полногеномной медицинской генетики // Патол. физиол. экспер. терапия. — 2001. — № 1. — С. 3-22.

14. *Молекулярная* и клиническая онкология: точки соприкосновения / Е. Н. Имянитов, И. В. Комочков, А. А. Лыщев, А. В. Того // Экспер. онкол. — 1993. — Т. 15, № 5. — С. 3-8.

15. *Имянитов Е. Н., Хансон К. П.* Молекулярные аспекты патогенеза первично-множественных опухолей // Рос. онкол. журнал. — 1998. — № 5. — С. 47-51.

16. *Коган Е. А.* Биомолекулярные маркеры неоплазий в морфологической верификации и прогнозировании злокачественных опухолей. — М.: Медицина, 1997. — 173 с.

17. *Коган Е. А.* Молекулярная патология предрака и рака легкого // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. — 2003. — № 3. — С. 13-21.

18. *Кушлинский Н. Е.* Возможности, неудачи и перспективы исследования опухолевых маркеров в современной онкологической клинике. Часть 2 (лекция) // Клин. лаб. диагностика. — 1999. — № 4. — С. 25-33.

19. *Копнин Б. П.* Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза // Биохимия. — 2000. — Т. 65, № 1. — С. 5-33.

20. *Harolinska-Szmyrka A.* Cancer as genes disease // Post Biochem. — 1997. — Vol. 41. — P. 7.

21. *Баранова А. В., Янковский Н. К.* Гены-супрессоры опухолевого роста // Молекул. биология. — 1998. — Т. 32, № 2. — С. 206-218.

22. *Liu Y., Ganesan T. S.* Tumour suppressor genes in sporadic epithelial ovarian cancer // Reproduction. — 2002. — Vol. 123, N 3. — P. 341-353.

23. *Белюсова А. К.* Молекулярно-биологические подходы к терапии опухолей. — М.: Медицина, 1993. — 204 с.

24. *Шацева Т. А., Мухина М. С.* Антиген Ki-67 в оценке опухолевой пролиферации. Его структура и функции // Вопр. онкол. — 2004. — Т. 50, № 2. — С. 157-164.

25. *Якубовская Р. Н.* Современные представления о молекулярных механизмах канцерогенеза и опухолевой прогрессии как основа для разработки новых методов терапии злокачественных новообразований // Рос. онкол. журнал. — 2000. — № 6. — С. 42-50.

26. *Major oncogenes and tumor suppressor genes involved in epithelial ovarian cancer* / В. Aunoble, S. Sanches, E. Didier, Y. Bignon // Int. J. Oncol. — 2002. — Vol. 16, N 3. — P. 567-576.

27. *Абелев Г. И.* Механизмы дифференцировки и опухолевый рост // Биохимия. — 2000. — Т. 65, вып. 1. — С. 127-138.

28. *Роль* различных киназных путей передачи сигнала в пролиферации трансформантов E1A+Ras / М. В. Абрамова, С. Б. Светликова, В. В. Гнинкевич, В. А. Поспелов // Цитология. — 2005. — Т. 47, № 12. — С. 1071-1081.

29. *Гарькавцева Р. Ф., Гарькавцев И. В.* Молекулярно-генетические аспекты злокачественных новообразований // Вестник РАМН. — 1999. — № 2. — С. 38-44.

30. *Vogelstein B., Kinzler W.* The genetic basis of human cancer. — McGraw-Hill Health Professional Division, N.-Y., 1998. — 731 p.

31. *Генодиагностика* наследственной предрасположенности к раку молочной железы и разработка индивидуального прогнозирования / Л. Н. Любченко, Р. Ф. Гарькавцева, Н. И. Потехина и др. // Онкология. — 2002, suppl. — С. 26-27.

32. *Мендельштам М. Ю.* Изучение предрасположенности к развитию злокачественных онкологических заболеваний, обусловленной наследуемыми мутациями в генах *BRCA1* и *BRCA2* // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике: Сб. науч. трудов. — Новосибирск, 2003. — № 3. — С. 92-109.

33. *Transcriptional profiling* reveals that several common fragile-site genes are down-regulated in ovarian cancer / S. R. Denison, N. A. Becker, M. J. Farber et al. // Genes,

Chromosomes, and Cancer. — 2002. — Vol. 34, N 4. — P. 406-415.

34. *Phillips J. L., Ghadimi B., Wangsa D.* Molecular cytogenetic characterization of early and late renal cell carcinoma in Von Hippel-Lindau disease // *Genes, Chromosomes, and Cancer.* — 2001. — Vol. 31, N 1. — P. 1-9.

35. *Зборовская И. Б.* Молекулярно-биологические исследования онкогенов и генов-супрессоров в практике клинической онкологии // *Канцерогенез.* — М.: Медицина, 2004. — С. 361-379.

36. *Hereditary cancer and its clinical implications: a view / W. D. Otter, J. W. Koten, B. J. H. Van der Vegt et al.* // *Anticancer res.* — 1990. — Vol. 10. — P. 489-496.

37. *Выявление вируса папилломы человека при опухолях эпителиальной природы / Л. Э. Завалишина, Ю. Ю. Андреева, Ю. Ю. Манькин, Г. А. Франк.* — М.: Изд. МНИОИ, 2004 — 21 с.

38. *Бочков Н. П., Чеботарев А. И.* Наследственность человека и мутагены внешней среды. — М.: Медицина, 1989. — 270 с.

39. *Evans M. F., McDicken I. W., Herington C. S.* Numerical abnormalities of chromosomes 1, 11, 17 and X are associated with stromal invasion in serous and mucinous epithelial ovarian tumors // *J. Pathol.* — 1999. — Vol. 189, N 1. — P. 53-59.

40. *Aberrant methylation during cervical carcinogenesis / A. K. Virmany, C. Muller, A. Rath et al.* // *Clin. Cancer Res.* — 2001. — Vol. 7. — P. 584-589.

41. *Colorectal cancers with both p16 and p14 methylation show invasive characteristics / K. Hibi, H. Nakayama, M. Koike et al.* // *Jap. J. Cancer Res.* — 2002. — Vol. 93, N 8. — P. 883-887.

42. *Esteller M., Herman J. G.* Cancer as epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumors // *J. Pathol.* — 2002. — Vol. 196, N 1. — P. 1-7.

43. *Бахидзе Е. В., Малев А. В.* Значение методов исследований генома для диагностики и терапии рака яичника // *Вопр. онкол.* — 2005. — Т. 51, № 1. — С. 50-55.

44. *Петров С. В., Райхлин Н. Т.* Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. — Казань: РИУ «Титул», 2000. — 288 с.

45. *Пожариский К. М., Лееман Е. Е.* Значение иммуногистохимических методик для определения характера лечения и прогноза опухолевых заболеваний // *Арх. патол.* — 2000. — Т. 62, № 5. — С. 3-11.

46. *Иммуногистохимический профиль эндометриоидной аденокарциномы тела матки: ER, PR, Her-2, Ki-67 и их прогностическое значение / К. М. Пожариский, Е. А. Самсонова, В. П. Тен и др.* // *Арх. патол.* — 2005. — Т. 67, № 2. — С. 13-17.

47. *Мушкамбаров Н. Н., Кузнецов С. Л.* Молекулярная биология. — М.: Мед. информ. агентство, 2003. — С. 535.

48. *Пальцев М. А. (ред.)* Введение в молекулярную медицину. — М.: ОАО «Изд. Медицина», 2004. — 496 с.

49. *Maser R. S., Vafa O.* Connecting chromosomes, crisis and cancer // *Science.* — 2002. — Vol. 297, N 5581. — P. 565-569.

50. *The role of chromosomal instability in tumor initiation / M. A. Nowak, N. Komarowa, A. Sengupta et al.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2002. — Vol. 99, N 25. — P. 16226-16231.

51. *Hino O.* Hereditary renal carcinogenesis fitting Knudson's two-hit model // *Genes, Chromosomes, and Cancer.* — 2003. — Vol. 38, N 4. — P. 357-367.

52. *Knudson A. G.* Genetic predisposition to cancer // *Hereditas.* — 1984. — Vol. 100, N 2. — P. 171-172.

53. *Johansson B., Mertens F., Mitelman F.* Geographic heterogeneity of neoplasia-associated chromosome aberrations // *Genes, Chromosomes, Cancer.* — 1991. — Vol. 3. — P. 1-7.

54. *Экспрессия белка p16<sup>INK4a</sup> в клетках некоторых распространенных форм рака / Г. М. Волгарева, Л. Э. Завалишина, Ю. Ю. Андреева и др.* // *Архив патол.* — 2004. — Т. 66, № 5. — С. 3-5.

55. *Prognostic significance of DNA ploidy and S-phase fraction in malignant serous cystadenocarcinoma of the ovary / N. Bakshi, A. Rajwanshi, F. Patel et al.* // *Anal. Quant.*

- Cytol. Histol. — 1998. — Vol. 20, N 3. — P. 215-220.
56. *Cell growth and oncogenes* / P. Banasch, D. Kandue, S. Papa, J. M. Tager. — Basel; Boston; Berlin: Birkhauser, 1998. — 312 p.
57. *Ivanova V., Karaivanov M., Marinov E.* Assessment of cell proliferation in clinical pathology // Clin. Appl. Immunol. — 2002. — Vol. 1, N 1. — P. 28-33.
58. *Comparative genomic hybridization detects genetic imbalances in primary ovarian carcinomas as correlated with grade of differentiation* / M. Kiechle, A. Jacobson, U. Schwarz-Boeger et al. // Cancer. — 2001. — Vol. 91, N 3. — P. 534-540.
59. *McManus D. T., Olaru A., Meltzer S. J.* Biomarkers of esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus // Cancer Res. — 2004. — Vol. 64, N 5. — P. 1561-1569.
60. *Stukenberg P. T.* Triggering p53 after cytokinesis failure // J. Cell Biol. — 2004. — Vol. 165, N 5. — P. 607-608.
61. *Лукьянова Н. Ю., Кулик Г. И., Чехун В. Ф.* Роль генов *p53* и *bcl-2* в апоптозе и лекарственной резистентности опухолей // Вопр. онкол. — 2000. — Т. 46, № 2. — С. 121-128.
62. *Чехун В. Ф., Шишова Ю. В.* Современные взгляды на механизмы формирования лекарственной устойчивости опухолей // Онкология. — 2000. — Т. 1, № 1-2. — С. 11-15.
63. *p53 and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression predict outcome in 833 patients with primary breast carcinoma* / B. Linderholm, B. Lindh, B. Tavelin et al. // Int. J. Cancer. — 2000. — Vol. 89. — P. 51-62.
64. *Olivier R. I., Beurden M., Veer L. J.* The role of gene expression profiling in the clinical management of ovarian cancer // Eur. J. Cancer. — 2006. — Vol. 42. — P. 2930-2938.
65. *Wu W., Hu W., Kavanagh J. J.* Proteomics in cancer research // Int. J. Gynecol. Cancer. — 2002. — Vol. 12. — P. 409-423.
66. *Хансон К. П., Имянитов Е. Н.* Молекулярная генетика рака яичников // Практик. онкол. — 2000. — № 4. — С. 1-6.
67. *Sherr C. J., McCormick F.* The RB and p53 pathways in cancer // Cancer Cell. — 2002. — Vol. 2. — P. 103-112.
68. *Li C. I., Malone K. E., Daling J. R.* Differences in breast cancer stage, treatment and survival by race and ethnicity // Arch. Intern. Med. — 2003. — Vol. 163. — P. 49-56.
69. *Упоров А. В., Цырлина У. В., Пожариский К. М.* Иммуногистохимическое изучение пролиферативной активности клеток рака молочной железы по экспрессии ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) // Арх. патол. — 2000. — Т. 62, № 2. — С. 26-30.
70. *Loss of heterozygosity on 10q23.3 and mutation of the tumor suppressor gene PTEN in benign endometrial cyst of the ovary: possible sequence progression from benign endometrial cyst to endometrial carcinoma and clear cell carcinoma of the ovary* / N. Sato, H. Tsunoda, M. Nishida et al. // Cancer Res. — 2000. — Vol. 60, N 24. — P. 7052-7056.
71. *p185 and p21 expression in primary tumors and lymph node metastases in non-small cell lung cancer* / K. Akita, H. Inagaki, S. Sato et al. // Jpn. J. Cancer Res. — 2002. — Vol. 93, N 9. — P. 1007-1011.
72. *Исследование в области хромосом в лимфоцитах периферической крови у больных лимфомами* / О. В. Михайловская, Н. А. Викторова, О. Р. Краснова и др. // Цитология. — 2005. — Т. 47, № 1. — С. 83-88.
73. *Роль антигена Ki-67, мутированно-го гена-супрессора p53 и митотической активности опухоли в определении прогноза гранулезоклеточных опухолей яичников взрослого типа (ГКОВТ)* / А. В. Волкова, О. Ф. Чепик, Е. В. Бахидзе, В. П. Тен // Вопр. онкол. — 2005. — Т. 51, № 4. — С. 455-459.
74. *Корнеев И. А.* Прогностическое значение индекса пролиферации Ki-67 в переходноклеточном раке почечной лоханки и мочеточника // Вопр. онкол. — 2005. — Т. 51, № 2. — С. 211-215.
75. *Анализ потери гетерозиготности на хромосоме 6 в дисплазиях и раке шейки матки* / А. Ю. Блиев, Д. Ю. Песков, Н. В. Снигур и др. // III съезд онкологов и ра-

диологов СНГ, 25–28 мая 2004 г., Минск. — С. 298.

76. *Ovarian cancer: loss of heterozygosity frequently occurs in the ATM gene, but structural alteration do not occur in this gene* / M. Koike, S. Takeuchi, S. Park, et al. // *Oncology*. — 1999. — Vol. 56, N 2. — P. 160-163.

77. *Different pattern of loss of heterozygosity among endocervical-type adenocarcinoma, endometrioid-type adenocarcinoma and adenoma malignum of the uterine cervix* / H. Tsuda, T. Takarabe, S. Okada et al. // *Int. J. Cancer*. — 2002. — Vol. 98, N 5. — P. 713-717.

78. Хансон К. П., Имянитов Е. Н. Онкоген ERBB2/HER2: от молекулярной к клинической онкологии // *Вопр. онкол.* — 2002. — Т. 48, № 2. — С. 137-145.

79. Автандилов Г. Г. Индекс клональной пролиферации и его изменения в процессе озлокачествления ткани по данным цитофотометрии ДНК // *Вопр. онкол.* — 2000. — Т. 46, № 4. — С. 423-426.

80. *Chromosome 11q22.3-q25 LOH in ovarian cancer: association with a more aggressive disease course and involved subregions* / V. Launonen, F. Stenback, U. Puistola et al. // *Gynecol. Oncol.* — 1998. — Vol. 71, N 2. — P. 299-304.

81. *Прогностическое значение пролиферативной активности клеток при раке тела матки* / В. М. Нечушкина, В. В. Кузнецов, В. Н. Богатырев и др. // III съезд онкологов и радиологов СНГ, 25–28 мая 2004 г., Минск. — С. 315.

82. *Возможности использования лазерной ДНК-проточной цитометрии у больных с эпителиальными опухолями яичников* / И. В. Паниченко, В. Н. Богатырев, В. П. Козаченко, К. И. Жордания // *Клин. лаб. диагностика*. — 2002. — № 4. — С. 48-51.

83. *Клинико-морфологические факторы прогноза у больных раком яичников (РЯ) с учетом количественных характеристик опухоли* / И. В. Паниченко, В. Н. Богатырев, К. И. Жордания, В. П. Козаченко // *Акушерство и гинекология*. — 2004. — № 6. — С. 28-31.

84. Шварцбургд П. М. Хроническое воспаление повышает риск развития эпителиальных новообразований, индуцируя предраковое микроокружение: анализ механизмов дисрегуляции // *Вопр. онкол.* — 2006. — Т. 52, № 2. — С. 137-144.

85. *Morrell D., Chase C. L., Swift M. Cancers in 44 families with ataxia-teleangiectasia* // *Cancer, Genet. Cytogenet.* — 1990. — Vol. 50. — P. 119-123.

86. *Effect of TERT and ATM on gene expression profiles in human fibroblasts* / A. Baross, M. Schertzer, S. D. Zuyderduyn et al. // *Genes, Chromosomes, and Cancer*. — 2004. — Vol. 39, N 4. — P. 298-310.

87. Давиденкова Е. Ф., Либерман И. С. *Клиническая генетика*. — М.: Медицина, 1975. — 428 с.

88. *Falconer D. S. The inheritance of liability to certain diseases, estimated from the incidence among relatives* // *Ann. Hum. Genet.* — 1965. — Vol. 29. — P. 51-76.

89. *Harnden D. G. Chromosome abnormalities and predisposition towards cancer* // *Proc. Roy. Soc. Med.* — 1976. — Vol. 69, N 1. — P. 41-43.

90. *Association between family history of colorectal cancer and genetic alteration in tumors* / M. L. Slattery, K. Curtin, D. Schaffer et al. // *Int. J. Cancer*. — 2002. — Vol. 97, N 6. — P. 823-827.

91. *Wolkenstein P. La neurofibromatose* // *Med. Scs.* — 2001. — Vol. 17, N 11. — P. 1158-1167.

92. *Cancer and genetics. American cancer society (Copyright) / J. Garber, S. J. Lemon, H. T. Lynch et al.* — 1997. — 147 p.

93. *Медико-генетическое консультирование и диспансеризация в детской онкологии: Метод. рекомендации* / Е. Н. Сотникова, Р. Ф. Гарькавцева, Л. А. Дурнов, А. Ф. Бухна. — М., 1988. — 18 с.

94. *Белев Н. Ф. Роль генетических факторов в этиопатогенезе рака толстой кишки* // III съезд онкологов и радиологов СНГ, 25–28 мая 2004 г., Минск. — С. 64-68.

95. *Genomic deletions in MSH2 or MLH1 are a frequent cause of hereditary non-polyposis colorectal cancer. Identification of*

- novel and recurrent deletions by MLPA / C. F. Taylor, R. S. Charlton, J. Burn et al. // *Hum. Mut.* — 2003. — Vol. 22, N 6. — P. 428-433.
96. *Lynch H. T., Lynch J.* Lynch Syndrome: Genetics, Natural History, Genetic Counseling, and Prevention // *Journal of Clinical Oncology.* — 2000. — Vol. 18, N 21. — P. 19-31.
97. *Abe Y., Masuda H.* Genetic alterations of sporadic colorectal cancer with microsatellite instability, especially characteristics of primary multiple colorectal cancers // *J. Surg. Oncol.* — 2000. — Vol. 74, N 4. — P. 249-256.
98. *Генетические повреждения в ходе прогрессии наследственного неполипозного рака толстой кишки / Т. А. Штам, О. А. Вострухина, А. В. Гуляев и др. // Доклады АН/РАН, 2004. — Т. 395, № 1. — С. 126-131.*
99. *Comparison between genotype and population identifies a high-risk population carrying BRCA1 mutations / L. Cortesi, D. Turchetti, Ch Bertoni et al. // Genes, Chromos., Cancer.* — 2000. — Vol. 27, N 2. — P. 130-135.
100. *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1 / Y. Miki, J. Swenson, D. Shattuck-Edens et al. // Science.* — 1994. — Vol. 266. — P. 66-71.
101. *Identification of genes induced by BRCA1 in breast cancer cells / A. Atalay, T. Crook, M. Oztruk, I. G. Yulug // Biochem. Biophys. Res. Com.* — 2002. — Vol. 299, N 5. — P. 839-846.
102. *Twenty three novel BRCA1 and BRCA2 sequence alterations in breast and/or ovarian cancer families in Southern Germany / P. Meyer, T. Voiglaender, C. R. Bartram, R. Klaes // Hum. Mut.* — 2003. — Vol. 22, N 3. — P. 259.
103. *Семиглазов В. Ф., Семиглазов В. В.* Наследственный синдром «Рак молочной железы + рак яичников»: проблема профилактики, выявления и лечения // *Матер. науч.-практ. конф. «Новые подходы к скринингу, диагностике и лечению опухолей яичников»*, Великий Новгород, 17–18 мая 2001 г. — СПб., 2001. — С. 55-56.
104. *Cancer risks in women with 2 breast or ovarian cancers: clues to genetic cancer susceptibility / H. S. Evans, C. M. Lewis, D. Robinson et al. // Int. J. Cancer.* — 2001. — Vol. 94, N 5. — P. 758-759.
105. *The presence of the hereditary BRCA1 gene mutations in women with familial breast or ovarian cancer and the frequency of occurrence of these tumors in their relatives / E. Skasko, Z. Paszko, A. Niwinska et al. // Eur. J. Gynec. Oncol.* — 2004. — Vol. 25, N 4. — P. 470-474.
106. *High-resolution 19p13.2-13.3 allelotyping of breast carcinomas demonstrates frequent loss of heterozygosity / T.-L. Yang, Y.-R. Su, C.-S. Huang et al. // Genes, Chromosomes and Cancer.* — 2004. — Vol. 41, N 3. — P. 250-256.
107. *Полищук Л. З.* Семейный раковый синдром: вивок чи засторога? // *Вісник Нац. акад. наук України.* — 2003. — № 1. — С. 24-29.
108. *Early detection of familial ovarian cancer / A. Drum, G. B. Kristensen, V. M. Abeler et al. // Eur. J. Cancer.* — 1996. — Vol. 32A, N 10. — P. 1645-1651.
109. *Акуленко Л. В.* Генетические аспекты рака яичников. Обзор // *Экспресс-информация «медицинская генетика».* — Вып. 6. — М.: ВИНТИ, 1989. — 12 с.
110. *Abu-Rustum N., Barakat R. R., Curtin G. P.* Ovarian and uterine disease in women with colorectal cancer // *Obstet. Gynecol.* — 1997. — Vol. 89, N 1. — P. 85-87.
111. *German family study on hereditary breast-ovarian cancer / U. Hamann, H. Becher, T. Zimmermann et al. // J. Med. Genet.* — 1996. — Vol. 33, N 8. — P. 633-635.
112. *Идентификация наследственных вариантов меланомы кожи / Т. П. Казубская, В. М. Козлова, В. К. Мусатов и др. // Генетика.* — 2004. — Т. 40, № 1. — С. 88-96.
113. *Чиссов В. И., Трахтенберг А. Х.* Первично-множественные злокачественные опухоли: Рук. для врачей. — М.: Медицина, 2000. — 336 с.
114. *Lynch H. T., Fusaro R. M., Lynch J.* Hereditary cancer in adults // *Cancer De-*

- tect. Prev. — 1995. — Vol. 19. — P. 219-233.
115. *Бохман Я. В., Рыбин Е. П.* Полинеоплазии органов репродуктивной системы. — СПб.: Нева-Люкс, 2001. — 240 с.
116. *Гарькавцева Р. Ф., Казубская Т. П., Сельчук В. Ю.* Анализ генетической предрасположенности к раку в семьях больных первично-множественными злокачественными новообразованиями // Цитол. и генет. — 1992. — Т. 26, № 2. — С. 32-36.
117. *Максимов С. Я., Хаджимба А. В., Катamadзе И. Г.* Рак яичников (РЯ) в синдроме полинеоплазий органов репродуктивной системы // Матер. науч.-практ. конф. «Новые подходы к скринингу, диагностике и лечению опухолей яичников». Великий Новгород, 17–18 мая 2001 г. — СПб, 2001. — С. 47-49.
118. *Зорин В., Кербер Р.* Прогностическое значение семейного анамнеза для выживаемости онкологических больных // Вопр. онкол. — 2001. — Т. 47, № 4. — С. 396-400.
119. *Eeles R. A., Powles T. J.* Chemoprevention options for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers // J. Clin. Oncol. — 2000. — Vol. 18, N 21. — P. 93-99.
120. *Shih H. A., Nathanson K. L., Seal S.* BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer families with multiple primary cancers // Clin. Cancer Res. — 2000. — Vol. 6, N 11. — P. 4259-4264.
121. *Заридзе Д. Г.* (ред.) Канцерогенез. — М.: Медицина, 2004. — 576 с.
122. *Райс Р. Х., Гуляева Л. Ф.* Биологические эффекты токсических соединений: Курс лекций. — Новосибирск: Новосиб. гос. ун-т, 2003. — 208 с.
123. *Hemminki K., Li X., Czene K.* Familial risk of cancer: data for clinical counseling and cancer genetics // Int. J. Cancer. — 2004. — Vol. 108, N 1. — P. 109-114.
124. *Кицера Н. И.* Медико-генетичне консультування сімей з онкологічною патологією у потомстві: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — К., 1999. — 19 с.
125. *Andrede M., Amos S. I., Foulkes W. D.* Segregation analysis of squamous cell carcinoma of the head and neck evidence for major gene determining risk // Ann. Hum. Genet. — 1998. — Vol. 62, N 6. — P. 505-510.
126. *Segregation analyses of 1476 population-based Australian families affected by prostate cancer / J. Cui, M. P. Staples, J. L. Hopper et al. // Amer. J. Hum. Genet. — 2001. — Vol. 68. — P. 1207-1218.*
127. *Стивенсон А., Дэвисон Б.* Медико-генетическое консультирование. — М.: Мир, 1972. — 504 с.
128. *Украинцева С. В., Украинцев А. Е., Сергеев А. С.* Компьютерные программы SAN и EPID: семейный анализ и эпидемиология мультифакторных заболеваний // Генетика. — 1996. — Т. 32, № 1. — С. 133-136.
129. *Чудина А. П., Акуленко Л. В.* Генетико-эпидемиологическое исследование рака яичников. Сообщение 1. Сравнение семейной и популяционной частот // Генетика. — 1984. — Т. 20, № 4. — С. 849-856.
130. *Ганина К. П., Войкшнарас Е. Б., Яковцова И. И.* Частота и клинико-генеалогический анализ рака яичников в Харьковском регионе // Цитол. и генетика. — 1996. — Т. 30, № 5. — С. 3-8.
131. *Ганина К. П., Шевченко И. Т., Залеваева Т. А.* Основы и принципы организации медико-генетического консультирования в онкологии: Метод. рекомендации. — М., 1979. — 19 с.

## **Глава 6. Генетическое консультирование.**

### **Принципы диагностики и ведения наследственных заболеваний и врожденных пороков развития**

---

---

The chapter presents etiology and pathogenesis of hereditary diseases; description of basic groups of the inherited diseases is given, including multifactor pathology. Attention is paid to the basic molecular genetic methods of research; diagnostic principles, treatment, prenatal diagnosis and prophylaxis of hereditary diseases are adduced.

---

#### **6.1. Общие принципы клинической диагностики наследственных болезней**

Результаты прогресса науки в области молекулярной биологии гена начинают активно использоваться в клинической медицине, порождая новую эру молекулярной медицины. Подтверждает это высказывание лауреата Нобелевской премии П. Берга (1981): «Как наша современная медицинская практика опирается на уточнённые знания в области анатомии человека, физиологии и биохимии, так в будущем изучение генетических болезней потребует детального понимания молекулярной патологии, физиологии и биохимии генома человека. Нам потребуются врачи настолько осведомленные в молекулярной анатомии и физиологии хромосом и генов, насколько кардиохирург знает работу сердца и структуру сосудистого дерева».

Медицинская генетика — раздел генетики человека, изучающий роль наследственных факторов в патологии человека на всех основных уровнях организации жизни — от популяционного до молекулярно-генетического.

Основной раздел медицинской генетики составляет клиническая генетика, которая изучает этиологию и патогенез наследственных болезней, изменчивость клинических проявлений и течения наследственной патологии и болезней, характеризующихся наследственным предрасположением, в зависимости от генетических факторов и влияния окружающей среды, а также разрабатывает методы диагностики, лечения и профилактики этих болезней. Клиническая генетика включает в себя нейрогенетику, дерматогенетику, офтальмогенетику, фармакогенетику и др. Медицинская генетика связана со всеми разделами современной клинической медицины и другими областями медицины и здравоохранения, в т. ч. с биохимией, физиологией, морфологией, общей патологией, иммунологией [1; 2].

Особенность клинической генетики состоит в том, что объектом исследования является не отдельный больной, а семья. Семей в узком смысле слова называют родительскую пару и их детей, но иногда и более широкий круг родственников. Сбор сведений о семье начинается с проба́нда — человека, обратившегося к врачу или первым попавшего в поле зрения исследователя. Им может быть ребенок или взрослый человек, а также супружеская

пара. В медико-генетическую консультацию чаще обращаются семьи, уже имеющие больного ребенка. В этом случае медико-генетическое консультирование называется ретроспективным, а пробандом обозначают больного.

Диагностика наследственных болезней, как правило, двухэтапная:

— общее клиническое обследование больного, составление и анализ родословной, а также параклиническое обследование по показаниям (УЗИ, рентгенологическое, эндокринологическое, иммунологическое и т. д.);

— при подозрении на конкретную наследственную патологию — специальные генетические исследования (цитогенетические, ДНК-диагностика, специальные биохимические методы).

**Сбор паспортных данных и анамнеза.** При сборе паспортных данных и анамнеза необходимо обращать внимание на ряд моментов.

1. Фамилия, имя, отчество родителей. У матери указывают девичью фамилию. Совпадение фамилий отца и девичьей фамилии матери может помочь установить близкородственный брак, при котором повышена вероятность рождения детей с рецессивными заболеваниями.

2. Возраст пробанда (указывают дату рождения пробанда) и возраст родителей

на момент рождения пробанда. С возрастом родителей риск рождения детей с некоторыми наследственными заболеваниями увеличивается. Так, с возрастом отца повышается вероятность новых генных доминантных мутаций (например, ахондроплазии и нейрофиброматоза), а возраст матери старше 35 лет указывает на повышенную вероятность рождения ребенка с хромосомными болезнями.

3. Национальность родителей (табл. 6.1). Некоторые наследственные заболевания встречаются преимущественно у лиц определенной национальности (или жителей определенной географической местности).

4. Место жительства семьи и предков по материнской и отцовской линии. Если в течение нескольких поколений предки по материнской и отцовской линиям жили в одном и том же небольшом населенном пункте, то велика вероятность родственных браков. Кроме того, информация о месте жительства семьи позволяет исключить эндемические заболевания и учесть возможное влияние факторов среды.

5. Место работы. Обращают внимание на возможный контакт с мутагенными и тератогенными факторами; по этой же причине необходимо выяснить, в каком роде войск служил отец.

6. Хронические заболевания матери. Особое внимание уделяют наличию забо-

Таблица 6.1

**Наследственные заболевания, встречающиеся у лиц определенной национальности с более высокой частотой [2]**

Национальность	Болезнь
Евреи-ашкенази (выходцы из европейских стран)	Болезнь Тея — Сакса Болезнь Гоше
Канадцы французского происхождения	Болезнь Тея — Сакса
Греки	$\beta$ -Талассемия
Финны	Врожденный нефротический синдром Аспартилгликозаминурия
Афроамериканцы	Серповидно-клеточная анемия
Армяне	Периодическая болезнь
Жители Юго-Восточной Азии	$\beta$ -Талассемия
Популяция Северной Европы, жители Юга Украины, в том числе Одесской области	Муковисцидоз

леваний сердечно-сосудистой системы, органов дыхания, эпилепсии, диабету, фенилкетонурии и др. Влияние на развивающийся плод может оказывать как само заболевание матери (гипоксия плода при болезнях сердечно-сосудистой системы, диабетическая эмбриофетопатия, фенилпировиноградная эмбриофетопатия), так и применяющиеся для его лечения медикаменты (например, используемые при лечении эпилепсии антиконвульсанты — это тератогены) [3].

7. Неблагоприятный акушерский анамнез. Спонтанные аборт и мертворождения в анамнезе могут свидетельствовать о наличии сбалансированной хромосомной мутации у отца или матери.

8. Отягощенный семейный анамнез. Наличие в семье или у близких родственников детей с наследственной патологией, пороками развития, а также детей, умерших в раннем возрасте по неизвестной причине, может свидетельствовать о наследовании в семье патологических генов или сбалансированных хромосомных перестроек.

9. Неблагополучное течение настоящей беременности, которая закончилась рождением пробанда.

Угроза прерывания беременности наблюдается при хромосомных и некоторых моногенных синдромах у плода. Задержка внутриутробного развития определяется на основании серии ультразвукографических измерений. Часто наблюдается при хромосомных синдромах у плода, моногенных синдромах, внутриутробных инфекциях (цитомегалии, врожденной краснухе, сифилисе), радиационном поражении, многоплодной беременности, аплазии поджелудочной железы у плода. Задержку внутриутробного развития нужно отличать от синдромов наследственной карликовости. Маловодие может свидетельствовать о заболеваниях мочевыделительной системы у плода, сопровождающихся снижением нормальной продукции мочи. Само по себе маловодие — один из тератогенных факторов. Многоводие наблюдается при пороках желудочно-кишечного

тракта у плода с нарушением функции глотания. Малая подвижность плода характерна для артрогрипоза, болезни Дауна.

**Осмотр и описание фенотипа больного с наследственной патологией или с подозрением на нее.** Цель осмотра — выявление признаков дизморфогенеза, являющихся составной частью многих наследственных болезней. Встречаются эти признаки практически по всем системам. На нарушения морфогенеза и эмбриональной дифференцировки указывают врожденные пороки и микроаномалии развития.

**Врожденные пороки развития (ВПР)** — стойкие морфологические изменения органа или всего организма, выходящие за пределы нормальной вариации их строения и нарушающие функцию органа и (или) вызывающие косметические дефекты. Они возникают внутриутробно или (много реже) после рождения ребенка вследствие нарушения дальнейшего формирования органов (например, пороки зубов). Как синонимы термина «врожденные пороки развития» в медицинской литературе используются термины «врожденные аномалии», «врожденные пороки» и «пороки развития» [4].

Для определения пороков развития используется ряд терминов.

**Агенезия** — полное врожденное отсутствие органа.

**Аплазия** — врожденное отсутствие органа с наличием его сосудистой ножки.

**Атрезия** — полное отсутствие канала или естественного отверстия.

**Гетеротопия** — наличие клеток, тканей или целых участков органа в другом органе или в других зонах, где их быть не должно.

**Гипертрофия (гиперплазия)** — увеличение относительной массы или размера органа за счет увеличения количества (гиперплазия) или объема (гипертрофия) клеток.

**Гипоплазия** — недоразвитие органа, проявляющееся дефицитом массы или размеров (меньше чем на две сигмы по сравнению со средними показателями для данного возраста). Термин «врожденная гипо-

плазия» иногда применяется по отношению к массе всего тела как синоним термина «врожденная гипотрофия».

*Дисхрония* — нарушение темпов (ускорение или замедление) развития.

*Задержка внутриутробного развития (ЗВУР)* — масса тела при рождении ниже 10 % центили для данного срока гестации (определение проводится по центильной таблице антропометрических параметров для гестационного возраста). Асимметричный тип ЗВУР (*устар.* — врожденная гипотрофия) — длина тела выше 10 % центили. Симметричный тип ЗВУР (*устар.* — врожденная гипоплазия) — длина тела также ниже 10 % центили.

*Инверсия* — обратное (зеркальное) расположение органа.

*Макросомия (гигантизм)* — увеличение длины (роста) или антропометрических параметров тела.

*Нанизм (карликовость, микросомия)* — низкий рост у детей старшего возраста.

*Нарушение лобуляции* — увеличение или уменьшение числа долей легкого или печени.

*Олиго* — отсутствие отдельных частей органа (олигодактилия — отсутствие одного или нескольких пальцев, олигогирия — отсутствие отдельных извилин головного мозга).

*Пази* — неразделившиеся одноййцевые близнецы («сиамские близнецы»): торакопаги — соединенные в области грудной клетки, краниопаги — в области головы, ишиопаги — в области крестца.

*Пахи* — увеличение органа или его части (пахигирия — утолщение извилин головного мозга, пахионихия — утолщение ногтей).

*Персистирование* — сохранение эмбриональных структур, в норме исчезающих к определенному периоду развития (персистирующий артериальный проток). Одна из форм персистирования — незаращение (дизрафия) эмбриональной щели (расщелины позвоночника, губы, неба).

*Поли* — наличие дополнительных органов (полидактилия, полиспления).

*Син* — приставка, означающая неразделение (синдактилия — неразделение пальцев).

*Стеноз* — сужение канала или естественного отверстия.

*Удвоение органа* — удвоение матки, дуги аорты и т. д.

*Эктопия* — смещение органа, то есть расположение его в необычном месте (сердца вне грудной клетки).

*Микроаномалии развития (МАР)*, или стигмы дизэмбриогенеза, — морфологические изменения органа, которые не нарушают его функцию и не являются косметическим дефектом, то есть не требуют медицинской коррекции.

Регистрируемые МАР можно разделить на три группы.

1. Антропометрические (измерительные) — признаки, определяемые абсолютным или относительным числовым значением (масса тела, рост, окружность головы, соотношение продольного и поперечного размеров черепа и др.). Эти данные сравниваются с нормальным распределением указанных размеров в популяции.

2. Альтернативные — признаки, которые или есть, или их нет (папилломы, фистулы и др.). Некоторые из них встречаются только при определенных наследственных синдромах (например, вертикальные насечки на мочке уха при синдроме Беквита — Видеманна).

3. Описательные — изменения нормальных признаков, к которым трудно применить количественные методы исследования (изменение ороговения кожи, структура волос и др.).

Количество МАР у здоровых детей колеблется от 0 до 6. Чаще встречаются следующие: эпикант, высокое небо, приросшая мочка уха, плоская переносица, деформация ушных раковин, клинодактилия мизинцев и др.

При наследственных заболеваниях количество МАР увеличивается (при моногенных наследственных заболеваниях чаще от 8 до 15). Поскольку МАР — это показатели нарушения морфогенеза и эмбриональной дифференцировки, которые возникают как под влиянием генетических факторов, так и факторов окружающей среды, в комплексе с другими симптомами

они позволяют правильно диагностировать наследственную патологию. При решении вопроса, служит ли выявленная МАР признаком наследственного заболевания, необходимо учитывать национальность и фенотип родителей ребенка [5].

Возможность точной диагностики наследственного заболевания и медико-генетическое консультирование во многом зависят от того, насколько полно выявлены МАР при осмотре больного. Так, изолированная расщелина губы и неба наследуется мультифакториально, и повторный риск рождения больного ребенка составляет около 4 %. Сочетание расщелины с гипертелоризмом позволяет определить фронтоназальную дисплазию (аномалия с очень низким повторным генетическим риском), а с гипотелоризмом — характерно для голопроэнцефалии (аутосомно-рецессивное заболевание, риск рождения еще одного больного ребенка — 25 %).

Осмотр больного с наследственной патологией проводят «от макушки до пят», так как ее признаками могут быть изменения любых морфологических структур человеческого тела.

Клиническое обследование больного начинают с измерения роста и массы тела. Полученные данные сравнивают с нормальными возрастными показателями в популяции. Антропометрические показатели у лиц с наследственной болезнью, как правило, выходят за пределы нормальных вариаций [1].

*Масса тела.* Масса тела в момент рождения у доношенного ребенка составляет 2800–4000 г (в среднем 3200–3400 г у мальчиков, 3100–3300 г у девочек). Прирост массы тела в норме составляет около 600 г за первый месяц жизни, 800 г ежемесячно на протяжении первого полугодия, и 400 г ежемесячно в течение второго полугодия. Масса тела ребенка в год составляет в среднем 10 кг. У ребенка в возрасте от 2 до 10 лет массу тела можно рассчитать по эмпирической формуле  $10 + 2n$ . В возрасте 10 лет масса тела составляет около 30 кг, и ее после 10 лет можно рассчитать по формуле  $30 + 4(n - 10)$ , где  $n$  — возраст

ребенка в годах. Клиническое значение имеют отклонения от эмпирических данных, превышающие 7 %.

Наследственные заболевания часто проявляются еще в эмбриональном периоде развития, что приводит к ЗВУР у новорожденного. Уменьшение массы тела, например, наблюдается при хромосомных болезнях, наследственных нарушениях обмена веществ, врожденных пороках пищеварительного тракта и др. Может наблюдаться ожирение (синдром Прадера — Вилли и др.) [6].

*Рост.* У здоровых детей при рождении рост составляет 48–54 см (в среднем 50–52 см). За первый год жизни ребенка его рост увеличивается в среднем на 25–27 см (50 % от исходного). Удвоение роста наблюдается в четырехлетнем возрасте и, в среднем, составляет 100 см. Этот рост принимают как исходный для приблизительного расчета роста. У детей от года до четырех лет нормальный показатель роста можно определить с помощью эмпирической формулы  $100 - 8(4 - n)$ , а у детей старше четырех лет  $100 + 6(n - 4)$ , где  $n$  — возраст ребенка. Клиническое значение имеют отклонения от эмпирических данных, превышающие 7 %.

Наследственные болезни чаще сопровождаются задержкой роста в эмбриональном и постэмбриональном периоде (хромосомные болезни или моногенные синдромы, сопровождающиеся карликовостью). Уменьшение роста называется микросомией (нанизм, или карликовость) у детей старшего возраста. Пропорции тела при этом могут быть изменены или оставаться нормальными. Реже наблюдается увеличение роста — макросомия, или гигантизм (синдром Сотоса) [7].

*Симметричность тела.* Необходимо обратить внимание на симметричность тела, так как к специфическим признакам некоторых наследственных болезней относится частичная асимметрия (гемифациальная гипертрофия, синдром Клиппеля — Вебера и др.) или полная асимметрия правой и левой частей тела (синдром Рассела — Сильвера).

### Голова, лицо, шея

1. Изменение размеров больше чем на 10 % от возрастной нормы. У новорожденных клинически значимо отклонение от нормы на 5 см: микроцефалия (-5 см) или макроцефалия (+5 см).

Гидроцефалия (водянка головного мозга) отличается фенотипически от макроцефалии несоответствием размеров лицевого и мозгового черепа — лицо относительно маленькое, лоб нависает, мозговой череп увеличен, расширены подкожные вены, возможно расхождение швов черепа, выбухание родничков.

2. Форма черепа может быть обычная или аномальная — асимметричная. Преждевременное срастание швов (краниосиностоз) ограничивает рост черепа в том или ином направлении и ведет к его деформации. Может наблюдаться брахицефалия (относительное увеличение поперечного диаметра, лицо уплощено); долихоцефалия (увеличение продольного диаметра черепа); скафоцефалия (узкая голова с выступающими лбом и затылком, ладьевидная форма черепа); тригоноцефалия (череп расширен в области затылка и сужен в лобной части за счет неразвитости лобных бугров); акроцефалия или оксипцефалия («башенный» череп с заострением в области сагиттального шва — «сахарная голова») [2].

3. Низкий рост волос на лбу и на затылке.

4. Лицо: птичье лицо (синдром Марфана), кукольное лицо (гликогенозы), грубое лицо с увеличенными надбровными дугами, толстыми губами (мукополисахаридоз); треугольное лицо (синдром Рассела — Сильвера).

5. Лоб: низкий, очень высокий, выступающие лобные бугры.

6. Пороки развития и микроаномалии глаз: разрез глаз может быть горизонтальным (норма для европейских популяций), монголоидным (наружный угол глаза выше внутреннего), антимонголоидным (наружный угол глаза ниже внутреннего); гипотелоризм — близко расположенные глаза, гипертелоризм — увеличенное расстояние между внутренними углами глаз

(в норме расстояние между внутренними углами глаз в среднем равно длине глазной щели).

Анофтальм — отсутствие одного или обоих глаз; криптофтальм — отсутствие глазной щели, век, недоразвитие глазного яблока; буфтальм — увеличенный «бычий» глаз; микрофтальм — маленький размер глаза; энофтальм — смещение глазного яблока назад (глубокое расположение в глазнице); экзофтальм — выпячивание глаз вперед.

Синофриз — сросшиеся на переносице брови; ди- и трихстихиаз — двойной и тройной ряд ресниц; колобома века — клиновидный дефект (провал края века); эпикант — кожная складка у внутреннего угла глаза, прикрывающая слезное мяско; микроблефарон — уменьшение вертикального размера век, приводящее к нарушению их смыкания; блефарофимоз — укорочение век и сужение глазной щели; птоз — опущение верхнего века.

Голубой цвет склер вследствие их истончения наблюдается при нарушении обмена соединительной ткани (синдром Марфана, несовершенный остеогенез и др.).

Микрокор и макрокор — уменьшение или увеличение размеров роговицы; лейкома роговицы — помутнение роговицы («бельмо»); колобома радужной оболочки — щелевидный дефект радужки; аниридия — почти полное отсутствие радужной оболочки (наследуется как доминантный признак); гетерохромия — неравномерное распределение пигмента в пределах одного глаза или разная окраска глаз; афакия — отсутствие хрусталика; катаракта — помутнение хрусталика. При наследственных заболеваниях встречается глаукома, страбизм (косоглазие), близорукость, слепота.

При подозрении на наследственную патологию обязательно необходима консультация окулиста, поскольку пороки и микроаномалии глаз входят в симптомокомплекс около 280 наследственных болезней.

7. Аномалии переносицы и носа. Переносица: запавшая, широкая, плоская, выступающая вперед с параллельными края-

ми («шлем греческого воина»). Нос: седловидный, птичий, грушевидный, короткий с вывернутыми вперед ноздрями. Гипоплазия одной половины носа, гипоплазия крыльев носа, искривление носовой перегородки, колобомы крыльев носа.

8. Аномалии строения и пороки носогубной области и челюстей. Верхняя челюсть может быть недоразвитой (микрпрогнатия) или выступать вперед (прогнатия). Недоразвитость нижней челюсти — микрогения, а ее чрезмерное развитие с массивным подбородком — прогения (нижняя прогнатия).

Укорочение или удлинение фильтра (фильтр — расстояние между концом носа и красной каймой верхней губы).

9. Рот. Макростомия и микростомия — увеличение или уменьшение размеров рта; очень толстые или тонкие губы.

Хейлосхиз — расщелина верхней губы («заячья губа») — полная или частичная, односторонняя или двусторонняя, срединная.

Изменение числа зубов (адонтия — отсутствие зубов, олигодонтия — меньшее количество зубов), сверхкомплектные зубы, изменение формы (конические зубы). Макро- и микродонтия — увеличение или уменьшение размера зубов, сросшиеся зубы, диастема — щель между центральными резцами. Изменение цвета зубов — амелогенез. Множественный кариес.

Высокое («готическое») небо. Палатосхиз («волчья пасть») — расщелина неба — полная, неполная, одно- и двусторонняя, сквозная или подслизистая.

Макроглоссия — увеличение языка, микроглоссия — уменьшение языка.

10. Ушные раковины. Процесс формирования ушной раковины в эмбриональном развитии очень чувствителен к изменению генотипа или действию тератогенных факторов. При наследственной и врожденной патологии часто наблюдается увеличение ушных раковин (макроотия) или уменьшение (микроотия), выше или ниже расположенные ушные раковины, деформация ушных раковин. В норме нижняя стенка наружного слухового прохода

у взрослого находится на уровне линии, соединяющей свободный край основания крыла носа с основанием сосцевидного отростка височной кости.

Часто встречаются: приросшая мочка уха, мясистая мочка уха, оттопыренные ушные раковины, околоушные фистулы (отверстия слепо заканчивающихся ходов), преаурикулярные папилломы, атрезия или стеноз наружного слухового прохода, гипо- и гиперплазия отдельных структур ушной раковины.

Может наблюдаться тугоухость или глухота.

11. Шея: укороченная; крыловидная складка кожи — шейный птеригиум; срединные и боковые кисты; мышечная кривошея — укорочение грудинно-ключично-сосцевидной мышцы, в результате чего голова ребенка наклонена в пораженную сторону.

#### *Туловище*

1. Деформации грудной клетки и позвоночника. Боковое искривление позвоночника с его поворотом — сколиоз, искривление позвоночника выпуклостью назад — кифоз (обычно в грудном отделе); кифосколиоз; искривление позвоночника выпуклостью вперед — лордоз (обычно в поясничном отделе). Плоская спина — отсутствие физиологических изгибов. Сакральный синус — западание кожи в пояснично-крестцовой области по средней линии.

Грудь сапожника — лейковидное углубление грудины и реберных сочленений, плоская грудная клетка, килевидная грудная клетка — выступающая вперед грудина и ребра («куриная грудь»).

2. Изменение сосков и молочных желез: отсутствие сосков — ателия, дополнительные соски — полителия, широко расставленные соски — гипертелоризм сосков. Чрезмерное развитие молочных желез у мужчин — гинекомастия.

3. Грыжи белой линии живота, пупочные, пупочного канатика (омфалоцеле), паховые, пахово-мошоночные.

4. Нарушения строения половых органов. У мужчин эписпадия и верхняя рас-

щелина уретры со смещением ее отверстия вверх; гипоспадия — нижняя расщелина уретры со смещением ее отверстия вниз вплоть до промежности. Макрофаллос и микрофаллос — увеличение или уменьшение полового члена. Крипторхизм — отсутствие одного или двух яичек в мошонке. У женщин — гипертрофия клитора, гипоплазия гиперплазия половых губ, атрезия влагалища и др.

**Конечности.** Амелия — отсутствие конечности. Фокомелия — полное или частичное отсутствие проксимальных отделов конечностей (тюленеобразные конечности). Брахимелия — укорочение конечности. Арахнодактилия — длинные паукообразные пальцы. Брахидактилия — укорочение пальцев. Изодактилия — все пальцы одной длины. Камптодактилия — сгибательная контрактура пальцев в проксимальном межфаланговом суставе. Клинодактилия — латеральное искривление пальцев. Олигодактилия — уменьшение числа пальцев. Полидактилия — увеличение числа пальцев. Синдактилия — сращение пальцев (кожная, костная, частичная или полная). Симфалангия — сращение фаланг пальцев. Эктродактилия — аплазия срединных компонентов кисти или стопы (расщепление кисти или стопы в области пястных или плюсневых костей) с образованием кисти или стопы в форме клешни рака. Сандалевидная щель — увеличение расстояния между первым и вторым пальцами стопы. Плоскостопие — уплощение свода стопы. «Полая стопа» — очень высокий свод стопы. Стопа-качалка — плоская стопа с выступающей назад пяткой. Врожденная косолапость (варусная стопа) — стойкая приводяще-сгибательная контрактура стопы [8].

**Кожа и ее производные (волосы, ногти, железы).** Гиперкератоз — чрезмерное утолщение рогового слоя. Ихтиоз — резко выраженный гиперкератоз с образованием чешуек и роговых наслоений. Альбинизм — отсутствие или выраженное уменьшение содержания пигмента в коже и волосах. Пигментные пятна на коже и невусы (родимые пятна). Депигментированные участ-

тки кожи (лейкодермы). Ангидроз (отсутствие потовых желез) или гипогидроз (пониженная функция потовых желез). Гипергидроз — избыточная функция потовых желез. Повышенное оволосение — гипертрихоз; избыточное оволосение у девочек по мужскому типу — гирсутизм. Гипотрихоз — пониженное оволосение. Алопеция — полное или частичное отсутствие волос на голове. Анонихия — отсутствие ногтей. Гипоплазия ногтей — недоразвитие ногтевых пластинок.

**Психомоторное развитие.** Определение соответствия психомоторного развития ребенка возрастной норме.

**Симптомы наследственной и врожденной патологии в разные возрастные периоды.** На наследственную или врожденную патологию могут указывать следующие признаки [9].

*У новорожденных*

1. Недоношенность характерна для многих хромосомных синдромов.

2. Гипотрофия или гипоплазия при рождении наблюдается при многих хромосомных и моногенных болезнях.

3. Макросомия наблюдается при синдроме Беквита — Видеманна, диабетической эмбриофетопатии и др.

4. Врожденные пороки развития (могут быть наследственными или тератогенными).

5. Микроцефалия может наследоваться как аутосомно-рецессивный признак и быть симптомом многих моногенных и хромосомных синдромов, иногда является следствием поражения мозга тератогенными факторами (внутриутробные инфекции, гипоксия).

6. Макроцефалия может быть семейной особенностью (вариант нормы) или проявлением наследственной патологии (например, ахондроплазии и др.).

7. Больше 6 МАР или их специфическое сочетание.

8. Недоразвитие или неправильное развитие гениталий — симптом нарушения функции коры надпочечников (адреногенитального синдрома), многих моногенных и хромосомных синдромов.

9. Мышечная гипотония, гипорефлексия — симптомы нервно-мышечных заболеваний, синдрома Дауна, Прадера — Вилли и др.

10. Судороги — симптом наследственного нарушения обмена веществ, пороков ЦНС.

11. Нарушения кислотно-основного состояния (алкалоз, ацидоз) — симптомы наследственного нарушения обмена веществ.

*У детей раннего возраста*

1. Отставание в прибавке массы тела наблюдается при ферментопатиях, хромосомных болезнях и др. Действие на плода тератогенных факторов (например, алкоголя) может вызвать как пре-, так и постнатальную задержку физического развития.

2. Задержка психомоторного развития. Часто служит симптомом хромосомных болезней (особенно если сочетается со специфическими МАР и врожденными пороками). Наблюдается при многих аминокацидуриях (наследственных нарушениях обмена аминокислот). Иногда — это симптом нервно-мышечных заболеваний.

3. Потеря ранее приобретенных навыков — симптом болезней накопления (сфинголипидозы, лейкодистрофии и др.), аминокацидурий.

4. Микроцефалия.

5. Макроцефалия.

6. Отклонения в физическом развитии:

а) гипертрофия и асимметрия лица и черепа (при синдроме гемифациальной гипертрофии и др.);

б) гипотрофия и асимметрия конечностей (синдром Рассела — Сильвера и др.);

в) ускорение темпов физического развития (синдром Беквита — Видеманна и др.);

г) диспропорции туловища и конечностей (при синдроме Марфана и гомоцистинурии длинные тонкие конечности; при ахондроплазии — укорочение проксимальных отделов конечностей и др.);

д) укороченное туловище (при аномалиях позвоночника).

7. Диффузные и очаговые нарушения пигментации кожи. Пятна типа кофе с мо-

локом характерны для нейрофиброматоза, гипопигментные пятна при туберозном склерозе, кожа в виде географической карты при синдроме недержания пигмента, множественные пигментированные родинки при синдроме базально-клеточного невуса. При альбинизме, эктодермальной дисплазии, фенилкетонурии наблюдается общая депигментация.

8. Необычный запах пота и мочи характерен для наследственных нарушений обмена веществ (болезнь кленового сиропа или фенилкетонурия с характерным мышиным запахом).

*У детей дошкольного и младшего школьного возраста*

1. Задержка умственного развития, которая становится особенно заметной у детей школьного возраста. Обычно ей предшествует отставание в нервно-психическом развитии ребенка (табл. 6.2).

2. В этом возрасте впервые могут манифестировать некоторые болезни обмена (мукополисахаридоз), нервно-мышечные заболевания (мышечная дистрофия) и т. д.

3. Хроническая анемия может быть обусловлена гемоглобинопатиями (талассемия и др.) или нарушением метаболизма эритроцитов (например, при недостаточности фермента глюкозы — 6-фосфатдегидрогеназы).

4. Преждевременное половое созревание наблюдается при синдроме Беквита — Видеманна, вирильной форме аденогенитального синдрома у мальчиков и др. Это также может быть симптомом опухоли надпочечников, яичников и гипоталамо-гипофизарной системы.

*В подростковом и зрелом возрасте*

1. Манифестируют некоторые заболевания нервной системы. У подростков может начинаться эпилепсия — болезнь Фридрайха, в зрелом возрасте — болезнь Вильсона — Коновалова, хорея Гентингтона, болезнь Альцгеймера и др.

2. Раннее начало заболеваний среднего возраста (ишемическая болезнь сердца или артериальная гипертензия) иногда обусловлено моногенными болезнями (наследственная гиперхолестеринемия).

Основные причины задержки умственного развития [2]

Этиология	Примеры
Аутосомно-доминантные заболевания	Туберозный склероз, миотоническая дистрофия
Аутосомно-рецессивные заболевания	Фенилкетонурия, мукополисахаридозы
Заболевания, сцепленные с полом	Фрагильная X-хромосома, стеноз силвиева водопровода
Мультифакториальные	Неспецифическая задержка умственного развития, гидроцефалия
Хромосомные болезни	Синдромы Дауна, Прадера — Вилли и др.
Тератогенные воздействия	Алкогольный синдром плода, врожденная краснуха
Спорадические случаи	Перинатальная гипоксия, внутричерепные кровоизлияния

3. Наследственный нефрит и поликистоз почек, одним из первых клинических проявлений которых может быть артериальная гипертензия.

4. Недоразвитие половых признаков. Первичная аменорея может наблюдаться при синдроме тестикулярной феминизации, первичная аменорея и недоразвитие вторичных половых признаков — при синдроме Шерешевского — Тернера (45, XO). Недоразвитие вторичных половых признаков у мальчиков характерно для синдрома Клайнфельтера (47, XXУ).

5. Бесплодие может быть обусловлено хромосомной перестройкой, носительством летальных генов, хромосомными болезнями. Например, у женщин причиной бесплодия могут быть пороки развития матки. Мужское бесплодие, связанное с олигоспермией, часто наблюдается при синдроме Клайнфельтера, муковисцидозе, делеции участка Y-хромосомы.

6. Невынашивание беременности случается при сбалансированной хромосомной перестройке, гетерозиготном носительстве одинаковых рецессивных летальных генов у обоих родителей и других наследственных патологиях.

Могут развиваться наследственные формы злокачественных опухолей.

**Портретная диагностика и синдромологический анализ.** Проявления наследственных заболеваний многообразны, затрагивают разные органы и системы органов. Это обусловлено большим числом

нозологических форм. С наследственной патологией в практической деятельности сталкиваются врачи всех специальностей — окулисты, невропатологи, психиатры, кардиологи и др. Для диагностики наследственных заболеваний наряду с общепринятыми параклиническими методами (биохимическими, гематологическими, иммунологическими, эндокринологическими, электрофизиологическими, рентгенологическими, радиологическими и пр.) используют специальные генетические методы. Без них невозможна точная диагностика, и особенно пренатальная.

К числу специальных генетических методов относят: портретную диагностику, цитогенетические, молекулярно-генетические, биохимические и дерматоглифические методы.

**Портретная диагностика.** Большинство наследственных синдромов диагностируется на основании характерной клинической картины. Наследственные болезни обусловлены мутациями, которые проявляются комплексом специфических симптомов (синдромами). Причем одинаковые мутации у разных больных проявляются сходным фенотипом. Больные с наследственной патологией больше похожи друг на друга, чем на своих биологических родителей. Поэтому синдромологический анализ (выявление устойчивого сочетания признаков) приобретает первостепенное значение для постановки диагноза наследственной патологии.

При анализе фенотипа больного особое внимание обращают на микроаномалии и пороки развития. Микроаномалии могут встречаться и у здоровых людей (от 0 до 6). Для больных с наследственной патологией характерно большее число МАР и/или специфическое их сочетание, что создает возможности для портретной диагностики.

Портретная диагностика — это анализ фенотипа больного (микроаномалий, пороков развития) с целью выявления устойчивого сочетания признаков для постановки диагноза. Она является основной для наиболее известных и распространенных моногенных болезней и синдромов, проявляющихся пороками развития, — ахондроплазии, синдрома Апера, синдрома Франческетти и многих других.

Это вспомогательный метод в диагностике хромосомных болезней, при которых характерны специфические черепно-лицевые дизморфии и пороки развития, что позволяет отобрать группу больных для цитогенетического исследования. При некоторых хромосомных синдромах фенотип больных настолько специфический, что синдром с большой вероятностью может быть диагностирован только на основании данных клинического обследования. Например, специфический фенотип имеют больные с синдромами Дауна, Шерешевского — Тернера, Клайнфельтера. Однако диагноз хромосомной болезни должен быть обязательно подтвержден цитогенетическими методами. Это связано с наличием генокопий, то есть генные мутации могут дать фенотип, похожий на хромосомный синдром. Так, генокопией синдрома Шерешевского — Тернера является синдром Нунан (аутосомно-доминантное заболевание). Известны случаи, когда диагноз синдрома Дауна был поставлен больным с гипотиреозом (только на основании особенностей черт лица без учета других специфических признаков).

Портретная диагностика — важный вспомогательный метод в диагностике наследственных болезней соединительной ткани (синдромы Марфана, Элерса — Дан-

ло), ряда болезней накопления («грубое лицо» у больных с мукополисахаридозом) и других наследственных нарушений обмена веществ.

Для портретной диагностики могут быть использованы фотографии больных и их родственников. Анализ фенотипа родственников больного на семейных фотографиях в ряде случаев позволяет выявить наиболее вероятных носителей патологического гена и тем самым уточнить тип наследования [9].

*Атласы наследственных синдромов.* Для уточнения диагноза наследственной патологии широко используются атласы наследственных синдромов. Наибольшей популярностью в нашей стране пользуется атлас-справочник «Наследственные синдромы и медико-генетическое консультирование» (С. И. Козлова и соавт., 1996) [10]. В атласе описано 460 синдромов, из них 148 проиллюстрировано фотографиями.

В конце книги приведен диагностический указатель, который помогает найти нужный синдром по наличию ряда симптомов у больного. Так, например, такой симптом, как асимметрия туловища, лица и конечностей, описан при 9 синдромах в этой книге, макросомия — при двух и т. д. В случае необходимости можно сравнить фенотип больного с фотографиями в атласе. Общие внешние черты больных наследственными болезнями помогают в постановке диагноза.

На английском языке изданы следующие атласы:

1. Jones K. L. Smith's recognizable patterns of human malformation. — 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders; 1997. Содержит описание наиболее распространенных синдромов с фотографиями больных.

2. Gorlin R. J., Cohen M. M., Levin L. S. Syndromes of the head and neck. — 3<sup>rd</sup> ed. — N.-Y.: Oxford University Press, 1990. Описание пороков и МАР головы и шеи при наиболее распространенных и редких наследственных синдромах.

3. Taybi H., Lachman R. Radiology of syndromes, metabolic disorders and skeletal

dysplasias. — 4<sup>th</sup> ed. — St. Louis: Mosby, 1996. Полное описание наследственных заболеваний, при которых наблюдается поражение скелета.

*Использование компьютерных диагностических программ и баз данных.* В настоящее время уже известно несколько тысяч наследственных заболеваний. Врач-генетик не может в своей памяти содержать сведения обо всех известных нозологических формах. Поэтому разработаны специальные компьютерные диагностические программы и информационные базы данных.

*Диагностические программы.* Одной из лучших на английском языке считается программа “Possum” (The London Date Bases), содержащая описания наследственных заболеваний с портретами больных. В Медико-генетическом научном центре Российской академии медицинских наук созданы информационно-поисковые диагностические программы для диагностики наследственных болезней обмена веществ, врожденных пороков развития, хромосомных болезней, редких наследственных синдромов. Описание этих программ можно найти на сайте <http://www.medgen.ru/index.shtml?page=develops/develops.html&menu=mainmenu.html>.

Во всех диагностических программах на основании имеющихся у больного специфических микроаномалий, пороков развития, данных параклинического обследования можно выбрать группу синдромов, при которых встречаются такие симптомы, и провести дифференциальную диагностику. Можно также обратиться в базу данных и получить описание синдрома и даже фотографии больных. Все программы коммерческие, ими пользуются в медико-генетических центрах.

*Специальные компьютерные диагностические программы* используются для анализа результатов цитогенетических и молекулярно-генетических исследований, пренатальной диагностики (анализ результатов биохимического и ультразвукового скрининга и расчет индивидуального генетического риска).

*Компьютерные информационные базы данных.* В США создан и ежедневно пополняется компьютерный аналог каталога генов и моногенных болезней В. Мак-Кьюсика “On-line Mendelian Inheritance in Man — OMIM” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>). Это информационно-поисковая система, содержащая описание всех известных патологических генов и моногенных болезней человека, а также генов, ответственных за развитие мультифакториальных заболеваний. Дополнительную информацию об этой программе можно получить на сайте <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>.

Информацию о генетических картах человека можно найти на сайте [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map\\_search.cgi?chr=hum\\_chr.inf&query](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?chr=hum_chr.inf&query).

## **6.2. Клинико-генеалогический метод. Принципы построения родословной**

Клинико-генеалогический метод основан на составлении и анализе родословной семьи. Это обязательный этап в обследовании больного с наследственной патологией.

Слова «родословная» и «генеалогия» — синонимы. Отсюда произошло название метода.

Метод позволяет ответить на следующие вопросы:

- 1) является ли признак единичным в семье или имеется несколько случаев данной патологии (семейный характер);
- 2) определить тип наследования;
- 3) выявить лиц, нуждающихся в медико-генетическом консультировании и определить риск рождения больного ребенка;
- 4) составить клинический прогноз для пробанда и его родственников с учетом особенностей заболевания и его генетической характеристики;

5) оценить экспрессивность и пенетрантность гена.

Метод не требует сложного оборудования, длительного лабораторного анализа, прост, доступен каждому врачу. Он включает три этапа: 1) сбор генеалогической информации (генеалогического анамнеза); 2) построение родословной; 3) генеалогический анализ родословной; 4) расчет генетического риска.

*I этап — сбор информации* — начинают с пробанда — человека, родословная которого будет составляться. Чаще всего — это больной с наследственным заболеванием, реже — здоровый человек, имеющий больных родственников. Пробанда часто называют консультируемым. Затем следует расспрос о сибсах, то есть братьях и сестрах пробанда, родителях, родственниках по материнской линии, родственниках по отцовской линии. Необходимо собрать информацию о любых заболеваниях, обращают внимание на спонтанные аборт, мертворождения, смерть в раннем детском возрасте. Следует указать возраст умерших, причину смерти.

Информацию о сибсах (и других родственниках) собирают в порядке рождения.

Важно выяснить, имеет ли в данной семье место родственный брак, так как у близких родственников больше шансов оказаться гетерозиготами по одному и тому же патологическому гену.

При сборе генеалогического анамнеза следует ответить на следующие вопросы [11]:

1. Каким по счету ребенком был пробанд в семье?
2. Сколько всего было беременностей у матери пробанда?
3. Чем закончилась первая беременность, вторая и т. д.?
4. Чем болели сибсы?
5. Причины и возраст смерти сибсов?
6. В каком сроке и по какой причине прерывались беременности?

Вопросы о семье матери:

1. Каким по счету ребенком была мать в семье?

2. Есть ли у сестер и братьев матери дети?

3. Количество детей в порядке рождения, состояние их здоровья.

4. Причины и возраст смерти родственников матери.

Ту же информацию необходимо выяснить о бабушке со стороны матери, дедушке, их родственниках.

После этого переходят к сбору информации об отце и всех родственниках отца.

Желательно обследовать ближайших родственников пробанда лично. Если это невозможно сделать по каким-либо причинам, необходимо проанализировать фенотипы родственников по семейным фотографиям. В ряде случаев нужно получить архивные данные, информацию о результатах вскрытий умерших или изучить медицинские документы. Все это необходимо для выяснения типа наследования признака в семье.

*II этап — построение родословной.* Родословная — графическое изображение семейного дерева [11]. Основные символы, которые используют для построения родословной, приведены на рис. 6.1.

При составлении родословной придерживаются ряда правил.

1. Родословная должна включать не менее 3–4 поколений.

2. Составление родословной начинают с пробанда. Пробанд обозначается стрелкой и рисуется посередине листа.

3. Сибсов изображают справа налево в порядке рождения.

4. Каждое предшествующее поколение изображается выше линии пробанда, а последующее — ниже нее. Порядок составления — от последующих поколений к предыдущим (сначала поколение пробанда и его детей, потом — его родителей). Все члены одного поколения изображаются на одной линии.

5. Для удобства сначала рисуют родословные связи, относящиеся к линии матери. Мать и ее родственники располагаются в родословной слева. Отец и родственники отца изображаются справа. Пробанда и его сибсов располагают посередине между семьями отца и матери.



Рис. 6.1. Основные символы, которые используют для построения родословной

6. Поколения нумеруют слева римскими цифрами сверху вниз. Членов одного поколения нумеруют слева направо арабскими цифрами. Таким образом, каждый человек в родословной имеет свой шифр (I-5, II-7 и т. д.).

7. Указывают возраст членов семьи около символа.

8. Лично обследованного обозначают (!).

9. Супруги родственников пробанда могут не изображаться в большой родословной, если они здоровы и «не влияют» на передачу заболевания.

10. Необходимо указать дату составления родословной.

Одновременно с родословной составляют письменное приложение к ней, называемое легендой родословной. В легенду включают все сведения, которые могут оказаться полезными при анализе родословной (национальность, места рождения и адреса, результаты клинико-инструментального обследования и др.), и сделанные заключения.

*III этап — генеалогический анализ.* Первый вопрос, на который следует ответить, анализируя родословную, имеет ли признак наследственную природу или нет; второй вопрос — является ли заболевание результатом новой мутации или наследуется и каков тип наследования заболевания в данной семье. Зная тип наследования, можно определить генотип родителей и рассчитать риск рождения больного ребенка.

*IV этап — расчет генетического риска.* На основании анализа родословной можно определить круг лиц, относящихся к группе риска и нуждающихся в медико-генетическом консультировании. Зная тип наследования, определяют генотипы членов семьи и рассчитывают величину генетического риска у консультируемых. Это позволяет спланировать комплекс профилактических мер для предотвращения повторных случаев болезни в семье.

### Характеристика родословных с разными типами наследования

*Аутосомно-доминантный тип наследования* означает, что для развития болезни достаточно одного мутантного аллеля (гетерозиготное состояние), находящегося в одной из аутосом. Мутантный аллель в этом случае обозначается как *A*, нормальный как *a*. Обычно больные гетерозиготны (*Aa*). Гомозиготы (*AA*), два патологических аллеля, в большинстве случаев нежизнеспособны.

Для классической родословной с аутосомно-доминантным типом наследования характерно:

- 1) большое количество больных в родословной;
- 2) признак передается от одного из родителей потомкам без пропуска поколений («вертикальная» передача болезни); у больного ребенка, как правило, болен один из родителей;
- 3) соотношение больных мужчин и женщин примерно одинаковое;
- 4) больные мужчины и женщины передают болезнь детям обоего пола с одинаковой вероятностью;
- 5) соотношение больных и здоровых потомков больного родителя близко к 50 %, то есть в большинстве случаев если один из родителей болен (*Aa*), а второй здоров, то вероятность рождения больного ребенка составляет 50 %;
- 6) у здоровых родителей все дети здоровы.

Родословные при доминантном типе наследования могут отличаться от классических в следующих случаях.

1. Ребенок с доминантным заболеванием может родиться у здоровых родителей. Это связано с новой генеративной мутацией у одного из родителей (чаще отца) или соматической мутацией у эмбриона. Особенно характерна такая ситуация для тяжелых заболеваний со снижением репродуктивной способности (практически все случаи в популяции — результат новых мутаций). Вероятность возникновения такой же мутации крайне низкая, и в семье обычно бывает только один больной ребенок. Рождение нескольких больных детей

в здоровой семье может быть связано с гонадным мозаицизмом.

2. Для доминантных признаков характерна неполная пенетрантность и варьирующая экспрессивность доминантных генов. Пенетрантность — частота фенотипического проявления доминантного гена. Она определяется как процент больных среди всех носителей этого доминантного аллеля в популяции. В случае неполной пенетрантности ген болезни может быть унаследован, но не обязательно проявится фенотипически.

Понятие экспрессивности аналогично понятию тяжести болезни. Варьирующая экспрессивность отражает разную степень фенотипического проявления признака. При очень низкой экспрессивности гена стертые клинические формы болезни могут не диагностироваться либо имеющиеся признаки не связывают с передающимся в семье заболеванием. Так, клинически признаками синдрома Марфана, который в этом случае не всегда распознается, могут быть астеническое телосложение, сколиоз, миопия, а единственным минимальным клиническим проявлением миотонической дистрофии может служить катаракта или нарушение сердечной проводимости.

При неполной пенетрантности и варьирующей экспрессивности в родословной с доминантно наследуемым заболеванием могут появиться пропуски поколений.

3. Некоторые заболевания проявляются не с момента рождения, а в более позднем возрасте (например, взрослая форма поликистоза почек, хорея Гентингтона, наследственная форма болезни Альцгеймера). В этом случае в момент составления родословной носитель доминантного гена может быть здоров, поэтому без применения методов ДНК-диагностики достоверное медико-генетическое консультирование невозможно. Иногда гетерозиготные носители гена погибают до клинической манифестации болезни от не связанных с наследственным заболеванием причин.

4. Если мутация затрагивает признаки, ограниченные полом (например, аномалии

матки), то поражены будут лица только одного пола. Тяжесть течения болезни может также определяться полом родителя, от которого унаследована болезнь, или полом больного.

*Аутосомно-рецессивный тип наследования* характеризуется тем, что мутантный ген проявляет свое действие только в гомозиготном состоянии. Ген болезни обозначается как рецессивный ген *a*, нормальный ген — *A*. Больные имеют генотип *aa*, здоровые — *AA* или *Aa*. В гетерозиготном состоянии (*Aa*) ген может передаваться в поколениях, не проявляясь фенотипически. Первый больной может появиться через многие поколения после возникшей мутации, когда оба родителя будут гетерозиготными носителями того же самого гена.

Для рецессивно наследуемых болезней характерна полная пенетрантность, варьирующая экспрессивность встречается редко.

Родословные с аутосомно-рецессивным типом наследования характеризуются следующим:

- 1) малое число больных в родословной (меньше 25 %);
- 2) мужчины и женщины болеют одинаково часто;
- 3) родители больного ребенка обычно здоровы и являются гетерозиготными носителями гена;
- 4) в многодетной семье может быть больше одного больного ребенка; болеют в основном сибсы, а не родители-дети, как при доминантном наследовании (наследование «по горизонтали»);
- 5) у гетерозиготных родителей риск рождения больного ребенка составляет 25 %. В многодетных семьях соотношение здоровых и больных детей приближается к 3 : 1;
- 6) от больного родителя рождаются здоровые дети (*AA* × *aa*);
- 7) если больны оба родителя, все дети будут больны;
- 8) в большинстве случаев родители больного — кровные родственники, особенно если заболевание встречается в по-

пуляции редко. Для часто встречающихся в популяции болезней возможна случайная встреча двух гетерозиготных носителей гена.

При известном рецессивном типе наследования могут наблюдаться атипичные родословные.

1. При многократном кровном родстве родословная может напоминать таковую при аутосомно-доминантном наследовании (псевдоминантное наследование), с прямой передачей признака от родителя к ребенку и 50%-й вероятностью рождения больных детей. В отличие от истинного доминантного наследования болезнь в этом случае регистрируется только в двух поколениях и не затрагивает боковых ветвей родословной.

P:	♀ <i>Aa</i>	×	♂ <i>aa</i>
G	<i>A, a</i>		<i>a</i>
F:	<i>Aa</i> ;		<i>aa</i>
	50 % здоровы		50 % больны

2. Известны случаи рождения больного ребенка у больного родителя, когда второй родитель не является носителем гена (*AA* × *aa*) либо когда только один из них гетерозиготный носитель (*AA* × *Aa*). Это объясняется унипарентной дисомией или изодисомией. Происхождение двух хромосом от одного родителя доказывают молекулярно-генетические методы.

3. У больных родителей возможно рождение здоровых детей в результате генетической гетерогенности наследственных болезней, когда одно и то же заболевание может быть обусловлено мутациями разных генов. Если у матери болезнь обусловлена одним рецессивным мутантным геном (*aaBB*), а у отца другим (*AAbb*), то все дети в семье будут здоровы, но являются двойными гетерозиготами. Этот феномен наблюдается при альбинизме, дефектах зрения, врожденной глухоте и других заболеваниях.

P:	♀ <i>aaBB</i>	×	♂ <i>AAbb</i>
G	<i>aB</i>		<i>Ab</i>
F:			<i>AaBb</i>
	100 % здоровы		

*Сцепленное с полом наследование* — это наследование признаков, которые определяются генами, расположенными в половых хромосомах. Оно включает X-сцепленный доминантный, X-сцепленный рецессивный, Y-сцепленный типы наследования. Все типы сцепленного с полом наследования характеризуются разной частотой поражения мужчин и женщин в родословной.

*X-сцепленное наследование.* Особенности X-сцепленного наследования определяются следующим:

— женщины имеют две X-хромосомы, а мужчины X и Y-хромосомы. Поскольку гены X и Y-хромосомы не гомологичны, у мужчин гены X-хромосомы не имеют пары (состояние гемизиготности);

— от матери X-хромосому наследуют дочери и сыновья, а от отца только дочери, и, соответственно, X-сцепленные болезни никогда не передаются от отца к сыну.

Гены, локализованные в X-хромосоме, могут быть доминантными и рецессивными.

*X-сцепленный рецессивный тип наследования.* Патологический ген обозначается как  $X^a$ , нормальный аллель —  $X^A$ . Генотип здоровой женщины обозначается как  $X^AX^A$  или  $X^AX^a$  (гетерозиготная носительница), генотип здорового мужчины  $X^AY$ . Генотип больной женщины  $X^aX^a$ , больного мужчины —  $X^aY$ .

Для рецессивного сцепленного с X-хромосомой наследования характерно следующее:

1) болеют преимущественно мужчины ( $X^aY$ ), так как у гемизиготного мужчины ген болезни всегда проявляется фенотипически;

2) все дети больного отца здоровы;

3) больные мужчины передают патологический аллель всем дочерям, которые становятся гетерозиготными носительницами гена;

4) никогда не наблюдается передача заболевания от отца к сыну, поскольку сын всегда наследует от отца Y-хромосому:

P:	♀	$X^AX^A$	×	♂	$X^aY$
G		$X^A$			$X^a, Y$
F:		$X^AX^a,$			$X^AY$

Здоровая носительница    здоров

5) больной сын наследует болезнь от здоровой матери — гетерозиготной носительницы патологического гена. В унаследованных случаях у больных мальчиков могут быть больные братья и дяди по линии матери. Болезнь сына может быть обусловлена и новой мутацией в X-хромосомном наборе матери;

6) в браке женщины-носительницы со здоровым мужчиной все дочери здоровы (50 % из них носители), 50 % сыновей больны и 50 % сыновей здоровы:

P:	♀	$X^AX^a$	×	♂	$X^AY$
G		$X^A, X^a$			$X^A, Y$
F:		$X^AX^A,$			$X^AX^a,$
		$X^AY,$			$X^aY$
					(50 % сыновей)

Здорова    здоров    здорова    болен  
(носитель)

7) рождение больной дочери возможно в браке женщины-носительницы с больным мужчиной: 50 % дочерей здоровы, 50 % носители, 50 % сыновей больны, 50 % здоровы.

P:	♀	$X^AX^a$	×	♂	$X^aY$
G		$X^A, X^a$			$X^a, Y$
F:		$X^AX^a,$			$X^aY$

Здорова    здоров    больна    болен

При анализе родословной могут возникнуть некоторые сложности: у гетерозиготных носительниц гена признак может проявляться фенотипически вследствие преимущественной инактивации хромосомы с нормальным аллелем (тельца Барра).

Если ген обладает летальным действием, все плоды мужского пола, унаследовавшие этот ген, погибают. Гетерозиготные женщины-носительницы здоровы, но гибнет половина их детей мужского пола. В результате соотношение потомков женского и мужского пола в родословной будет 2 : 1.

Иногда больные мужчины не оставляют потомства, так как умирают по достижении половой зрелости (например, мышечная дистрофия Дюшена) или бесплодны.

*X-сцепленный доминантный тип наследования.* Патологический ген обозначается как  $X^A$ , нормальный аллель —  $X^a$ . Гено-

тип здоровой женщины обозначается как  $X^aX^a$ , здорового мужчины —  $X^aY$ . Генотип больной женщины  $X^AX^A$  или  $X^AX^a$ , генотип больного мужчины  $X^AY$ .

Доминантное X-сцепленное наследование имеет следующие особенности:

1) поражаются и мужчины, и женщины, но число больных женщин в родословной в два раза больше, чем мужчин;

2) больными дети будут только в том случае, если болен один из родителей. У здоровых родителей все дети здоровы;

3) заболевание прослеживается в каждом поколении;

4) если больная мать — гетерозиготна ( $X^AX^a$ ), то признак наследуют 50 % дочерей и сыновей;

5) от больного отца признак наследуют все дочери и никогда сыновья, поскольку сын наследует от отца Y-хромосому;

6) у женщин заболевание наблюдается в более легкой форме, так как они чаще гетерозиготны ( $X^AX^a$ ). У гемизиготных мужчин ( $X^AY$ ) заболевание проявляется в более тяжелой форме. Доминантный ген может давать летальный эффект у эмбриона мужского пола. В таком случае все больные в родословной только женского пола.

*Y-сцепленный тип наследования.* В Y-хромосоме находятся гены, контролирующие сперматогенез, рост тела, конечностей и зубов, оволосение ушной раковины и др. (голландрические признаки). Моногенные заболевания, сцепленные с Y-хромосомой, в настоящее время неизвестны. Так как Y-хромосома передается от отца к сыну, родословные характеризуются следующим:

а) болеют только мужчины;

б) от больного отца признак наследуют все сыновья.

Патологические мутации, затрагивающие сперматогенез, наследоваться не могут, поскольку больные стерильны.

*Митохондриальное наследование.* Все рассмотренные выше типы наследования связаны с мутациями ядерной ДНК. Митохондриальные болезни вызваны мутациями митохондриальной ДНК и характеризуются

цитоплазматическим типом наследования.

Родословные при митохондриальном наследовании имеют следующие особенности:

а) болезнь передается от больной матери всем ее детям — как сыновьям, так и дочерям;

б) передача болезни по мужской линии невозможна.

*Тип наследования при мультифакториальных болезнях.* При мультифакториальных болезнях, развитие которых связано с несколькими генами предрасположенности и действием факторов среды, родословные характеризуются семейным накоплением случаев болезни, но не соответствуют ни одному из перечисленных типов наследования.

При анализе родословных необходимо исключить ложное отцовство, помнить о генетической гетерогенности наследственных болезней и существовании фенкопий (ненаследственных болезней, по своей симптоматике напоминающих наследственные).

### **6.3. Цитогенетические методы диагностики хромосомных заболеваний**

Цитогенетические методы основаны на изучении кариотипа человека. До середины 50-х годов XX в. биологи считали, что человек имеет 48 хромосом. В 1956 г. шведские ученые Д. Х. Тию и А. Леван усовершенствовали методику изучения хромосом, что позволило им четко увидеть 46 хромосом в диплоидном наборе человека [12]. Метод кариотипирования, который они разработали, используется и сегодня с небольшими модификациями во всех цитогенетических лабораториях.

К основным цитогенетическим методам относятся:

— кариотипирование;

— молекулярно-цитогенетические методы;

— определение полового хроматина.

Показания к цитогенетической диагностике:

1) подозрение на хромосомную болезнь по клинической симптоматике (для подтверждения диагноза);

2) дети с множественными врожденными пороками развития и их родители;

3) дети с задержкой психомоторного развития и их родители;

4) дети с задержкой и аномалиями полового развития;

5) супружеские пары, у которых наблюдается невынашивание беременности (более двух спонтанных абортов) или другие репродуктивные потери;

6) супружеские пары с отягощенным анамнезом (мертворождения, наличие ребенка с врожденными пороками развития или хромосомной болезнью, выявление хромосомной патологии у членов семьи);

7) бесплодные супружеские пары или нарушения репродуктивных функций у женщин или мужчин;

8) доноры половых клеток, которые обратились в центр искусственного оплодотворения;

9) лейкозы (для дифференциальной диагностики, оценки эффективности лечения и прогноза течения);

10) оценка мутагенных воздействий (радиационных или химических).

**Кариотипирование.** С помощью кариотипирования можно изучить кариотип в целом (то есть число и структуру хромосом). Хромосомы человека исследуют на стадиях метафазы и прометафазы митоза.

*Изучение метафазных хромосом [2; 13].* В этой стадии хромосомы максимально спирализованы и хорошо видны в световой микроскоп. Препарат метафазных хромосом называется метафазной пластинкой. Для диагностики большинства хромосомных болезней метафазные пластинки изготавливают из лимфоцитов периферической крови. Пригодны также фибробласты кожи, клетки красного костного мозга. Для пренатальной диагностики культивируют

клетки амниотической жидкости, ворсин хориона, плаценты, эмбриональные ткани.

Метафазные пластинки из лимфоцитов периферической крови получают следующим образом.

Для кариотипирования используют венозную кровь (1–2 мл). Кровь помещают в специальную питательную среду (среда 199, «Игла» и др.) с фитогемагглютинином (ФГА), представляющим собой белок бобовых растений. Он вызывает иммунологическую трансформацию лейкоцитов и их деление путем митоза. Культуру помещают в термостат на 48–72 ч.

За 2–3 ч до конца культивирования добавляют колхицин (или колцемид). Колхицин получают из растения безвременника осеннего (*Colchicum autumnale*). Он разрушает веретено деления и останавливает деление клетки на стадии метафазы.

Следующий этап изготовления препарата — обработка клеток гипотоническим раствором хлорида калия или нитрата натрия. В гипотоническом растворе клетки набухают, межхромосомные связи рвутся и хромосомы свободно плавают в цитоплазме. Клеточную суспензию фиксируют и наносят на предметное стекло. При высушивании фиксатора клетки и хромосомы прочно прикрепляются к стеклу.

Препарат окрашивают ядерными красителями. Различают методы рутинной и дифференциальной окраски. При рутинной окраске препарат окрашивают азур-эозином по Романовскому — Гимзе. При этом хромосомы окрашиваются равномерно по всей длине. Рутинная окраска позволяет подсчитать число хромосом, распределить их по группам и обнаружить грубые хромосомные aberrации. Для некоторых диагностических целей (например, для выявления количественных аномалий хромосом) этот метод вполне достаточен. Для получения более детальной картины структуры хромосом и точной диагностики хромосомных aberrаций используются различные способы дифференциального окрашивания.

Впервые методику дифференциальной окраски хромосом предложил Т. Cas-

persson (1968). В настоящее время используют четыре основных метода дифференциальных окрасок: G-, R-, Q-, C-окраски [13].

*G-окраска* (от *англ.* *giemsa stain*) — наиболее широко используемая. Хромосомы перед окраской по Романовскому — Гимзе предварительно обрабатывают протеазами (трипсином). После окраски они становятся полосатыми. В них чередуются темные и светлые полосы. Поперечные полосы, выявляемые при дифференциальной окраске, называются сегментами. Предполагают, что темные полосы (G-полосы) — гетерохроматиновые участки, а светлые (R-полосы) — эухроматиновые. Обычно в гаплоидном наборе можно насчитать до 400 сегментов. Подсчитано, что каждый сегмент содержит около 8 млн п. н. Чередование темных и светлых полос (сегментов) индивидуально в каждой паре хромосом. Разработана форма представления стилизованного идеального кариотипа с типичным рисунком полос на каждой хромосоме. Такая форма называется идиограммой.

*R-окраска* (от *англ.* *reverse banding* — обратная окраска). Препарат перед окраской по Романовскому-Гимзе предварительно нагревают в солевом растворе до 78–90°C. При этом хромосомы также имеют поперечную исчерченность. Рисунок полос сохраняется, но их цвет меняется на противоположный по сравнению с G-окраской, то есть темные полосы становятся светлыми и наоборот. Отсюда и название метода *reverse banding*.

*Q-окраска* (от *англ.* *quinacrine* — квинакрин, акрихин — один из флюоресцентных красителей) — исторически первый метод, разработанный Т. Caspersson (1968). При этом методе хромосомы окрашивают флюоресцентными красителями и изучают с помощью люминесцентного микроскопа. В качестве красителей в настоящее время используют акрихин, акрихин-иприт и др. Ярко светящиеся сегменты при Q-окраске эквивалентны темно окрашенным полосам при G-окраске.

*C-окраска* (от *англ.* *constitutive heterochromatin* — конститутивный гетерохрома-

тин). Препараты обрабатывают щелочами, а затем окрашивают по Романовскому — Гимзе. При этом хорошо окрашиваются центромеры всех хромосом, длинное плечо Y-хромосомы и другие районы, богатые гетерохроматином.

Следует подчеркнуть, что названные методы не альтернативны. На Парижской конференции (1971) были сопоставлены данные, полученные при различных методах дифференциального окрашивания. Оказалось, что все методы выявляют в принципе одни и те же структуры, но каждый из них специфичен в отношении определенных хромосомных сегментов.

*Изучение прометафазных хромосом (высокоразрешающее дифференциальное окрашивание)*. В настоящее время разработаны методики изготовления прометафазных пластинок, то есть деление останавливают на стадии прометафазы, когда хромосомы еще недостаточно конденсированы. Прометафазные хромосомы более длинные, чем на стадии метафазы. При дифференциальной окраске прометафазных хромосом можно рассмотреть от 550 до 850 сегментов. При этом сегменты, наблюдаемые в метафазных хромосомах, могут быть подразделены на субсегменты. Этот метод используют для диагностики микроделций, микродупликаций и сложных хромосомных aberrаций.

**Молекулярно-цитогенетические методы** сочетают традиционные цитогенетические методики с молекулярно-генетическими технологиями [14].

*Метод флюоресцентной гибридизации in situ (FISH-метод)* — основной молекулярно-генетический метод, включает гибридизацию *in situ* (то есть в препарате, на предметном стекле) окрашенных флюоресцентными красителями ДНК-зондов с метафазными или интерфазными хромосомами.

Зонд — это участок одноцепочечной ДНК, комплементарный определенному участку гена или хромосомы. Зондами могут служить последовательности ДНК, выделенные из генома, искусственным

образом синтезированные или клонированные с помощью бактериальных плазмид или другими способами. Для FISH-метода зонды метят биотином или дигоксигенином, к которым затем присоединяются флуоресцентные красители [15; 16].

Метод включает следующие этапы:

1) готовят препарат метафазных или прометафазных хромосом;

2) обрабатывают препарат щелочами; происходит денатурация ДНК, то есть разрываются водородные связи между двумя цепями ДНК;

3) на стекло капают ДНК-зонды, которые соединяются с комплементарными последовательностями ДНК хромосом; происходит так называемая гибридизация — соединение по принципу комплементарности нуклеиновых кислот, выделенных из разных источников (в данном случае — гибридизация ДНК пациента с ДНК зонда);

4) отмывают препарат от избытка зонда (гибридизированные зонды остаются фиксированными на хромосомах), обрабатывают флуоресцентными красителями, которые присоединяются к биотину или дигоксигенину. В качестве красителей могут быть использованы родамин (дает красное свечение) или флуоресцеин изотиоцианат (зеленое свечение);

5) изучают препарат под люминесцентным микроскопом; участки хромосом, где произошла гибридизация и где находятся зонды, дают специфическое свечение.

В настоящее время FISH-метод используют также для изучения хромосом в неделящихся клетках на стадии интерфазы.

В клинической генетике метод применяют для быстрой диагностики хромосомных болезней, связанных с изменением числа хромосом в интерфазных ядрах, а также для диагностики микроделеций, микродупликаций и сложных хромосомных перестроек, которые с помощью обычных цитогенетических методик выявляются редко [17; 18].

Разработаны различные типы зондов.

*Зонды к определенному локусу хромосомы (гену)* используют для диагностики микроделеций или микродупликаций. Например, зонды к определенному участку длинного плеча 15 хромосомы используют для диагностики синдромов Ангельмана и Прадера — Вилли.

Таковыми зондами пользуются также для картирования хромосом. При этом зонды могут быть приготовлены на основе иРНК, выделенных из тканей.

*Зонды к теломерам.* Синтезирован полный набор зондов к теломерам всех 24 хромосом человека (22 аутосомы плюс X- и Y-хромосомы). Использование этих зондов позволило выявить небольшие субтеломерные делеции и транслокации у части детей с необъяснимой ранее умственной отсталостью.

*Набор зондов к различным локусам одной и той же хромосомы.* Если их используют одновременно, то можно «окрасить» хромосому целиком. Этот метод позволяет диагностировать транслокации небольших участков хромосом, выявить природу кольцевидных или маркерных хромосом.

*Зонды к центромерам определенных хромосом.* Синтезированы зонды к центромерам 13, 18, 21, X- и Y-хромосом. Их используют для быстрой пренатальной диагностики наиболее распространенных хромосомных синдромов в интерфазных клетках ворсин хориона или амниотической жидкости. Принцип метода такой же, как и для метафазных пластинок. Готовится препарат клеток амниотической жидкости или ворсин хориона на предметном стекле. Препарат денатурируют щелочами и затем обрабатывают зондами к центромерам определенной хромосомы (например, к 21-й). В норме соматические клетки имеют две 21-х хромосомы. В ядре под люминесцентным микроскопом будут видны две флуоресцирующие соответствующим цветом точки. Если у плода синдром Дауна, то в ядре будут видны 3 точки. Метод прост и требует мало времени (несколько часов).

*Метод обратного мечения (reverse painting).* В ряде случаев в клетках могут обнаруживаться добавочные фрагменты не-

которых хромосом в виде кольцевидной или маркерной хромосомы. Для того чтобы установить ее происхождение, хромосому выделяют. Затем ДНК этой хромосомы амплифицируют с помощью метода полимеразной цепной реакции. Для амплификации используют нуклеотиды. Полученные ДНК с радиоактивной меткой гибридизируют с хромосомами нормальной метафазной пластинки. Происхождение добавочного сегмента устанавливают по хромосоме, с которой гибридизировалась меченая ДНК [16].

*Метод сравнительной геномной гибридизации (comparative genomic hybridization)* используется в онкогенетике для обнаружения в опухоли участков хромосом, которые амплифицировались (это свидетельствует об активации онкогенов) или подверглись делеции (что подтверждает потерю соответствующего гена-супрессора). Суть метода в том, что выделяют ДНК из опухоли («тестируемая ДНК»), амплифицируют с помощью ПЦР и метят флюоресцентным красителем, а ДНК, выделенную из нормальной ткани, метят другим красителем. Затем готовят по стандартной методике метафазную или прометафазную пластинку (для FISH-метода). Смесь тестируемой и нормальной ДНК гибридизируют с хромосомами. Участки опухолевой ДНК, в которых произошла делеция (потеря генов) или амплификация (увеличение числа генов), определяют по изменению интенсивности свечения [19].

*Спектроскопический анализ хромосом* (многоцветное спектральное кариотипирование — multicolour spectral karyotyping). В FISH-методе используются наборы зондов к разным локусам хромосом. Зонды метят разными флюоресцентными красителями и обрабатывают кариотип набором таких зондов. Каждая пара хромосом имеет специфические спектральные характеристики, а после компьютерной обработки спектра каждая пара хромосом приобретает специфическую окраску. Поскольку каждая пара имеет специфический цвет, в таком кариотипе легко распознаются самые сложные хромосомные aberrации.

Метод в основном используется в онкогенетике, поскольку он позволяет точно описать множественные структурные перестройки хромосом, происходящие в опухолевых клетках. Широкое применение спектроскопического анализа в клинической генетике ограничивается дороговизной [20].

В табл. 6.3 приведены данные об эффективности разных цитогенетических методов для диагностики хромосомной патологии.

**Определение полового хроматина.**

Разработаны методы определения X-полового (тельца Барра) и Y-полового хроматина.

*X-половой хроматин.* Тельца Барра — это спирализованная X-хромосома. Одна из X-хромосом у плодов женского пола инактивируется и спирализуется на 16–19-е сутки эмбрионального развития, а вторая остается активной. Спирализованная X-хромосома видна в ядрах соматических клеток в виде темной, хорошо окрашивающейся глыбки.

Тельца Барра обнаруживают в эпителиальных клетках со слизистой щеки (в буккальном соскобе).

Методика определения полового хроматина в буккальном соскобе следующая. После предварительного полоскания ротовой полости стоматологическим шпателем берут соскоб эпителия внутренней поверхности щеки у коренных зубов. Соскоб наносится равномерным слоем на предметное стекло, окрашивается в течение 2 мин ацетоарсеином, затем покрывается покровным стеклом. Излишки краски удаляют с помощью фильтровальной бумаги. Подсчет телец полового хроматина проводят под иммерсией в круглых или овальных ядрах с ненарушенной ядерной мембраной. В эпителиальных клетках глыбки полового хроматина располагаются под ядерной мембраной, а у женщин в норме половой хроматин обнаруживают более чем в 20 % клеток, а у мужчин половой хроматин в норме отсутствует.

Половой хроматин можно определять также в мазках крови, окрашенных по Ро-

**Эффективность цитогенетических методов  
в диагностике хромосомной патологии [13]**

Основные цитогенетические методы	Хромосомная патология, которая может быть выявлена с использованием данной методики, %
Кариотипирование с рутинной окраской	30
Методы дифференциальной окраски метафазных хромосом	60
Методы исследования прометафазных хромосом (высокоразрешающее дифференциальное окрашивание)	75
Молекулярно-цитогенетические методы (FISH-метод)	До 95–99

мановскому — Гимзе. В нейтрофильных лейкоцитах тельца Барра имеют вид барабанных палочек. В норме у женщин барабанные палочки обнаруживаются в 1–2 % лейкоцитов, а у мужчин отсутствуют.

Метод используют:

1) для экспресс-диагностики хромосомных болезней, связанных с изменением числа X-хромосом; число X-хромосом на единицу больше числа глыбок полового хроматина и определяется по формуле:

$$N = n + 1,$$

где N — число X-хромосом; n — число глыбок полового хроматина;

2) как экспресс-метод диагностики пола при гермафродитизме;

3) в судебной медицине для определения половой принадлежности фрагментов трупа человека (тельца Барра хорошо сохраняются в хрящевой ткани).

*Y-половой хроматин.* Существует методика определения Y-хроматина. Он представляет собой интенсивно флуоресцирующий участок длинного плеча Y-хромосомы в интерфазных ядрах. Определить Y-хроматин можно в буккальном соскобе, лейкоцитах периферической крови. Препарат окрашивают флуоресцентным красителем акрихин-ипритом. Под люминесцентным микроскопом Y-хроматин выявляется в ядре клетки как яркое пятно диаметром 0,3–1,0 мкм. У мужчин в норме одна глыбка Y-хроматина. Метод используется для экспресс-диагностики синдрома полисомии Y.

### 6.4. Молекулярно-генетические методы (методы ДНК-диагностики)

Молекулярно-генетические методы (методы ДНК-диагностики) — это большая и разнообразная группа, предназначенная для выявления вариаций в структуре исследуемого участка ДНК [14; 21].

Показания к ДНК-диагностике:

1. Диагностика моногенных болезней или дифференциальная диагностика. Возможности диагностики связаны с осуществлением программы «Геном человека» и расшифровкой генома человека. Перечень моногенных болезней, диагностируемых молекулярными методами и доступных пренатальной диагностике, постоянно расширяется. К этому списку относятся: муковисцидоз, мышечная дистрофия Дюшенна — Беккера, гемофилия (А и В), фенилкетонурия, болезнь Хантера (мукополисахаридоз), адено-генитальный синдром, хорей Гентингтона, синдром fragile X-хромосомы и др. В настоящее время возможна диагностика (в лабораториях всех стран мира) более 1000 моногенных заболеваний.

2. Пресимптоматическая диагностика, когда клинические признаки заболевания с поздним дебютом отсутствуют.

3. Пренатальная диагностика моногенных болезней.

4. Преимплантационная диагностика.

5. Выявление генетической предрасположенности к мультифакториальным заболеваниям.

6. Идентификация личности (геномная дактилоскопия) и установление родства в судебной медицине.

7. Диагностика онкологических заболеваний.

8. В клинической фармакогенетике — для определения типа метаболизма лекарственных препаратов.

9. Диагностика инфекционных заболеваний (выявление ДНК- или РНК-возбудителя). Сегодня созданы и широко используются в практической диагностике тест-системы для идентификации: ВИЧ-инфекции, вирусных гепатитов В, С, D, E и т. д., в том числе количественная диагностика; заболеваний, передающихся половым путем (хламидиоз, уреаплазмоз, микоплазмоз, трихомоноз, гарднереллез, гонорея); ТОРСН-инфекций (токсоплазмоз, краснуха, герпес-вирусные инфекции, цитомегаловирусная инфекция); туберкулеза и прочих бронхолегочных заболеваний, а также ряда других. Практически при помощи этого метода может быть выявлен любой микроорганизм или вирус в любой среде.

10. Для определения устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний к антибиотикам. Формирование устойчивости связано с мутациями определенных генов, которые можно идентифицировать.

11. В перспективе — для создания генетического паспорта любого человека. Речь идет о том, что с помощью автоматизированной системы можно проанализировать весь спектр мутаций, ответственных как за моногенные, так и мультифакториальные болезни, определить предрасположенность к онкологическим заболеваниям.

**Исходный материал для проведения ДНК-диагностики.** Для молекулярно-генетической диагностики используют любые ядродержащие клетки:

— для диагностики наследственного заболевания чаще берут кровь (лейкоциты), реже — смывы из полости рта, волосные фолликулы;

— для пренатальной диагностики проводят хориоцентез (получение ворсинчатой оболочки хориона), плацентоцентез (получение ткани плаценты), амниоцентез (получение амниотической жидкости и выделение из нее клеток), кордоцентез (получение пуповинной крови);

— для доимплантационной диагностики — blastomer или полярное тельце;

— в судебной медицине для идентификации личности используют любые ткани (пятна крови, кожа, сперма и др.), а для установления родства с помощью методов геномной дактилоскопии — кровь;

— для диагностики инфекционных заболеваний — соскобы из влагалища, уретры, бронхолегочные смывы, сыворотку крови, культуры возбудителей;

— для диагностики онкологических заболеваний — красный костный мозг (при лейкозах) и др.;

— для диагностики митохондриальных болезней основным источником ДНК служит биоптат мышц.

**Этапы ДНК-диагностики с использованием полимеразной цепной реакции.**

В настоящее время одним из основных этапов ДНК-диагностики является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Метод был разработан в 1983 г. К. Мюллисом (США). За разработку этого метода в 1993 г. ему была присуждена Нобелевская премия в области биологии и медицины.

Метод основан на амплификации (то есть многократной редупликации) *in vitro* строго определенного участка ДНК длиной от нескольких десятков до тысячи и более пар нуклеотидов. Это позволяет в течение 3–5 ч получить большое число копий нужной последовательности ДНК. Идентификация такого большого числа копий ДНК в дальнейшем не представляет большой сложности. В качестве матрицы пригодна любая ДНК, выделенная из разных источников. Преимущества ПЦР следующие:

— амплификация желаемого участка ДНК, даже если анализируемый препарат недостаточно очищен или представляет собой сложную смесь молекул. Именно к

таким препаратам относятся образцы крови, мочи, экссудатов, мокроты и других сред организма, а также бактериальные культуры;

— амплификация ДНК, присутствующей в образце в ничтожно малых количествах. По сути, в качестве стартового материала для ПЦР достаточно взять не только одну клетку, но и одну молекулу. Это важно при исследовании проб воздуха, воды и т. д. на наличие патогенных возбудителей заболеваний, фрагментов тканей человека для судебно-медицинских исследований.

Рассмотрим следующие этапы ДНК-диагностики с использованием ПЦР [21].

**Выделение ДНК.** Для проведения амплификации не требуется большого количества матричной ДНК, пригодны даже небольшие фрагменты слабо очищенной ДНК и в принципе может быть достаточно даже одной молекулы. Как правило, ДНК из биологического материала выделяют методами лизиса клеток с последующей очисткой от белковых компонентов. Для повышения чувствительности реакции ДНК можно сорбировать на ионообменных смолах.

**Проведение ПЦР** позволяет избирательно амплифицировать (многократно редуцировать) интересующий исследователя участок ДНК в миллионы раз.

Необходимое условие для проведения ПЦР — знание нуклеотидной последовательности амплифицируемой области ДНК, так как специфический выбор этого участка осуществляется путем гибридизации матричной ДНК с двумя искусственно синтезированными праймерами (олигонуклеотидные последовательности ДНК длиной от 15 до 30 п. о., комплементарные 3'-концам амплифицируемого участка на смысловой и антисмысловой нитях ДНК соответственно). Таким образом, расстояние между праймерами определяет длину синтезируемых фрагментов ДНК.

По сути, метод ПЦР имитирует естественный процесс репликации ДНК в клетках. В состав реакционного раствора вводят ДНК обследуемого человека, четы-

ре вида нуклеотидов ДНК (дезоксирибонуклеотид-трифосфаты), а также термостабильную ДНК-полимеразу (Taq-полимеразу), которая сохраняет свою активность при высокой температуре. Этот фермент был выделен из бактерий, живущих в горячих источниках (*Thermus aquaticus*). Оптимум работы фермента при температуре +72 °С.

Проведение реакции осуществляется в специальной буферной смеси с определенными концентрациями ионов калия, хлора, магния и точным значением рН.

Полимеразная цепная реакция протекает циклически. Каждый цикл имеет три фазы.

1. Денатурация или плавление: смесь нагревают до 90–95 °С. При этом происходит разрыв водородных связей, соединяющих две цепи ДНК, и ДНК переводится в однонитевую форму.

2. Гибридизация, или отжиг: смесь охлаждают до 45–60 °С, праймеры соединяются с комплементарными участками ДНК.

3. Синтез: смесь вновь нагревают до 72 °С, начинает работать термостабильная ДНК-полимераза и синтезируется дочерняя цепь ДНК. ДНК-полимераза достраивает нить нуклеотидов комплементарно матричной ДНК. Причем синтез ДНК идет от места гибридизации праймера в направлении 3'-5'. При этом праймер включается в состав вновь синтезируемого участка нуклеиновой кислоты. В последующих циклах вновь синтезированные молекулы ДНК становятся, в свою очередь, матрицей для аналогичного синтеза новых копий. Поскольку синтез каждой из двух антипараллельных цепей ДНК начинается от места гибридизации праймера, это место и становится границей синтезируемого участка.

Если представить себе, что в реакционной смеси находилась одна молекула ДНК с участком, который необходимо редуцировать, то после первого цикла получают 2 молекулы, после второго цикла — 4 и т. д. Таким образом, количество копий ДНК увеличивается в геометрической прогрессии.

Число указанных циклов в ПЦР составляет обычно от 25 до 30. В итоге число копий ДНК увеличивается в миллионы раз.

Смесь помещают в специальный прибор — термоциклер или амплификатор. В нем автоматически происходит смена температур, необходимых для реакции.

Преимущества ПЦР:

1) значительные (в 2–10 раз) сокращение затрат труда и времени;

2) высокая точность, исключение ложноположительных результатов;

3) возможность проведения исследования на крайне малом (несколько микролитров) объеме материала;

4) простота подготовки материала к исследованию; может использоваться практически любая ткань или жидкость организма.

Проведение ПЦР-диагностики требует строгого соблюдения всех санитарно-гигиенических норм во избежание загрязнения образцов инородной ДНК, специально оборудованных лабораторий и обученного персонала.

*Анализ полученных результатов.* Дальнейший анализ предполагает исследование конкретных особенностей амплифицированного фрагмента ДНК. Фрагменты с нормальной и мутантной последовательностями могут отличаться по электрофоретической подвижности, поэтому часто проводится электрофорез амплифицированных фрагментов в геле. Одновременно выполняют электрофорез контрольных фрагментов ДНК. В гель добавляют бромистый этидий (для окрашивания ДНК). Фрагменты ДНК перемещаются на определенное расстояние. Участки геля, в которых находятся фрагменты ДНК, будут давать оранжевое свечение при ультрафиолетовом освещении. Совпадение полос контрольного фрагмента и опытного позволят диагностировать наличие искомого гена. Гель можно сфотографировать или его изображение перенести на экран компьютера.

Для идентификации амплифицированных фрагментов используются методы секвенирования, а также метод аллель-специ-

фических олигонуклеотидов, основанный на гибридизации амплифицированных фрагментов ДНК с мечеными олигонуклеотидами, комплементарными нормальной или мутантной последовательности ДНК. Примером такого подхода служит применение ДНК-чипов.

*Модификации ПЦР.* Существует немало модификаций метода ПЦР, разработанных для быстрого сканирования генома и поиска известных генных мутаций [22].

*Мультиплексная (мультипраймерная) ПЦР [23]* основана на одновременной амплификации в одной реакции нескольких экзонов исследуемого гена или нескольких фрагментов разных генов, что позволяет проводить экспресс-скрининг наиболее частых мутаций в гене или выявлять одновременно мутации в разных генах.

*Аллель-специфическая амплификация [24]* предусматривает использование различных праймеров, один из которых комплементарен нормальной, а другой — мутантной последовательности ДНК. В результате такой реакции в растворе синтезируется две разновидности ПЦР-продуктов — нормальные и мутантные, различающиеся по своей длине.

*Метод сайт-направленной модификации амплифицированной ДНК* основывается на использовании в ПЦР специфического mismatch-праймера, отличающегося от матричной последовательности на 1 нуклеотид. В результате включения такого праймера в состав мутантного ПЦР-продукта в нем образуется искусственно созданный сайт рестрикции для одной из рестриктаз, что позволяет провести ДНК-диагностику с помощью рестрикционного анализа.

Существуют специальные способы проведения ПЦР, позволяющие изучать не только ДНК, но и РНК. Это важно, например, при исследовании РНК-содержащих вирусов (ретровирусы, в том числе ВИЧ, вирус гепатита С, гриппа А и др.), а также при анализе экспрессии различных генов в организме. Подобные методики обычно включают в себя два этапа: обратную транскрипцию и ПЦР на матрице полученной ДНК.

*ПЦР в реальном времени (Real-time PCR).* Одно из быстро развивающихся перспективных направлений ДНК-технологий — ПЦР в реальном времени. Этот метод не требует электрофореза продуктов амплификации в агарозном или полиакриламидном геле. Наличие или отсутствие продуктов амплификации может регистрироваться двумя путями: учетом флюоресценции продуктов амплификации либо по характеру температурных кривых этапа отжига, которые зависят от наличия или отсутствия искомой ДНК-мишени.

Применение ПЦР в реальном времени позволяет значительно сэкономить время и воспользоваться преимуществами «закрытой системы», так как не требуется открывать пробирки с реакционной смесью. Таким образом, предотвращается возможность контаминации оборудования и материалов продуктами амплификации и возникновения ложноположительных результатов. Метод Real-time PCR особенно перспективен при диагностике вирусных и бактериальных инфекций.

#### **Другие методы ДНК-диагностики**

*Использование рестрикционных эндонуклеаз.* В различных методах молекулярной диагностики часто используются ферменты — рестрикционные эндонуклеазы (рестриктазы). Они были впервые открыты у бактерий. Эти ферменты *in vivo* участвуют в репарации и уничтожении чужеродных ДНК. Рестриктазы узнают специфические последовательности из 4–6, реже 8–12 нуклеотидов в двухцепочечной ДНК и разрезают ее на фрагменты в местах локализации этих последовательностей, называемых сайтами рестрикции. Количество образующихся рестрикционных фраг-

ментов ДНК и их длина определяются частотой сайтов рестрикции и их расположением в ДНК. Чем чаще расположены сайты рестрикции, тем короче фрагменты ДНК после рестрикции и тем большее число фрагментов образуется [22].

В настоящее время известно более 500 различных типов рестриктаз бактериального происхождения. Они называются по виду микроорганизма, из которого выделены. Каждый из этих ферментов узнает свою специфическую последовательность нуклеотидов. Любая рестриктаза разрезает ДНК в строго определенных местах, где находятся специфические сайты рестрикции (табл. 6.4).

Длина полученных фрагментов может быть определена методом электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле.

Точковые мутации могут изменять последовательность нуклеотидов в сайте рестрикции для определенной рестриктазы. Такая рестриктаза не сможет расщепить мутантный фрагмент ДНК. В некоторых случаях, наоборот, мутация приводит к появлению нового сайта рестрикции для определенной рестриктазы, отсутствующего в норме. В обеих описанных ситуациях мутантная и нормальная ДНК дадут различные по длине фрагменты рестрикции, что можно легко обнаружить при электрофорезе.

*Электрофорез фрагментов ДНК.* Практически любая методика ДНК-диагностики включает электрофорез фрагментов ДНК в агарозном или полиакриламидном геле. Молекулы ДНК имеют отрицательный заряд и при электрофорезе движутся по направлению к положительно заряжен-

Таблица 6.4

**Примеры рестрикционных эндонуклеаз и соответствующих сайтов рестрикции [16]**

Рестриктаза	Микроорганизм, из которого впервые выделен фермент	Сайт рестрикции
BamH1	Bacillus amyloliquefaciens H	G-GATCC
EcoR1	Escherichia coli RY 13	G-AATTC
HaeIII	Haemophilus aegyptius	GC-CC
HindIII	Haemophilus influenzae Rd	A-AGCTT

ному электроду. Чем короче фрагмент, тем большее расстояние он проходит при электрофорезе. Расстояние может зависеть также от конформации фрагментов ДНК.

Для того чтобы увидеть ДНК в геле, в него добавляют специальные красители, например, бромистый этидий. Это люминесцентный краситель, который избирательно окрашивает ДНК. Гель исследуют в проходящем ультрафиолетовом свете. Места локализации ДНК имеют характерное оранжевое свечение. Гель фотографируют или его изображение сканируют и переносят на экран компьютера для последующего анализа.

*Определение полиморфизма длин рестриционных фрагментов* (ПДРФ; restriction fragments length polymorphism — RFLP) — один из распространенных методов ДНК-диагностики. Принцип метода: выделенная ДНК обрабатывается ферментами, которые «разрезают» ее на фрагменты в строго определенных участках (сайтах рестрикции). Патологические мутации могут изменять сайты рестрикции, что приводит к изменению длин полученных фрагментов. При электрофорезе контрольной нормальной ДНК и исследуемой ДНК полосы находятся на разном уровне [22].

*Блот-гибридизация по Саузерну.* При обработке тотальной геномной ДНК человека рестриктазами образуется очень большое количество фрагментов различной длины. С помощью электрофореза не удается идентифицировать отдельные фрагменты ДНК. После электрофореза рестрицированной геномной ДНК получается равномерное окрашивание по всей длине геля — так называемый шмер. Идентификация нужных фрагментов ДНК в таком геле возможна только путем гибридизации с мечеными ДНК-зондами. Это достигается при помощи метода блот-гибридизации по Саузерну [22].

Методика была предложена английским исследователем Саузерном (1975) и включает пять этапов.

1. Выделение и очистка ДНК. Для проведения исследования необходима хоро-

шая очистка ДНК. С целью выделения ДНК полученный биологический материал обрабатывают протеолитическими ферментами, чтобы удалить все белки. Затем ДНК адсорбируют на пористых носителях или экстрагируют органическими растворителями, после чего следует многократное очищение. При этом получают всю ДНК клеток (геномную ДНК).

2. Обработка ДНК рестриктазами. Геномную ДНК обрабатывают одной из рестрикционных эндонуклеаз. После этого проводят электрофорез рестрикционных фрагментов ДНК в агарозном геле. Но идентификация фрагментов непосредственно в геле в данном случае затруднена, так как в результате получают сплошную последовательность фрагментов разной длины.

3. Блоттинг — следующий этап метода, заключающийся в переносе фрагментов с геля на нитроцеллюлозный или нейлоновый фильтр. Предварительно гель обрабатывают щелочами, что приводит к денатурации ДНК (разрываются водородные связи между комплементарными нуклеотидами в двух цепях ДНК). Затем гель помещают в буферный раствор, сверху кладут нитроцеллюлозный фильтр, а на него помещают пачку фильтровальной бумаги, впитывающей солевой раствор. Он поднимается вверх и вымывает денатурированные фрагменты ДНК на фильтр, имеющий такую величину пор, которая не пропускает ДНК. На фильтре получают точную копию расположения рестрикционных фрагментов в геле.

4. Гибридизация с ДНК-зондами. Фиксированную на фильтре ДНК гибридизируют с ДНК-зондами. Зонд представляет собой однонитевую ДНК, комплементарную определенной последовательности изучаемого гена. В качестве зондов часто используют искусственно синтезированные олигонуклеотидные последовательности ДНК размером не больше 30 нуклеотидов, преимущественно фрагменты часто встречающихся некодирующих последовательностей. Могут использоваться радиоактивно-меченные зонды и зонды, мечен-

ные химическими веществами: флуоресцентными красителями либо специальными лигандами — биотином и дигоксигенином. Радиоактивно-меченные зонды, синтезированные из нуклеотидов, содержащих радиоактивный изотоп  $^{32}\text{P}$ , обеспечивают очень высокую чувствительность, но недолговечны и не безопасны. В настоящее время приоритет отдается зондам, меченым химическими веществами.

5. Анализ полученных результатов. Фильтр отмывают от избытка зонда. В случае если используют радиоактивно-меченные зонды, на него накладывают рентгеновскую пленку. В том месте, где произошла гибридизация зонда с ДНК, наблюдается засветка пленки. Положение искомого фрагмента ДНК можно определить с помощью метода автордиографии.

Если используют химические метки, то результаты гибридизации могут быть зарегистрированы визуально при освещении видимым или ультрафиолетовым светом (в зависимости от вида используемого красителя).

Таким образом, блот-гибридизация позволяет идентифицировать специфические последовательности нуклеотидов в общем наборе рестрикционных фрагментов геномной ДНК. Когда та или иная мутация затрагивает сайт узнавания используемой при блот-гибридизации рестриктазы, на пленке можно четко зафиксировать отсутствие соответствующей полосы или появление атипичного фрагмента ДНК. Удлинение или укорочение фрагмента ДНК приведет к появлению полосы в атипичном месте.

Существует несколько модификаций Саузерн-блоттинга без предварительной рестрикции и электрофореза. На фильтр наносят геномную ДНК и гибридизируют с зондами.

Метод блот-гибридизации обладает высокой чувствительностью, однако он весьма трудоемок, предъявляет высокие требования к очистке ДНК, необходимо большое количество геномной ДНК. Если используются радиоактивные зонды, то необходима специально оборудованная

лаборатория. Длительность и трудоемкость всей процедуры делают этот метод дорогостоящим.

В настоящее время в большинстве лабораторий используют более дешевый и не менее точный метод ПЦР. Однако блот-гибридизация по Саузерну и сегодня используется для диагностики моногенных заболеваний. Этот метод применяют в тех случаях, когда по каким-либо причинам ПЦР невозможно выполнить. Так, для осуществления ПЦР необходимо точно знать структуру кодирующих участков гена и примыкающих к ним интронных областей (без этого невозможно синтезировать праймеры, иницирующие реакцию). Некоторые участки гена, содержащие сверхдлинные тандемные тринуклеотидные (или более сложные) повторы, не могут быть эффективно амплифицированы. Кроме того, возникают трудности с амплификацией больших и сложных по своей организации генов (таких как ген дистрофина), с выявлением протяженных делеций в гетерозиготном состоянии и в некоторых других случаях.

*Секвенирование ДНК.* Метод позволяет определить точную последовательность нуклеотидов во фрагменте ДНК (например, в продукте ПЦР). Его используют для выявления нуклеотидных замен в гене. Этот метод нашел широкое применение для изучения строения ДНК человека и других организмов в ходе выполнения программы «Геном человека». На практике часто используют метод секвенирования по Сенгеру, который основан на полимеразной цепной реакции. Широкое использование в клинической генетике пока ограничено из-за дороговизны метода.

**Прямые и косвенные методы ДНК-диагностики.** Молекулярно-генетические методы можно разделить на прямые и косвенные [25].

*Прямая диагностика* предполагает выявление мутации в исследуемом гене. Она обладает практически абсолютной точностью, требует для анализа только образец ДНК обследуемого лица и может проводиться как в семейных, так и спорадичес-

ких случаях заболеваний. Для осуществления прямой ДНК-диагностики необходимо точно знать структуру гена (или конкретного участка гена, содержащего анализируемую мутацию). Поиск мутаций, вызвавших заболевание, — это не простая задача, поскольку болезнь может быть обусловлена разными мутациями одного и того же гена. Однако, как правило, в конкретной популяции чаще встречается определенный тип мутаций. Преобладающие мутации, которые обуславливают значительный процент всех случаев заболевания в данной популяции, называются мажорными. Так, большинство случаев фенилкетонурии обусловлено мутацией R408W в гене, ответственном за заболевание; муковисцидоз чаще всего вызван мутацией гена белка хлорного канала  $\Delta F508$ ; при синдроме ломкой X-хромосомы — экспансии тринуклеотидных повторов; при миодистрофии Дюшенна — делеции; при адреногенитальном синдроме — протяженная делеция и т. д. Знание мажорных мутаций облегчает проведение прямой ДНК-диагностики.

Методические подходы, используемые при прямой ДНК диагностике того или иного наследственного заболевания, зависят от характера мутаций и молекулярной организации соответствующего гена.

В прямой диагностике применяют методы ПЦР. Используя праймеры к участку гена, который чаще мутирует, получают большое количество копий данного участка. Дальнейшее изучение продуктов ПЦР зависит от типа мутации. Так, если заболевание обусловлено делецией нуклеотидов, дубликацией или экспансией тринуклеотидных повторов, то амплифицированные фрагменты нормального и мутантного генов отличаются по длине и электрофоретической подвижности. В этом случае после электрофореза фрагментов в агарозном геле проводят анализ полиморфизма длин амплифицированных фрагментов (ПДАФ). Для обнаружения нуклеотидных замен в анализируемом участке гена возникает необходимость секвенирования амплифицированных фрагментов. Для детек-

ции мутации могут использоваться и другие методики. В ряде случаев мутации нарушают сайты рестрикции для определенных рестриктаз. В мутантном гене может отсутствовать сайт рестрикции либо, наоборот, он появляется в необычном месте. В обеих ситуациях мутантный и нормальный ПЦР-продукт дадут различные по длине фрагменты рестрикции, что можно легко обнаружить при электрофорезе (ПДРФ) [25].

Для прямой диагностики используют различные модификации ПЦР, а также другие методы ДНК-диагностики — блот-гибридизацию по Саузерну, трансляцию белкового продукта *in vitro* и др.

*Косвенная диагностика* используется при заболеваниях, когда ген картирован (известна его локализация в хромосоме), но строение гена, характер мутаций в нем недостаточно выяснены. Сущность косвенной ДНК-диагностики заключается в анализе наследования у больных и здоровых членов семьи полиморфных генетических маркеров, сцепленных с геном болезни (то есть расположенных в соседних локусах в хромосоме и наследующихся сцепленно — по закону Морганна). В качестве таких маркеров могут выступать сайты рестрикции для определенных рестриктаз, полиморфизм минисателлитных и микросателлитных последовательностей.

*Сайты рестрикции* могут располагаться рядом с патологическим геном в некодирующих участках ДНК. Для человека характерен однонуклеотидный полиморфизм ДНК — в некодирующих участках ДНК часто встречаются однонуклеотидные замены, делеции. Они могут затрагивать сайты рестрикции, сцепленные с патологическим геном. При этом изменяется длина рестрикционных фрагментов ДНК (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов).

*Микросателлитные ДНК* — короткие tandemные повторы из 2–6 нуклеотидов. Самые распространенные из них — динуклеотидные ЦА-повторы. Они располагаются tandemно кластерами (то есть группами друг за другом, например, ЦАЦАЦА...).

Часто встречаются три-, тетра- и пентануклеотидные тандемные повторы — STR (short tandem repeats). Количество повторов в одном и том же локусе может существенно отличаться у разных людей. Следовательно, и длина кластеров полиморфна. Микросателлиты находятся в основном в некодирующих участках ДНК, поэтому фенотипически изменение числа повторов не проявляется. Они наследуются по законам Менделя, редко мутируют. Ребенок получает одну хромосому от матери с определенным числом повторов и другую от отца с другим числом повторов. Если рядом с геном, ответственным за моногенное заболевание, или внутри гена находится такой кластер микросателлитов, то маркером патологического гена может быть определенное число повторов и длина кластера. В данном случае диагностика основана на изучении длины коротких тандемных повторов ДНК (STR).

*Минисателлитные ДНК* — тандемные повторы большего числа нуклеотидов (15–100). Они получили название VNTR (variable number tandem repeats) — варьирующие по числу тандемные повторы. Длина этих локусов также существенно варьирует у разных людей и может быть маркером патологического гена. В ДНК часто встречаются кластеры минисателлитных тандемных повторов 10–15 нуклеотидов, которые впервые обнаружил английский генетик А. Джеффриз (A. Jeffreys). Используются реже, чем микросателлитные ДНК.

Недостаток косвенных методов — обязательное предварительное изучение генотипа хотя бы одного большого родственника, чтобы можно было установить сцепление патологического гена с определенным полиморфным маркером. В случае отсутствия пораженных родственников, доступных для обследования, проведение диагностики, как правило, невозможно. При проведении косвенной ДНК-диагностики всегда существует вероятность ошибки, связанная с возможной рекомбинацией в мейозе между геном болезни и исследуемым маркером, в результате чего «патоло-

гический» маркерный аллель и ген болезни у потомка разойдутся по разным хромосомам. Величина такой ошибки прямо пропорциональна расстоянию между маркерным локусом и изучаемым геном: чем ближе они друг к другу в хромосоме, тем меньше вероятность расхождения вследствие кроссинговера. Для известных на сегодня генетических маркеров, используемых в косвенной ДНК-диагностике наследственных заболеваний, вероятность кроссинговера с геном болезни не превышает 1–5%. Таким образом, точность косвенной ДНК-диагностики составляет обычно 95% и выше.

Косвенные методы могут также использоваться при заболеваниях, гены которых идентифицированы, но имеют большой размер и сложную молекулярную организацию, в связи с чем непосредственное определение мутаций в них затруднено. Примерами таких заболеваний с расшифрованными генами, для которых используется косвенная ДНК-диагностика, можно назвать атаксию-телеангиэктазию, болезнь Коновалова — Вильсона и др.

*ДНК-чипы* — это современная и интенсивно развивающаяся технология биологических исследований. Метод заключается в том, что на плоскую поверхность нейлоновой мембраны (макрочипы) или предметное стекло (микрочипы) наносят и иммобилизуют большое количество ДНК-зондов. В зависимости от поставленной задачи, сложность чипа (количество иммобилизованных зондов и плотность их расположения) может варьировать в широких пределах. Зонды — искусственно синтезированные олигонуклеотиды, комплементарные нормальным или мутантным последовательностям исследуемых образцов ДНК [26].

Исследуемую ДНК специально подготавливают: нужные фрагменты исследуемой ДНК предварительно амплифицируют с использованием биотин-меченных праймеров. Для выявления специфической последовательности в исследуемом образце ДНК проводят гибридизацию зондов, иммобилизованных на макрочипе или

микрочипе, с полученными мечеными ПЦР-продуктами. После гибридизации чип отмывают от несвязавшейся ДНК. Результаты гибридизации регистрируют по наличию люминесценции с помощью флюоресцентной микроскопической техники и анализируют с использованием соответствующего компьютерного программного обеспечения. Этот процесс автоматизирован [27].

Созданы микрочипы на основе полиакриламидного геля. Гелевые чипы представляют собой стеклянную пластинку (предметное стекло), на которой находятся гелевые ячейки. Каждая ячейка — это прямоугольный или цилиндрический блок. Размеры ячейки могут быть 100×100×20 мкм или меньше. Такой микрочип может содержать до нескольких тысяч ячеек. По существу, каждая гелевая ячейка представляет собой маленькую пробирку объемом менее 1 нл, они изолированы друг от друга.

В ячейки вносят набор разных ДНК-зондов и используют для изучения ДНК аналогично описанной выше методике. Гелевыми ДНК-микрочипами пользуются также для проведения ПЦР. Для этого в ячейки помещают разные праймеры, что позволяет тестировать исследуемую ДНК сразу по большому количеству мутаций, осуществлять быстрое секвенирование крупных фрагментов ДНК.

Технология ДНК-чипов позволяет проводить автоматизированный и эффективный анализ большого числа мутаций и полиморфизмов, а также изучать экспрессию большого числа генов в изучаемой ДНК. Области применения этой технологии в медицине: 1) определение устойчивости микроорганизмов к антибиотикам (ДНК-чипы позволяют одновременно тестировать штамм микроорганизмов по большому числу мутаций, ответственных за антибиотикоустойчивость); 2) диагностика лейкозов и других опухолей, анализ так называемого «генетического портрета опухоли»; 3) диагностика вирусных инфекций, обнаружение вирусов в окружающей среде [28; 29].

## 6.5. Метод дерматоглифики

Данный метод основан на изучении рисунка кожи на пальцах, ладонях и подошвах (от *греч.* *derma* — кожа, *glyphe* — рисовать). В отличие от других частей тела, на пальцах, ладонях и подошвах имеются выступы эпидермиса — гребешки, которые образуют сложные узоры. Метод был предложен Ф. Гальтоном (1892), который установил, что указанные узоры для каждого человека индивидуальные и не изменяются в течение всей жизни. На этом основании он предложил использовать метод в криминалистике.

Изучение узоров на подушечках пальцев называется дактилоскопией, на ладонях — пальмоскопией, на подошвах — плантоскопией. Осмотр сгибательных складок проводят невооруженным глазом. Папиллярные линии в грудном возрасте исследуют с помощью 3- или 5-кратной лупы.

В медицинской генетике метод в основном используется как вспомогательный для диагностики хромосомных болезней. Однако одновременное формирование рисунка на коже указанных частей тела и развитие головного мозга в эмбриональном периоде позволяют считать, что этот метод имеет значительно большие потенциальные возможности.

Особенности дерматоглифики при хромосомных болезнях [11; 30]:

- 1) четырехпальцевая поперечная ладонная складка;
- 2) несколько дуг на пальцах рук;
- 3) радиальные петли на 1, 4 или 5-м пальцах кисти;
- 4) дистальный осевой трирадиус, увеличение угла atd;
- 5) аплазия подпальцевых трирадиусов;
- 6) поперечная сгибательная борозда на подошве;
- 7) дуговой узор на поле 1-го пальца подошвы.

## 6.6. Биохимические методы

### *Первичная диагностика (скрининг)*

Метод используют для диагностики наследственных болезней обмена веществ. Объектами биохимической диагностики могут быть моча, пот, плазма и сыворотка крови, культура клеток (фибробласты, лимфоциты).

Биохимическую диагностику, как правило, проводят в два этапа: 1) первичная диагностика (скрининг); 2) уточнение диагноза.

Основная цель скрининга заключается в отборе индивидов для последующего уточнения диагноза. Скрининг может быть селективным и массовым.

*Селективный биохимический скрининг* проводится среди групп детей и взрослых с подозрением на наследственный дефект обмена веществ. Иными словами, речь идет о «просеивании» специальных контингентов детей или взрослых, среди которых можно ожидать значительное увеличение частоты больных с наследственными болезнями обмена [31].

Показания для селективного скрининга:

- задержка психомоторного развития у детей раннего возраста, умственная отсталость у детей старшего возраста;

- неврологические нарушения (судороги, снижение мышечного тонуса, спастические парезы);

- диспепсические явления, непереносимость отдельных продуктов и лекарств, нарушение вскармливания;

- нарушение физического развития детей (задержка в прибавке массы тела, неправильный рост, деформация костей туловища и конечностей);

- другие симптомы наследственных болезней обмена (катаракта, нарушение слуха, зрения, специфический цвет и запах мочи, кожные проявления и др.).

В селективных программах в основном используются качественные и полуколичественные методы: на фенилпировиноградную кислоту (диагностика фенилкетон-

урии), аминокислоты, белок, кетокислоты, цистин и гомоцистин, креатинин, ионы аммония, мукополисахариды и др. В целом одна порция мочи или крови исследуется с помощью большого числа (до 30) реакций. Они позволяют выявить целую группу заболеваний: проба Фелинга (с треххлорным железом) на фенилкетонурию, проба Селиванова на фруктозу, проба на аминокацидурию (повышенное выделение аминокислот с мочой) и др.

*Массовый скрининг новорожденных (неонатальный скрининг)* — это массовое обследование всех новорожденных с целью раннего выявления на доклинической стадии заболевания, для которого разработаны методы профилактического лечения. Раннее лечение предупреждает развитие клинических признаков болезни [2; 32].

Основные требования к программам массового неонатального скрининга.

1. Частота заболевания в популяции 1:10 000 (иногда скринируются менее распространенные болезни).

2. Без своевременного лечения развиваются тяжелые нарушения здоровья, что приводит к ранней инвалидизации.

3. Должны существовать способы профилактического лечения.

4. Применяемые методы диагностики высоко чувствительны (не должны давать ложноотрицательных результатов), специфичны (допускается небольшой процент ложноположительных результатов), экономичны; биологический материал для диагностики должен быть доступен. В большинстве программ исследуют кровь.

5. Затраты на скрининг-программы не могут превышать затрат на лечение и содержание данной категории больных.

Программа обязательно включает в себя следующие этапы: 1) взятие биологического материала для исследования у всех новорожденных и его доставка в диагностическую лабораторию; 2) лабораторная просеивающая диагностика; 3) уточняющая диагностика всех случаев с положительными результатами при просеивании; 4) лечение больных и их диспансеризация

с контролем за ходом лечения; 5) медико-генетическое консультирование семьи [33].

Программы массового скрининга на наследственные болезни, подающиеся профилактическому лечению, могут учреждаться только в рамках государственного или регионального здравоохранения.

Первую программу массового скрининга новорожденных на фенилкетонурию разработал К. Гатри (США) в 1961 г. Во многих странах в настоящее время проводится скрининг новорожденных на фенилкетонурию и гипотиреоз (для них характерна высокая частота, при ранней диагностике и лечении обеспечивается формирование нормального фенотипа), в некоторых странах скринируют галактоземию (частота 1 : 50 000, но заболевание хорошо лечится при своевременной диагностике). К числу заболеваний, для которых разработаны программы массового скрининга, относятся также аденогенитальный синдром, муковисцидоз и некоторые редко встречающиеся наследственные болезни обмена веществ (гомоцистинурия, тирозинемия, гистицинемия, «болезнь кленового сиропа» и др.) [34].

В Украине проводится массовый скрининг новорожденных на фенилкетонурию. С учетом частоты, эффективности профилактического лечения, экономической значимости патологии считают целесообразным также проведение массового неонатального скрининга врожденного гипотиреоза.

**Фенилкетонурия.** На 3-и – 5-е сутки у новорожденных берут кровь на специальную хроматографическую или фильтровальную бумагу (карточки Гатри). Кровь высушивают, образец пересылают в лабораторию, занимающуюся скрининговыми исследованиями. Одна и та же карточка с пятнами крови может использоваться для скрининга многих наследственных заболеваний.

Для скрининга применяют три методики: 1) микробиологический тест Гатри, 2) тонкослойную хроматографию аминокислот крови, 3) флюориметрический метод.

Тест Гатри микробиологический — качественно-полуколичественный, позволяет определить концентрацию фенилаланина выше 4 мг%. В планшеты высевают бактерии *Bacillus subtilis* на среду с антиметаболитом фенилаланина. На этой среде бактерии не растут. Из пятна высушенной крови вырезают кружки (диски) диаметром 2 мм и раскладывают их на питательную среду. В крови есть фенилаланин, поэтому вокруг пятна с кровью появляется рост бактерий. Интенсивность роста зависит от количества фенилаланина. Метод Гатри (метод тонкослойной хроматографии — ТСХ) — также качественно-полуколичественный, определяет концентрацию фенилаланина выше 4 мг%, технически относительно прост и дешев, позволяет диагностировать не только фенилкетонурию, но и другие аминокислотурии.

Флюориметрический метод — бумагу с кровью помещают в специальный раствор и добавляют краситель нингидрин, который с фенилаланином дает сиреневую окраску. Интенсивность окраски зависит от количества фенилаланина и определяется с помощью специального прибора — флюороскана. Это количественный метод, наиболее точный, позволяет определить концентрацию фенилаланина. Он используется в большинстве лабораторий.

В случае положительного результата проводится уточняющая биохимическая диагностика. Некоторые формы гиперфенилаланинемии протекают доброкачественно и не требуют лечения [35].

**Врожденный гипотиреоз.** Скрининг основан на определении содержания в крови тироксина (у больных — снижено) или тиреотропного гормона (ТТГ, у больных — увеличено) в высушенном пятне крови на фильтровальной бумаге. Забор крови проводится в те же сроки, что и для диагностики фенилкетонурии. Могут использоваться радиоиммунные или иммуноферментные (иммунофлюоресцентные методы). По техническим и экономическим причинам иммуноферментные методы предпочтительны [31].

*Адреногенитальный синдром (врожденная гиперплазия надпочечников).* Наиболее частая причина заболевания — мутация гена, кодирующего фермент 21-гидроксилазу. Метод скрининга основан на выявлении увеличения содержания 17- $\alpha$ -оксипрогестерона в высушенном пятне крови на фильтровальной бумаге. Разработаны радиоиммунные и иммуноферментные методы, последние предпочтительны.

Для скрининга *галактоземии* используются микробиологический или биохимический тесты, определяющие содержание галактозы в крови.

*Муковисцидоз.* Скрининг основан на определении высокого содержания иммунореактивного трипсина в крови. Методов профилактического лечения муковисцидоза не существует, но рано начатая терапия существенно увеличивает продолжительность жизни больного. Поэтому скрининг целесообразно проводить в странах с высокой популяционной частотой муковисцидоза (на юге Украины одно из самых распространенных моногенных заболеваний, частота его 1 : 1600) [36].

Процедура скрининга не обеспечивает окончательного диагноза, так как для скрининга используются высокочувствительные реакции, которые в ряде случаев могут давать ложноположительные результаты. Необходим второй этап — повторное обследование и подтверждение диагноза.

*Уточнение диагноза.* На втором этапе применяются более сложные методы, позволяющие уточнить диагноз. Например, с помощью тонкослойной хроматографии мочи и крови можно диагностировать наследственные нарушения обмена аминокислот, олигосахаридов, гликозаминогликанов. Газовая хроматография применяется для выявления наследственных болезней органических кислот. С помощью электрофореза гемоглобинов диагностируют всю группу гемоглобинопатий.

В ряде случаев определяют активность ферментов в тканях, для чего используют цитохимические методы. Диагноз может быть уточнен с помощью молекулярно-генетических методов.

## 6.7. Пренатальная диагностика наследственных заболеваний и врожденных пороков развития

Пренатальная диагностика состоит в определении наследственных заболеваний и врожденных пороков развития в период беременности. Это одна из самых ресурсоемких отраслей медицины. Подсчитано, что стоимость лечения, реабилитации и пожизненного содержания больного с врожденной патологией в 100–1000 раз превышает затраты на антенатальную диагностику, профилактику и коррекцию патологии внутриутробного плода.

Методы пренатальной диагностики:

— неинвазивные — УЗИ, определение в сыворотке крови беременной веществ, получивших название сывороточных маркеров матери:  $\beta$ -фракция хорионического гонадотропина ( $\beta$ -ХГ), ассоциированный с беременностью протеин А (pregnancy-associated plasma protein A — PAPP-A), альфа-фетопротеин (АФП), общий хорионический гонадотропин человека (ХГЧ), неконъюгированный (несвязанный) эстриол (НЭ);

— инвазивные (биопсия хориона, амниоцентез, плацентоцентез, кордоцентез).

Методы пренатальной диагностики подразделяют также на просеивающие или скринирующие (УЗИ, сывороточные маркеры) и диагностические (УЗИ, инвазивные методы) [5].

### Неинвазивные методы

*Сывороточные маркеры матери.* В процессе беременности плацентой, тканями и органами плода синтезируется целый ряд белков и стероидов с различными функциями. Эти вещества проникают через плаценту в кровяное русло беременной и могут определяться в сыворотке крови женщины. Для каждого срока беременности характерна их определенная концентрация. При патологических состояниях (наследственные заболевания у плода, по-

роки развития, нарушения функции плаценты и др.) концентрация изменяется, что позволяет использовать эти вещества в качестве маркеров для скрининга наследственной патологии и патологического течения беременности.

К наиболее важным сывороточным маркерам относятся АФП,  $\beta$ -ХГ, ХГЧ, РАРР-А, НЭ.

Для диагностики используются иммуноферментные методы. Абсолютное значение этих сывороточных маркеров разное в разные сроки беременности и во многом зависит от используемых диагностических тест-систем. Однако для биохимического скрининга наследственной патологии это не имеет большого значения, поскольку отклонение уровня белка от нормы выражают обычно через кратность медиане. Эта единица называется МоМ (multiple of medians). Ее получают путем деления величины показателя  $\beta$ -ХГ, ХГЧ, АФП, РАРР-А, НЭ, зарегистрированного при исследовании, на медиану — среднюю величину нормального уровня белка при данном сроке беременности. Нормальные показатели этих сывороточных маркеров при сроках, информативных для пренатальной диагностики, находятся в пределах 0,5–2 МоМ. Эмпирически установлено, что при показателях сывороточных маркеров, выходящих за эти границы (в меньшую или большую сторону), беременные должны быть отнесены в группу риска по определенной патологии.

Для оценки полученных результатов используются специальные компьютерные программы, которые учитывают полученные результаты концентрации сывороточных маркеров в комбинации со всеми прочими факторами (возраст, масса тела матери, срок беременности, наличие диабета и др.). С учетом всех факторов рассчитывается для каждой беременной индивидуальный риск патологии плода.

Важно подчеркнуть, что ни один из перечисленных маркеров не позволяет однозначно диагностировать наследственную патологию или врожденный порок развития. Эти тесты не являются на 100 % спе-

цифичными. Сходные изменения показателей могут наблюдаться при многих патологических состояниях. Они позволяют только зачислить беременную в группу повышенного риска и рассчитать для нее значения риска. Для точной диагностики патологического состояния необходимо дополнительно использовать другие методы (УЗИ, инвазивные методы).

При оценке результатов биохимического скрининга следует иметь в виду, что они сигнализируют не только о возможном риске наследственной патологии, но и о состоянии самой беременности. Так, одновременное снижение или повышение уровней АФП и ХГЧ в 70 % случаев указывает на возможное патологическое течение беременности еще до видимых проявлений патологии (наличие генитальных инфекций, угроза прерывания, плацентарная недостаточность и т. д.). Поэтому одновременные изменения сывороточных маркеров при отсутствии каких-либо патологических признаков у плода при ультразвуковом сканировании требуют исключения патологического течения беременности [2].

*Альфа-фетопроtein (АФП)* — гликопротеид, состоящий из олигосахарида и одной полипептидной цепи. Начинает синтезироваться на 3–4-й неделе внутриутробного развития в желточном мешке. К концу I триместра беременности (12–13 нед) основным местом синтеза АФП становятся гепатоциты печени плода. Это один из основных белков плазмы крови плода. Транспортирует полиненасыщенные жирные кислоты, обладает иммуносупрессорным действием. Существует два пути проникновения АФП из крови плода в кровь матери: 1) часть АФП, синтезированного плодом, попадает в амниотическую жидкость, а оттуда через плаценту и трансцеллюлярно в кровотоки матери; 2) после завершения формирования маточно-плацентарного кровотока АФП в кровь матери поступает преимущественно из крови плода через плаценту. Достоверные изменения АФП в сыворотке крови беременной можно регистрировать с 14–

15-й недели беременности, то есть с момента завершения плацентации. В норме концентрация АФП повышается со сроком беременности. Максимальная концентрация наблюдается в сроке 30–35 нед.

В 1972 г. D. Brock, A. Boltan обнаружили высокое содержание АФП в амниотической жидкости и сыворотке крови беременной при наличии у плода дефекта нервной трубки (анэнцефалии, открытой спинномозговой грыжи и др.). Благодаря этому появилась возможность использовать АФП как маркер для скрининга дефектов нервной трубки у плода. Эффективность определения анэнцефалии в сроки до 24 нед беременности составляет в среднем 85,7 %, при открытой и закрытой *spina bifida* — 62,5 %, при энцефалоцеле (черепно-мозговой грыже) — 100 %. Считают, что при открытых пороках нервной трубки происходит просачивание белка из сосудистого русла плода в амниотическую жидкость через образовавшиеся дефекты, в результате чего уровень АФП в амниотической жидкости возрастает в несколько раз, а из амниотической жидкости попадает в кровь беременной. Однако повышение АФП наблюдается и при других патологических состояниях (табл. 6.5). Поэтому тест не является специфическим на 100 %. Он позволяет отнести беременную к группе риска по порокам нервной трубки и требует проведения дополнительных исследований. Как правило, осуществляют повторное определение АФП, ультразвуковое исследование плода, а в случае необходимости — амниоцентез с определением АФП в амниотической жидкости [37].

Снижение содержания АФП наблюдается при синдроме Дауна, поэтому этот тест может использоваться и для скрининга синдрома Дауна (одновременно с другими сывороточными маркерами — ХГЧ, НЭ и др.). Для уточнения диагноза необходимо проведение инвазивной диагностики и кариотипирование клеток плода (или использование молекулярно-цитогенетических методов) [37–39].

Для скрининга пороков нервной трубки и синдрома Дауна определяют АФП в

сыворотке крови беременной в сроке 15–20 нед. Проводится иммуноферментный анализ (ИФА).

У женщин вне беременности и у мужчин уровень АФП в крови существенно повышается при первичном раке печени, опухолях эмбрионального происхождения, у мужчин также при опухоли яичка.

*Хорионический гонадотропин человека (ХГЧ)* — гликопротеин, продуцируемый трофобластом плаценты. Состоит из двух полипептидных цепей — альфа( $\alpha$ )- и бета( $\beta$ )-субъединиц. Альфа-субъединица одинакова для ХГЧ и гипоталамических гормонов, а бета-субъединица ( $\beta$ -ХГ) специфична для каждого из них. Из плаценты ХГЧ поступает в кровь матери. Он поддерживает активность желтого тела и как основной гормон ранней беременности регулирует стероидогенез в надпочечниках плода, развитие яичников и выполняет другие функции. При физиологическом течении беременности концентрация ХГЧ повышается в первом триместре и достигает максимума на 9–12-й неделях, а затем постепенно уменьшается.

Белок определяется в сыворотке крови беременной с 10–12-го дня беременности. При нормальном течении беременности ХГЧ появляется в моче на 5–7-е сутки после зачатия. Исследование уровня ХГЧ служит точным показателем беременности уже при сроке 2–3 нед.

Для оценки состояния плода содержание этого белка в сыворотке крови беременной исследуют в I триместре беременности (в 10–14 недель определяется  $\beta$ -ХГ), во втором триместре беременности определяется общая фракция ХГЧ в сроки 15–20 нед (параллельно с АФП и другими маркерами). Повышение ХГЧ характерно для синдрома Дауна у плода, полиплоидии и для других патологических состояний (табл. 6.6) [40–42]. При синдроме Эдвардса концентрация ХГЧ снижается в 2 и более раза по сравнению с нормой.

Как и в случае АФП, изменение концентрации ХГЧ позволяет отобрать группу беременных для последующей инвазивной диагностики [40].

**Изменение содержания АФП в сыворотке крови беременной при различных патологических состояниях у плода [37]**

Концентрация АФП	Патологические состояния
Содержание АФП повышено	Пороки нервной трубки (анэнцефалия, открытая спинномозговая грыжа, черепно-мозговая грыжа) Дефекты передней брюшной стенки (гастрошизис, омфалоцеле) Атрезия пищевода и/или двенадцатиперстной кишки Пороки почек (врожденный нефроз финского типа, поликистоз почек, агенезия почек) Крестцово-копчиковая тератома Обширное поражение кожи (буллезный эпидермолиз) Синдром Шерешевского – Тернера Неблагоприятная акушерская ситуация (угроза прерывания беременности и спонтанного аборта, патология плаценты, гипотрофия плода, внутриутробная гибель плода) Многоплодная беременность
Содержание АФП понижено	Синдром Дауна Деления хромосомы 18 Синдром Клайнфельтера

*Неконъюгированный эстриол (НЭ)* — основной эстроген, продуцируемый плацентой. Предшественник стероида синтезируется в надпочечниках плода, затем преобразуется в печени и в плаценте, в результате появляется эстриол. При беременности концентрация гормона прогрессивно повышается в сыворотке крови беременной. Недостаток синтеза НЭ вызывает угрозу прерывания в 1-й половине беременности или угрозу преждевременных родов во второй. Поскольку НЭ синтезируется в плаценте, его уровень непосредственно характеризует функциональное состояние плаценты и плода. Повышение НЭ характерно для многоплодной беременности и крупного плода, а снижение — для синдрома Дауна, анэнцефалии, гипоплазии надпочечников плода, фетоплацентарной недостаточности. Определяется во втором триместре беременности (15–20 нед) параллельно с АФП и ХГЧ («тройной тест» или «биохимический скрининг на синдром Дауна»).

*Ассоциированный с беременностью протеин А (pregnancy-associated plasma protein A — PAPP-A)* синтезируется плацентой.

Концентрация белка увеличивается в течение всей беременности, к 10-й неделе беременности его содержание повышается в 100 раз. Входит в группу белков иммуносупрессоров (вместе с АФП). Предполага-

Таблица 6.6

**Изменение содержания ХГЧ в сыворотке крови беременной при различных патологических состояниях у плода [40]**

Концентрация ХГЧ	Патологические состояния
Содержание ХГЧ повышено	Синдром Дауна, полиплоидия у плода Многоплодие Резус-конфликт Пузырный занос
Содержание ХГЧ понижено	Синдром Эдвардса Внематочная беременность Угроза прерывания беременности Фетоплацентарная недостаточность

ют, что эти белки подавляют иммунную реактивность материнского организма к развивающемуся зародышу (плоду). Это надежный маркер беременности (определяется после экстракорпорального оплодотворения).

Используется PAPP-A для ранней пренатальной диагностики синдрома Дауна и других хромосомных синдромов в I триместре беременности (параллельно с определением  $\beta$ -ХГ и УЗИ). Исследования проводятся в сроке 10–14 нед. Существенное снижение концентрации белка PAPP-A характерно для синдрома Дауна, Эдвардса, Патау, трисомии по хромосоме 22. При синдроме Шерешевского — Тернера и других анеуплоидиях по половым хромосомам также наблюдается снижение уровня PAPP-A, но менее выраженное [43].

**Ультразвуковое сканирование.** Это один из главных, эффективных и общедоступных методов пренатальной диагностики. До настоящего времени не получено данных о вредном воздействии такого исследования на развитие плода. Однако целесообразно при проведении ультразвуковых исследований придерживаться принципа ALARA (As Low As Reasonably Achievable, что означает «Столь мало, сколь достижимо в пределах разумного»). Другими словами, специалист УЗИ должен стремиться к получению объективной информации о плоде минимальными средствами. Такой подход необходим потому, что хотя не отмечен тератогенный эффект ультразвука с точки зрения больших пороков развития, его действие с точки зрения «малого тератогенеза» (воздействие на функциональное состояние нервной и иммунной системы) в настоящее время недостаточно изучено [44].

С помощью УЗИ можно выявить как врожденные пороки развития, так и функциональное состояние плода и его провизорных органов (плаценты, пуповины, оболочек). Исследование можно проводить с 6–8 нед и до конца беременности. Этот метод может применяться как просеивающий, так и как уточняющий. Для массового скрининга наследственных заболеваний

и пороков развития предложены сроки беременности 10–14, 18–20 и 24–26 нед. При показаниях исследования могут проводиться в другие сроки.

В 10–14 нед устанавливают точный срок беременности, количество плодов. Проводится также скрининг синдрома Дауна и другой хромосомной патологии. Высокоспецифичным УЗИ-маркером хромосомной патологии плода в I триместре служит измерение ширины воротникового пространства плода, определяющееся как анэхогенная зона между кожей и мягкими тканями, окружающими позвоночник в области шеи. Увеличение ширины воротникового пространства плода более 2,5 мм — это симптом синдрома Дауна и других хромосомных трисомий, моносомии X и полиплоидии, а также служит показанием к инвазивной диагностике. Оно наблюдается только у 5 % плодов с нормальным кариотипом. Второй УЗИ-маркер I триместра беременности — косточка носа у плода, отсутствие которой также указывает на высокий риск хромосомной патологии.

Сочетанное использование УЗИ и сывороточных маркеров, компьютерная обработка полученных результатов с учетом возраста, массы тела беременной, срока гестации позволяют выявить в I триместре беременности до 87 % плодов с хромосомной патологией. В этом сроке могут быть диагностированы некоторые грубые пороки развития (например, анэнцефалия).

К 18–20 нед беременности уже сформированы все органы и могут быть выявлены многие пороки опорно-двигательного аппарата, сердца, отсутствие передней брюшной стенки, пороки головного мозга, *spina bifida* и др. Описаны разнообразные маркеры хромосомных синдромов. Так, при синдроме Дауна у плода часто обнаруживаются утолщенная шейная складка (более 5 мм), задержка развития плода, умеренный гидронефроз, укорочение бедренной кости, гиперэхогенный кишечник и пороки сердца. Другие симптомы хромосомной патологии — изменения провизорных органов (в частности, плаценты), количества амниотической жидкости, раз-

личные пороки развития и аномалии плода (табл. 6.7). В целом с помощью тщательно проведенного УЗИ в 20 нед могут быть выявлены до 20 % плодов с хромосомной патологией и до 40 % плодов с трисомией по 21-й хромосоме [45].

В 24–26 нед диагностируются практически все пороки развития, особое внимание обращают на гистологические структуры головного мозга, легких, почек. Неполный перечень врожденных пороков, диагностируемых с помощью УЗИ, представлен в табл. 6.8.

Ультразвуковое сканирование должно быть двухэтапным: 1) первый этап — УЗИ-скрининг в родовспомогательных учреждениях; 2) второй — уточняющая диагностика специалистом УЗИ высокой квалификации в рамках медико-генетического консультирования.

Эффективность ультразвукового исследования зависит от профессионального уровня врача ультразвуковой диагностики и разрешающей способности аппаратуры. В целом УЗИ позволяет диагностировать до 80–86 % всех пороков развития.

При обнаружении патологии у плода необходим обратный скрининг («плод-родители»), медико-генетическое консультирование семьи. У родителей могут быть обнаружены не диагностированные ранее пороки развития. Особенно это касается пороков мочевыделительной системы.

**Использование клеток плода, циркулирующих в крови матери, для пренатальной диагностики наследственных болезней.** Новый неинвазивный подход к пренатальной диагностике наследствен-

ных болезней — выделение и анализ клеток плода, присутствующих в крови матери. Во время беременности происходит трансплацентарный двухсторонний перенос не только растворенных в крови веществ, но и клеток. Первое упоминание об обнаружении клеток трофобласта в легочной ткани при патолого-анатомическом исследовании беременных женщин, умерших от эклампсии, относится к 1893 г. Впервые клетки с XY-кариотипом в культуре лимфоцитов крови женщин, беременных плодом мужского пола, были обнаружены J. Walknovska и соавт. (1969). Процесс двухстороннего трансплацентарного переноса плазмы и форменных элементов крови наблюдается с ранних сроков нормальной беременности, что способствует развитию толерантности материнского организма по отношению к плоду. Присутствие малого количества клеток плода в крови женщины во время беременности называется «микрочимизмом». Вероятно, лимфоцитарный микрочимизм сохраняется в организме рожавших женщин на протяжении всей жизни. Проникновение клеток плода значительно увеличивается при травме плаценты или патологическом течении беременности: угрозе ее прерывания, плацентарной геморрагии, эктопической и многоплодной беременности. Существенно увеличивается концентрация клеток плода в крови женщин, беременных плодом с трисомией 21 и другими хромосомными синдромами [46].

В крови беременных женщин присутствуют клетки трофобласта, лимфоциты,

Таблица 6.7

**Примеры симптомов хромосомной патологии при ультразвуковом исследовании [44]**

Пороки и аномалии развития	Хромосомные синдромы
Пороки сердца (особенно общий атриовентрикулярный канал)	Трисомия 13, 18, 21
Кистозная гигрома и водянка плода	Трисомии 13, 18, 21, синдром Шерешевского — Тернера
Атрезия двенадцатиперстной кишки	Трисомия 21
Пупочная грыжа	Трисомия 13, 18
Стопа-качалка	Трисомия 18

## Врожденные пороки, диагностируемые с помощью УЗИ [44]

Система или орган	Пороки
ЦНС	Анэнцефалия, голопрозэнцефалия, энцефалоцеле, <i>spina bifida</i> , аномалия Денди – Уокера (агенезия мозжечка, кистозное расширение IV желудочка и увеличение задней черепной ямки), микроцефалия, агенезия мозолистого тела и др.
Лицо	Расщелины губы и неба
Опорно-двигательная система	Редукционные пороки конечностей, ахондроплазия, танатоформная дисплазия, несовершенный остеогенез, косолапость, агенезия крестца и др.
Сердечно-сосудистая система	Разнообразные пороки сердца и сосудов (гипоплазия левых отделов сердца, атрезия митрального или трехстворчатого клапана, дефект межжелудочковой перегородки, общий артериальный ствол, аномалия Эбштейна, тетрада Фалло, транспозиция крупных сосудов, коарктация и стеноз аорты и др.)
Желудочно-кишечный тракт	Атрезии различных отделов пищеварительного тракта, дефекты передней брюшной стенки, омфалоцеле, диафрагмальная грыжа с эвентрацией органов брюшной полости и без нее, мекониальный перитонит
Легкие	Врожденный кистозно-аденоматозный порок легких
Мочеполовая система	Агенезия почек, поликистоз почек, удвоение почки, выраженный гидронефроз, опухоли почек, опухоли яичников
Другие	Водянка плода, амниотические перетяжки

гранулоциты, эритробласты и тромбоциты плода. Все ядродержащие клетки могут быть источником ДНК плода и потенциальными клетками-кандидатами для пренатального исследования с помощью FISH-метода или ПЦР [46].

В настоящее время наибольшие успехи в пренатальной диагностике получены при выделении эритробластов плода. Описаны успешные случаи пренатальной диагностики пола у плода, трисомий по 21 и 18 хромосоме,  $\beta$ -талассемии и других наследственных заболеваний.

Однако концентрация клеток плода в крови беременной чрезвычайно мала. Например, D. Bianchi и соавт. (1997), используя высокочувствительный метод количественной ПЦР, нашли, что количество амплифицированных Y-специфических последовательностей, выделенных из 16 мл материнской крови, эквивалентно в среднем 19 клеткам плода (или 1 клетка на 1 мл крови). Даже использование современных методов сортировки и concentra-

ции клеток не всегда позволяет выделить клетки плода в достаточном для пренатальной диагностики количестве. Кроме того, они всегда оказываются «загрязненными» клетками матери. Поэтому в настоящее время метод исследования клеток плода, выделенных из крови беременной женщины, не дает стабильных надежных результатов. Остается высоким процент диагностических ошибок. Метод следует рассматривать как перспективный, но требующий доработки и, возможно, усовершенствований с использованием новых технологий [47].

**Комплексная программа пренатальной диагностики врожденных пороков развития и хромосомных синдромов. Пренатальный скрининг.** Для скрининга наследственной патологии в период беременности используются неинвазивные методы. Наиболее эффективно сочетание сывороточных маркеров и УЗИ.

В настоящее время проводится массовый пренатальный скрининг:

- 1) синдрома Дауна и другой хромосомной патологии;
- 2) пороков нервной трубки;
- 3) других врожденных пороков развития.

Для массового скрининга предложена следующая схема обследования беременных (С. Б. Арбузова, 2002).

*Для женщин, которые стали на учет в первом триместре беременности*, проводится двухэтапная пренатальная диагностика.

Первый этап — в 10–14 нед — анализ маркеров PAPP-A и  $\beta$ -ХГ, УЗИ (определение толщины воротникового пространства и визуализация косточек носа). Проводится с целью скрининга плодов с синдромом Дауна и другими хромосомными синдромами. В этом сроке может быть выявлено до 87 % плодов с хромосомной патологией.

Для синдрома Дауна и другой хромосомной патологии характерно увеличение толщины воротникового пространства, отсутствие косточки носа, снижение концентрации белка PAPP-A и повышение  $\beta$ -ХГ. При синдроме Эдвардса наблюдается снижение как PAPP-A, так и  $\beta$ -ХГ. С помощью специальных компьютерных программ для каждой беременной рассчитывается индивидуальный генетический риск с учетом срока беременности, возраста, массы тела и др. Для корректного расчета индивидуального генетического риска с использованием компьютерных программ УЗИ и биохимическое обследование беременной должны проводиться одновременно. Получение положительных результатов позволяет отнести беременную в группу риска по хромосомной патологии, что требует уточнения диагноза (инвазивные методы с последующим кариотипированием клеток плода).

Второй этап — в 15–20 нед — анализ АФП (лучше 16-я неделя), УЗИ. Основная цель этого этапа — диагностика пороков нервной трубки и других пороков развития. Повышение концентрации АФП характерно для пороков нервной трубки, снижение — для хромосомной патологии. При УЗИ могут быть выявлены врожденные пороки развития и симптомы хромосомной патологии. Эффективность диаг-

ностики хромосомной патологии существенно ниже, чем в первом триместре. Полученные результаты также анализируются с помощью специальных компьютерных программ. Для уточнения диагноза порока нервной трубки проводится детальное УЗИ, в случае необходимости выполняют амниоцентез и определяют концентрацию АФП в амниотической жидкости. Для уточнения диагноза хромосомной патологии необходима инвазивная диагностика с последующим кариотипированием. Для уточнения диагноза врожденного порока проводится повторное детальное УЗИ плода.

*Для женщин, которые стали на учет во втором триместре* — одноэтапная диагностика — анализ АФП и ХГЧ в 15–20 нед беременности. В эти сроки проводится также УЗИ. Цель исследования — диагностика синдрома Дауна и другой хромосомной патологии, пороков нервной трубки и других пороков развития. Эффективность диагностики хромосомной патологии во втором триместре 60–70 %.

В некоторых странах в этом сроке определяется три сывороточных маркера — АФП, ХГЧ, НЭ (так называемый «тройной тест»). Результаты тройного теста при двух хромосомных синдромах представлены в табл. 6.9.

Недавно обнаруженный новый биохимический маркер — ингибин А, концентрация которого повышается в сыворотке крови беременной при синдроме Дауна. В совокупности с АФП, ХГЧ, НЭ он составляет наиболее информативный «квадратичный тест», который проводится в те же сроки, что и тройной тест. Эффективность выявления синдрома Дауна повышается до 75 % [48; 49].

Специфично для пороков нервной трубки повышение АФП. В этом сроке пороки нервной трубки могут быть диагностированы при УЗИ [42].

### **Инвазивные методы**

Инвазивная диагностика — это получение клеток и тканей эмбриона, плода и провизорных органов в период беременно-

Изменение сыровоточных маркеров (тройной тест) при синдромах Дауна и Эдвардса у плода [37]

Хромосомные синдромы	Альфа-фетопротеин	Несвязанный эстриол	Хорионический гонадотропин
Синдром Дауна	Снижен	Снижен	Повышен
Синдром Эдвардса	Снижен	Снижен	Снижен

сти для последующего исследования с помощью цитогенетических, молекулярно-цитогенетических, биохимических, цитохимических и других методов. Проводится при высоком риске рождения детей с моногенными и хромосомными болезнями с целью диагностики (уточнения диагноза) наследственного заболевания у плода.

Показания к проведению инвазивной пренатальной диагностики [5]:

1) возраст беременной 35 лет и старше, так как в этом возрасте высокий риск рождения ребенка с синдромом Дауна и другой хромосомной патологией; вначале проводится диагностика хромосомной патологии плода в первом триместре беременности с помощью неинвазивных методов (в 10–14 нед), а затем при высоком индивидуальном риске у беременной используются инвазивные методы для уточнения диагноза;

2) наличие хромосомной мутации у одного из родителей;

3) рождение предыдущего ребенка с хромосомной болезнью;

4) результаты биохимического и УЗИ-скрининга, предполагающие хромосомную болезнь у плода;

5) высокий риск рождения ребенка с моногенной болезнью по результатам медико-генетического консультирования или просеивающих программ выявления гетерозиготного носительства;

6) уточнение диагноза врожденных пороков развития (например, для уточнения диагноза порока нервной трубки проводится амниоцентез с последующим определением концентрации АФП в амниотической жидкости);

7) диагностика инфекции плода, иммунологической несовместимости матери и плода;

8) применение женщиной или ее супругом фармакологических препаратов цитостатического действия или облучение одного из супругов незадолго до наступления беременности. Повышен риск хромосомной патологии.

Противопоказания к проведению инвазивной пренатальной диагностики:

- 1) инфекции половых путей;
- 2) угроза прерывания беременности;
- 3) острые инфекционные заболевания;
- 4) миома матки больших размеров.

Так как сама процедура инвазивной пренатальной диагностики небезопасна и при положительном результате тестирования предполагает элиминацию плода, то ее необходимо проводить только после того, как супруги будут информированы об опасности осложнений, а также дадут согласие на досрочное прерывание беременности.

Основной метод целенаправленной инвазивной пренатальной диагностики в I триместре беременности — биопсия ворсин хориона (хориоцентез). Во втором триместре беременности проводится амниоцентез, плацентоцентез и кордоцентез.

**Биопсия хориона** — получение ткани хориона. Хорион — ворсинчатая оболочка — формируется в процессе беременности из трофобласта, поэтому клетки хориона имеют такой же генотип, что и клетки эмбриона. Рекомендуют проводить при сроке беременности 10–14 нед. Эта процедура может быть проведена и в более ранние сроки, но отмечено, что при ранней хорионбиопсии (до 9-й недели гестации) повышается частота редуцированных пороков конечностей. Ткань хориона получают через переднюю брюшную стенку (трансабдоминально) или трансцервикально под контролем УЗИ. При этом с помощью специ-

альной иглы аспирируют 15–20 мг материала. Ткань используют для цитогенетической диагностики или выделяют ДНК для молекулярно-генетического исследования. Осложнения (риск прерывания беременности) составляют 2,5–3 %.

**Плацентоцентез** — получение ткани плаценты, проводится с 14-й недели. Аспирируют 15–20 мг плаценты. Ткань используется в тех же целях, что и хорион.

**Амниоцентез** — получение околоплодной жидкости, в которой находятся слущенные клетки плода и амниона. Ранний амниоцентез проводится на 13–14-й неделе, поздний обычно на 16–20-й неделе (лучше на 16-й неделе). Под контролем УЗИ через переднюю брюшную стенку извлекают 10–20 мл амниотической жидкости. В ней можно определить количество АФП, а также активность некоторых ферментов. Клетки пригодны для цитогенетической или ДНК-диагностики. Осложнения возникают в 0,5–1 %.

**Кордоцентез** — взятие крови из пуповины под контролем УЗИ через переднюю брюшную стенку. Получают 1–1,5 мл крови. Проводится с 20-й недели беременности. Осложнения не превышают 2 %. Кровь исследуют с помощью цитогенетических, молекулярно-генетических и биохимических методов. Кордоцентез используется для диагностики гематологических наследственных болезней (гемоглобинопатии, коагулопатии, тромбоцитопении), иммунодефицитов, внутриутробных инфекциях, иммунологической несовместимости матери и плода, внутриутробной генотерапии.

**Фетоскопия** — осмотр плода с помощью эндоскопической техники. Проводится на 18–23-й неделе. Осложнения составляют 7–8 %. После внедрения УЗИ метод практически не используется, поскольку все пороки, которые можно увидеть с помощью эндоскопической техники, хорошо диагностируются при ультразвуковом сканировании.

**Биопсия тканей плода** — биопсия кожи плода или мышц под контролем УЗИ проводится во II триместре беременности для диагностики болезней кожи (ихтиоз,

эпидермолиз) и мышечной дистрофии Дюшенна. Полученный материал изучают с помощью цитологических, цитохимических, иммунофлюоресцентных методов.

**Проблемы, которые возникают при инвазивной пренатальной диагностике.** В ряде случаев при инвазивной пренатальной диагностике не удастся получить достаточное количество клеток для последующего исследования или невозможно получить культуру этих клеток. Вероятность таких осложнений, как правило, не превышает 1 %.

Могут возникнуть проблемы, связанные с интерпретацией результатов. При хорионцентезе и плацентоцентезе может быть диагностирован мозаицизм. Это может свидетельствовать о мозаичной форме хромосомной болезни у плода, но в ряде случаев мозаицизм обусловлен другими причинами. Он может быть следствием контаминации ткани клетками матери, мозаицизмом только в плодных оболочках (в зародышевых оболочках мозаицизм возникает чаще, чем в клетках эмбриона, и может не иметь никаких последствий для развивающегося организма). Консультация супружеской пары в этих ситуациях чрезвычайно сложная.

В ряде случаев невозможно однозначно оценить фенотипические последствия хромосомных или геномных мутаций. Это наблюдается в таких ситуациях:

1. Если у плода анеуплоидия по половым хромосомам, то это может не сопровождаться снижением интеллекта; при трисомиях X у женщин может быть практически нормальный фенотип (но могут быть и клинически выраженные формы болезни).

2. У плода может быть диагностирована хромосомная aberrация, которая относится к сбалансированным (транслокация, инверсия). Если такая же мутация есть у одного из родителей и он имеет нормальный фенотип, то можно с большой вероятностью говорить о нормальном фенотипе будущего ребенка. Если же это мутация *de novo*, то в ряде случаев из-за «эффекта положения» активность генов может быть

нарушена и у ребенка будет хромосомная болезнь. Таким образом, интерпретация результатов затруднена.

3. Обнаружение маркерных хромосом у плода также вызывает трудности с оценкой возможных последствий. Маркерная хромосома — это добавочная хромосома (вернее, фрагмент какой-либо хромосомы с центромерой). Если такая хромосома содержит только гетерохроматин, то фенотип не меняется. Если же она содержит эухроматин (экспрессирующиеся гены), то это сопряжено с развитием хромосомной болезни. Если маркерную хромосому имеет один из родителей с нормальным фенотипом, то можно предполагать нормальный фенотип у ребенка.

## 6.8. Методы диагностики наследственной патологии в системе современных репродуктивных технологий

**Доимплантационная (преимплантационная) диагностика.** В настоящее время в связи с развитием методов экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) широкое распространение получает доимплантационная диагностика наследственных заболеваний. Цель доимплантационной диагностики — не допустить переноса и имплантации эмбрионов с серьезными генетическими заболеваниями. Такая диагностика предлагается супружеским парам, имеющим высокий риск рождения детей с хромосомными болезнями (связанный с возрастом матери, с носительством сбалансированных хромосомных мутаций) или с моногенными болезнями [50].

Идея доимплантационной диагностики возникла давно. Еще в 1967 г. R. Edwards и R. Gardner успешно определили пол у эмбрионов кролика, находящихся на стадии бластоцисты, и затем перенесли их в полость матки. Однако у человека методика успешно используется с начала 90-х годов XX в., когда стало возможным с помощью ПЦР, а затем FISH-метода опреде-

лять мутации в единичных клетках [51].

Суть метода заключается в следующем. После стимуляции ХГЧ гиперовуляции у женщин получают несколько овоцитов, проводят оплодотворение *in vitro* (экстракорпоральное оплодотворение). На 3-й день у эмбрионов на стадии 5–8 клеток с помощью микроманипулятора отделяют бластомер и исследуют его с помощью FISH-метода или ПЦР. В последующем имплантируют генетически полноценные эмбрионы [50].

Известно, что большинство случаев анеуплоидий — это следствие нерасхождения хромосом во время мейоза при овогенезе. Поэтому для исследования может быть получено полярное тельце (первое и второе). Такая преимплантационная диагностика особенно показана женщинам старше 35 лет, треть овоцитов которых может иметь хромосомный дисбаланс.

Для диагностики хромосомных синдромов наиболее надежным методом исследования бластомеров или полярных телец служит FISH-метод, в котором используются ДНК-зонды для одновременного определения хромосом 13, 18, 21, X, Y. С помощью специальных зондов может быть проведена диагностика хромосомных аберраций (если один из родителей является носителем сбалансированной хромосомной аберрации). Однако анализ кариотипа одного бластомера (или полярного тельца) не исключает возможности мозаичной формы хромосомной болезни.

Если родители имеют риск рождения ребенка с моногенным заболеванием, то бластомер исследуют с помощью ПЦР. В настоящее время проводится доимплантационная диагностика муковисцидоза, болезни Тея — Сакса, гемофилии А и В, серповидно-клеточной анемии, талассемии, мышечной дистрофии Дюшенна, синдрома ломкой X-хромосомы, синдрома Марфана, хорей Гентингтона и других заболеваний [52].

Пока проводится анализ клетки, зародыш продолжает развиваться в искусственных условиях. Он может быть заморожен в жидком азоте. Половые клетки че-

ловека и ранние эмбрионы после размораживания хорошо сохраняют жизнеспособность. Подсадка после заморозки может быть осуществлена во время любого другого овариального цикла, не обязательно в тот месяц, когда взята яйцеклетка. Имплантируют только генетически полноценные эмбрионы [53].

**Генетические исследования доноров спермы, которая используется для искусственного осеменения.** В настоящее время считают целесообразным проведение тестирования доноров спермы на гетерозиготное носительство генов наиболее распространенных моногенных заболеваний. К числу таких заболеваний относятся муковисцидоз, фенилкетонурия, спинальная амиотрофия (болезнь Верднига — Гофмана), аденогенитальный синдром. Целесообразно также выявление мутации в гене *Sx26*, являющейся причиной более половины всех случаев наследственной несиндромальной глухоты.

## **6.9. Диагностика гетерозиготных носителей рецессивных генов наследственных заболеваний, генных болезней с поздней манифестацией, генов предрасположенности к мультифакториальным заболеваниям**

**Обнаружение гетерозиготных носителей рецессивных мутантных генов** может проводиться: 1) в популяциях, в которых с высокой частотой встречается определенное наследственное заболевание; 2) в семьях с высоким риском развития ряда тяжелых наследственных заболеваний; 3) у супругов при близкородственных браках [54].

Впервые популяционный скрининг гетерозиготных носителей был начат в неко-

торых популяциях евреев ашкенази, в которых с высокой частотой встречается болезнь Тея — Сакса, или GM2-ганглиозидоз (частота 1 : 3600 новорожденных). Скрининг на гетерозиготное носительство серповидно-клеточной анемии (HbS) проводят в афроамериканских популяциях в США и на Кубе (частота 1 : 600 новорожденных). Во многих странах средиземноморья и на Кубе проводится скрининг гетерозигот по  $\beta$ -талассемии (частота 1 на 36 000 новорожденных в Италии, Греции и на Кипре). В настоящее время для скрининга гетерозиготных носителей используют методы ДНК-диагностики [55].

Выявление гетерозигот проводят у школьников. Все обнаруженные носители составляют диспансерную группу региональной медико-генетической консультации. При заключении брака между гетерозиготными носителями семья может осуществить пренатальную диагностику при каждой беременности. Скрининг гетерозиготного носительства позволил снизить частоту  $\beta$ -талассемии на Кипре и на Кубе более чем на 90 %.

В настоящее время в Англии начался скрининг на выявление гетерозиготных носителей мутации  $\Delta F508$  в гене муковисцидоза. Эта мутация встречается не менее чем в 80 % случаев муковисцидоза в этой стране при частоте самого заболевания близкой к 1 на 2500 новорожденных.

В Украине популяционный скрининг гетерозиготного носительства пока не проводится. По-видимому, целесообразным было бы проведение скрининга гетерозиготного носительства мутаций в гене муковисцидоза, поскольку частота этого заболевания в некоторых областях составляет 1 на 1600 новорожденных. Частота гетерозиготных носителей может достигать 1:20.

Широко практикуется генетический анализ для выявления гетерозиготного носительства в семьях с высоким риском развития ряда тяжелых наследственных заболеваний (муковисцидоз, миодистрофия Дюшенна, фенилкетонурия, гемофилия и многие другие). Отбор людей, которым необходимо провести такое исследование,

проводится с помощью генеалогического метода. Особое значение имеет выявление женщин — гетерозиготных носительниц рецессивных сцепленных с X-хромосомой генов [51].

Для супружеских пар, которые обратились в медико-генетическую консультацию за прогнозом потомства в случае кровнородственного брака, целесообразно проводить тестирование гетерозиготного носительства частых мутаций в генах, вызывающих наиболее распространенные моногенные заболевания (муковисцидоз, фенилкетонурию, спинальную амиотрофию, аденогенитальный синдром и др.).

#### **Определение генов поздно проявляющихся наследственных заболеваний.**

Перспективное направление профилактической работы — выявление генов моногенных наследственных болезней с поздней манифестацией. К таким заболеваниям относятся: 1) нейродегенеративные болезни, обусловленные особым типом так называемых динамических мутаций (хорея Гентингтона, спиноцеребеллярная атаксия, болезнь Мачада — Жозефа, болезнь Кеннеди, миотоническая дистрофия); их патологические эффекты проявляются только у взрослых; 2) болезнь Альцгеймера; 3) рак молочной железы и семейный аденоматозно-полипозный рак толстой кишки.

Досимптоматическая диагностика таких заболеваний имеет большое значение, поскольку профилактическое лечение позволяет отсрочить срок манифестации, своевременно провести хирургическое лечение при опухолях. Диагностика основана на выявлении мутаций в генах, ответственных за заболевание. Она реальна в семьях, отягощенных определенной наследственной патологией.

**Определение генов предрасположенности к мультифакториальным заболеваниям.** В настоящее время выявлены гены предрасположенности ко многим мультифакториальным заболеваниям. Например, полиморфизм в экзоне гена рецептора витамина D<sub>3</sub> (*VDR3*), некоторые аллели коллагеновых генов *COL1A1* и *COL2A1*,

генов рецепторов к кальцитонину и другие предрасполагают к остеопорозу. При этом заболевании наблюдается снижение минеральной плотности костей, что ведет к резкому увеличению вероятности переломов, часто встречается у женщин в менопаузальном и постменопаузальном периоде.

Мутации в гене рецепторов липопротеинов низкой плотности (*LDLR*) ведут к раннему атеросклерозу и предрасполагают к ишемической болезни и инфаркту миокарда. Предрасположенность к инфаркту миокарда связана также с полиморфизмом в гене ангиотензинконвертирующего фермента (полиморфизм связан с делецией *Alu*-последовательности в интроне 16, встречается у 30 % населения).

К генам предрасположенности относится ген фермента метилентетрагидрофолатредуктазы, точковая мутация которого в положении 677 С-Т встречается в гомозиготном состоянии примерно у 5 % населения. Вследствие этого полиморфизма возникает гипергомоцистеинемия, которая в свою очередь имеет положительную корреляцию с ишемической болезнью сердца, атеросклерозом, с возникновением врожденных пороков нервной трубки (анэнцефалия, спинномозговая и черепно-мозговая грыжи). Назначение фолиевой кислоты у носителей мутантных генов предупреждает развитие патологических признаков [56].

Идентифицированы мутации гена *СС16*, предрасполагающие в гомозиготном состоянии (10 % населения) к астме. Мутации в гене фактора V свертывания крови резко увеличивают вероятность тромбозов. Аллельные полиморфизмы гена *TGF2* коррелируют с заячьей губой и волчьей пастью.

Тестирование генов предрасположенности позволяет выявлять людей с повышенным риском развития той или иной патологии. Само по себе наличие неблагоприятных аллелей еще не означает неотвратимости развития заболевания. При мультифакториальных заболеваниях большое значение в этиологии играют факторы окружающей среды. С помощью про-

филактических мероприятий можно существенно снизить риск развития патологии.

**Генетический паспорт.** В настоящее время существует реальная возможность получения генетического паспорта каждого человека. Генетический паспорт может включать следующие данные:

- 1) изучение кариотипа;
- 2) тестирование генома человека на мутантные аллели генов, ответственные за развитие опухолей;
- 3) скрининг генов предрасположенности к мультифакториальным заболеваниям;
- 4) досимптоматическая диагностика генных болезней с поздней манифестацией;
- 5) скрининг гетерозиготного носительства генов наиболее распространенных рецессивных заболеваний;
- 6) геномная дактилоскопия (имеет значение не только в судебной медицине для идентификации личности, определения отцовства, установления кровного родства, но и помогает решить проблему генетической совместимости органов и тканей при их трансплантации).

Получение такого паспорта сегодня сопряжено со значительными материальными затратами. Однако быстро совершенствующаяся автоматизированная техника детекции мутаций и ДНК-полиморфизмов с помощью ДНК-микрочипов позволяет надеяться на значительное удешевление метода уже в ближайшем будущем.

Наличие такого генетического паспорта при грамотном медико-генетическом консультировании может играть важную положительную роль на всех этапах жизни человека. Своевременная коррекция питания, правильная профориентация, целенаправленная пренатальная диагностика способствовали бы профилактике многих заболеваний, предупреждению рождения детей с наследственной патологией, позволили бы избежать многих медицинских и личных катастроф.

Однако наличие генетического паспорта не только открывает новые горизонты перед здравоохранением, но и порождает массу серьезных социальных и этических проблем.

Какие институты здравоохранения и каким образом смогут обеспечить эффективное использование генетического паспорта? Кто реально будет иметь доступ к индивидуальной базе данных? Как будет обеспечена ее строгая конфиденциальность? Не могут ли результаты тестирования использоваться для дискриминации носителей патологических генов (при приеме на работу, страховании жизни, здоровья и в других ситуациях)? Когда нужно проводить тестирование?

Многие люди не хотят знать о наличии у них генов тяжелых неизлечимых заболеваний с поздней манифестацией (хорея Гентингтона, болезнь Альцгеймера). Эксперты ВОЗ рекомендуют воздерживаться от любого тестирования детей до их совершеннолетия, то есть до тех пор, пока они сами не смогут принять обдуманного решения в отношении такой процедуры. Пресимптоматическое тестирование можно проводить только по желанию, только в случае возможной реальной пользы для пациента или его родственников, при условии максимально объективного информирования пациента о результатах тестирования.

В какой мере результаты тестирования могут приниматься во внимание при вступлении в брак? Должен ли носитель неблагоприятных аллелей сообщать о них членам своей семьи, своему семейному врачу? Эти и многие другие вопросы, связанные с генетическим паспортом и генетическим тестированием вообще, все чаще становятся предметом широкой дискуссии.

Тем не менее, учитывая, что наши знания о геноме человека непрерывно углубляются и постепенно проникают во все области жизни, прежде всего в медицину, есть все основания думать, что все эти вопросы со временем будут непременно решены. Подготовка высококвалифицированных специалистов по медицинской генетике, свободно ориентирующихся в геноме человека, рост генетической грамотности населения, разработка хорошо продуманных юридических правил и норм ге-

нетического тестирования — неперенные условия для достижения такой цели.

### 6.10. Общие принципы ведения наследственных заболеваний и врождённых пороков развития

Прогресс в развитии теоретической и клинической медицины, достижения генетики привели к значительным успехам в лечении многих врожденных и наследственных заболеваний, увеличению продолжительности и улучшению качества жизни больных. Существуют следующие подходы к лечению врожденных и наследственных заболеваний [4]:

- симптоматическое лечение;
- патогенетическое лечение;
- этиологическое лечение;
- реабилитация больных.

**Симптоматическое лечение** применяется при всех видах наследственных и врожденных заболеваний. Для многих форм патологии симптоматическое лечение является единственным. Такая терапия не требует знания первичного генетического дефекта или другой причины возникновения заболевания. Для симптоматического лечения используют лекарственную терапию, хирургические методы лечения, физиотерапию.

В основе рациональной симптоматической фармакотерапии врожденных и наследственных заболеваний лежит понимание патогенетических механизмов, приводящих к развитию тех или иных симптомов заболевания. В качестве примера можно привести симптоматическое лечение поражения бронхолегочной системы при муковисцидозе. У больных муковисцидозом аномальный генный продукт (нефункционирующий хлорный канал) не позволяет выйти из клеток эпителия бронхиального дерева ионам хлора, что вызывает дегидратацию бронхиального секрета. Как следствие, изменяются реологические

свойства дегидратированного секрета, что приводит к нарушению мукоцилиарного клиренса и развитию хронической эндо-бронхиальной инфекции. Назначение муколитиков в сочетании с дыхательной гимнастикой и специальным массажем, а также рациональная антибактериальная терапия позволяют в значительной степени замедлить прогрессирование бронхолегочного процесса с формированием пневмосклероза, пневмофиброза и легочного сердца.

Хирургическое симптоматическое лечение занимает существенное место в лечении врожденной и наследственной патологии, особенно выражающейся в виде врожденных пороков развития или системных поражений скелета. Вышеуказанное лечение врожденных и наследственных заболеваний включает удаление органов или патологических образований, коррекцию врожденных пороков развития, трансплантацию органов и тканей. Так, для лечения анемии Минковского — Шофара удаляют селезенку. При этом прекращается разрушение эритроцитов, уменьшаются симптомы гемолитической анемии. Примером использования трансплантации при лечении наследственных заболеваний служит трансплантация костного мозга, используемая для лечения тяжелых комбинированных иммунодефицитов. Трансплантацию печени проводят при болезни Вильсона — Коновалова. При муковисцидозе успешно выполняются операции по трансплантации комплекса сердце — легкие. Перспективный метод лечения — введение стволовых клеток. По сути, трансплантация — это вариант генотерапии, так как вместе с трансплантатом вводится нормальный донорский геном.

В некоторых случаях хирургическая помощь выходит за рамки симптоматического лечения, приближаясь по своему характеру к патогенетическому. В последние годы благодаря внедрению современной ультразвуковой аппаратуры, методов оценки состояния плода и проведению инвазивных и неинвазивных диагностических процедур значительно изменились понимание и тактика ведения многих прена-

тально диагностируемых пороков развития. При наличии большинства пренатально диагностируемых пороков развития более рационально проведение оперативного лечения после рождения плода. Однако существует группа аномалий плода, плаценты и пуповины, которая приводит к значительным необратимым нарушениям развития, затрудняющим их хирургическое лечение после рождения ребенка. В таких случаях требуется проведение вмешательства уже во внутриутробном периоде. Так, проведенное внутриутробное хирургическое вмешательство при диафрагмальной грыже позволяет избежать развития гипоплазии легких. При ликвидации во внутриутробном периоде обструкции мочевыводящих путей удается предупредить развитие почечной недостаточности и гипоплазии легких. К другим показаниям для проведения хирургического вмешательства пренатально относятся крестцово-копчиковая тератома, объемные образования грудной клетки, дефекты невралной трубки.

Одним из важных вопросов, которые необходимо решить перед хирургическим вмешательством, выполняемым пренатально, остается выбор оптимального времени вмешательства. Решение этого вопроса зависит от многих факторов: специфики и патофизиологии аномалии, гестационного возраста, состояния здоровья матери, гестационного возраста и осложнений беременности. Определяющими являются размеры плода. Считается нецелесообразным проведение хирургического лечения до 18 нед беременности. С другой стороны, чем больше срок беременности, тем менее вероятно полная хирургическая коррекция порока развития и его возможных последствий. Кроме того, доказано, что с увеличением срока беременности повышается сократительная активность матки и возрастает вероятность преждевременных родов. Поэтому проведение операций открытым способом ограничено сроками 18 и 30 нед беременности.

Существуют два типа операций: открытым способом со вскрытием полости мат-

ки и эндоскопическим путем. Таким образом, спектр оперативных вмешательств, которые проводятся пренатально, достаточно широк и колеблется от операций открытым методом до малых инвазивных вмешательств, проводимых в ходе фетоскопии. Однако наиболее важным в будущем станет не только расширение списка патологии плода, при которой возможно проведение антенатальной хирургической коррекции, но и решение юридических и этических вопросов, связанных с оперативным лечением. При этом доминирующими будут вопросы обеспечения безопасности матери и соблюдение интересов семьи.

Многие виды физических методов лечения (теплотерапия, разные виды электротерапии и др.) применяются при наследственных заболеваниях нервной системы, наследственных болезнях обмена веществ, заболеваниях скелета. Так, при мукополисахаридозе вследствие накопления в клетках гликозаминогликанов развивается тугоподвижность суставов, сгибательные контрактуры. Грязелечение, бальнеотерапия, разные виды электротерапии, теплотерапия значительно улучшают общее состояние таких больных и объем движений в суставах. К симптоматическому лечению можно отнести и рентгенорадиологическое облучение при наследственно обусловленных опухолях до и после хирургического вмешательства.

**Патогенетическое лечение** используется при многих нарушениях обмена веществ — ферментопатиях, эндокринопатиях. Однако следует понимать, что ни один из существующих ныне методов патогенетического лечения не устраняет причину заболевания, так как не восстанавливает структуру поврежденных генов. Действие каждого из них продолжается сравнительно короткое время, поэтому лечение, как правило, становится непрерывным и пожизненным.

В настоящее время существуют следующие основные патогенетические направления терапии наследственных болезней.

1. Полное или частичное устранение из пищевого рациона субстрата или предше-

ственника субстрата блокированной метаболической реакции. Этот прием используется в случаях, когда избыточное накопление субстрата оказывает токсичное действие на организм. Иногда (особенно когда субстрат не жизненно необходим или может синтезироваться в достаточном количестве организмом) такая диетотерапия оказывает очень хороший эффект. Типичный пример — пожизненная аглютенновая диета при целиакии, которая предусматривает полное исключение продуктов, содержащих белок глиадин. Например, при фенилкетонурии диета с резким ограничением фенилаланина позволяет уменьшить содержание этой аминокислоты и ее метаболитов в крови. Больной ребенок развивается нормально. При галактоземии диета без лактозы на основе специальных смесей предупреждает накопление галактозо-1-фосфата и развитие заболевания.

2. Стимуляция образования недостающего фермента. Введение больших доз кофермента (как правило, витаминов) позволяет преодолеть метаболический блок, если дефицит фермента связан с нарушением образования комплекса апофермент-кофермент или снижением синтеза кофермента. Так, большие дозы витамина B6 и B12 эффективны при лечении гомоцистинурии, витамин B1 используют при лечении лейциноза и др.

3. Нейтрализация и устранение экскреции токсических продуктов, накапливающихся в случае блокирования их дальнейшего метаболизма. К числу таких продуктов относится, например, медь при болезни Вильсона — Коновалова. Для нейтрализации меди больному вводят D-пеницилламин и унитиол.

4. Регуляция уровня субстрата или его предшественника, которая заключается в применении лекарственных средств, направляющих обмен неметаболизируемых субстратов или их предшественников по обходному пути, что уменьшает нагрузку на дефектную ферментную систему. Например, для лечения гипераммониемии используют бензойную кислоту и фенилацетат натрия. Таким же образом

лечат нарушения метаболизма органических кислот — метилмалоновую ацидемию и гомоцистинурию. В первом случае применяют левокарнитин, во втором — *бетаин*.

5. Искусственное введение в организм больного продукта блокированной у него реакции. Например, прием цитидиловой кислоты при оротоацидурии (заболевание, при котором страдает синтез пиримидинов) устраняет явления мегалобластической анемии. Эта же методика восполнения продукта используется для лечения гликогенозов (введение глюкозы), недостаточности пируватдегидрогеназы (диета с высоким содержанием липидов).

6. Воздействие на «испорченные» молекулы. Этот метод применяется для лечения серповидно-клеточной анемии и направлен на уменьшение вероятности образования кристаллов гемоглобина. Ацетилсалициловая кислота усиливает ацетилирование гемоглобина и таким путем снижает его гидрофобность, обуславливающую агрегацию этого белка.

7. Замещение недостающих веществ. Заместительная терапия широко используется при наследственных эндокринопатиях (гипофизарный нанизм, гипотиреоз, адреногенитальный синдром, муковисцидоз). Лечение болезни Гоше (один из типов сфинголипидоза) проводится с помощью введения недостающего фермента глюкоцереброзидазы (препарат цередаза). Коррекцию панкреатической недостаточности при муковисцидозе проводят с помощью высокоактивных ферментных препаратов.

Однако использование заместительной ферментотерапии, однако, несмотря на всю ее привлекательность, наталкивается на ряд трудностей:

— далеко не во всех случаях существует способ доставить фермент в нужные клетки и одновременно защитить его от разрушения;

— если синтез собственного фермента полностью подавлен, экзогенный фермент при длительном введении инактивируется иммунной системой больного;

— получение и очистка достаточного количества ферментов — зачастую очень сложная задача.

8. Блокирование патологической активности ферментов с помощью специфических ингибиторов или конкурентное торможение аналогами субстратов данного фермента. Этот метод лечения применяется при избыточной активации систем свертывания крови, фибринолиза, а также при освобождении из разрушенных клеток лизосомальных ферментов.

Сопоставление молекулярных механизмов, поражаемых при наследственных заболеваниях, с используемыми для их лечения терапевтическими методами показывает, что еще далеко не все основные симптомы генетически обусловленных болезней человека в настоящее время могут быть устранены. Можно надеяться, что дальнейшее изучение молекулярных процессов, лежащих в основе наследственных заболеваний, в будущем приведет к значительному расширению арсенала методов лечения.

Несмотря на успехи симптоматического и патогенетического лечения врожденных и наследственных заболеваний, вопрос о возможности их этиологического лечения остается очень актуальным.

**Этиологическое лечение** основано на коррекции первичного генетического дефекта путем изменения генотипа (генная терапия). Генную терапию определяют как лечение наследственных, мультифакториальных и ненаследственных, в том числе и инфекционных, заболеваний путем введения генов в клетки пациентов с целью направленного изменения генных дефектов или придания клеткам новых функций. Генная терапия — частный раздел более широкой области биотехнологии — генетической инженерии.

**Генетическая инженерия** — это раздел молекулярной генетики, связанный с целенаправленным созданием новых комбинаций генетического материала. В ее основе лежит обусловленная последними достижениями молекулярной биологии и генетики возможность целенаправленного ма-

нипулирования с фрагментами нуклеиновых кислот. В результате генной инженерии создаются искусственные генетические конструкции, в которых отдельные части генов или гены целиком объединяются в требуемой последовательности, что позволяет определять их взаимное влияние и функциональное значение и проводить экспрессию генов в новом генетическом окружении.

Известна обширная группа генетических явлений, связанная с передачей генов в пределах одного поколения организмов, а также между клетками одного и того же многоклеточного организма.

Примерами такого рода служат специфическая и неспецифическая *трансдукция*, осуществляемые бактериофагами, в результате чего происходит перенос небольших частей генома микроорганизмов. Большое значение в эволюции бактерий имеет обмен генами с помощью конъюгационных плазмид и транспозонов, в частности, распространение генов устойчивости к различным химическим веществам как в популяциях родственных бактерий, так и между представителями таксономически удаленных друг от друга групп. Ретровирусы, по-видимому, и в природных условиях способны осуществлять горизонтальный перенос генов у млекопитающих, а с помощью Ti-плазмид происходит горизонтальный обмен генами у растений. Перемещение генетической информации и изменение характера ее экспрессии возможны в пределах самих одноклеточных и многоклеточных организмов под действием разнообразных мобильных генетических элементов, а также при воздействии мутагенных факторов окружающей среды.

Использование в лабораторных условиях генетических принципов, лежащих в основе природных перемещений генов, позволило разработать системы передачи генетической информации между организмами и приступить к исследованиям генетических явлений на молекулярном уровне.

На основе генетической инженерии возникла отрасль фармацевтической про-

мышленности, названная «индустрией ДНК». Это одна из современных ветвей биотехнологии. Благодаря генетической инженерии стало возможным производить биотехнологическим методом в промышленных масштабах такие вещества, как инсулин, интерферон, гормон роста человека или некоторые антитела. Генноинженерные методы наиболее перспективны в сельском хозяйстве, особенно в растениеводстве. Первые трансгенные культуры, используемые для производства продуктов питания, появились на американском рынке в начале 90-х гг. XX в. и быстро завоевали популярность у сельхозпроизводителей. По данным на конец 2004 г., генетически модифицированные сорта овощей и культурных растений во всем мире занимают посевные площади около 58 млн га. В США и Канаде выращивается 64 вида трансгенных культур. Сюда входят соя, кукуруза, картофель, помидоры, лен, зерновые растения, кормовые культуры и др.

Применение методов генной инженерии позволяет увеличить продуктивность сельскохозяйственных животных. В этой области намечаются два пути: использование генно-модифицированных кормов и непосредственное вмешательство в генотип животных. Например, в Гонконге с применением методов генной инженерии выведена новая порода кур, отличающихся очень крупными размерами и быстрым ростом. Транспортированный фрагмент ДНК был взят у китайских кур редкой разновидности. Для облегчения борьбы с сельскохозяйственными вредителями также пользуются трансгенозом [56].

Под генной терапией подразумевают медицинский подход, основанный на введении в клетки и организм генных конструкций с лечебной целью. Позитивная генная терапия направлена на введение недостающего нормального гена, негативная — на подавление функции гиперэкспрессированного гена. Современные исследования в области генной терапии могут быть разделены на ряд относительно независимых этапов: разработка генных конструкций, проведение предклинических испытаний

на животных и, наконец, осуществление прямых попыток лечения отдельных заболеваний. Главными предпосылками перехода от теоретических построений и опытов на животных к клиническим испытаниям методов генной терапии послужили достижения молекулярной биологии и генетики в изучении тонкой структуры генов эукариот, их картировании на хромосомах человека, впечатляющие успехи проекта «Геном человека» в идентификации и клонировании генов, мутации которых приводят к многочисленным наследственным болезням, и, наконец, бурный рост в области биотехнологии и генной инженерии.

Существуют три основных подхода к генной терапии, различающиеся природой клеток-мишеней. Фетальная генная терапия предусматривает введение чужеродной ДНК в зиготу или эмбрион на ранней стадии развития. При этом ожидается, что введенный материал попадет во все клетки реципиента (и даже в половые клетки, обеспечив тем самым передачу введенной генетической информации следующему поколению). Соматическая генная терапия заключается во введении генетического материала только в соматические клетки, чем обеспечивается терапевтический эффект, однако отсутствует возможность передачи полученного признака по наследству. Третий подход основан на активации собственных генов организма с целью полного или частичного преодоления действия мутантного гена. Яркий пример такого подхода — использование гидроксимочевины для активации синтеза гемоглобина F у больных с серповидно-клеточной анемией и талассемией.

Большинство методов фетальной генной терапии разработаны в экспериментах на трансгенных мышах. Чужеродную ДНК вводят в оплодотворенные яйцеклетки, полученные от мышей, у которых была искусственно стимулирована овуляция. С помощью этого метода удалось заметно улучшить состояние мышей с наследственным дефицитом соматотропного гормона (СТГ), а также рядом других наследственных заболеваний. В подобных эксперимен-

тах получена важная информация о регуляции экспрессии генов и патогенезе наследственных болезней. Однако трансгенные животные получают только из 15–20 % яйцеклеток с инъекированной ДНК, причем лишь у 20–30 % животных введенный ген экспрессируется. Более того, из-за случайного встраивания чужеродной ДНК в геном есть опасность повреждения гена хозяина (инсерционный мутагенез), приводящего к дефициту белка или нарушению регуляции, что может стать причиной развития злокачественных новообразований. Таким образом, фетальная генная терапия пока не применима для лечения наследственных болезней человека. Однако методы, разработанные в экспериментах с эмбриональными клетками, можно использовать для пренатальной диагностики [57].

Первые клинические испытания методов генной терапии были предприняты 22 мая 1989 г. с целью генетического маркирования опухоль-инфильтрующих лимфоцитов в случае прогрессирующей меланомы. Первая успешная попытка генотерапии *ex vivo* была проведена в США 14 сентября 1990 г. у двух девочек с редкой наследственной болезнью — тяжелым комбинированным первичным иммунодефицитом, обусловленным мутацией в гене аденозиндезаминазы (АДА). Лимфоциты больных были отделены от остальных элементов крови, Т-лимфоциты стимулировали к росту. Затем в условиях *in vitro* в них ввели ген АДА с помощью ретровирусного вектора. Модифицированные таким образом «генноинженерные» лимфоциты культивировали и в течение двух лет с определенной периодичностью вводили больным. У обеих пациенток отмечалась экспрессия гена АДА и клиническое улучшение. Лечебный эффект наблюдался в течение нескольких месяцев, после чего процедура была повторена с интервалом 3–5 мес. Первым моногенным наследственным заболеванием, в отношении которого были применены методы генной терапии, оказался наследственный иммунодефицит, обусловленный мутацией в гене АДА. За три года терапии в общей

сложности проведены 23 внутривенные трансфузии АДА-трансформированных Т-лимфоцитов без видимых побочных эффектов и осложнений. В результате лечения состояние пациенток стабилизировалось, не требовалось проведения профилактики оппортунистических инфекций антибактериальными препаратами, они смогли вести нормальный образ жизни. В настоящее время клинические испытания генной терапии этого заболевания проводятся в Италии, Франции, Великобритании и Японии. Всего к концу прошлого столетия число допущенных к клиническим испытаниям протоколов генной терапии составляло более 300. Более 2000 пациентов приняли участие в их реализации. Большинство современных исследовательских проектов в области генной терапии касаются лечения онкологических заболеваний и ВИЧ-инфекции / СПИДа. В США, Японии, странах Западной Европы медицинские протоколы с использованием смысловых последовательностей ДНК подвергаются обязательной экспертизе в соответствующих комитетах и комиссиях. В США таковыми являются Консультативный комитет по рекомбинантным ДНК (Recombinant DNA Advisory Committee, RAC) и Управление по лекарствам и пищевым продуктам (Food and Drug Administration, FDA) с последующим обязательным утверждением проекта директором Национальных институтов здоровья (National Institutes of Health). В Европе такие протоколы составляют и утверждают в соответствии с рекомендациями Европейской рабочей группы по переносу генов и генной терапии (European Working Group on Human Gene Transfer and Therapy).

Программы генной терапии для клинических испытаний включают:

- обоснование выбора заболевания для проведения такой терапии;
- определение типа клеток, подлежащих генетической модификации;
- схему конструирования экзогенной ДНК;
- обоснование биологической безопасности вводимой генной конструкции,

включая опыты на культурах клеток и на модельных (трансгенных) животных;

— разработку переноса генной конструкции в клетки-мишени в организме пациента;

— методы мониторинга и анализа работы введенных генов, оценки клинического и возможных побочных эффектов.

В зависимости от способа введения экзогенной ДНК в геном пациента генная терапия может проводиться либо в культуре клеток (*ex vivo*), либо непосредственно в организме (*in vivo*) [58]. Клеточная генная терапия или терапия *ex vivo* предполагает выделение и культивирование специфических типов клеток пациента. Затем производят введение в них чужеродных генов и реинфузию их пациенту.

Генная терапия *in vivo* основана на прямом введении клонированных и определённым образом упакованных последовательностей ДНК в специфические ткани больного.

Для достижения успеха в проведении генной терапии следует решить проблему эффективной доставки генетического материала в клетки-мишени с обеспечением длительного функционирования его в этих клетках и созданием условий для полноценной работы гена (его экспрессии). Трансфекция (доставка генетической информации) может проводиться с использованием нативной ДНК или легирированной (встроенной) в соответствующую плазмиду. Для трансфекции может быть также использована комплексирующая ДНК — плазмидная ДНК, соединенная с солями, белками (трансферрин), органическими полимерами (DEAE-декстран, полилизин), липосомами или частицами золота, или ДНК в составе вирусных частиц, предварительно лишенных способности к репликации. Генетическая конструкция, используемая в генной терапии для трансфекции, должна обладать следующими свойствами:

— высокой степенью безопасности и надёжности в сочетании с достаточной дешёвизной и возможностью широкого применения;

— способностью сохранять активность при движении в русле крови в течение длительного и контролируемого времени (при этом не распознаваться иммунной системой и не вызывать патологических процессов в организме);

— высокой избирательностью взаимодействия только с клетками-мишенями;

— достаточным объёмом генетической информации и высокой эффективностью, при которой достигается экспрессия каждой доставляемой молекулы ДНК;

— возможностью контролировать как интенсивность, так и время экспрессии на основе данных клинического наблюдения.

Основные методы доставки чужеродных генов в клетки разделяются на химические, физические и биологические. К физическим методам относятся микроинъекции, электропорация, замораживание — оттаивание, биобаллистика (бомбардирование клеток каплями жидкости или суспензией частичек золота с адсорбированной плазмидой). Химическими агентами, используемыми для трансфекции, служат соли некоторых катионов, например кальция, декстран, полилизин, липосомы. Более половины уже одобренных протоколов клинических испытаний по генной терапии предполагают использовать биологические методы доставки генетической информации (вирусную трансдукцию), и около 100 из них основаны на применении ретровирусных векторов. Если проблема доставки чужеродной ДНК *in vitro* практически решена, а её доставка в клетки-мишени разных тканей *in vivo* успешно решается, то другие характеристики существующих векторных систем — стабильность интеграции, регулируемая экспрессия, безопасность — всё ещё нуждаются в серьёзных доработках. В последнее время особое внимание уделяется созданию векторов на базе искусственных хромосом млекопитающих. Благодаря наличию основных структурных элементов такие мини-хромосомы длительно удерживаются в клетках и способны нести полноразмерные (геномные) гены и их естественные регуляторные элементы, которые необходимы

для правильной работы гена, в нужной ткани и в должное время.

Большинство вирусных векторов, используемых для генной терапии, получены от диких штаммов, обладающих различной степенью патогенности, но утративших патогенные свойства благодаря удалению генов, ответственных за размножение и (или) сборку вирусных частиц. В клинической практике обычно используются ретровирусы и аденовирусы. Ретровирусы — это РНК-содержащие вирусы, репликация которых осуществляется через образование провирусной ДНК и внедрение непосредственно в геном клетки-хозяина. Большинство ретровирусов эффективны в качестве векторов генетической информации только для генной терапии, направленной на активно делящиеся клетки. Эти вирусы не могут применяться, если в качестве клеток-мишеней выступают клетки мышечной нервной ткани, печени и легких. Исключение составляют вирусные векторы семейства лентивирусов. Аденовирусы — ДНК-содержащие вирусы. К положительным качествам вирусных векторов с использованием аденовирусов относится возможность доставки существенно большего объема генетической информации, чем при использовании ретровирусов. Их также отличает высокая эффективность в отношении клеток дыхательных путей. Однако ДНК аденовирусных векторов не внедряется в геном клетки-хозяина, что приводит к ее элиминации при делении и гибели клеток. Основные недостатки биологического метода доставки генетической информации с использованием вирусных векторов следующие [59]:

- инициация иммунного ответа в связи с введением чужеродного белка;
- реактогенность, обусловленная свойствами вирусов, используемых в качестве векторов;
- отсутствие тканевой специфичности;
- риск онкогенных мутаций и трансформации вирусных векторов в патогенные вирусы;
- технические трудности и дороговизна массового производства.

Преимущества использования липидных комплексов в качестве векторов генетической информации следующие [57]:

- они могут использоваться для переноса большого объема генетической информации;
- не могут приобретать инфекционных свойств в связи с мутациями или рекомбинацией;
- менее вероятно могут вызывать инициацию иммунопатологических реакций в организме, чем вирусные векторные системы;
- отличаются технической простотой и дешевизной производства.

Особенно перспективно использование в качестве векторов фосфолипидов, например кардиолипина и фосфатидилэтаноламина. В присутствии катионов кальция или магния взаимодействие ДНК с фосфолипидами становится более прочным. Использование высокомолекулярных катионных посредников, обеспечивающих формирование комплексов ДНК с фосфолипидами и взаимодействие этих комплексов с поверхностью клеток, потенциально могло бы повысить эффективность данного метода трансфекции.

Новым этапом использования липидов в качестве векторов генетической информации в генной терапии стало введение в практику использования катионного липида ДОТМА (1,2-диолеил-3-N,N,N-триметиламинопропан). Одновременно был введен в практику новый термин «липофекция».

Однако следует отметить, что все уже известные и испытанные *in vivo* и *in vitro* векторные системы имеют существенные недостатки, которые ограничивают их широкое клиническое применение. Существующие векторные системы позволяют эффективно решить проблему доставки чужеродной ДНК *in vitro*. Доставку генетической информации в клетки-мишени различных тканей *in vivo* осуществляют путем создания конструкций, несущих рецепторные белки, в том числе и антигены, специфичные для тех или иных тканей. Однако другие характеристики существующих векторных систем — стабильность

интеграции, регулируемая экспрессия, безопасность — все еще нуждаются в серьезных доработках. Повысить стабильность интеграции можно путем совершенствования генных конструкций типа рецепторопосредованных систем либо путем создания достаточно стабильных ДНК-структур, способных к длительной персистенции внутри ядер.

Развитие генной терапии моногенных заболеваний тесно связано с расшифровкой строения генов, с осуществлением программы «Геном человека». В настоящее время разрабатываются и осуществляются программы генной терапии многих моногенных заболеваний (табл. 6.10).

К сожалению, даже успешное лечение моногенных заболеваний не решает всех проблем. Это связано с сохранением патологического генотипа. Так, при клинически компенсированной галактоземии у взрослых женщин часто наблюдается дисфункция яичников. Больные, успешно вылеченные от ретинобластомы, с высокой степенью вероятности заболевают остеосаркомой. У больных с митохондриальным синдромом Пирсона (панцитопения) можно компенсировать дефект кроветворения с помощью повторных гемотрансфузий. В течение жизни доля мутантных митохондрий в клетках костного мозга снижается

и дефект кроветворения компенсируется. Однако одновременно увеличивается доля патологической мтДНК в клетках скелетных мышц. Это неизбежно приводит к развитию летального митохондриального синдрома Кернса — Сейра. Поэтому для моногенных болезней, как и для всех наследственных, справедливо общее правило — предупреждение лучше, чем лечение. Профилактика моногенных болезней включает массовый скрининг новорожденных, генетическое консультирование и пренатальную диагностику.

Генная терапия онкологических заболеваний базируется на понимании молекулярно-генетических принципов их возникновения. Однако разнообразие генетических изменений, приводящих к развитию злокачественных новообразований, затрудняет разработку протоколов генной терапии и внедрение их в клиническую практику. Современные подходы к генной терапии опухолей основаны, во-первых, на нормализации работы мутировавшего гена (онкогена или гена-супрессора) и, во-вторых, на обучении иммунной системы организма распознавать опухолевые антигены и активировать противоопухолевый иммунный ответ.

К первому относятся попытки подавить работу наиболее часто активируемых он-

Таблица 6.10

Генотерапия наследственных заболеваний [60]

Клинические испытания	Экспериментальные разработки	Принципиально возможны
Тяжелый комбинированный иммунодефицит (аденозиндезаминаза)	Гемофилия А (фактор VIII)	Болезнь Хантера (идуонат-сульфатаза)
Семейная гиперхолестеринемия (рецептор липопротеинов низкой плотности)	Фенилкетонурия (фенилаланингидроксилаза)	Синдром Гурлера (идуонидаза)
Гемофилия В (фактор IX)	Мышечная дистрофия Дюшенна (дистрофин)	Гипераммонемия (орнитинтранскарбамилаза)
Болезнь Гоше (глюкоцереброзидаза)	Талассемия (гамма-глобин)	Метохроматическая лейкодистрофия (арилсульфатаза)
Муковисцидоз (CF трансмембранный фактор)	Серповидно-клеточная анемия (глобин)	Синдром Леша — Нихена (гипоксантин-фосфорибозил трансфераза)
	Болезнь Паркинсона (тирозингидроксилаза)	

когенов, например онкогена *ras*, или, наоборот, вызвать образование нормального продукта гена-супрессора опухолей, например белка p53. В частности, заражение опухолей вирусами, синтезирующими нормальный белок p53, останавливает развитие опухоли, хотя и не приводит к полному излечению.

Второй подход основан на мобилизации иммунной системы организма против опухоли. В рамках теории иммунного ответа, трансформированные клетки должны элиминироваться из организма. Однако наличие опухолей указывает на низкую эффективность или полное отсутствие иммунного ответа. Идея противоопухолевой терапевтической вакцинации базируется на принципиальной возможности стимуляции противоопухолевого иммунитета. За последнее десятилетие за рубежом проведено большое количество клинических испытаний по противоопухолевой вакцинации. В основном их можно разделить на три группы. К первой относят клинические исследования, в которых в качестве иммуногенов используются известные опухолевые антигены в виде синтетических пептидов. Для этого определяется наличие этих антигенов в опухоли пациента и проводится иммунизация соответствующими пептидами. При подобном подходе частичный регресс опухоли достигался только в 2–3 % случаев. С точки зрения клинической медицины, применение стандартизованных химических пептидов имеет неоспоримое преимущество. Однако, во-первых, эффективность такой вакцинации незначительна, во-вторых, количество известных опухолевых антигенов еще очень ограничено. Кроме того, в организме пациентов уже сформировалась толерантность к опухолевым антигенам, используемым для вакцинации. Значит, необходимо каким-то образом либо преодолеть эту толерантность, либо применять те опухолевые антигены, на которые она еще не сформировалась.

Эти задачи пытаются решить в исследованиях, относящихся ко второй группе. Здесь источником опухолевых антигенов

служат сами инактивированные опухолевые клетки, которые для преодоления толерантности генетически модифицируются, чтобы секретировать различные цитокины, такие как интерлейкин-2, -4, -7, интерферон, фактор, стимулирующий рост колоний, и целый ряд других. Все перечисленные цитокины принимают участие в формировании приобретенного иммунного ответа. Большинство опухолевых клеток, модифицированных для продукции определенных цитокинов, *in vitro* не замедляют свой рост. Однако *in vivo* рост опухоли значительно замедляется, что говорит об активации иммунного ответа организма благодаря цитокинам. Механизмы данного процесса до конца не ясны и могут отличаться для различных цитокинов. Тем не менее, использование инактивированных цитокин-продуцирующих опухолевых клеток для иммунизации пациентов применяется в клинике, однако его эффективность составляет 3–4 %.

К третьей группе относятся вакцины на основе дендритных клеток пациента, которые нагружаются вне организма (*ex vivo*) опухолевыми антигенами в виде пептидов или клеточных лизатов. Эффективность такой вакцинации, а именно случаи частичного регресса опухоли, составляет 7–7,5 %. Как видно из приведенных клинических данных, эффективность терапевтических вакцин достаточно низкая.

Кроме того, с одной стороны, в экспериментах разрабатываются подходы к генотерапевтическим воздействиям, способным повысить эффективность традиционной терапии злокачественных новообразований, то есть повысить чувствительность опухолевых клеток к химиотерапии и лучевому воздействию. С другой стороны, ведутся поиски протекции здоровых тканей от воздействия химио- и лучевой терапии. Основные подходы к генетической коррекции онкологических заболеваний представлены в табл. 6.11.

Все процедуры генной терапии, начиная с создания векторных конструкций и кончая их доставкой в организм больного, должны строго подчиняться общеприня-

тым биоэтическим нормам и требованиям, разработанным в связи с развитием генной инженерии. Однако внедрение методов генной инженерии в клиническую практику, возможное их широкое использование для лечения больных ставит исследователей и клиницистов перед новыми биоэтическими проблемами и предъявляет особые требования к их безопасности. Особенно острые биоэтические споры вызывает возможность проведения фетальной генной терапии. Введение генных конструкций в половые клетки может вызвать неконтролируемые, возможно фатальные, изменения в геноме будущих поколений. Теоретическая возможность усовершенствования человеческой природы путем фетальной или соматической генной терапии является основой для этических споров, которые переходят из сугубо медицинской плоскости к евгенике.

Многие из научных гипотез, высказанных на заре становления генной терапии, об опасности такого подхода не нашли своего подтверждения. Признана целесообразность и подтверждена клиническая эффективность генной терапии для лечения многих заболеваний. Единственное и неперемutable ограничение, сохраняющее свою силу и в современных условиях, —

это запрет фетальной генной терапии, то есть все генотерапевтические мероприятия должны быть направлены только на конкретного больного и касаться исключительно его соматических клеток.

Однако утверждение о безусловном запрете экспериментов в области фетальной генной терапии становится в последние годы менее категоричным. Ведутся поиски подходов к генетическим вмешательствам в клетки эмбриона человека, то есть внутриматочной генной терапии. Протоколы подобных вмешательств должны включать следующие этапы:

— установление с помощью пренатальной диагностики наличия у плода наследственных заболеваний в тяжелой форме или потенциально летальных, являющихся, согласно существующим протоколам, безусловным медицинским показанием для прерывания беременности;

— введение в ткани плода соответствующей генетической конструкции.

Данные исследования не представляют прямой попытки фетальной генной терапии. Однако они ознаменовали изменение тенденций в развитии фетальной генной терапии и возобновление дискуссии о целесообразности генокоррекции зародышевых и половых клеток человека. О некото-

Таблица 6.11

## Основные подходы к генетической коррекции онкологических заболеваний [59]

Принципы	Вводимые гены
Повышение иммуноактивности опухоли	Гены чужеродных антигенов, цитокинов
Генетическая модификация иммунных клеток	Гены цитокинов, костимуляторов
Инсерция генов «чувствительности» либо генов-«самоубийц»	Гены тимидинкиназы HSV, цитозин дезаминазы
Блок экспрессии онкогенов	Антисмысловые Ki-ras м-РНК, гены внутриклеточных антител
Инсерция генов-супрессоров опухолей	p53
Защита нормальных клеток от химиотерапии	Гены лекарственной устойчивости, тип 1
Индукция синтеза противоопухолевых веществ нормальными клетками	Гены интерлейкина-2, интерферона
Продукция противоопухолевых рекомбинантных вакцин	Вакцины типа БЦЖ (экспрессирующие опухолевый антиген)
Локальная радиопротекция тканей с помощью антиоксидантов	Гены трансферазы, глутатионсинтетазы

ром ослаблении биоэтических требований к генетическим манипуляциям на половых клетках человека свидетельствуют сообщения в прессе о начале опытов по клонированию человека в ряде стран, разрешении Британской палаты лордов на выращивание так называемых стволовых клеток эмбриона человека. Генетическое исправление наследственных дефектов эмбриона может грозить потомству потенциальной возможностью возникновения отрицательных генетических последствий. Поэтому кажется разумным запрет на внутриматочную генную терапию, но возникающие здесь морально-этические проблемы не имеют однозначного решения.

Потенциальная опасность развития серьезных осложнений для организма больного существует и при проведении соматической генной терапии. Неконтролируемое встраивание в те или другие участки генома способно привести к нарушению функции любых генов, в том числе регулирующих клеточное размножение и иммунные реакции. Это может, в свою очередь, вызвать развитие аутоиммунных заболеваний, злокачественных новообразований и других патологических процессов. Однако возможный негативный эффект генетического воздействия потенциально несоизмерим при трансфекции или генетической трансформации соматических и половых клеток. В первом случае речь идет о судьбе конкретного индивида, как правило, тяжело или смертельно больного. Здесь риск, связанный с генной терапией, обычно значительно меньше или соизмерим с риском смертельного исхода от основного заболевания. Существуют подходы, позволяющие минимизировать степень генетического риска при соматической генной терапии путем использования генетических конструкций, не обладающих способностью встраиваться в геном клетки-реципиента.

Еще одна проблема широкого внедрения генной терапии — ее возможная опасность для окружающих. Вирусные биологические векторы в результате мутаций или рекомбинаций могут приобретать инфекционные свойства и стать потенциа-

но опасными как для самого больного, так и для окружающих [60].

Основные биоэтические вопросы, связанные с генной терапией, были сформулированы В. С. Барановым [56].

1. Сможет ли в будущем генная терапия обеспечить столь полноценную генокоррекцию, которая не представит угрозы для потомства?

2. В какой мере полезность и необходимость генотерапевтической процедуры для одной супружеской четы перевесят риск такого вмешательства для всего человечества?

3. Сколь оправданны будут эти процедуры на фоне грядущего перенаселения планеты?

4. Как будут соотноситься генноинженерные мероприятия на человеке с проблемами гомеостаза общества и биосферы?

Таким образом, бурное развитие генетической медицины, сделавшее реальностью генную терапию, создало возможность полного излечения заболеваний наследственной и другой природы и породило существенные биоэтические проблемы.

**Реабилитация больных** с врожденными и наследственными заболеваниями — это важная и трудная задача. Неуклонный рост числа инвалидов, с одной стороны, увеличение внимания к каждому из них — независимо от его физических, психических и интеллектуальных способностей — с другой стороны; представление о повышении ценности личности и необходимости защищать ее права, характерное для демократического, гражданского общества, с третьей стороны, — все это предопределяет важность социально-реабилитационной деятельности.

В 1989 г. ООН приняла текст Конвенции о правах ребенка, которая обладает силой закона. Украина относится к числу государств, которые ратифицировали Конвенцию. В ней закреплено право детей, имеющих отклонения в развитии, вести полноценную и достойную жизнь в условиях, которые позволяют им сохранить достоинство, чувство уверенности в себе и облегчают их активное участие в жизни

общества (ст. 23); право неполноценного ребенка на особую заботу и помощь, которые должны предоставляться, по возможности, бесплатно с учетом финансовых ресурсов родителей или других лиц, обеспечивающих заботу о ребенке, с целью обеспечения неполноценному ребенку эффективного доступа к услугам в области образования, профессиональной подготовки, медицинского обслуживания, восстановления здоровья, подготовки к трудовой деятельности и доступа к средствам отдыха, что должно способствовать, по возможности, наиболее полному вовлечению ребенка в социальную жизнь и развитию его личности, включая культурное и духовное развитие.

Врожденные и наследственные заболевания часто приводят к инвалидизации детей, что в значительной мере отражается на качестве их жизни, приводит к социальной дезадаптации вследствие нарушения их развития и роста, потери контроля за своим поведением, а также способностей к самообслуживанию, передвижению, ориентации, обучению, общению, трудовой деятельности в будущем. Врожденные и наследственные заболевания, будучи серьезной медицинской проблемой, представляют, как правило, и целый комплекс социальных проблем. После установления диагноза ребенок оказывается «вершиной пирамиды», от которой во многом зависит уровень медицинской, социальной помощи, а также качество его жизни.

Люди с ограниченными возможностями испытывают функциональные затруднения не только вследствие заболевания, отклонений или недостатков развития, но и неприспособленности физического и социального окружения к их специальным потребностям, предрассудков общества, предосудительного отношения к инвалидам.

Основная цель ранней социально-реабилитационной работы — обеспечение социального, эмоционального, интеллектуального и физического развития ребенка, имеющего нарушения, и попытка максимального раскрытия его потенциала для

обучения. Другая важная цель — предупреждение тех состояний, которые возникают в результате нарушения взаимоотношений между больным ребенком и семьей, вызванного, в частности, тем, что ожидания родителей (или других членов семьи) относительно ребенка не оправдались. Рождение больного ребенка обычно становится поворотным моментом в жизни всей семьи, часто накладывает на родителей груз ежедневного выполнения медицинских назначений и манипуляций, ухода за хронически больным ребенком. Дополнительной психологической нагрузкой может стать ранняя смерть больного ребенка, вероятность рождения в этой семье больных детей в будущем. Проведение ранней социально-реабилитационной работы, помогающей членам семьи достичь понимания с ребенком и приобрести навыки, более эффективно адаптирующие их к особенностям ребенка, нацелено на предотвращение дополнительных внешних воздействий, способных усугубить нарушения, связанные непосредственно с основным заболеванием ребенка. Третьей целью ранней социально-реабилитационной работы становятся обучение и информационная поддержка ребенка с врожденным заболеванием, направленные на максимально эффективный уход за больным ребенком.

Под реабилитацией детей, страдающих врожденными и наследственными заболеваниями, понимают систему мероприятий, цель которых заключается в наиболее полном возможном сохранении или восстановлении здоровья больных с созданием возможностей активной жизни. Реабилитация представляет собой комплексную систему государственных, медицинских, психологических, социально-экономических, педагогических, производственных, бытовых и других мероприятий.

Медицинская реабилитация направлена на полное или частичное восстановление или компенсацию той или иной нарушенной или утраченной функции, или на замедление прогрессирования заболевания.

Право на бесплатную медицинскую и реабилитационную помощь детям, страдающим врожденными и наследственными заболеваниями, в Украине закреплено законодательством.

Все другие формы реабилитации — психологическая, педагогическая, социально-экономическая, профессиональная, бытовая — проводятся наряду с медицинской.

Психологическая форма реабилитации — это воздействие на психическую сферу больного ребенка и членов его семьи, на преодоление в их сознании представления о бесполезности лечения. Эта форма реабилитации сопровождает весь цикл лечебных и лечебно-восстановительных мероприятий.

Педагогическая реабилитация — это мероприятия воспитательного характера, направленные на то, чтобы больной ребенок овладел необходимыми умениями и навыками по самообслуживанию, получил школьное образование. Очень важно вырабатывать у ребенка психологическую уверенность в собственной полноценности и создать правильную профессиональную ориентацию, подготовить к доступным ему видам деятельности, создать уверенность в том, что приобретенные знания в той или иной области окажутся полезными в последующем трудоустройстве.

Социально-экономическая реабилитация — это целый комплекс мероприятий: обеспечение больного ребенка необходимым и удобным для него жилищем, находящимся вблизи места учебы, поддержание в нем уверенности в том, что он — полезный член общества; денежное обеспечение больного ребенка и его семьи путем предусмотренных государством выплат, назначения пенсии и т. п.

Профессиональная реабилитация подростков-инвалидов предусматривает обучение или переобучение доступным формам труда, обеспечение необходимыми индивидуальными техническими приспособлениями для облегчения пользования рабочим инструментом, приспособление рабочего места подростка-инвалида к его функциональным возможностям, органи-

зацию для инвалидов специальных цехов и предприятий с облегченными условиями труда и сокращенным рабочим днем и т. д.

В реабилитационных центрах широко используется метод трудовой терапии, основанный на тонизирующем и активизирующем воздействии труда на психофизиологическую сферу ребенка. Длительная бездеятельность расслабляет человека, снижает его энергетические возможности, а работа повышает жизненный тонус, являясь естественным стимулятором. Нежелательный психологический эффект дает и длительная социальная изоляция ребенка.

Особое значение трудовая терапия приобрела при лечении психических болезней, которые часто становятся причиной длительной изоляции больного ребенка от общества. Трудовая терапия облегчает взаимоотношения между людьми, снимая состояние напряженности и беспокойства. Занятость, концентрация внимания на выполняемой работе отвлекают пациента от его болезненных переживаний.

Бытовая реабилитация — это предоставление ребенку-инвалиду протезов, личных средств передвижения дома и на улице (специальные вело- и мотоколяски и др.).

Целью реабилитации должна быть не только ликвидация болезненных проявлений, но и выработка у них качеств, помогающих более оптимально приспособиться к окружающей среде.

Таким образом, необходимо учитывать, что реабилитация — это не просто оптимизация лечения, а комплекс мероприятий, направленных не только на самого ребенка, но и на его окружение — в первую очередь на его семью. В этой связи важное значение для реабилитационной программы имеют групповая психотерапия, семейная, трудовая терапия и терапия средой. Терапия как определенная форма вмешательства (интервенции) в интересах ребенка может быть рассмотрена как метод лечения, влияющий на психические и соматические функции организма; как метод влияния, связанный с обучением и профессиональной ориентацией; как инстру-

мент социального контроля; как средство коммуникации.

В процессе реабилитации происходит изменение ориентации — от медицинской модели (установка на болезнь) к антропоцентрической (установка на связь индивида с социальной средой). В соответствии с этими моделями и решается, кем и какими средствами, а также в рамках каких государственных учреждений и общественных структур должна осуществляться терапия.

### 6.11. Общие принципы медико-генетического консультирования

**Основные задачи медико-генетического консультирования.** Медико-генетическое консультирование — один из видов специализированной медицинской помощи населению, направленной главным образом на предупреждение появления в семье больных с наследственной патологией. Медико-генетическое консультирование, по определению рабочего комитета Американского общества по генетике человека, представляет собой «...коммуникативный процесс, связанный с решением проблем, относящихся к появлению или риску появления наследственного заболевания в семье. Этот процесс заключается в попытке одного или нескольких специалистов: 1) объяснить пациенту или семье диагноз, тип наследования, основные проявления, течение и доступное лечение наследственного заболевания; 2) помочь семье принять определенное решение относительно репродуктивного поведения с учетом величины повторного риска и выбрать ряд действий в соответствии с этим решением, учитывая степень риска и семейные цели; 3) помочь обратившемуся лучше адаптироваться к наличию больного в семье и риску повторения этой болезни» [61].

Особенность такого консультирования заключается в том, что объект исследования — не отдельный человек, а семья в целом [62].

Показания для медико-генетического консультирования следующие:

1) установленная или подозреваемая наследственная болезнь в семье в широком смысле слова; рождение ребенка с врожденным пороком развития; задержка физического развития и умственная отсталость у ребенка; повторные спонтанные аборт, выкидыши, мертворождения; выявление патологии в ходе просеивающих программ;

2) кровно-родственные браки;

3) воздействие на беременную известных или возможных тератогенов в первые 3 мес беременности;

4) неблагоприятное протекание беременности.

Сущность генетического прогноза состоит в оценке вероятности появления наследственной патологии у будущих или уже родившихся детей. Консультации по прогнозу здоровья потомства можно разделить на две группы: 1) проспективное консультирование — риск рождения больного ребенка определяется до наступления беременности; 2) ретроспективное консультирование, проводящееся после рождения больного ребенка в семье относительно здоровья будущих детей.

Основные задачи медико-генетического консультирования:

— установление точного диагноза наследственного заболевания;

— определение типа наследования заболевания в данной семье;

— расчет риска повторения болезни в семье;

— определение наиболее эффективного способа профилактики;

— объяснение обратившимся смысла собранной и проанализированной информации, медико-генетического прогноза и методов профилактики.

#### Этапы медико-генетического консультирования

**Первый этап — уточнение диагноза наследственного или врожденного заболевания** с помощью генетических методов и определения типа наследования за-

болевания в данной семье. Это необходимое условие любой консультации, поскольку на знании точного диагноза базируется генетический прогноз для семьи, прогноз для жизни и профессиональной ориентации больного. Для уточнения диагноза используют портретную диагностику, клинико-генеалогический, цитогенетический, специальные биохимические методы и методы ДНК-диагностики.

Иногда точный диагноз может быть поставлен только при тщательном обследовании всех членов пораженной семьи и обнаружении у них симптомов, отсутствующих у больного.

Для установления типа наследования семейной патологии генетик составляет родословную семьи. Она должна включать информацию не менее чем о трех поколениях. Важно помнить, что наследственное заболевание может быть результатом новой мутации. Детальное составление родословной позволяет установить генотипы некоторых родственников [1].

**Второй этап — расчет генетического риска**, который представляет собой вероятность появления определенной наследственной патологии у обратившегося за консультацией, у его потомков или ближайших родственников. Он основывается на точности диагноза и полноте генеалогических данных. Исходным моментом служит родословная обследуемой семьи. Существует два способа определения генетического риска: теоретические расчеты, основанные на генетических закономерностях, и использование эмпирических данных (полученных с помощью популяционно-статистического, близнецового, генеалогического методов).

*Если в семье моногенное заболевание, генотипы родителей известны*, генетический риск определяется по менделевским правилам наследования в зависимости от типа наследования патологии, пенетрантности гена (табл. 6.12). В настоящее время для большинства моногенных заболеваний возможно определение генотипа с использованием молекулярно-генетических методов исследования [1].

*Если в семье моногенное заболевание, генотипы родителей не известны*, расчет риска строится на байесовском подходе. Это математический метод, который предложил Т. Байес в 1763 г. Он основан на сравнении двух вероятностей (одна из них — если событие произойдет и вторая — если не произойдет). Метод базируется на анализе родословной, могут использоваться данные о популяционной частоте гена или заболевания. В ряде случаев расчет более сложный, основан на законах вероятности и учитывает распространенность болезни в популяции. Например, муковисцидоз наследуется как аутосомно-рецессивное заболевание. Вероятность рождения больного ребенка с муковисцидозом у гетерозиготных родителей составит  $1/4$  или 25 % ( $Aa \times Aa$ ). Для любой здоровой пары вероятность рождения ребенка с муковисцидозом будет определяться частотой гетерозиготного носительства гена в популяции ( $1/20$ ). Вероятность того, что оба родителя будут гетерозиготны, составит  $1/20 \times 1/20 = 1/400$ ; вероятность рождения в этом случае больного ребенка составит  $1/4$ . Суммарная вероятность для пары, не имеющей в семейном анамнезе муковисцидоза, составит  $1/20 \times 1/20 \times 1/4 = 1/1600$  (общепопуляционный риск).

*Если причиной заболевания становится новая мутация*. Выявление гетерозигот при медико-генетическом консультировании. По некоторым заболеваниям гетерозиготные носители могут быть выявлены с высокой степенью вероятности. Следует помнить, что каждый человек — гетерозиготный носитель не менее 10 рецессивных патологических генов, в том числе 4–5 летальных. Выявление гетерозигот целесообразно проводить при высоком риске гетерозиготного носительства:

1) у сестер мальчиков, страдающих рецессивным, сцепленным с X-хромосомой заболеванием (мышечная дистрофия Дюшенна, гемофилия, синдром Леша — Нихена);

2) у здоровых sibсов в семьях, где есть больные с аутосомно-рецессивным заболеванием;

Таблица 6.12

## Вероятность рождения больного ребенка в зависимости от типа наследования и генотипа родителей [62]

Тип наследования	Генотип родителей	Риск рождения больного ребенка
Аутосомно-доминантный A — болезнь a — норма	AA × AA	100 %
	AA × Aa	100 %
	Aa × Aa	75 %
	Aa × aa	50 %
	aa × aa	0 %
Аутосомно-рецессивный A — норма a — болезнь	AA × AA	0 %
	AA × Aa	0 %
	Aa × Aa	25 %
	Aa × aa	50 %
	aa × aa	100 %
X-сцепленный доминантный X <sup>A</sup> — болезнь X <sup>a</sup> — норма	X <sup>A</sup> X <sup>A</sup> × X <sup>A</sup> Y	100 %
	X <sup>A</sup> X <sup>A</sup> × X <sup>a</sup> Y	100 %
	X <sup>A</sup> X <sup>a</sup> × X <sup>A</sup> Y	100 % дочерей, 50 % сыновей
	X <sup>A</sup> X <sup>a</sup> × X <sup>a</sup> Y	50 % дочерей, 50 % сыновей
	X <sup>a</sup> X <sup>a</sup> × X <sup>A</sup> Y	100 % дочерей, 0 % сыновей
	X <sup>a</sup> X <sup>a</sup> × X <sup>a</sup> Y	0 %
X-сцепленный рецессивный X <sup>A</sup> — норма X <sup>a</sup> — болезнь	X <sup>A</sup> X <sup>A</sup> × X <sup>A</sup> Y	0 %
	X <sup>A</sup> X <sup>A</sup> × X <sup>a</sup> Y	0 %
	X <sup>A</sup> X <sup>a</sup> × X <sup>A</sup> Y	50 % сыновей
	X <sup>A</sup> X <sup>a</sup> × X <sup>a</sup> Y	50 % дочерей, 50 % сыновей
	X <sup>a</sup> X <sup>a</sup> × X <sup>A</sup> Y	100 % сыновей, 0 % дочерей
	X <sup>a</sup> X <sup>a</sup> × X <sup>a</sup> Y	100 %

3) среди групп населения с относительно высокой популяционной частотой рецессивного патологического гена (у евреев-ашкенази — болезни Тея — Сакса, в определенных регионах Африки — серповидно-клеточной анемии, бета-талассемии у населения средиземноморского бассейна).

Существует несколько способов выявления гетерозиготного носительства (табл. 6.13).

1. По клинической симптоматике у гетерозигот. Иногда носители определенных патологических генов имеют минимальные клинические проявления болезни, выявляемые только при детальном обследовании. Это наблюдается при некоторых X-сцепленных заболеваниях у гетерозиготных женщин за счет случайной инактивации X-хромосомы с нормальным геном. Так, у носительниц гена фрагильной X-хромосомы часто несколько снижен ин-

теллект, при носительстве ангидротической эктодермальной дисплазии определяются участки кожи без потовых желез. У гетерозиготных носительниц гемофилии часто образуются гематомы, но это же может наблюдаться и у нормальных женщин.

2. Биохимическая диагностика. При некоторых заболеваниях биохимические изменения — это результат прямого действия генов. Активность ферментов у носителей занимает промежуточное положение по сравнению со здоровыми и больными (снижена примерно в два раза по сравнению с нормой).

3. Молекулярно-генетические методы — наиболее точный метод.

При мультифакториальных заболеваниях расчет генетического риска достаточно сложен, поскольку учесть все генетические факторы и факторы среды невозможно. Так, например, формирование врож-

Методы диагностики гетерозиготного носительства отдельных заболеваний [33]

Заболевание	Тип наследования	Методы диагностики носительства
Миопатия Дюшенна	ХР	Быстрая утомляемость, повышен уровень креатин-фосфокиназы, изменения на электромиограмме, ДНК-диагностика
Гемофилия А и В	ХР	Уровень антигемофильного глобулина и тромбопластина плазмы снижен, ДНК-диагностика
Синдром Леша – Нихена	ХР	Активность гипоксантин-гуанин-фосфорибозил-трансферазы в фибробластах кожи снижена, ДНК-диагностика
Серповидно-клеточная анемия	АР	Электрофорез гемоглобина, ДНК-диагностика
Бета-талассемия	АР	Аномалии эритроцитов, количество гемоглобина А2, ДНК-диагностика
Болезнь Тея – Сакса	АР	Активность гексозаминидазы А снижена, ДНК-диагностика

денного вывиха бедра зависит от: 1) формы вертлюжной впадины, контролирующей полигенно; 2) повышенной подвижности суставов, которая наследуется ауто-сомно-доминантно; 3) уровня эстрогенов, который влияет на подвижность суставов.

В связи со сложностью определения риска при мультифакториальной патологии, пользуются специальными эмпирическими таблицами риска. Генетический прогноз при мультифакториальных заболеваниях зависит от количества генов предрасположенности. На величину риска влияет ряд факторов, которые косвенно позволяют оценить число генов предрасположенности [2; 11; 56].

1. Частота встречаемости заболевания в популяции. Для сибсов или детей больно-

го риск рассчитывается как квадратный корень из частоты болезни в популяции; при мультифакториальных пороках развития, частота которых в популяции около 1/1000, генетический риск составляет в среднем 2–4 %. Если частота заболевания в популяции превышает 1 % (распространенные болезни среднего возраста), то риск составляет около 5–10 % (по J. M. Friedman).

2. Степень родства с пораженным членом семьи. Генетический риск одинаков для всех родственников, имеющих одинаковую долю общих с больным генов (табл. 6.14). Чем дальше степень родства, тем меньше общих генов имеют родственники и тем меньше вероятность заболевания. Так, например, риск расщелины губы и

Таблица 6.14

Процент одинаковых генов в генотипе у родственников разных степеней родства [53]

Степень родства	Доля общих генов
Монозиготные близнецы	100 % (1,0)
1-я степень родства (родители-дети; родные братья-сестры, то есть сибсы)	50 % (1/2)
2-я степень родства (дядя, тетя-племянник, племянница; бабушка, бабушка-внуки; сводные братья и сестры, то есть полусибсы)	25 % (1/4)
3-я степень родства (двоюродные братья и сестры)	12,5 % (1/4)
4-я степень родства (троюродные братья-сестры)	3,125 % (1/32)

неба составляет 4 % для сибсов (1-я степень родства), а для двоюродных сибсов (2-я степень родства) — 0,5 %. Среди родственников 4-й и более дальних степеней родства вероятность заболевания соответствует среднепопуляционной.

Мультифакториальные болезни чаще встречаются в родственных браках, так как в этих случаях количество генов предрасположенности у потомков больше.

3. Число больных родственников. Чем больше в родословной больных, тем выше риск развития заболевания. Так, если в семье расщелину губы и неба имеет один ребенок, риск для сибсов составляет 4 %, если больных детей двое — 10 %. Риск развития сахарного диабета у ребёнка составляет 1,8 %, если болеет один родитель, и 12 %, если болеют оба. При дефектах закрытия нервной трубки риск для сибсов составляет 2–5 %, если болен один ребенок, и 10 % — после рождения двух больных. Это связано с потенциально большим количеством генов предрасположенности в семье.

4. Степени тяжести заболевания. У лиц с более тяжелыми проявлениями болезни

число генов предрасположенности должно быть больше. Так, при односторонней расщелине губы и неба риск для сибсов составляет 2,5 %, а при двусторонней расщелине — 4 %.

5. В случае разницы в частоте заболевания по полу риск для родственников будет выше, если больной относится к менее поражаемому полу, так как он должен иметь больше генов предрасположенности. Например, стеноз привратника встречается в 5 раз чаще у мальчиков, чем у девочек. Риск для сибсов мужского пола составляет 4 %, если больной ребенок в семье мальчик, и 9 % — если девочка. Если врожденный вывих бедра определен у девочки, риск для сибсов мужского пола составит 1 %, для сибсов женского пола — 5 %; если больной ребенок — мальчик, риск для его братьев составит 5 %, а для сестер — 7 %.

Эмпирический риск для некоторых мультифакториальных заболеваний представлен в табл. 6.15.

При медико-генетическом консультировании семьи по поводу мультифакториальной патологии следует помнить о по-

Таблица 6.15

**Эмпирический риск при некоторых мультифакториальных заболеваниях и пороках развития [62]**

Заболевания, пороки	Эмпирический риск	
	для сибсов, %	для потомства, %
Анэнцефалия	2–5	
Расщелина губы и/или неба	4	4
Расщелина неба	2	6–7
Косолапость	2	
Гипоспадия	10 для братьев	
Неосложненная миопия высокой степени	10–15	10–15
Язвенная болезнь	9	
Псориаз	16	20
Атопический дерматит	16	
Бронхиальная астма	8–9	
Эпилепсия	3–12	
Шизофрения		
если болен один родитель		10
если двое родителей		40
Аффективные психозы	5–10	

добных заболеваниях, наследуемых моногенно, и хромосомных, и тератогенных синдромах. Значения эмпирического риска неприменимы, если болезнь наследуется не мультифакториально. Так, расщелина губы и неба может быть симптомом около 200 моногенных, хромосомных и тератогенных синдромов. В каждом из этих случаев риск будет различным и зависеть он будет от характера наследования. Мультифакториально наследуемые пороки можно отличить по изолированности поражения.

В большинстве случаев при расчете генетического риска *при хромосомных болезнях* учитывают кариотип родителей, возраст матери, наличие детей с хромосомной патологией в анамнезе. Можно рассмотреть следующие случаи.

1. Расчет генетического риска при изменении числа и структуры аутосом. Если у родителей нормальный кариотип, в этом случае риск для sibсов пробанда оценивается по эмпирическим данным. Такой риск определяют по фактическим данным, полученным на основании анализа семей, имеющих детей с хромосомными болезнями, с помощью генеалогического, близнецового методов и популяционных исследований.

Например, риск рождения второго ребенка с синдромом Дауна у женщины до 35 лет составляет 1 %, старше — удвоенный популяционный риск для данной возрастной группы. Повторный риск при синдроме

ме Патау и Эдвардса — менее 1 % (табл. 6.16).

До 30-летнего возраста частота нерасхождений практически не возрастает, но в дальнейшем увеличивается существенно, особенно после 35 лет. В целом можно считать, что 1 % всех детей, рожденных от матерей в возрасте 38–40 лет, имеют трисомию 21 и 3,7 % — хромосомную аномалию другого типа.

При обнаружении мозаицизма у кого-либо из родителей пробанда риск для sibсов определяется по формуле:

$$\frac{X \times K}{2 - X},$$

где X — доля аномального клеточного клона; K — коэффициент элиминации несбалансированных зигот в эмбриогенезе; например, при синдроме Дауна K = 0,5.

Прогноз при семейных формах структурных аномалий хромосом зависит от типа хромосомной аберрации. Для расчетов используют специальные таблицы эмпирического риска.

В отличие от простой трисомии частота транслокационных форм хромосомных синдромов не зависит от возраста матери и поэтому встречается относительно чаще у молодых родителей. Например, у 8 % всех детей с синдромом Дауна, рожденных женщинами до 30 лет, отмечается транслокация; при этом в 2–3 % случаев транслокация имеет место также у одного из родителей. У детей, рожденных женщинами более старшего возраста, транслокационный вариант болезни Дауна встречается лишь в 0,4 % случаев (за счет увеличения доли простых трисомий). При семейных формах структурных аномалий хромосом можно теоретически определить процентное соотношение различных типов образующихся гамет и зигот. Однако для оценки риска эти расчеты практически мало пригодны, и в действительности пораженной оказывается значительно меньшая часть потомства, чем теоретически ожидаемая. Это объясняется селекцией несбалансированных зигот в эмбриогенезе. Поэтому и при семейных формах структурных анома-

Таблица 6.16

**Суммарный популяционный риск рождения детей с трисомиями (синдромы Дауна, Патау, Эдвардса) в зависимости от возраста матери [62]**

Возраст матери (лет)	Риск, %
Менее 19	0,08
20–24	0,06
25–29	0,1
30–34	0,2
35–39	0,54
40–44	1,6
Более 45	4,2

Таблица 6.17

## Риск для потомства носителей робертсоновских транслокаций [61]

Тип робертсоновской транслокации	Генетический риск, %	
	Носитель-женщина	Носитель-мужчина
Транслокация между 21 и 22 хромосомами (21q22q)	7	2
Транслокация между 22 хромосомой и любой хромосомой из группы D 13, 14, 15 пары (21qDq)	10	2,4
Транслокация между двумя гомологичными хромосомами 21 (21q21q)	100	100

лий хромосом риск оценивается по эмпирическим данным.

Как правило, риск выше при наличии перестройки у матери, чем у отца. Для распространенных транслокаций эмпирический риск равен приблизительно 11 %, когда носитель — мать, и около 2 %, когда носитель — отец.

В крайне редких случаях транслокаций типа центрального слияния между двумя гомологичными хромосомами (например, робертсоновская транслокация 21 хромосомы на гомологичную) все гаметы будут иметь либо избыток, либо нехватку хромосомного материала. Поэтому теоретический и фактический риск для потомства носителя подобной транслокации равен 100 %. Схема наследования синдрома Дауна в этом случае дана в разделе «Этиология хромосомных болезней». Пример расчета генетического риска при семейной транслокационной форме синдрома Дауна представлен в табл. 6.17.

Структурные сбалансированные аномалии хромосом супругов могут быть причиной повторных спонтанных аборт. В этом случае риск невынашивания беременности также зависит от пола носителя хромосомной аберрации и характера перестройки.

2. Расчет генетического риска при хромосомных болезнях, связанных с изменением числа половых хромосом. Риск для сибсов, как правило, менее 1 % (не превышает популяционный).

3. Повторный риск для потомства женщин с кариотипом XXX и мужчин с кариотипами ХХУ или ХУУ. Теоретический

риск рождения потомков с трисомией по половым хромосомам составляет 50 % (лишняя хромосома попадает в 50 % гамет); однако большая часть анеуплоидных эмбрионов abortируется, поэтому фактически риск составляет около 10 %.

**Третий этап — оценка генетического риска.** В целом если риск рождения больного ребенка не превышает 5 %, то его считают низким. Низкий генетический риск не считается противопоказанием к деторождению в данной семье. Риск от 6 до 20 % принято считать средним. В этом случае рекомендации относительно планирования дальнейших беременностей зависят не только от величины риска, но и от тяжести медицинских и социальных последствий конкретного наследственного заболевания, а также от возможности пренатальной диагностики. Если генетический риск превышает 20 %, то его расценивают как высокий и в отсутствие методов пренатальной диагностики соответствующей патологии дальнейшее деторождение в данной семье не рекомендуется.

**Четвертый (заключительный) этап** — заключение медико-генетического консультирования и советы родителям. Они касаются прогноза рождения здорового потомства и возможности деторождения. При объяснении риска врач должен не только сообщить семье конкретную оценку, но и объяснить значение различных дополнительных факторов (тяжесть, возможность лечения, пренатальная диагностика и др.). Форма общения консультирующихся и врача-генетика может быть директивной (совет) или недирективной (ин-

формация о природе заболевания). Но в любом случае задача врача заключается в оказании помощи семье принять правильное решение относительно репродуктивного поведения (деторождения).

Заключения генетика относительно деторождения носят рекомендательный характер. Принятие решения о деторождении остается за семьей. Оно зависит от многих обстоятельств — медико-генетических сведений, полученных от врача-генетика, социально-экономического положения семьи, уровня образования ее членов, степени религиозности, структуры личности, взаимоотношений между супругами и др.

В настоящее время существует реальная возможность пренатальной диагностики большинства наиболее распространенных моногенных и хромосомных болезней и врожденных пороков развития. Выбор метода пренатальной диагностики определяется диагнозом наследственной патологии, типом наследования. Когда применяется пренатальная диагностика, то снимается необходимость решения генетической задачи. В таком случае не прогнозируется рождение ребенка с болезнью, а диагностируется заболевание у плода.

При некоторых хромосомных aberrациях генетический риск может составлять 100 % (если один из родителей — носитель такой aberrации), то есть рождение здорового ребенка невозможно. В этих случаях может быть рекомендовано использование донорских половых клеток.

При медико-генетическом консультировании перед врачом-генетиком встают не только сугубо медицинские, но и морально-этические проблемы. В любой семье рождение ребенка с наследственным заболеванием или врожденным пороком развития — большая психологическая травма. У супругов возникает чувство вины за случившееся, комплекс неполноценности. В ряде случаев решается вопрос о возможности сохранения семьи. Считают, что на медико-генетическую консультацию целесообразно направлять супругов не раньше чем через 3–6 мес после постановки диагноза наследственной болезни,

так как в этот период происходит адаптация к возникшей ситуации в семье. Беседа врача-генетика с супругами может помочь им адаптироваться к ситуации, снять чувство вины и тем самым подготовить к дальнейшим действиям.

### **Список литературы**

1. Бочков Н. П. Клиническая генетика: Учебник. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. — 448 с.
2. Медична генетика: Підручник для вузів / В. М. Запорожан, Ю. І. Бажора, А. В. Шевеленкова, М. М. Чеснокова. — Одеса: ОДМУ, 2005. — 260 с.
3. Ronan R. O'Rahilly, Fabiola Müller. Human Embryology & Teratology. — 3rd Edition, 2001. — 520 p.
4. Резник Б. Я., Запорожан В. Н., Минков И. П. Врожденные пороки развития у детей. — Одесса, 1994. — 448 с.
5. Спадкові захворювання і природжені вади розвитку в перинатологічній практиці: Навч. посібник / В. М. Запорожан, А. М. Сердюк, Ю. І. Бажора та ін. — К.: Здоров'я, 1997. — 360 с.
6. Аряев Н. Л., Циунчик Ю. Г. Принципы диагностики и лечения ЗВУР и гипотрофии: Монография. — Одесса: Ярослав, 2005. — 256 с.
7. Cole T. R., Hughes H. E. Sotos syndrome: a study of the diagnostic criteria and natural history // Journal of Medical Genetics. — 1994. — Vol. 31. — P. 20-32.
8. McKusick V. A. The Genetics of Hand Malformations. — N.-Y.: Alan R. Liss, 1978.
9. Mehes K., Stalder G. Informative Morphogenetic Variants in the New-Born Infant. — Budapest: Akademiai Kiado, 1988.
10. Наследственные синдромы и медико-генетическое консультирование: Справочник / С. И. Козлова, Е. Семенова, Н. С. Демикова, О. Е. Блинникова. — М.: Практика, 1996. — 470 с.
11. Клиническая генетика: Учеб. пособие к практ. занятиям для студентов мед. ун-та / Ю. И. Бажора, А. В. Шевеленкова, З. Н. Живац и др. — Одесса: ОГМУ, 2001. — 146 с.
12. Tjio J. H., Levan A. The chromosome number in man // Hereditas. — 1956. — Vol. 42. — P. 1-6.
13. Diagnostic Cytogenetics / Ed. Wegner R.-D. — N. Y.: Springer, Lab. Manual, 1999. — P. 460.

14. Молекулярно-генетические и биофизические методы исследования в медицине / Под ред. Ю. И. Бажоры, В. И. Кресюна, В. Н. Запорожана. — К.: Здоров'я, 1996. — 207 с.
15. *Fauth C., Speicher M. R.* Classifying by colors: FISH-based genome analysis // *Cytogenet Cell Genet.* — 2001. — Vol. 93. — P. 1-10.
16. *Genome Analysis: a laboratory manual* / Ed. by B. Birren, E. D. Green. — CSHL Press, 1997. — 675 p.
17. *Ledbetter D.* The "colorizing" of cytogenetics: Is it ready for prime time // *Hum. Mol. Genet.* — 1992. — Vol. 1. — P. 297-299.
18. *Pergament E.* The clinical application of FISH in prenatal diagnosis // *Prenat. Diagn.* — 2000. — Vol. 20. — P. 215-220.
19. *High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays* / D. Pinkel, R. Seagraves, D. Sudar et al. // *Nat. Genet.* — 1998. — Vol. 20, N 2. — P. 207-211.
20. *Spectral karyotyping* / Yuval Garini, Merryn Macville, Stanislas du Manoir et al. // *Bioimaging.* — 2001. — Vol. 4, N 2. — P. 65-72.
21. Молекулярно-клиническая диагностика. Методы: Пер. с англ. / Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. — М.: Мир, 1999. — 558 с.
22. Анализ генома. Методы: Пер. с англ. / Под ред. К. Дейвиса. — М.: Мир, 1990. — 246 с.
23. *Markoulatos P., Siafakas N., Moncanu M.* Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach // *Journal of Clinical Laboratory Analysis.* — 2002. — Vol. 16, N 1. — P. 47-51.
24. *Rapid, nonradioactive detection of mutations in the human genome by allele-specific amplification* / H. Okayama, D. T. Curiel, M. L. Brantly et al. // *J. Lab. Clin. Med.* — 1989. — Vol. 114, N 2. — P. 105-113.
25. *Пузырев В. П., Степанов В. А.* Патологическая анатомия генома человека. — Новосибирск: Наука. Сиб. предпр. РАН, 1997. — 224 с.
26. *Graham Ramsay.* DNA chips: State-of-the-art // *Nature Biotechnology.* — 1998. — Vol. 16. — P. 40-44
27. *The Chipping.* Forecast // *Nature Genetics.* — 1999. — Vol. 21. — P. 1-60.
28. *Fluorescence data analysis on gel-based biochips* / V Barsky, A. Perov, S. Tokalov et al. // *J. Biomol. Screening.* — 2002. — Vol. 7. — P. 247-257.
29. *Oligonucleotide microchips as genosensors for determinative and environmental studies in microbiology* / D. Guschin, B. Mobarry, D. Proudnikov et al. // *Applied and Environmental Microbiology.* — 1997. — Vol. 63. — P. 2397-2402.
30. *Revised methods of interpreting and formulating palmar dermatoglyphics* / H. Cummins, H. H. Keith, Ch. Midlo et al. // *American Journal of Physical Anthropology.* — Vol. 12, N 3. — P. 415-473.
31. *Баращнев Ю. И.* Диагностика и лечение врожденных и наследственных заболеваний у детей. — М.: Триада-Х, 2004. — 560 с.
32. *Neonatal screening for inborn errors of metabolism: cost, yield and outcome* / R. J. Pollitt, A. Green, C. J. McCabe et al. // *Health Technol Assess.* — 1997. — Vol. 1(4). — P. 1-202.
33. *Control of Hereditary Diseases.* Report of a WHO Scientific Group. — Geneva: WHO, 1996.
34. *Newborn screening for inborn errors of metabolism: a systematic review* / C. A. Seymour, M. J. Thomason, R. A. Chalmers et al. // *Health Technol Assess.* — 1997. — Vol. 1 (11). — P. 1-95.
35. *Elliman D. A., Dezateux C. Bedford H. E.* Newborn and childhood screening programmes: criteria, evidence, and current policy // *Archives of Disease in Childhood.* — 2002. — Vol. 87. — P. 6-9.
36. *Запорожан В. Н., Аряев Н. Л., Старец Е. А.* Муковисцидоз. — К.: Здоров'я, 2001. — 176 с.
37. *Wald N. J., Hackshaw A. K., George L. M.* Assay precision of serum alpha-fetoprotein in antenatal screening for neural tube defects and Down's syndrome // *Journal of Medical Screening.* — 2000. — Vol. 7, N 2. — P. 74-77.
38. *Cuckle H. S., Wald N. J., Thompson S. G.* Estimating a woman's risk of having a pregnancy associated with Down's syndrome using her age and serum alpha-fetoprotein level // *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology.* — 1987. — Vol. 94, Issue 5. — P. 387.
39. *Macri J. N., Weiss R. R.* Prenatal serum alpha-fetoprotein screening for neural tube

- defects // *Obstetrics & Gynecology*. — 1982. — Vol. 59. — P. 633-639.
40. A screening program for trisomy 21 at 10-14 weeks using fetal nuchal translucency, maternal serum free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A / Dr K. Spencer, V. Souter, N. Tul et al. // *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. — 2002. — Vol. 13, Issue 4. — P. 231-237.
41. Maternal serum Down syndrome screening: free beta-protein is a more effective marker than human chorionic gonadotropin / J. N. Macri, R. V. Kasturi, D. A. Krantz et al. // *Am J Obstet Gynecol*. — 1990. — Vol. 163. — P. 1248-1253.
42. Maternal serum screening for birth defects: results of a Connecticut regional program / P. A. Benn, D. Horne, A. Craffey et al. // *Conn. Med.* — 1996. — Vol. 60 (6). — P. 323-330.
43. First-trimester Down syndrome screening: Free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein A / Krantz David A., Larsen John W., Buchanan Philip D., Macri James N. // *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. — 1996. — Vol. 174 (2). — P. 612-616.
44. Utility of minor ultrasonographic markers in the prediction of abnormal fetal karyotype at a prenatal diagnostic center / Sohl Bryan D., Scioscia, Angela L., Budorick Nancy E., Moore Thomas R. // *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. — 1999. — Vol. 181(4). — P. 898-903.
45. Choice of second-trimester genetic sonogram for detection of trisomy 21 / A. M. Vintzileos, E. R. Guzman, J. C. Smulian et al. // *Obstetrics & Gynecology*. — 1997. — Vol. 90. — P. 187-190.
46. Dennis Lo Y. M. Fetal DNA in Maternal Plasma: Biology and Diagnostic Applications // *Clinical Chemistry*. — 2000. — Vol. 46. — P. 1903-1906.
47. Diana W. Bianchi Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis // *British Journal of Haematology*. — 1999. — Vol. 105, Issue 3. — P. 574.
48. Four-marker serum screening for Down's syndrome / N. J. Wald, J. W. Densem, D. Smith, G. G. Klee // *Prenat. Diagn.* — 1994. — Vol. 14 (8). — P. 707-716.
49. Prenatal screening for Down's syndrome using inhibin-A as a serum marker / N. J. Wald, J. W. Densem, L. George et al. // *Prenat. Diagn.* — 1996. — Vol. 16 (2). — P. 143-153.
50. Preimplantation Single-Cell Analysis of Multiple Genetic Loci by Whole-Genome Amplification / M. C. Snabes, S. S. Chong, S. B. Subramanian et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1994. — Vol. 91. — P. 6181-6185.
51. Thornhill A. R., Snow K. Molecular Diagnostics in Preimplantation Genetic Diagnosis // *Journal of Molecular Diagnostics*. — 2002. — Vol. 4, N 1. — P. 11-29.
52. Sermon K., Van Steirteghem A., Liebaers I. Preimplantation genetic diagnosis // *The Lancet*. — 2004. — Vol. 363, Issue 9421. — P. 1633-1641.
53. ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) Consortium: data collection II (May 2000) // *Human Reproduction*. — 2000. — Vol. 15, N 12. — P. 2673-2683.
54. Gutai J. P., Kowarski A. A., Migeon C. J. The detection of the heterozygous carrier for congenital virilizing adrenal hyperplasia // *J. Pediatr.* — 1977. — Vol. 90 (6). — P. 924-929.
55. Prenatal and Postnatal Diagnosis and Carrier Detection of Fanconi Anemia by a Cytogenetic Method / Arleen D. Auerbach, Barbara Adler, R. S. K. Chaganti // *Pediatrics*. — 1981. — Vol. 67, N 1. — P. 128-135.
56. Горбунова В. Н., Баранов В. С. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. — СПб.: Спец. литература, 1997. — 287 с.
57. Niidome T, Huang L. Gene Therapy Progress and Prospects: Nonviral vectors // *Gene Therapy*. — 2002. — Vol. 9. — P. 1647-1652.
58. The challenge of fetal gene therapy / C. Coutelle, A. M. Douar, W. H. Colledge, U. Froster // *Nat Med*. — 1995. — Vol. 1 (9). — P. 864-866.
59. George J. A. St. Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors // *Gene Therapy*. — 2003. — Vol. 10. — P. 1135-1141.
60. Fletcher J. C., Richter G. Human fetal gene therapy: moral and ethical questions // *Hum. Gene Ther.* — 1996. — Vol. 7 (13). — P. 1605-1614.
61. Biesecker B. B., Marteau T. M. The future of genetic counselling: an international perspective // *Nature Genetics*. — 1999. — Vol. 22. — P. 133-137.
62. *Practical Genetic Counselling* / Ed. by P. S. Harper. — 5 ed., 1998.

## Глава 7. Выделение и характеристика СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

---

---

Classification of stem cells (SC), short history of selection and cultivation of embryonic SC (ESC) derived from laboratory animals and human is given. Anticipated properties of ESC and gene regulation are described, including pluripotentiality of SC. The distinctive features of human ESC are emphasized, mentioning the methods of their cultivation.

Attention is paid to the ESC markers, specialized human cells and methods of their identification.

---

Стволовые клетки подразделяют по возрасту организма, из которого они происходят, и по месту получения. Согласно первому параметру, выделяют эмбриональные (*embryonic*), фетальные (*fetal*) и взрослые (*adult*) стволовые клетки. Первые — это клетки внутренней клеточной массы (*inner cell mass*) раннего эмбриона до стадии его имплантации (у человека — 5–6-е сутки после оплодотворения); вторые — это клетки эмбриона (у человека — взятые обычно из абортивного материала на 5–12-й неделях беременности); третьи — взрослые, выделяемые после рождения организма и в течение всей его жизни. Фетальные и взрослые часто объединяют в понятие взрослые стволовые клетки.

Эмбриональные стволовые клетки плюрипотентны, то есть способны дифференцироваться в клетки тканей всех трех зародышевых слоев. Стволовые клетки во взрослом организме находятся как в центральном органе (костный мозг), так и в региональных органах и тканях. В зависимости от этого существуют различия в их способности дифференцироваться в ткани, отличные от места их нахождения и выделения, однако, в общем, взрослые стволовые клетки характеризуют как мультипотентные — способные дифференцироваться в несколько типов тканей.

Выделение эмбриональных и взрослых (в том числе фетальных) стволовых клеток кардинально различается, поэтому их следует рассматривать независимо друг от друга. И хотя взрослые стволовые клетки стали изучать раньше, мы вначале обратимся к эмбриональным стволовым клеткам. Первые работы по выделению эмбриональных стволовых клеток были начаты с бластоцистами мыши линии 129 SvE в 1981 г. [1], и с этого времени во многих лабораториях мира используют различные варианты описанного метода, который заключался в следующем. При помощи введения гормона в сроке 2,5 дней беременности, добивались задержки имплантации бластоцист, которые выделяли через 4–6 дней после инъекции гормона. На этой стадии преимплантационный эмбрион мыши состоит из 150 клеток, в состав которых входят клетки внешнего слоя (трофэктодема), полость, заполненная жидкостью (бластоцель), и кластер клеток внутри нее (внутренняя клеточная масса).

Интактные бластоцисты культивировали группами по 6 эмбрионов в небольшой капле среды для культур клеток под парафиновым маслом в культуральных чашках Петри в течение 4 дней. Через 48 ч бластоцисты прикреплялись, и клетки трофэктодермы разрастались и дифференцирова-

лись в гигантские трофобластные клетки. Внутренняя клеточная масса постепенно развивалась в большие цилиндрические структуры с группами мелких округлых клеток, окруженных эндодермальными клетками, которые росли прикрепленными в чашке Петри. Цилиндрические структуры отбирали с чашки, обрабатывали трипсином для разделения на отдельные клетки, после чего сеяли на предварительно желатинизированные чашки Петри с фибробластами STO, инактивированными митомицином С. Клетки выращивали в среде DMEM с 10 %-й фетальной телячьей сыворотки и 10 %-й сыворотки новорожденных телят, ежедневно просматривали и трипсинизировали каждые 2–3 дня. На самых ранних стадиях были заметны активно пролиферирующие колонии клеток, которые имели выраженное сходство с эмбриональными клетками. Эти клетки отбирали, пассировали и массово наращивали. Они имели внешний вид и общие характеристики роста эмбриональных клеток, зависящих от фидерного слоя.

Таким образом была показана возможность выделения плюрипотентных клеток непосредственно из раннего эмбриона, сходных по своему поведению с эмбриональными клетками, получаемыми из тератокарциномы. Кариотипирование клеток, полученных из нескольких бластоцист, показало наличие нормального кариотипа XX или XY с характерным для мышцы диплоидным набором хромосом — 40.

По определению [2], эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) должны обладать рядом характеристик, а именно:

- происходить из внутренней клеточной массы бластоцисты;
- иметь способность к неограниченному числу симметричных делений без дифференциации (длительное самообновление);
- обладать стабильным, полным (диплоидным) набором хромосом и поддерживать его;
- быть способными дифференцироваться в клетки всех трех первичных зародышевых слоев эмбриона (эндодерма, мезодерма и эктодерма);

— обладать способностью интегрироваться во все зародышевые ткани во время развития;

— проявлять способность колонизировать зародышевую линию и давать начало яйцеклеткам или клеткам спермы;

— быть клоногенными, то есть единственная эмбриональная стволовая клетка дает рост колонии, состоящей из генетически идентичных клеток или клонов с теми же свойствами, что и исходная клетка;

— экспрессировать фактор транскрипции Oct-4, который впоследствии активирует или ингибирует целевые гены хозяина и поддерживает эмбриональные стволовые клетки в пролиферативном, недифференцированном состоянии;

— могут быть индуцированы для продления пролиферации или дифференциации;

— у них отсутствует контрольная точка G1 клеточного цикла — ЭСК находятся длительное время в S-фазе, в которой происходит синтез ДНК. В отличие от дифференцированных соматических клеток ЭСК не требуют внешних стимулов для начала репликации ДНК;

— не проявляют инактивацию X-хромосомы. В отличие от женских соматических клеток млекопитающих, для которых характерна инактивация одной из X-хромосом, таковая не происходит в недифференцированных ЭСК.

Последующие исследования с мышинными ЭСК показали, что полученные в различных лабораториях в разное время и прошедшие разное число пассажей в культуре клеток линии удовлетворяют вышеизложенным требованиям.

Поддержание мышинных ЭСК в пролиферативном недифференцированном состоянии *in vitro* возможно при выращивании их на фидерном слое клеток эмбриональных фибробластов мышцы (MEF). Альтернатива фидерному слою — добавление в культуральную среду лейкемию-ингибирующего фактора (LIF) [3; 4]. Он секретруется клетками фидерного слоя и в их отсутствие позволяет поддерживать мышинные ЭСК в недифференцированном состоянии, сохранив их пролиферативную спо-

способность [5]. На сегодняшний день есть сообщения [6] о проведении около 300 пассажей мышинных ЭСК без их дифференциации.

Плюрипотентность мышинных ЭСК была доказана в трех типах экспериментов. Первый состоял во введении ЭСК, полученных из внутренней клеточной массы бластоцисты, в полость другой бластоцисты. Полученное в результате развития «комбинированного» эмбриона потомство было химерным — имело ткани и органы, развившиеся из смеси клеток как донора эмбриональных стволовых клеток, так и реципиентной бластоцисты. В последующем было показано, что культивированные ЭСК также сохраняют способность заменять внутреннюю клеточную массу (ВКМ) бластоцисты мыши с последующим развитием нормального эмбриона. Однако по сравнению с клетками, полученными непосредственно из ВКМ, этот процесс намного менее эффективен, причем указанная способность зависит от числа пассажей ЭСК *in vitro* [7; 8].

Второй метод определения плюрипотентности мышинных ЭСК — их введение подкожно или в почечную капсулу генетически идентичным или иммунодефицитным взрослым мышам (для предотвращения отторжения), у которых развивается доброкачественная опухоль — тератома. Микроскопическое исследование данной опухоли показывает, что в ней содержатся клетки, происходящие из всех трех зародышевых слоев эмбриона — эндо-, мезо- и эктодермы. В тератомах обычно обнаруживают клетки: эпителиальные, гладкомышечные, сердечной и скелетной мускулатуры, нервной ткани, кости и хряща, иногда волосы. Таким образом, ЭСК, которые в течение длительного времени поддерживали *in vitro*, ведут себя *in vivo* как плюрипотентные клетки. Они могут участвовать в нормальном эмбриогенезе, дифференцируясь в клетки всех типов организма, а также во многие типы клеток во взрослом животном. Однако нормальные ЭСК мыши не образуют ткани трофобласта *in vivo* [9].

Третий способ доказательства плюрипотентности ЭСК мыши — их способность к спонтанной дифференциации *in vitro* или направленной дифференциации, что достигается обычно удалением фидерного слоя. Такое изменение условий культивирования приводит через несколько дней к агрегации клеток и формированию эмбрионидных телец, которые в культуральных чашках во многом напоминают тератома у животных. Они также состоят из дезорганизованных, полностью или частично дифференцированных клеток, происходящих из всех трех зародышевых слоев эмбриона.

Крайне важной при характеристике ЭСК представляется экспрессия в них гена *Pou5f1*, кодирующего фактор транскрипции Oct-4, называемый также Oct-3 или Oct-3/4. Так, Oct-4 присутствует в зиготе мыши, и его наличие необходимо в течение всего развития бластоцисты для установления и поддержания плюрипотентности внутренней клеточной массы. *In vitro* недифференцированные пролиферирующие эмбриональные стволовые клетки мыши [10] и человека [11] экспрессируют Oct-4.

Кроме фактора транскрипции Oct-4, существует ряд поверхностных маркеров, которые также служат для характеристики пролиферирующих недифференцированных плюрипотентных эмбриональных клеток. Эти белки экспрессируются клетками внутренней клеточной массы, эмбриональными стволовыми клетками и клетками эмбриональной карциномы. В некоторых случаях эти поверхностные маркеры для клеток мыши и человека различны. Например, ЭСК и клетки эмбриональной карциномы мыши экспрессируют эмбриональный антиген SSEA-1, отсутствующий в клетках человека. В то же время для последних характерна экспрессия SSEA-3 и SSEA-4, отсутствующая в клетках мыши [12; 13]. Биологическое значение экспрессии этих поверхностных антигенов до конца неясно, однако экспрессия SSEA-1 может быть связана с характеристиками роста клеток *in vitro*, поскольку человеческие клетки образуют плоские, относительно

неплотные колонии, в то время как для мышинных клеток характерно образование многослойных компактных колоний.

Другими маркерами, используемыми для идентификации ЭСК, служат поверхностные антигены TRA1-60, TRA1-81 и фермент щелочная фосфатаза, причем все они экспрессируются как в мышинных, так и в человеческих ЭСК [14–16]. В табл. 7.1 указаны основные маркеры ЭСК мыши и человека.

Работы по получению и характеристике мышинных эмбриональных стволовых клеток стали модельными для перехода к исследованиям по получению эмбриональных стволовых клеток человека. Во-первых, это значительно более простая методика, во-вторых, отсутствуют этические проблемы. Хотя материал для работы с ЭСК человека может быть получен исключительно из клиник экстракорпоральной фертилизации, даже сегодня работы с ЭСК человека во многих странах запрещены, а в отдельных государствах разрешены исследования лишь с уже имеющимися линиями.

Для получения ЭСК человека обычно используют пятидневную бластоцисту. Нормальный эмбрион человека на этой стадии *in vitro* содержит от 200 до 250 клеток, большинство из которых составляет трофэктодерму (рис. 7.1). Для получения ЭСК трофэктодерму удаляют микрохирургическим или иммунохирургическим способом (при этом антитела против трофэктодермы помогают разрушить ее, освобождая таким образом внутреннюю клеточную массу). На этой стадии внутренняя клеточная масса состоит из 30–34 клеток [17].

В одной из последних работ [18] сообщалось об использовании для получения ЭСК человека поздней, 8-дневной бластоцисты. Методика получения удлинялась на дополнительную стадию, однако при этом значительно увеличивалось количество клеток внутренней клеточной массы.

Первое сообщение [19] появилось в 1998 г. В нем авторы описали получение 5 линий эмбриональных стволовых клеток из 14 эмбрионов, достигших стадии блас-

Таблица 7.1

**Сравнение мышинных и человеческих плюрипотентных стволовых клеток**

Название маркера	Мышинные ЭСК	Человеческие ЭСК
SSEA-1	+	—
SSEA-3	—	+
SEA-4	—	+
TRA-1-60	—	+
TRA-1-81	—	+
Щелочная фосфатаза	+	+
Oct-4	+	+
Теломеразная активность	+	+
Зависимость от фидерного слоя	+	+
Факторы, помогающие самообновлению стволовых клеток	LIF и другие факторы, которые действуют через рецептор gp130 и способны замещать фидерный слой	Фидерные клетки + сыворотка; фидерный слой + бессывороточная среда + bFGF
Ростовые характеристики <i>in vitro</i>	Образуют плотные, округлые, многослойные группы; могут образовывать эмбрионидные тельца	Образуют плоские, рыхлые агрегаты; могут образовывать эмбрионидные тельца
Образование тератом <i>in vivo</i>	+	+
Образование химер	+	+



Рис. 7.1. Бластоциста человека с внутренней клеточной массой и трофэктодермой [17]

тоцисты (изначально было 36 эмбрионов, предоставленных клиникой искусственного оплодотворения). Для получения эмбриональных стволовых клеток человека клетки внутренней клеточной массы бластоцисты человека культивировали с помощью многоступенчатого процесса. Плюрипотентные клетки внутренней клеточной массы отделяли от окружающей их трофэктодермы иммунохирургическим способом — антигеносредованным растворением трофэктодермы. Клетки внутренней клеточной массы помещали в культуральные чашки, содержащие ростовую среду с фетальной телячьей сывороткой, на фидерный слой мышинных эмбриональных фибробластов, инактивированных с помощью  $\gamma$ -облучения для предотвращения их размножения. Через 9–15 дней, когда клетки внутренней клеточной массы поделались и образовали группы клеток, клетки с периферии этих групп химическим или механическим методом отделили и переселили в такие же культуральные условия. Колонии явно гомогенных клеток селективно отбирали, механически ресуспендировали и пересевали, пассируя и размножая. Таким образом были получены клеточные линии (рис. 7.2).

Ни одна из начальных линий ЭСК человека не была клонирована из единственной клетки и, следовательно, не являлась генетически однородной. Пять исходных линий ЭСК человека продолжали делиться без дифференцировки в течение 5–6 мес [20], затем одна из них продолжала делиться *in vitro* еще примерно в течение двух лет, пройдя более 300 удвоений, и дала 2 субклона. Все линии ЭСК человека



Рис. 7.2. Схема получения эмбриональных стволовых клеток в культуре

экспрессировали высокие уровни теломерызы, что помогает поддерживать длинные теломеры. Это характерно для пролиферирующих клеток эмбриональных тканей и половых клеток, в отличие от соматических клеток человека, у которых отсутствует теломеразная активность и теломеры значительно короче. Кроме того, дифференцированные соматические клетки прекращают деление в культуре — явление, называемое репликативным старением.

Как упоминалось ранее, истинно плюрипотентная стволовая клетка способна к самообновлению и дифференциации в большинство клеток организма, происходящих из всех трех зародышевых слоев. Эмбриональные стволовые клетки человека способны к длительному самообновлению *in vitro* с сохранением нормального кариотипа [21–24]. Согласно данным разных авторов, ЭСК человека способны к 300 [6] или даже 450 [25] удвоениям популяции. Сегодня показано, что ЭСК человека *in vitro* плюрипотентны, они могут давать типы клеток всех зародышевых слоев [11; 12; 26; 27]. В настоящее время единственный тест определения плюрипотентности ЭСК человека *in vivo* — введение иммунодефицитным мышам, в которых они образуют дифференцированные клетки, происходящие из эндодермы (эпителиальные клетки кишечника), мезодермы (клетки гладкой и поперечно-полосатой мускулатуры) и эктодермы (многослойный чешуйчатый эпителий) эмбриона [28–30].

Со временем методика получения ЭСК человека была значительно модифицирована. Во-первых, учитывая, что ЭСК человека весьма перспективны для использования в регенеративной медицине, встал вопрос о проблемах в связи с использованием в качестве фидерного слоя мышинных фибробластов. Недавно было доказано [31], что линии ЭСК человека, созданные до 2001 г. в США, содержат ксеноантиген-сигналовую кислоту, которая в клетках человека, в отличие от других млекопитающих, не синтезируется. Она интегрировалась из мышинового фидерного слоя и среды культивирования, содержащей заместитель сы-

воротки с ксенобелками. Вероятно, большинство линий ЭСК, выделенных до 2002 г. во всём мире, потенциально содержат подобный ксеноантиген, поскольку создавались в стандартных условиях культивирования [32]. Кроме того, использование в качестве фидера клеток животных опасно внедрением в ЭСК человека инфекционного материала, обычно нехарактерного для человека. Однако в последние 2–3 года отдельными исследовательскими группами и частными компаниями были предложены протоколы бессывороточного и бесфидерного культивирования ЭСК. Одна из таких бесфидерных систем предполагает использование коммерческого аналога компонентов экстрацеллюлярного матрикса — Matrigel [33–35]. В качестве источника цитокинов и ростовых факторов, необходимых для поддержания ЭСК в недифференцированном состоянии, предлагается использовать кондиционированную среду от культивирования мышинных фибробластов [36]. В то же время возможно и самостоятельное получение экстрацеллюлярного матрикса [37]. Другие исследователи предлагают не отказываться от фидерного слоя, а заменить его на человеческий [38; 39]. В качестве источников последнего предлагаются стромальные клетки костного мозга [40], кожные фибробласты [41], адгезивные клетки плаценты [42].

Описывая получение или характеристику тех или иных стволовых клеток, исследователи практически всегда используют понятие «маркеры». Рассмотрим более подробно само понятие и механизм использования маркеров. Итак, что же такое маркеры стволовых клеток? Поверхность всех клеток организма покрывают специализированные белки, называемые рецепторами, которые способны селективно связываться с другими сигнальными молекулами. Существует огромное количество различных типов рецепторов, различающихся по структуре и аффинности (сродству) к сигнальным молекулам. Обычно эти рецепторы и молекулы, которые связываются с ними, используются клетками как средство коммуникации с другими моле-

## 7. Выделение и характеристика стволовых клеток

Таблица 7.2

### Маркеры, используемые для идентификации стволовых и характеристики специализированных клеток

Название маркера	Тип клеток	Значение
Кровеносные сосуды		
Киназа-1 эмбриональной печени (Flk1)	Эндотелиальные	Рецепторный белок клеточной поверхности, который идентифицирует предшественников эндотелиальных клеток; маркер межклеточных контактов
Тяжелая цепь миозина, специфичная для клеток гладкой мускулатуры	Гладкая мускулатура	Идентифицирует клетки гладкой мускулатуры в стенках кровеносных сосудов
Кагерин клеток сосудистого эндотелия	Гладкая мускулатура	Идентифицирует клетки гладкой мускулатуры в стенках кровеносных сосудов
Костный мозг и кровь		
CD4 и CD8	Клетки белой крови 1 (WBC)	Белковые маркеры клеточной поверхности, специфичные для зрелых Т-лимфоцитов
CD34	Гемопоэтические стволовые клетки (HSC), сателлиты, эндотелиальные предшественники	Поверхностный белок на клетках костного мозга, индикатор HSC и эндотелиальных предшественников; идентифицирует также мышечные сателлиты и мышечные стволовые клетки
CD34+Sca1+ Lin-профиль	Мезенхимальные стволовые клетки (MSC)	Идентифицирует MSC, способные дифференцироваться в адипоциты, остеоциты, хондроциты и миоциты
CD38	Отсутствует на HSC Присутствует на WBC	Рецептор клеточной поверхности на типах клеток костного мозга, позволяющий идентифицировать HSC и MSC; при связывании с фетальной сывороткой телят (FCS) усиливает пролиферацию ЭСК, HSC, MSC и гематопоэтических предшественников
CD44	Мезенхимальные	Тип молекул клеточной адгезии для характеристики специфических типов мезенхимальных клеток
c-Kit	HSC, MSC	Молекула клеточной поверхности, которая идентифицирует линии WBC lineages. Селекция клеток CD34 <sup>+</sup> /CD38 <sup>-</sup> позволяет очистку популяции от HSC
Печень		
Альбумин	Гепатоциты	Молекула клеточной адгезии, важная при взаимодействии клетка-клетка; маркер, экспрессирующийся во время развития печени
V-1 интегрин	Гепатоциты	Основной белок, продуцируемый печенью; указывает на функционирование зрелых и полностью дифференцированных гепатоцитов

кулами, а также для четкого выполнения своих функций в организме. Такие же рецепторы поверхности клеток являются маркерами стволовых клеток. Каждый тип

клеток, например клеток печени, имеет определенную комбинацию рецепторов на своей поверхности, и это отличает их от других типов клеток. Исследователи учли



Рис. 7.3. Идентификация поверхностных маркеров клетки с использованием флуоресцентной метки

преимущества биологической уникальности рецепторов стволовых клеток, а также химические свойства определенных соединений, что позволило маркировать, или «метить», клетки. Использование маркеров обеспечило в свое время успех в обнаружении и характеристике стволовых клеток.

Маркеры стволовых клеток получили краткие названия, основывающиеся на молекулах, которые связываются с поверхностными рецепторами стволовых клеток. Например, клетка, имеющая на своей поверхности рецептор к антигену 1 стволовых клеток, обозначается как Sca-1. Во многих случаях для идентификации определенного типа стволовых клеток используют комбинацию многих маркеров. Сегодня авторы часто характеризуют стволовые клетки с помощью кратких названий нескольких маркеров, указывая их наличие (+) или отсутствие (-). Например, особый тип гемопоэтических клеток крови или костного мозга, называемый “side population” или “SP”, описывается как as (CD34-/low, c-Kit+, Sca-1+).

Для примера приводим некоторые маркеры (перечень очень неполный), обычно используемые для характеристики стволовых и специализированных клеток (табл. 7.2).

Исследователи используют сигнальные молекулы, селективно присоединяющиеся

к рецепторам на поверхности клеток, как инструмент, позволяющий им идентифицировать стволовые клетки. Была разработана методика присоединения к сигнальной молекуле другой молекулы (или метки), способной флуоресцировать или излучать световую энергию при активировании источником энергии, например ультрафиолетовым светом или лазерным лучом (рис. 7.3). Сегодня в распоряжении исследователей имеются многочисленные флуоресцентные метки, различающиеся по интенсивности излучения и цвету.

Один из широко используемых подходов с применением флуоресцентной метки и специфических рецепторов на клеточной поверхности для идентификации определенной популяции стволовых клеток — флуоресцентно активированный сортирование клеток (FACS). Этот инструмент используется исследователями для выявления редких стволовых клеток среди большого количества (миллионов) других клеток. Схема метода представлена на рис. 7.4 и состоит в следующем. Суспензия клеток, маркированных флуоресцентной меткой на их поверхности, под давлением направляется в столь узкую щель, что одновременно через нее может проходить только одна клетка. В это время клетка проходит через источник света, обычно лазер, а затем — через электрическое поле. Флуоресцентные клетки становятся отрицательно заряженными, тогда как клетки без флуоресцентной метки — положительно. Различный заряд позволяет отделять стволовые клетки от других клеток, в результате чего исследователь имеет популяцию клеток с одинаковыми характеристиками маркеров.

Существуют и другие методы, использующие маркеры стволовых клеток и их флуоресцентные метки. Например, часто необходимо наблюдать появление и поведение стволовых клеток в тканях, при этом используют микроскопию, а не FACS. В этом случае готовят тонкие срезы ткани, стволовые клетки метят по их поверхностным маркерам с помощью сигнальных молекул (например, моноклональных антител к ним), имеющих флуоресцентную

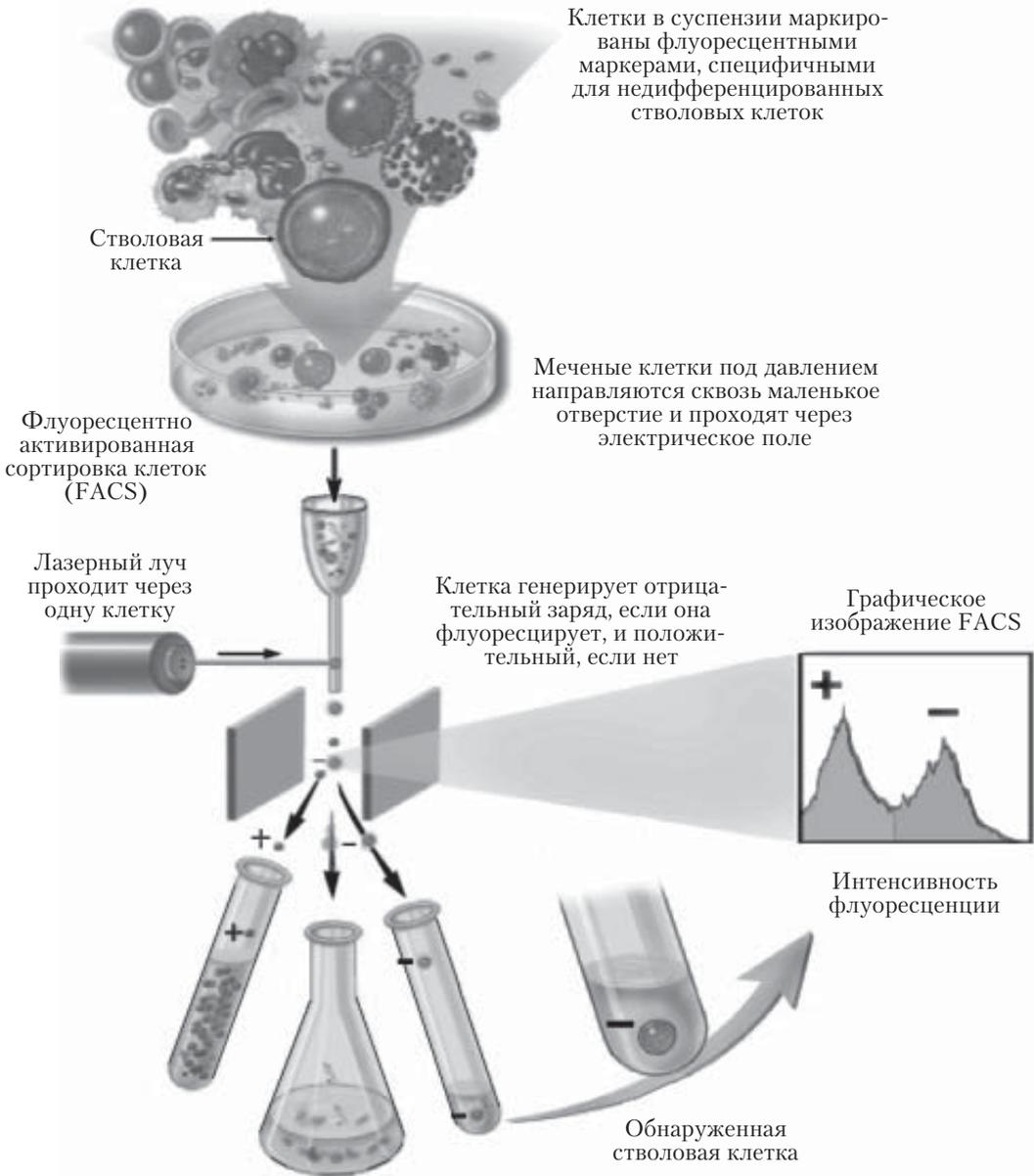


Рис. 7.4. Схема выявления стволовых клеток

метку. После активации (световой или химической) метки, стволовые клетки начинают флуоресцировать, что можно наблюдать в микроскоп.

Для изучения специализации клеток в процессе развития организма широко используют методы молекулярной биологии

и генетики. Так, например, известны ряд генов и факторов транскрипции, строго специфичные для стволовых клеток. Использование полимеразной цепной реакции позволяет определить наличие активных генов, которые отвечают за специализацию клетки. Другой широко применяе-

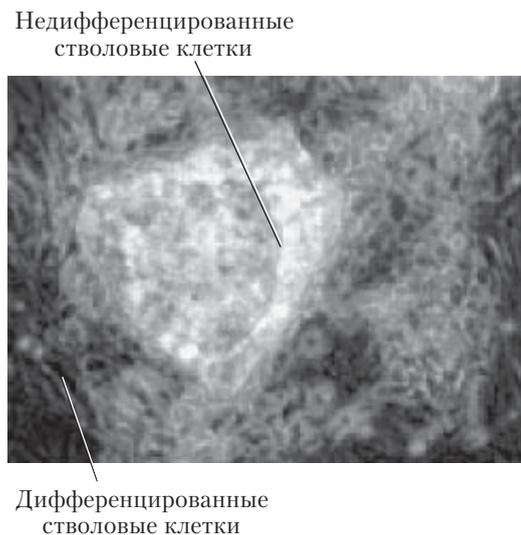


Рис. 7.5. Микрофотография флуоресцентно меченной стволовой клетки

мый в настоящее время генноинженерный подход — использование так называемых репортерных генов. Метод позволяет следить за стволовыми клетками в процессе их дифференциации и специализации за счет трансфекции стволовых клеток репортерными генами, например геном зеленого флуоресцентного белка (GFP). Если ген активен, то он экспрессирует белок, который флуоресцирует ярко зеленым цветом, что позволяет отслеживать стволовые клетки; в процессе специализации стволовых клеток ген теряет свою активность (рис. 7.5).

Сегодня исследователи сочетают использование метода репортерных генов с FACS и методами микроскопии, что дает возможность разделить клетки, идентифицировать их в тканях и следить за их дифференциацией или специализацией.

### Список литературы

1. Evans M. J., Kaufman M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // *Nature*. — 1981. — N 292. — P. 154-156.

2. Stem cells: scientific progress and future research directions//<http://www.nih.gov/news/stemcell/scireport.htm>

3. Smith A. G. Origins and properties of mouse embryonic stem cells // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* — 2001. — Vol. 17. — P. 435-462.

4. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells / R. L. Williams, D. J. Hilton, S. Pease et al. // *Nature*. — 1988. — N 336. — P. 684-687.

5. Differentiation inhibiting activity is produced in matrix-associated and diffusible forms that are generated by alternate promoter usage // P. D. Rathjen, S. Toth, A. Willis et al. // *Cell*. — 1990. — N 62. — P. 1105-1114.

6. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture / M. Amit, M. K. Carpenter, M. S. Inokuma et al. // *Dev. Biol.* — 2000. — N. 227. — P. 271-278.

7. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse / A. Nagy, E. Gocza, E. M. Diaz et al. // *Development*. — 1990. — N 110. — P. 815-821.

8. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells / A. Nagy, J. Rossant, R. Nagy et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1993. — N 90. — P. 8424-8428.

9. Ward C. M., Barrow K. M., Stern P. L. Significant variations in differentiation properties between independent mouse ES cell lines cultured under defined conditions // *Exp. Cell. Res.* — 2004. — N 293. — P. 229-238.

10. Niwa H., Miyazaki J., Smith A. G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells // *Nat. Genet.* — 2000. — N 24. — P. 372-376.

11. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells / M. Schuldiner, O. Yanuka, J. Itskovitz-Eldor et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 2000. — N 97. — P. 11307-11312.

12. *Embryonic* stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro* / B. E. Reubinoff, M. F. Pera, C. Y. Fong et al. // Nat. Biotechnol. — 2000. — N 18. — P. 399-404.
13. *Embryonic* stem cell lines derived from human blastocysts / J. A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro et al. // Science. — 1998. — N 282. — P. 1145-1147.
14. *Derivation* of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells / M. J. Shambloott, J. Axelman, S. Wang et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. — 1998. — N 95. — P. 13726-13731.
15. *Pluripotent* embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation *in vivo* and *in vitro* / P. W. Andrews, I. Damjanov, D. Simon et al. // Lab. Invest. — 1984. — N 50. — P. 147-162.
16. *Differences* between human and mouse embryonic stem cells / I. Ginis, Y. Luo, T. Miura et al. // Dev Biol. — 2004. — Vol. 15, N 269 (2). — P. 360-380.
17. *De Vos A., van Steirteghem A.* Zona hardening, zona drilling and assisted hatching: new achievements in assisted reproduction // Cells Tissues Organs. — 2000. — N 166. — P. 220-227.
18. *Establishment* of human embryonic stem cell-transduced clones carrying a marker of undifferentiated cells / R. Eiges, M. Schuldiner, M. Drukker et al. // Curr. Biol. — 2001. — N 11. — P. 514-518.
19. *Derivation* of human embryonic stem cells from day-8 blastocysts recovered after three-step *in vitro* culture / M. Stojkovic, M. Lako, P. Stojkovic et al. // Stem Cells. — 2004. — N 22. — P. 790-797.
20. *Thomson J. A., Odorico J. S.* Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines // Trends. Biotechnol. — 2000. — N 18. — P. 53-57.
21. *Surface* antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture / J. S. Draper, C. Pigott, J. A. Thomson, P. W. Andrews // J. Anat. — 2002. — N 200. — P. 249-258.
22. *Karyotypic* evolution of human Embryonic Stem (ES) cells in culture: recurrent gain of chromosomes 17 (17q) and 12 / J. S. Draper, K. Smith, P. J. Gokhale et al. // Nature Biotech. — 2004. — N 22. — P. 53-54.
23. *Karyotype* of human ES cells during extended culture / J. J. Buzzard, N. M. Gough, J. M. Crook et al. // Nat. Biotechnol. — 2004. — N 22. — P. 381-382.
24. *Preserving* the genetic integrity of human embryonic stem cells / M. M. Mitalipova, R. R. Rao, D. M. Hoyer et al. // Nat. Biotechnol. — 2005. — N 23. — P. 19-20.
25. *Odorico J. S., Kaufman D. S., Thomson J. A.* Multilineage Differentiation from Human Embryonic Stem Cell Lines. Stem Cells. — 2001. — N 19. — P. 193-204.
26. *Green H., Easley K., Iuchi S.* Marker succession during the development of keratinocytes from cultured human embryonic stem cells // PNAS. — 2004. — Vol. 101. — N 26. — P. 15625-15630.
27. *Characterization and Enrichment of Cardiomyocytes Derived From* / Xu Chunhui, Police Shailaja, Rao Namitha, Carpenter Melissa K. // Human Embryonic Stem Cells Circ Res. — 2002. — N 91. — P. 501-508.
28. *Human* mesenchymal stem cells maintain transgene expression during expansion and differentiation / K. Lee, M. K. Majumdar, D. Buyaner et al. // Molecular Therapy. — 2001. — Vol. 3. — N 6. — P. 857-866.
29. *Adult* cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration / A. P. Beltrami, L. Barlucchi, D. Torella et al. // Cell. — 2003. — Vol. 114. — P. 763-776.
30. *Isolation* of endothelial progenitor cells from cord blood and induction of differentiation by ex vivo expansion / J. W. Shin, D. W. Lee, M. J. Kim et al. // Yonsei Med J. — 2005. — Vol. 46 (2). — P. 260-267.
31. *Varki A.* Loss of N-glycolylneuraminic acid in humans: mechanisms, consequences and implications for hominid evolution // Yearb Phys Anthropol. — 2002. — N 44. — P. 54-69.
32. *Carpenter M. K., Rosler E., Rao M. S.* Characterization and differentiation of human embryonic stem cells // Cloning Stem Cells. — 2003. — N 5. — P. 79-88.
33. *Culture* and characterization of human embryonic stem cells / Draper J. S., Moore

- H. D., Ruban L. N. et al. // *Stem. Cells Dev.* — 2004. — Vol. 13, N 4. — P. 325-236.
34. *Long-term* culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions / E. S. Rosler, G. J. Fisk, X. Ares et al. // *Dev Dyn.* — 2004. — N 229. — P. 259-274.
35. *Feeder layer-* and serum-free culture of human embryonic stem cells / M. Amit, C. Shariki, V. Margulets, J. Itskovitz-Eldor // *Biol. Reprod.* — 2004. — N 70. — P. 837-845.
36. *Protocols for the Maintenance of Human Embryonic Stem Cells in Feeder Free Conditions.* Geron Corporation, 230 Constitution Drive, Menlo Park, CA 94025.
37. *Human* embryonic stem cells derived without feeder cells / I. Klimanskaya, Y. Chung, L. Meisner et al. // *Lancet.* — 2005. — Vol. 365. — P. 1636-1641.
38. *Human* feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells / M. Richards, C. Y. Fong, W. K. Chan et al. // *Nat. Biotechnol.* — 2002. — N 20. — P. 933-936.
39. *Comparative* evaluation of various human feeders for prolonged undifferentiated growth of human embryonic stem cells / M. Richards, S. Tan, C. Y. Fong et al. // *Stem. Cells.* — 2003. — N 21. — P. 546-556.
40. *Human* adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture / L. Cheng, H. Hammond, Z. Ye et al. // *Stem. Cells.* — 2003. — N 21. — P. 131-142.
41. *A culture* system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells / O. Hovatta, M. Mikkola, K. Gertow et al. // *Hum. Reprod.* — 2003. — N 18. — P. 1404-1409.
42. *Human* placenta feeder layers support undifferentiated growth of primate embryonic stem cells / K. Miyamoto, K. Hayashi, T. Suzuki et al. // *Stem. Cells.* — 2004. — N 22. — P. 4330-4440.

## Глава 8. Клиническое применение СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

---

---

This chapter deals with the issues of stem cell usage for treatment of liver diseases, advantages and disadvantages of the methods that already exist and those that have been proposed recently, as well as prospects of their development. In particular, it is noted that the major limitations of orthotopic liver transplantation are non-availability of the donor liver, need for a major surgical procedure, high cost and long-term immunosuppression. The problem of immunogenicity of xenogenic hepatocytes can be overcome to some extent by immunoisolation, encapsulation technique, which may also provide protection to the hepatocytes during cryopreservation.

---

Начиная с 1998 г., когда Джеймс Томсон из Висконсинского университета (США) получил первые эмбриональные культуры стволовых клеток человека (ЭСК), повысилось внимание к научным работам, указывающим на терапевтический потенциал стволовых клеток для лечения различных дегенеративных болезней и повреждений [1]. Открытие этих особенностей стволовых клеток положило начало новой области медицинской науки, известной сейчас как «регенеративная медицина».

Потенциальные цели терапии стволовыми клетками дают надежду на революционные открытия в медицине. Для многих болезней, таких как болезнь Паркинсона, диабет, болезни сердца, болезнь Альцгеймера и поражение спинного мозга, существует немного или вообще нет вариантов лечения, тогда как миллионы больных во всем мире в настоящий момент нуждаются в таком лечении.

Исследование стволовых клеток предлагает беспрецедентные возможности для разработки нового направления в лечении болезней, приводящих к инвалидности, и новые пути исследования основных вопросов биологии.

Стволовые клетки — это неспециализированные клетки, которые могут самообновляться и дифференцироваться в более

зрелые клетки со специальными функциями. Поэтому возник значительный интерес к биологии и терапевтическому потенциалу ЭСК у медиков-исследователей.

Различают два вида стволовых клеток:  
— эмбриональные стволовые клетки;  
— взрослые стволовые клетки.

*Эмбриональные стволовые клетки* получают из эмбриона, находящегося на ранней стадии развития, то есть когда оплодотворенное яйцо в результате деления образовало около 1000 клеток. Они выделяются и сохраняются в культуре клеток; способны самообновляться, таким образом сохраняя непрерывный запас стволовых клеток и способность давать начало специализированным (дифференцированным) типам клеток.

Стволовые клетки можно получить из нескольких источников. Свободные эмбрионы: стволовые клетки могут поступать от эмбрионов, оставшихся в репродуктивных клиниках, не использованных парами, которые хотят иметь детей.

*Кроветворные взрослые стволовые клетки и их клинический потенциал.* Бесперывная способность кроветворных стволовых клеток (КСК) к самообновлению и способность дифференцироваться во все типы клеток, найденных в крови, квалифицирует их как взрослые стволовые клетки. Относятся КСК к нескольким стволовым клеткам, которые выявлены у

взрослых людей. Они находятся в костном мозге и при определенных условиях мигрируют в другие ткани через кровь. Можно также обнаружить КСК в печени и селезенке эмбриона, в пуповине и крови плаценты.

Растет число доказательств того, что КСК пластичны, то есть при некоторых обстоятельствах способны, кроме дифференциации в клетки кровеносной системы, участвовать также в регенерации других тканей. Исследования показали, что КСК могут давать начало клеткам печени. Эти данные заставили ученых задуматься о биологической реакции КСК на болезнь или повреждение ткани и о ранней дифференциации эмбриональных тканей в зародышевые листки. Ученые не ожидали, что компонент крови мог перескочить прошедшее в развитии разделение, чтобы сформировать тип ткани, который обычно имеет другое эмбриональное происхождение [2]. Вышеизложенные данные и другие сообщения об образовании сердечной и мышечной ткани после пересадки костного мозга у мышей [3] и развитии нейроноподобных клеток из костного мозга [4] указывают на то, что КСК, в конечном итоге, способны дать начало многочисленным типам клетки, происходящим из всех трех зародышевых листков. В исследовании продемонстрировано, что единичная КСК, пересаженная в облученную мышь, генерирует не только компоненты (из мезодермального слоя эмбриона) крови, но и эпителиальные клетки легких, кишечника (энтодермальный слой) и кожи (эктодермальный слой) [5]. Если КСК по-настоящему мультипотентны, их потенциал для регенеративной терапии, способный спасти жизнь, может значительно расшириться в будущем.

Как взрослые, так и эмбриональные стволовые клетки могут способствовать развитию регенеративной медицины. Эмбриональные стволовые клетки — мультипотентны и легко культивируются в лаборатории. Пересадка костного мозга — это процесс, при котором клиническое применение проходит без глубокого понимания

биологических механизмов, но успех этой методики значительно повысится по мере увеличения понимания этого процесса.

## **8.1. Применение стволовых клеток в эксперименте и клинической практике**

*Трансплантация клеток мозга.* Распознавание и локализация нервных как эмбриональных, так и взрослых стволовых клеток — одна из основных целей исследования в настоящее время. Потенциальные цели для пересадок нервных стволовых клеток: инсульт, повреждение спинного мозга и нейродегенеративные болезни, как, например, болезнь Паркинсона.

До недавнего времени считали, что нервные стволовые клетки являются сугубо эмбриональными. Многочисленными данными доказано, что это не так. Последние исследования свидетельствуют о присутствии стволовых клеток в гипокампе.

*Нервные стволовые клетки человека.* Эти клетки могут быть взяты из разных отделов взрослого мозга, включая височную и фронтальную часть коры, гипокамп, спинной мозг и стенки бокового желудочка [6]. Человеческие ЭСК могут быть взяты из эмбрионов, оставшихся после оплодотворения *in vitro* или из материала выкидыша [7; 8]. Они могут дифференцироваться в электрофизиологически активные нейроны и клетки глии и экспрессируют соответствующие специфические маркеры из этих клеток. Установлено, что эмбриональные нервные стволовые клетки проявляют стабильность при многократном пассаже и, таким образом могут применяться для трансплантации.

В экспериментах по пересадке эмбриональных нервных стволовых клеток человека показано, что они внедряются во все главные части мозга взрослых грызунов и дают начало нейронам, астроцитам и олигодендроцитам [9–11]. Выявлено также, что они идут по путям, обычно используе-

мым эндогенными стволовыми клетками грызуна [10], и принимают участие в нормальном развитии мозга мыши (после пересадки в новорожденную мышь или эмбриональный крысиный мозг) [12]. Примечательно то, что человеческие эмбриональные нервные стволовые клетки активно внедряются в старый крысиный мозг, что приводит к улучшению познавательной функции, предполагая потенциал для их использования в возрастных нарушениях. Интересно, что у грызунов-реципиентов человеческих стволовых клеток меньший трансплантат (приблизительно 200 000 клеток) дает больше нейронных волокон и меньше провоцирует иммунологическое отторжение, чем трансплантат из 2 млн клеток. Установлена также потенциальная дифференцировка фетальных стволовых клеток человека в специфические типы нейронов, что важно для терапии; мезенхимальные предшественники нейронов дифференцировались и дали 1 % допаминэргических нейронов в культурах.

*Пересадка стволовых клеток при болезни Lou Gehrig's.* При этой болезни двигательные нейроны, которые контролируют движение, прогрессивно уничтожаются. Исследователи университета Джона Хопкинса (США) проводили эксперименты с целью выявления способности стволовых клеток восстанавливать нервы и улучшать подвижность крыс путем дифференцировки их в моторные нейроны, чтобы заменить поврежденные, вызывающие паралич крыс, моторные нейроны которых были уничтожены вирусом *sindbis*. Пересаженные ЭСК экспрессировали маркеры нервных стволовых клеток.

*Пересадка стволовых клеток при болезни Паркинсона.* Болезнь Паркинсона вызывает потерю клеток, которые продуцируют нейромедиатор допамин. Первое двойное слепое исследование трансплантатов фетальных клеток при болезни Паркинсона показало их выживаемость, продукцию допамина и функциональное улучшение клинических симптомов. Однако у некоторых больных появились побочные эффекты, которые свидетельствуют о повыше-

нии сенсibilизации или выделении слишком большого количества допамина. Хотя нежелательные побочные эффекты и не предвиделись, успех эксперимента на клеточном уровне достаточно значителен. Свыше 250 больным была трансплантирована ткань плода человека. Необходимы дальнейшие исследования в этом направлении.

*Пересадка стволовых клеток для регенерации кардиомиоцитов.* Замена и регенерация функциональной сердечной мышцы после инфаркта миокарда может быть достигнута путем стимуляции пролиферации зрелых эндогенных кардиомиоцитов или местных стволовых клеток хозяина, или с помощью имплантации СК донора, или аллогенных кардиомиоцитов. Вновь образующиеся кардиомиоциты должны поступать точно в стенку миокарда для того, чтобы увеличить сократительную функцию остаточного миокарда в синхронизированной форме и избежать изменений в электрической проводимости и синхронном сокращении сердца. Иначе потенциально возникают угрожающие жизни последствия.

Установлено, что мышинные ЭСК могут дать начало кардиомиоцитам *in vitro* и *in vivo* [13]. Недавно [14] продемонстрировали, что человеческие ЭСК могут также дифференцироваться *in vitro* в клетки с особенностями кардиомиоцитов. Достоверно доказано, что стволовые клетки мезенхимы, полученные из мультиэффективного костного мозга, обладают способностью дифференцироваться в клетки сердечной мышцы и экспрессируют специфические маркеры, такие как CD34 или CD45.

Независимо от того, получены ли линии кардиомиоцитов из предшественников стволовых клеток из взрослого костного мозга или эмбрионального источника, новые кардиомиоциты, кажется, имеют сходство с нормальными кардиомиоцитами по фенотипу (экспрессия актинина, десмина и тропонина) и функции, включающей позитивное и негативное хронотропное регулирование сократимости фармакологическими агентами и продукцию вазо-

активных факторов, таких как натрийуретические пептиды. Другой подход для замены поврежденного миокарда включает использование аутологических скелетных миобластов. Процедура заключается в выделении скелетных мышечных клеток больного, накоплении клеток в лаборатории и обратном введении клеток в сердце больного. Главное преимущество такого подхода — доступ к источнику клеток. Кроме того, отпадает необходимость супрессии и устраняются нравственные дилеммы, связанные с применением аллогенных и эмбриональных клеток.

**Лечение диабета.** Диабет — это самая распространенная болезнь поджелудочной железы. Она поразила 120 млн людей во всем мире, и их число возрастет в скором времени предположительно до 300 млн. Диабет 1-го типа — это аутоиммунная болезнь, характеризующаяся постепенным уничтожением  $\beta$ -клеток. Диабет 2-го типа, также известный как диабет взрослых, — самая распространенная форма диабета. Она характеризуется недостаточной продукцией инсулина и пониженной чувствительностью клеток к инсулину. Все больные с диабетом 1-го типа должны принимать инсулин, чтобы жить, а многим больным с диабетом 2-го типа помогает лечение инсулином. Однако применение инсулина не вылечивает ни один вид диабета и не препятствует возможным и разрушительным его последствиям: почечной недостаточности, слепоте, повреждению нервов, сердечному приступу, инсульту.

С 1990-х годов было проведено много клинических испытаний с целью лечения диабета 1-го типа путем пересадки островковых клеток, взятых из аллогенного органа донора для того, чтобы заменить эндогенный инсулин, продуцируемый клетками больного. Крупные достижения в этом направлении свидетельствуют о том, что пересадка клеток — многообещающая терапия диабета. Две главные преграды все еще затрудняют повсеместное использование этой формы терапии: потребность в непрерывной иммуносупрессии и серьезная нехватка донорских органов. Чтобы

преодолеть эти ограничения, исследуются несколько подходов, включая генетическую модификацию клеток поджелудочной железы или клеточных линий, или увеличение массы  $\beta$ -клеток *ex vivo*.

**Взрослые стволовые клетки поджелудочной железы.** В нескольких лабораториях исследуется наличие островкового предшественника во взрослом органе. Существует достаточное доказательство присутствия островкового предшественника в поджелудочных протоках, основанное на фактах, что протоки помнят раннюю эмбриональную стадию, когда поджелудочные эндодермальные клетки образуются в протоках.

**Поджелудочно-печеночный переключатель.** Самый замечательный вид пластичности дифференцировки во взрослой поджелудочной железе — это образование поджелудочных гепатоцитов. Когда крысы или хомяки подвергались лечению хронического поражения экзокринной части поджелудочной железы, наблюдалось образование очагов гепатоцитов. Пересадка поджелудочных клеток приводит к увеличению популяции клеток печени и восстановлению метаболических дефектов печени у реципиентов [15].

Недавно в нескольких исследованиях продемонстрировано, что предшественники клеток печени могут дифференцироваться в производящие клетки, продуцирующие инсулин или наоборот. Поджелудочно-печеночный переключатель был продемонстрирован в культурах *in vitro* [16]. Была установлена трансдифференциация поджелудочных клеток в гепатоциты путем индукции дексаметазоном. В дальнейшем эти клетки синтезировали специфические ферменты печени. L. Yang et al. (2002) [17] также показали, что овальные клетки печени могут трансдифференцироваться в функционирующие клетки с продукцией гормона поджелудочной железы после культивирования в среде с высокой концентрацией глюкозы. Продукция инсулина была подтверждена иммуноцитохимически и вестерн-блот-анализом. Эти клетки трансдифференцировались в организме животных, у которых вызывали появление

стрептозотоцинового диабета. Животным вводили 200 островковоподобных кластеров. В пользу этих результатов свидетельствует известный факт, что печень и поджелудочная железа развиваются из единой эндодермы.

*Пересадка стволовых клеток печени и ее возможности в лечении болезней печени.* Успех пересадки целой или части печени в лечении острого и хронического гепатита и обменных болезней печени повысил частоту выживаемости этих больных. Запас трупных донорских органов остался прежним, тогда как потребность в пересадке печени возрастает. Принимая во внимание эту ситуацию, многие исследователи начали производить пересадку изолированных гепатоцитов как дополнение или альтернативу к пересадке органа при острых, хронических и наследственных обменных болезнях печени. Этот подход имеет несколько преимуществ по сравнению с пересадкой органа: во-первых, это менее инвазивный метод, не требующий хирургического мастерства; во-вторых, изолированные клетки могут быть подвержены консервации, что может использоваться в непредвиденных случаях. В последнем десятилетии много центров начали эту программу, подтверждая данные безопасности и реальности этой терапии при различных болезнях печени.

М. Mito и М. Kusano (1993) [18] первыми сообщили о пересадке гепатоцитов в селезенку больных циррозом. Эта работа была поворотным пунктом в клиническом применении пересадки гепатоцитов. За этим последовала работа нашего центра (1994), где семи больным с острой печеночной недостаточностью (ОПН) внутрибрюшинно были введены эмбриональные гепатоциты человека. Результаты показали повышение частоты выживания этих больных. В другом сообщении было показано явное улучшение в клиническом состоянии больных с ОПН после интрапортальной трансфузии гепатоцитов. Пересадка гепатоцитов также показала удивительное улучшение при наследственных метаболических заболеваниях. В испыта-

нии 1998 г., которое было поворотным пунктом, сообщалось, что ребенок с синдромом Криглера — Найра 1-го типа, страдающий опасной для жизни гипербилирубинемией, получил  $7,5 \cdot 10^9$  донорских аллогенных гепатоцитов путем вливания через катетер в портальную вену. Эта процедура привела к снижению уровня билирубина сыворотки. Клиническое улучшение наблюдалось также у 5-летнего ребенка с нарушением цикла мочевины, дефициту орнитинтранскарбамилазы, которому ввели миллиард гепатоцитов.

Несмотря на первоначальный успех клинических испытаний, предпринятых в различных центрах, было два фактора ограничения для применения этой терапии в регулярной клинической практике лечения болезней печени. Во-первых, успех пересадки зрелых гепатоцитов требует большого количества клеток (приблизительно 20 млрд) в лечении ОПН. Во-вторых, вследствие того, что зрелые гепатоциты чрезвычайно дифференцированные клетки, пролиферирующая способность их очень медленная.

*Рак и другие заболевания.* Взрослые стволовые клетки успешно использовались в клинических испытаниях при следующих заболеваниях: рак, опухоли мозга, ретинобластома, рак яичников, рак яичек, множественная миелома, лейкемии, рак молочной железы, нейробластома, неходжкинская лимфома и почечная клеточная карцинома.

Стволовые клетки можно выделить у конкретного больного, который нуждается в лечении. К этим методам относятся: перенос гена с помощью вирусов, электропорация, нуклеофекция и перенос гена с использованием липосом и нуклеосом.

Средства трансфекции могут быть постоянными или временными. После систематического введения в организм больного, модифицированные стволовые клетки возвращаются в соответствующее место и начинают продуцировать недостающий белок либо замещают поврежденный тип клеток.

## 8.2. Лечение с использованием стволовых клеток — уровень клинического применения в настоящее время

Несмотря на ранние этапы развития, исследование стволовых клеток — наиболее острая тема в биологии из-за ожидания прорыва в медицине как развитых, так и развивающихся стран. Время от времени в СМИ появляются заголовки, освещающие чудеса излечения при применении стволовых клеток в неизлечимых случаях. Это одна из многообещающих отраслей биотехнологии, обеспечивающая «регенеративной медицине» материал для восстановления или замещения тканей и клеток вместо поврежденных при травмах или заболеваниях, таких как болезни сердца, печени, паралич, повреждения спинного мозга, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, дегенерация сетчатки, мышечная дистрофия, сахарный диабет и т. п. Кроме того, возможно его успешное использование для лечения таких инфекционных заболеваний, как ВИЧ/СПИД, когда наблюдается значительная потеря клеток. Исследования стволовых клеток важны как для теоретической, так и для практической медицины. Знания дифференцировки и роста клеток очень важны для понимания развития болезни и разработки более эффективных и безопасных лекарственных средств. Ученые интенсивно изучают основные свойства стволовых клеток.

По уровню развития их можно классифицировать на две основные группы: эмбриональные стволовые клетки и взрослые стволовые клетки. Эмбриональные стволовые клетки — это плюрипотентные клетки (табл. 8.1), полученные из внутреннего слоя клеток эмбриона млекопитающих периода бластоцисты. Плюрипотентные клетки — это клетки, способные давать начало большинству тканей организма,

включая зародышевые клетки во время развития. Эмбриональные стволовые клетки человека были изолированы в 1998 г. [1]. Как и для эмбриональных стволовых клеток мышей, была доказана способность сохранять пластичность, то есть возможность дифференцироваться в некоторые соматические или подобные соматическим функциональные клетки, такие как нейроны, гепатоциты, кардиомиоциты и другие. Многообещающая природа эмбриональных стволовых клеток и их удивительная способность становиться клетками любого другого типа обусловили быстрый прогресс и перспективное лечение в лабораторных экспериментах и на животных (табл. 8.2). Линии эмбриональных стволовых клеток и человека, и мыши свободно выращиваются *in vitro* при соблюдении соответствующих условий (табл. 8.3).

Единственный потенциальный источник стволовых клеток — ранняя зародышевая ткань, полученная в период эмбрионального развития. Эмбриональные клетки, выделенные из человеческого абортивного материала, имеют схожие свойства со стволовыми клетками, полученными из внутреннего клеточного слоя бластоцисты. Эмбриональные стволовые клетки — это примитивные типы клеток зародыша, развивающиеся в различные органы тела; но исследования эмбриональной ткани были ограничены только несколькими типами клеток: гепатоцитами, клетками нервного гребня, стволовыми клетками гемопоэза и клетками-предшественниками островков поджелудочной железы.

*Взрослые стволовые клетки.* Наряду с изучением ЭСК человека, проводились также исследования взрослых стволовых клеток во многих академических и биотехнических лабораториях. Взрослые стволовые клетки биологически многосторонние и способны развить гораздо больше клеточных функций, чем предполагали ранее. Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга обладают способностью сформировать не только кость и хрящ, но и мышцу, сухожилие, подкожную клетчатку и строму, паутинообразную матрицу тка-

Таблица 8.1

Типы стволовых клеток

Тип клеток	Определение	Традиционные примеры
Тотипотентные	Стволовые клетки, способные сформировать целостный организм человека	Стволовые клетки оплодотворенной яйцеклетки
Плюрипотентные	Стволовые клетки, способные развиваться в любой тип клеток тела, но не могущие сформировать целый организм человека	Стволовые клетки 7-дневного эмбриона или бластоцисты
Мультипотентные	Стволовые клетки, способные дифференцироваться только в тот же тип ткани	Стволовые клетки костного мозга могут дифференцироваться только в другой тип клеток костного мозга, но не в клетки почки, сердца, мышцы или мозга
Унипотентные	Клетки могут продуцировать только один тип клеток, но способные к самообновлению, что и отличает их от нестволовых клеток	

Таблица 8.2

Доклинические исследования применения эмбриональных клеток для лечения различных заболеваний

Модель заболевания	Основные нарушения	Примененное лечение	Экспериментальные животные	Клинический эффект	Ожидаемые результаты в клинике
1. Гемофилия	Кровь не сворачивается	Инфузия факторов свертывания	Мыши	Восстановление свертываемости крови	Пациенты с гемофилией
2. Болезнь Лу Герига	Повреждение спинного мозга или заболевание мотонейронов		Парализованные мыши	Восстановление способности к движению	Восстановление движений у пациентов с болезнью Лу Герига
3. Множественный склероз	Повреждение защитного слоя нервов (миелиновой оболочки)		Мыши	Восстановление миелиновой оболочки	Улучшение здоровья при нарушениях в нервной системе
4. Болезнь Паркинсона	Потеря двигательной функции		Крысы	Возможность улучшения двигательной функции	Лечение пациентов с болезнью Паркинсона
5. Диабет	Потеря продукции инсулина	Инсулиновые инъекции	Мыши	Возможность нормализации обмена веществ	Источник инсулинсинтезирующей заместительной ткани

Таблица 8.3

Линии эмбриональных стволовых клеток

Название	Номер клеточной линии
BresaGen, Inc., Athens, Georgia	4
CyThera, inc., San Diego, California	9
Karolinska Institute, Stockholm, Sweden	5
Monash University, Melbourne, Australia	6
National Centre for Biological Sciences, Bangalore, India	3
Reliance Life Sciences, Mumbai, India	7
Technion-Israel Institute of Technology, Haifa, Israel	4
University of California, San Francisco, California	2
Geteborg University, Geteborg, Sweden	19
Wisconsin Alumni Research Foundation, Madison, Wisconsin	5

ни внутри костей. У мышей пересаженные стволовые клетки, взятые из костного мозга, могут мигрировать в мозг и развиваться в клетки с особенностями нейронов и клетки мозга других типов.

Фетальные стволовые клетки являются простыми типами клеток плода, которые, в конечном счете, развиваются в различные органы тела, но исследования фетальных тканей пока ограничены лишь несколькими типами клеток: нервными стволовыми клетками, включая нервные клетки гребня; кроветворными стволовыми клетками и предшественниками панкреатических островков. Нервные стволовые клетки, которых очень много в эмбриональном мозге, могут изолироваться и выращиваться в недифференцированные формы в культуре, и было показано, как они дифференцируются в три главных вида клеток мозга. Эти клетки использовались при моделировании болезни Паркинсона у грызунов. Нервные клетки гребня происходят из нервной трубки и мигрируют

из нее по всему развивающемуся плоду. Они способны развиваться в многочисленные типы клеток, включая нервы, которые иннервируют сердце и кишечник, нервные клетки гормональных желез, пигментные клетки кожи, хрящ, лицевую и черепную кость и соединительную ткань во многих частях тела. Клетки нервного гребня мышей были культивированы в лаборатории.

Печень и кровь эмбриона — это богатые источники кроветворных стволовых клеток, которые ответственны за генерацию многочисленных типов клеток крови, но их свойства не были исследованы. Не будучи частью плода, пуповина и плацента — это также богатые источники кроветворных стволовых клеток. Было показано, что ткань, извлеченная из эмбриональной поджелудочной железы, стимулирует выработку инсулина при пересадке мышам с диабетом, но не ясно, связано ли это с истинной стволовой клеткой, более зрелой клеткой-предшественником или с наличием полностью зрелых клеток панкреатических островков, вырабатывающих инсулин.

### 8.3. Потенциальное клиническое применение: заболевания зрелого возраста

*Стволовые клетки печени.* Утверждение о существовании стволовых клеток в печени взрослых было выдвинуто более 40 лет назад Wilson и Leduc и обсуждалось на протяжении многих лет. Оно базировалось на исследованиях (проведенных на грызунах), которые показали, что клетки дистальных холангиол желчных протоков обеспечивали восстановление печеночной паренхимы после алиментарных повреждений. Активация этих систем дремлющих стволовых клеток для регенерации печени происходит, когда оставшиеся гепатоциты функционально не способны к делению. Во

многих исследованиях показано, что эпителиальные клетки канальцев Геринга, вероятнее всего, являются оставшимися взрослыми стволовыми клетками печени. Существование мелких недифференцированных эпителиальных клеток в печени было открыто Фарбером при изучении действия таких канцерогенов, как этионин, 2-ацетиламинофлуорен (2-ААФ) и 3-метил-4-диметиламинобензен.

Невозможность изоляции печеночных клеток-предшественников из человеческого материала — главное препятствие для клинического применения этой терапии. Недавно печеночные клетки-предшественники были изолированы из двух источников: печень трупа, абортивный материал.

Печень, извлеченная из трупа и по какой-то причине не подходящая для трансплантации, — один из источников печеночных клеток-предшественников [18]. Эмбриональные клетки печени в большинстве диплоидные, но при созревании превращаются в полиплоидные гепатоциты, что уменьшает клеточную пролиферацию и в конечном итоге приводит к старению. Клетки-предшественники из печени зародыша могут генерировать и в гепатоциты, и в клетки желчных путей. Таким образом, печень человеческого эмбриона в перспективе — альтернативный источник стволовых клеток-предшественников.

В настоящее время развивается новое клиническое направление в применении стволовых клеток с целью лечения острых и хронических заболеваний печени и различных врожденных нарушений обмена веществ. Об этом более подробно мы будем говорить ниже.

*Стволовые гемопоэтические клетки* — взрослые стволовые клетки, находящиеся, в основном, в костном мозге. Это первые стволовые клетки, которые были успешно применены в терапии. Гемопоэтические стволовые клетки на протяжении десятилетий применяются для лечения опухолей системы крови (к примеру, лейкемии) и других заболеваний. Гемопоэтические стволовые клетки имеют потенциал к продуцированию не только клеток крови, но

и клеток других типов. Стволовые клетки, полученные из костного мозга, были способны к формированию *in vitro* нервной ткани, одна взрослая стволовая клетка костного мозга способна к участию в формировании различных тканей, таких как костный мозг, печень, мозг, сердце, кожа и пищеварительный тракт [2; 3].

Некоторые исследования показали способность этих взрослых стволовых клеток принимать участие в регенерации тканей сердца и улучшать работу поврежденного сердца. В экспериментах на животных, например крысах и мышах, и человеческих стволовых клетках была установлена их интеграция в ткани сердца, формирование кардиомиоцитов и/или кровеносных сосудов сердца, а также регенерация тканей сердца после инфаркта и улучшение функции сердца. Начаты исследования на больных с использованием мононуклеарных клеток костного мозга при инфаркте миокарда, кардиомиопатии, повреждениях спинного мозга, церебральной дисплазии мотонейронов, мышечной дистрофии, ишемии конечностей, при диабете [4].

*Мезенхимальные стволовые клетки* — другая хорошо изученная популяция взрослых стволовых клеток. Эти клетки также обнаружены в костном мозге и способны к продуцированию не только клеток крови, но и других клеток. Они могут быть получены в количествах, достаточных для клинических исследований, поэтому являются обнадеживающими кандидатами для применения в восстановлении тканей. Некоторые исследования при применении мезенхимальных стволовых клеток на экспериментальных моделях животных свидетельствуют об их способности к реконструкции различных поврежденных тканей: хрящевой, костной, мышечной, сухожилия и сердечной мышцы, что указывает на перспективы применения таких клеток у людей.

*Стволовые клетки пуповинной крови.* Увеличивается интерес к применению стволовых клеток пуповинной крови для лечения серповидно-клеточной анемии, поскольку эти клетки были признаны по-

лезным источником гемопоэтических трансплантатов, схожих с трансплантатами стволовых клеток костного мозга. Для снижения возможности отторжения трансплантатов кровяных стволовых клеток пуповинной крови необходимо уменьшить экспрессию бета-2-микроглобулина в этих клетках. Пуповинная кровь может быть криоконсервирована на многие годы и сохраняет значительный функциональный потенциал. Стволовые клетки пуповинной крови также схожи со стволовыми клетками костного мозга в их потенциале к дифференцировке в клетки других типов тканей. Стволовые клетки пуповинной крови могут экспрессировать маркеры нейронов *in vitro*, и внутривенное введение крови пуповины животным с моделями паралича привело к функциональному выздоровлению животных с экспериментальным параличом. Инфузия кровяных стволовых клеток пуповинной крови человека была успешной в терапии повреждений спинного мозга крыс и мышей линии ALS. Некоторые работы указывают также на образование функциональных клеток печени из кровяных стволовых клеток пуповинной крови человека.

*Стволовые клетки при сердечных заболеваниях.* Исследования на крысах, мышах и людях показали интеграцию стволовых клеток в ткани сердца, формирование кардиомиоцитов и/или кровеносных сосудов сердца, регенерацию его тканей после инфаркта и улучшение функции сердца. Инфузии стволовых клеток из костного мозга старым мышам восстанавливали функ-

цию сердца, очевидно, из-за увеличения работы кровеносных сосудов этого органа. Посмертные исследования на людях показали, что стволовые клетки из костного мозга могут превращаться в кардиомиоциты после повреждений сердечной мышцы [14]. Отдельные группы исследователей применяли стволовые клетки из костного мозга для лечения пациентов с повреждениями тканей сердца (таблица 8.4). В некоторых центрах успешно проведена терапия клетками сердца пациентам с сердечным приступом или закупоркой артерий (табл. 8.5).

*Стволовые клетки при нервных болезнях.* Многие нервные болезни — это результат потери нервных клеток. Зрелые нервные клетки не способны к делению, чтобы заменить клетки, потерянные при таких заболеваниях, как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, амиотрофический боковой склероз, повреждение спинного мозга и паралич. Единственная надежда в лечении таких пациентов исходит из потенциала плюрипотентных стволовых клеток к созданию новой нервной ткани и восстановлению функции. Исследования в экспериментах на животных с трансплантацией им указанных стволовых клеток свидетельствуют о больших перспективах в данном направлении [11; 19].

Стволовые клетки при сахарном диабете. Сахарный диабет 1-го типа — это аутоиммунное заболевание, характеризующееся деструкцией инсулинсинтезирующих клеток поджелудочной железы. Текущие попытки лечения этих пациентов с помощью трансплантации островков поджелу-

Таблица 8.4

**Исследование трансдифференцировки BMSCS в кардиомиоциты [14]**

Показатели	Результаты
Общее число исследований трансдифференцировки в кардиомиоциты	18
Статус клеток в трансплантате	В 17 случаях стволовые клетки и в 1 — кардиомиоциты
Улучшение функции сердца	В 12 случаях не определялось, в 6 — улучшение наблюдалось специальными методами
Ангиогенез	В 12 случаях не определялся, в 6 — улучшение наблюдалось специальными методами

Таблица 8.5

## Исследование применения стволовых клеток в лечении заболеваний сердца

Координационный центр	Заболевание	Количество наблюдений	Статус
Univ. of Dusseldorf	Сердечный приступ	60	Закончен
Univ. of Frankfurt	Разрыв сердца	200	Продолжается
Univ. Clinic, Hanover	Сердечный приступ	60	Продолжается
Hospital European Georges Pompidou	Сердечный приступ	300	Продолжается
Seoul national Univ. Hospital	Сердечный приступ	11	Приостановлен
St. Elizabeth's Medical Centre, Boston	Закупорка артерий	24	Продолжается
BioHeart Inc, Weston, Florida	Разрыв сердца	15	Продолжается
Texas Heart Institute, Houston	Закупорка артерий /разрыв сердца	30	Продолжается

дочной железы человека с целью восстановления инсулиносекреторной функции ограничены нехваткой доноров и токсичностью иммуносупрессивных препаратов, применяемых для предотвращения полному отторжению трансплантата. Плюрипотентные стволовые клетки, направленные на дифференцировку в бета-клетки поджелудочной железы, могут превзойти нехватку терапевтически эффективного материала для трансплантации. Трансплантация трансдифференцированных инсулинсинтезирующих клеток хорошо демонстрируется на различных животных моделях. Начаты клинические испытания по введению моноклеарных клеток костного мозга через гастродуоденальную артерию в поджелудочную железу.

*Стволовые клетки при заболеваниях костной и хрящевой ткани.* Стволовые клетки, дифференцировавшись соответственно, могут излечить многие болезни и дегенеративные состояния, при которых наблюдается уменьшение числа или нарушение функционирования костных или хрящевых клеток. Возникает перспектива лечения таких генетических нарушений, как пороки остеогенеза или хондродисплазии. Соответственно, клетки могут быть культивированы и введены в поврежденные участки суставных хрящей в случаях остеоартрита или большие трещины костей после переломов или оперативных вмешательств.

*Стволовые клетки при ишемии конечностей.* Хроническая артериальная окклюзия обычно наблюдается на нижних конечностях, реже на верхних, и сокращает ток крови в конечности при нагрузке и в покое. Начаты испытания по аутологичной трансплантации стволовых клеток костного мозга пациентам с ишемией конечностей, что может привести к неоваскуляризации.

*Стволовые клетки и доклинические исследования метаболизма лекарств.* Стволовые клетки — источник генерации нормальных клеток человека, которыми можно генетически или фармакологически управлять и изучать для создания лекарств. Ученые получают возможность экспериментального изучения при тщательно контролируемых условиях роста и развития многих различных типов человеческих клеток, что важно для таких заболеваний, как рак, диабет, паралич, сердечные заболевания и т. п.

#### 8.4. От пересадки гепатоцитов до стволовых клеток печени: новая стратегия лечения заболевания печени

Печень — центральный орган обмена веществ, регулирующий обеспечение орга-

низма энергией, секретирующий ряд необходимых веществ и очищающий его внутреннюю среду различными путями, включая рециркуляцию, инактивацию и экскрецию. Серьезная потеря печени присущих ей функций вызывает глубокую нестабильность обмена веществ и нарушение таких жизненно важных показателей, как кислотно-щелочной баланс и терморегуляция, что ведет к ОПН. Если эти изменения не будут купированы в краткие сроки, возникают такие осложнения, как неконтролируемое кровотечение. Начинается также нарушение функции зависимых органов (мозга, почек), что уменьшает шансы на выздоровление в дальнейшем.

Сегодня ортотопическая трансплантация печени (ОТП) — единственный метод лечения, повышающий выживаемость пациентов с ОПН. Появление различных иммуносупрессорных препаратов повысило успешность этой процедуры, так как предотвращается отторжение трансплантата. Однако основным ограничением остается недостаток донорских органов. Для обеспечения временной поддержки печени, пока не появится подходящий орган, используются два подхода:

1. Пересадка гепатоцитов.
2. Экстракорпоральная система поддержки печени.

Эти подходы продемонстрировали свою эффективность в доклинических и клинических исследованиях.

*Трансплантация гепатоцитов на экспериментальных моделях ОПН.* Эффективность трансплантации гепатоцитов была изучена на нескольких экспериментальных моделях животных. Чаще всего используют модели галактозамин-индуцированной печеночной недостаточности у крыс, кроликов, морских свинок и собак [9; 20–24] и тиоацетамид-индуцированной печеночной недостаточности — у кроликов и крыс [25–29]. В этих экспериментах трансплантация гепатоцитов приводила к выживаемости более чем 60 % подопытных животных [30–33]. Из различных подходов (внутрипортально, внутриселезеночно, внутрибрюшинно), используемых для

трансплантации, внутрибрюшинное введение наиболее благоприятно ввиду большого количества клеток, необходимого для поддержки пораженной печени. Мы пересаживали  $60 \cdot 10^6$  клеток на 1 кг массы тела (D-галактозамин-индуцированная ОПН у животных) и получили 60%-ю выживаемость при отсутствии таковой у животных контрольной группы, не получавших лечения [34].

*Трансплантация гепатоцитов пациентам с острой и хронической печеночной недостаточностью.* Основываясь на доклинических данных, в различных медицинских центрах начались клинические испытания. M. Mito и M. Kusano (1993) [18] первыми попытались провести трансплантацию гепатоцитов пациентам с циррозом печени. Гепатоциты были изолированы из долек циррозной печени пациентов и трансплантированы путем инъекции в пульпу селезенки, селезеночную артерию, селезеночную вену, воротную вену. Хотя инъекции хорошо переносились и наблюдались некоторые очевидные улучшения состояния мозга, синтеза белка и функции почек, окончательный клинический результат заметно не изменился. Тем не менее, эти исследования были вехой для внедрения трансплантации гепатоцитов в клиническую практику. За ним последовало сообщение, когда семи больным с острой печеночной недостаточностью интраперитонеально были введены эмбриональные гепатоциты [35].

Мы осуществили сингенную трансплантацию гепатоцитов пациентам с ОПН, используя человеческие эмбриональные гепатоциты. Семь пациентов с ОПН продолжительностью менее 2 нед и печеночной энцефалопатией III–IV степени, без осложняющих общих заболеваний, подверглись трансплантации гепатоцитов. Предварительные результаты показывают эффективность пересадки гепатоцитов для таких пациентов. Эти позитивные эффекты могут быть связаны с улучшением метаболической и детоксикационной функций. Трансплантированные гепатоциты могут также пролиферировать под влиянием

ем гепатотропных факторов, тем самым увеличивая свою общую метаболическую и детоксикационную способность. Любая из этих поддерживающих функций устраняла повреждения печени реципиента и помогала ей регенерировать. S. C. Storm et al. (1997) [36] сообщили об успешном ведении 3 из 5 пациентов до ОТП с помощью трансплантации гепатоцитов. У троих из пяти пациентов в данном исследовании была острая декомпенсация хронической печеночной недостаточности. H. E. Sorino et al. (1997) [37] лечили троих пациентов инфузией гепатоцитов через портальную вену. Из трех больных только один оказался восприимчивым к терапии. В другом исследовании [38] вводили изолированные гепатоциты в портальную вену с помощью трансъюгулярной катетеризации. Ни один из пяти пациентов с ОПН не прожил длительный период времени.

Недавно в нашем центре была проведена интраперитонеальная трансплантация гепатоцитов 26-летней беременной пациентке с острой печеночной недостаточностью и ожирением печени. Пациентка выздоровела через два дня после пересадки [39].

*Трансплантация гепатоцитов при болезнях обмена веществ.* Пересадка гепатоцитов в печень ведет к коррекции заболевания. В исследовании, результаты которого были опубликованы в 1998 г., ребенку с синдромом Криглера – Наяра типа 1, страдающему от опасной для жизни гипербилирубинемии, было введено  $7,5 \cdot 10^9$  аллогенных донорских гепатоцитов путем инфузии через катетер в портальную вену. В результате снижался уровень билирубина в сыворотке крови. Точно так же пятилетнему пациенту с нарушением обмена мочевины и дефицитом орнитин-карбамоилтрансферазы был введен миллиард гепатоцитов и отмечалось клиническое улучшение [40]. Недавно четырехлетнему пациенту с синдромом Рефсума была проведена трансплантация гепатоцитов, которая привела к замещению аномальных желчных кислот гликохолевой кислотой до 60 % от их уровня до трансплантации. Ре-

бенок мог стоять и ходить в течение 6 мес после трансплантации гепатоцитов [41].

*Экстракорпоральная искусственная система поддержания печени (ЭИСПП).* Чтобы обеспечить временную поддержку печени до тех пор, пока не появится подходящий орган для трансплантации, многими исследователями использовались различные временные системы, которые включали обменное переливание крови, гемодиализ, гемоперфузию через древесный уголь, перекрестное кровообращение и системы поддержки с использованием целой экстракорпоральной печени [42]. Результаты применения этих небиологических систем поддержки были не такими уж обнадеживающими, так как они основывались главным образом на детоксикации, а не на метаболических или синтетических функциях. Биореакторы, содержащие биологические компоненты в синтетической сетке, имеют ряд преимуществ перед небиологическими системами поддержки. Например, ЭИСПП обеспечивает более широкий диапазон специализированных функций печени. Главное преимущество ЭИСПП состоит в том, что полупроницаемый материал защищает гепатоциты от иммунной системы пациента, предотвращая отторжение. Биореактор состоит из пучка полых волокон, формирующих два отделения — клеточное и плазменное. Для создания трехмерной конфигурации для прилипающих клеток были разработаны биореакторы из соосных полых волокон. Они состоят из четырех трубочек увеличивающегося диаметра, вставленных одна в другую, и создают четыре пространственно отделенных друг от друга отделения. Ацинарная система и физиологические параметры печени имитируются прослоечными клетками в промежутке между двумя наиболее внутренними полупроницаемыми трубочками, создающими радиальный ток от наружного отделения через клеточное в самое внутреннее отделение. Самое наружное отделение сделано из газопроницаемых трубочек и используется для оксигенации протекающей жидкости до перипортального уровня ЕСС. Соосный

биореактор из полого волокна оказался в 4 раза эффективней, чем обычный биореактор из волокна по производству антител на единицу глюкозы [43]. Начальные исследования изолированных гепатоцитов крысы, поддерживаемых в соосном биореакторе, показали, что если расстояние между концентрическими волокнами (трубочками) больше 200 нм, то изготовленные и испытанные на моделях ОПН малых (грызуны, кролики) и больших (свиньи, собаки) животных образцы цилиндрических биореакторов дали обнадеживающие результаты [42–54]. Эти экспериментальные исследования подтвердили не только хорошие метаболические функции устройства, но и улучшение гемодинамической стабильности, ослабление энцефалопатии и, что наиболее важно, повышение выживаемости пациентов с острой и хронической печеночной недостаточностью. Положительные экспериментальные результаты оправдывают исследования и разработку устройства, пригодного для испытания на человеке. Некоторые образцы искусственной печени с инкапсулированными гепатоцитами и сывороткой пациентов уже проходят клиническое испытание.

*Клеточный компонент.* Печеночные клетки — главный компонент развития любого ЭИСПП. Примерно  $25 \cdot 10^9$  гепатоцитов необходимо для обеспечения адекватной искусственной системы поддержки печени у пациента с ОПН [44]. Чтобы получить такое большое количество гепатоцитов, было испытано несколько источников, а именно измененные (трансформированные) клеточные линии гепатоцита, культивированные гепатоциты и свежееизолированные гепатоциты. Преимущество клеточной линии заключается в способности неограниченно поддерживать рост клетки, что невозможно в первичной культуре клетки печени. Однако изменение генной экспрессии в культуральных условиях может вызвать проблемы [45]. Использование недавно изолированных гепатоцитов, оказывается, имеет практический выход в получении большого количества жизнеспособных клеток. Первич-

ные человеческие гепатоциты можно взять из хирургических образцов, при биопсии или из имплантатов печени; однако их количество недостаточно. Таким образом, большинство групп исследователей использовало гепатоциты из других видов (источников), чаще всего из клеток свиней. Метаболические, детоксикационные и синтетические функции свиных печеночных клеток были достаточно хорошо изучены. Прямой контакт свиных гепатоцитов с человеческой сывороткой вызывает цитоллиз клеток, который устанавливается с помощью заранее сформированных комплементзависимых антител (IgM/IgG), направленных против alpha-gal эпитопа, присутствовавшего на этих клетках. Было установлено, что инкапсуляция этих гепатоцитов в альгинатную поли-1-лизин-мембрану обеспечивает защиту против такого повреждения [54].

Следовательно, применение микроинкапсулированных клеток печени в биореакторном модуле обеспечивает путь для использования ксеногенных гепатоцитов. Недавно мы инкапсулировали печеночные клетки коз в альгинатную поли-1-лизин-мембрану с целью создания идеального ЭИСПП устройства и подтвердили изоляцию от иммунного воздействия, обеспеченную инкапсуляцией гепатоцитов, а также оценили полный модуль биореактора, используя эти инкапсулированные гепатоциты, а кроме того, показали его способность детоксифицировать аммиак в моче [55].

*Иммунomodификация гепатоцитов.* Ксеногенный источник гепатоцитов предлагает использование свежееизолированных гепатоцитов для развития ЭИСПП и изолированной трансплантации гепатоцитов. Чтобы преодолеть эти ограничения, использовали два метода, а именно:

- 1) ультрафиолетовое облучение;
- 2) микроинкапсулирование в альгиновой кислоте поли-1-лизин-мембраны.

*Ультрафиолетовое облучение.* Изолированные гепатоциты крысы были облучены в различных дозах (400 Jm-2, 800 Jm-2 и 1000 Jm-2). Клетки тестировались на активность лактатдегидрогеназы,

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-АТФазы и орнитининкарбамиловой трансферазы (ОКТ) и способность продуцировать мочевину. Активность лактатдегидрогеназы и Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-АТФаз была значительно снижена во всех облученных группах (P<0,001), ОКТ и выработка объема мочевины не изменялись.

Ультрафиолетовое облучение появилось как способ воздействия для получения иммуномодулирующего эффекта. Оно полезно, так как меняет свойства клеточной поверхности и снижает иммуногенность трансплантатов в естественных условиях, в то же время экономит функцию специализированных клеток. Ксеногенная трансплантация гепатоцитов, облученных ультрафиолетом в индуцированной лекарственным препаратом модели ОПН у животных, показала 60%-ю выживаемость леченных животных по сравнению с 23%-й у нелеченных животных [24]. Никаких существенных изменений в клеточной и гуморальной иммунной ответной реакции у животных, которым вводили облученные ультрафиолетом ксеногенные клетки печени, не наблюдалось [34].

*Роль ксеноантител против галакто сильного (alpha-gal) эпитопа при НАР.* Гал-эпитоп вырабатывается в большом количестве в плаценте приматов млекопитающих, у приматов и современных обезьян (кроме обезьян Старого Света) или человека [56]. Анти-гал-антитела вырабатываются в большом количестве у людей и обезьян (в том числе обезьян Старого Света). Эти ксеноантитела узнают гал-эпитопы и взаимодействуют с ними в результате активности  $\alpha$ -1-3 р 1-4 GlcNac-R — терминального дисахарида на гликопротеинах и гликолипидах [24; 56–58]. Гал-эпитоп формируется вследствие активности  $\alpha$ -(1-3)-галактозилтрансферазы. Отсутствие такого фермента приводит к тому, что гал-эпитоп у людей, обезьян и обезьян Старого Света не экспрессируется. Взаимодействие гал-антител с клетками, несущими гал-эпитоп, приводит к лизису этих клеток. Было предложено несколько стратегий устранения вклада альфа-гал-антител в лизис клеток. Они включа-

ют очищение либо с помощью неспецифического плазмафереза, либо с помощью специфической иммуносорбции. Другие методы основаны на очищении или элиминировании гал-эпитопа донора [59]. Инактивация *GalT* гена имеет потенциальное преимущество над устранением лизирующего действия альфа-гал-антител лизиса клеток. Однако было доказано, что делеция гал-эпитопа может быть летальной. Применение иммуноизоляционных технологий для предотвращения сенсбилизации реципиента по отношению к имплантированным клеткам — это возможный подход, направленный против отторжения ксенотрансплантата. В нашем недавнем исследовании продемонстрировано, что микроинкапсуляция свинных клеток в альгинатную поли-1-лизин-мембрану обеспечивает защиту от ксеноактивных антител против  $\alpha$ -галактозил эпитопа [60].

*Ксеногенная трансплантация микроинкапсулированных гепатоцитов крысы на моделях ОПН у животных.* Гепатоциты являются фиксированными клетками, от чего зависят их функции и длительность выживания. Различные субстраты и скелеты использовались, чтобы зафиксировать клетки. Продемонстрировали длительную выживаемость микроносителя, удерживающего гепатоциты крысы, при аллогенной внутрибрюшинной трансплантации. Эти клетки были сформированы в конгломераты — около поджелудочной железы. Световая и электронная микроскопия выявляла жизнеспособные и морфологически неповрежденные клетки до 60 дней после трансплантации. Микроинкапсуляционная техника успешно используется для различных типов клеток с целью обеспечения субстратом длительного выживания и иммунозащиты иммобилизованных имплантированных клеток. Клетки печени крысы были инкапсулированы в альгинатные поли-1-лизин-мембраны и пересажены в брюшную полость кроликам. Мы изучили эффект внутрибрюшинного применения инкапсулированных и неинкапсулированных ксеногенных гепатоцитов внутрибрюшинно на D-галактозаминовой модели

гепатоцита животных. Все животные, которые не получили гепатоциты, погибли в течение 36 ч. У животных, которым вводили инкапсулированные гепатоциты, выживаемость была выше (73 %;  $P < 0,001$ ), тогда как только 25 % из тех, которые получили неинкапсулированные гепатоциты, выжили. Было обнаружено, что при выживаемости животных пересаженные капсулы были интактными даже спустя 60 дней после трансплантации, более 75–80 % жизнеспособных клеток имели нормальную способность вырабатывать мочевину. Это доказывает, что микроинкапсулирование является эффективным для поддержания функциональной активности и предотвращения иммунного разрушения пересаженных гепатоцитов.

*Локализация и функция внутриселезеночнопересаженных изогенных гепатоцитов при острой печеночной недостаточности, индуцированной CCL4, у мышей.* Внутриселезеночный участок — один из главных благоприятных эктопических участков для выживания пересаженных гепатоцитов. Ранее опубликованные работы показали, что более 40 % внутриселезеночно пересаженных гепатоцитов мигрируют в печень. Эти гепатоциты были идентифицированы с помощью периодического Шифф-окрашивания и исследовались FISH-технологией с использованием Y-хромосомной метки [61]. Четко отличающаяся пересаженные клетки от клеток реципиента, FISH-технология показала, что большинство экзогенно пересаженных клеток было обнаружено в печени и селезенке даже спустя 1 нед после введения этих гепатоцитов. Пересаженные клетки перемещались, главным образом, в синусоиды печени. Семьдесят процентов изогенных взрослых самок мышей линии Swiss, которым произвели внутриселезеночную трансплантацию изогенных гепатоцитов самцов, выживали на протяжении 2-недельного периода исследования, в то же время ни одно животное из контрольной группы не выжило.

*Стволовые клетки печени.* С момента открытия эмбриональных стволовых кле-

ток Дж. Томсоном [62] технология ЭСК привела к революции во всей цитобиологии. Кроме ЭСК, органы содержат определенные взрослые стволовые клетки, имеют некоторую степень самовосстановления и определенный уровень пластичности. Это вселяет надежду на излечение различных болезней и открывает новое направление — регенеративную медицину.

*Наличие и регенерация стволовых клеток печени.* Наличие стволовых клеток во взрослой печени обсуждалось много лет, что постулировали первоначально еще более 40 лет назад I. W. Wilson и E. H. Leduc [63]. Оно основывалось на данных исследований, проведенных на грызунах. Как оказалось, клетки дистальных холангиол желчных протоков отвечали за восстановление массы печени после алиментарного поражения. В течение экспериментов установлено, что нормальная взрослая печень может полностью восстанавливаться после хирургической резекции части печени, главным образом, замещаясь за счет компенсаторной гиперплазии остаточных гепатоцитов. Недавно полученные данные продемонстрировали, что печень также имеет «дремлющие» резервные системы, питаемые стволовыми клетками, предназначенные для регенерации печени.

«Дремлющие» резервные системы имеют два источника:

1. Активация овальных клеток: активация этих «дремлющих» систем стволовых клеток для регенерации печени осуществляется, когда остаточные гепатоциты функционально неспособны делиться. Многими исследователями было доказано, что эпителиальные клетки каналов Геринга становятся кандидатами на резидентные взрослые стволовые клетки печени [63]. При названии этих клеток используются различные термины. В экспериментальных исследованиях (на крысах, мышах) пролиферируется большое количество овальных клеток небольшого размера ( $< 10$  мк). Отсюда и происходит их название — «овальные клетки». Для обозначения клеток печени человека применяется термин «предшественники клеток печени», которые слу-

жат эквивалентом овальных клеток грызунов. Эти клетки (овальные клетки/предшественники гепатоцитов) рестриктируют несколько гемопоэтических фенотипических маркеров с функциональными характеристиками гепатоцитов, но они отличаются по размеру от зрелых клеток печени.

2. Деривация гепатоцитов из многофункциональных стволовых клеток: многофункциональные стволовые клетки, полученные из циркулирующих предшественников костного мозга, обеспечивают еще один путь для восстановления ткани печени.

*Активация овальных клеток в экспериментах на животных.* E. Farber [64] зарегистрировал наличие малых недифференцированных эпителиальных клеток во взрослой печени во время исследований карциногенных свойств веществ, таких как этионин, 2-ацетиламинофлюорин (2-AAF) и 3-метил-4-диэтиламинобензен. В этих исследованиях пролиферирующие в перипортальной области эпителиальные клетки с малым количеством базофильной цитоплазмы и равномерно окрашенным ядром овальной формы получили название овальных. Они характеризовались наличием AFP, GGT, глюкозы-6-фосфатазы. Наблюдалась экспрессия печеночного транскрибирующего фактора (HNFs) в печени во время активации «овальных клеток» в моделях с 2-AAF/PH [65]. Другие исследования показали активацию c-kit [66], CD34,flt 3 рецептора [67] и LIF [68] во время пролиферации «овальных клеток» в модели с 2-AAF/PH.

Однократное введение D-галактозамина (70–80 мг на 100 г веса тела) также вызывало активацию овальных клеток. AFP-позитивные овальные клетки начинают распространяться в перипортальную область в течение 48 ч после назначения D-галактозамина, простираются в паренхиму печени, образуют структуры, подобные каналу и экспрессирующие AFP, альбумин, GGT и глюкозу-6-фосфатазу, а затем дифференцируются в зрелые гепатоциты [69]. В обоих образцах повреждения печени 2-AAF/PH и D-галактозамина ключевым факто-

ром при активировании пролиферации «овальных» или клеток-предшественников является стимуляция печеночной регенерации при условии блокирования пролиферации гепатоцитов.

*Существование предшественников клеток печени и их происхождение при заболеваниях у человека.* Понятие бипотенциальных овальных клеток у грызунов сейчас общепризнано. Наличие человеческого эквивалента заинтересовало многих исследователей. В ряде морфологических исследований присутствие малых или овальных клеток подобного строения было отмечено в печеночной ткани человека. Более убедительно использование маркеров, изначально установленных для экспрессии или для регуляции овальных клеток крысы (включая OV-6, c-kit и CD34). Несколько групп исследователей идентифицировали овальные клетки при массивном некрозе печени, «алкогольном» циррозе, очаговой узелковой гиперплазии, гепатобластоме и атрезии желчных протоков [70]. С появлением чувствительных методов клеточной и молекулярной биологии исследователи начали изучать возможность выделения популяции клеток-предшественников из печени взрослого человека и плода. Большинство лабораторий выделяют и характеризуют клетки-предшественники печени путем селекции специфическими антителами и FACS или путем иммуномагнитного выделения на бусах от клеток, несущих антитела-мишени.

*Источники прогениторов печени.* Выделение печеночных предшественников из печени человека — главное направление в клиническом применении этой терапии. Недавно печеночные предшественники были выделены из двух источников: печени трупов и печени плода.

*Печень трупов,* которая считается недостаточного качества для трансплантируемого органа, является одним из источников предшественников клеток печени. Выделенные гепатоциты, полученные из плодов в результате аборт, — альтернативный источник предшественников клеток печени.

*Предшественники клеток печени из печени плода.* Предшественники клеток печени берут начало из эндодермальных клеток, которые образуют так называемый печеночный дивертикул. У эмбриона человека печеночные предшественники могут быть выявлены к концу четвертой недели. Эти клетки могут дифференцироваться как в гепатоциты, так и в клетки желчных протоков. Однако специфические маркеры для предшественников клеток печени из печени плода все еще нуждаются в подтверждении. В некоторых исследованиях гемопоэтические показатели (CD34, Thy-1 и c-kit, иРНК для flt-3 рецептора), ранее отмеченные только для гемопоэтических стволовых клеток, использовали для идентификации/выделения печеночных предшественников. Наличие гемопоэтических маркеров у предшественников печени подкрепляется тем фактом, что печень остается кроветворным органом на протяжении всего внутриутробного периода и приблизительно в течение первой недели после рождения у новорожденных.

Н. Malhi et al. (2002) [70], выделившие стволовые клетки-предшественники, полученные из зародышевой печени у человека, продемонстрировали высокую дифференциацию и популяционную способность печени у животных [71]. В условиях культивирования клетки-предшественники разрастались в течение нескольких месяцев, при этом каждая клетка претерпевала более чем 40 делений, сохраняя нормальные кариотипы. В нашем центре мы также выделили популяцию предшественников, используя систему обратного отмывания, в которой в условиях культивирования выделенные печеночные клетки-предшественники дифференцировались в клетки желчных протоков, и гепатоциты сохраняли способность к пролиферации.

В другой работе L. M. Reid et al. показали, что жизнеспособные стволовые клетки можно выделить даже из печени донора, у которого была остановка сердца и чья печень не могла использоваться в качестве целого органа-трансплантата.

*Маркеры клеток-предшественников.* Печеночные стволовые клетки экспрессируют маркеры, сходные с таковыми у гепатоцитов или клеток желчных протоков, и также рестрицируют некоторые из гемопоэтических маркеров, AFP, некоторые показатели кератина (например, цитокератин 19 и гамма-глутамилтранспептидаза). Высокие уровни некоторых иРНК, подобно AFP и фактору стволовых клеток (ФСК), могут также экспрессироваться овальными клетками. OV-6 идентифицирует цитокератин с молекулярным весом 56 000 с эпитопами для цитокератина (CKs) 14 и 19. В печени человека OV-6 идентифицирует клетки в желчном проходе, а также овальные клетки, обнаруженные при очаговой узелковой гиперплазии [72]. В отдельных исследованиях было показано, что стволовые клетки печени рестрицируются CD34, Thy-1 и c-kit, иРНК для flt-3 рецептора, характеризующих гемопоэтические стволовые клетки [66–68; 73]. Thy-1 — маркер клеточной поверхности, соединяющийся с CD34, а также со специфическим маркером для идентификации гемопоэтических стволовых клеток. В. E. Petersen et al. [74] продемонстрировали, что стволовые клетки печени (овальные клетки) экспрессируют высокий уровень маркера Thy-1, а также специфические маркеры печени AFP, GGT и СК-19. Недавно [72] использовали СК-18 (печеночный маркер) и Thy-1 (гемопоэтический маркер) для обогащения потенциальной популяции клеток-предшественников печени из развивающейся печени крысы [75].

*Пополненные популяции стволовых клеток печени/клеток-предшественников.* Обогащение стволовых клеток печени проводили, используя некоторые физические методы, подобно системе отмывания, а также отдельные специфические стволовые маркеры. Первыми исследованиями, отметившими обогащение стволовых клеток печени/клеток-предшественников у плода, были исследования [71], которые использовали методы промывания и сортировки активированных путем флюоресценции клеток с помощью моноклональных антител, реагирующих с протеинами клеточной

поверхности, экспрессирующихся на овальных и эпителиальных клетках желчных протоков. Однако даже сегодня маркеры специфической селекции для стволовых клеток печени/клеток-предшественников не были идентифицированы. A. Suzuki et al. (1994) [76] отбирали из печеночных клеток зародыша те, которые проявляли положительную экспрессию интегрина  $\alpha$ -6 (CD49f), как известно, они выступают представителями гепатоцитов, но не являются гемопоэтическими, и отрицательную экспрессию интегрина  $\alpha$ -6 (CD49f) и  $\beta$ -1-интегрина (CD29) – представителей гепатоцитов, но не гемопоэтических клеток, и отрицательную экспрессию CD45 и Ter119, которые служат специфическими маркерами гемопоэтических клеток. Интересно, что клетки, обогащенные клетками-предшественниками печени в образцах колоний, оказались отрицательными для c-kit [77], выступающего положительным маркером для сортировки гемопоэтических стволовых клеток и также выявляющегося в «овальных клетках» печени [65]. Наоборот, положительная селекция c-kit (CD34) была использована для обогащения стволовых клеток, подобно клеткам-предшественникам человека, которые можно дифференцировать в культуре эпителиальных клеток желчных протоков. H. Kubota, L. M. Reid (2000) [78] использовали совершенно разные гены (*MHC класса 1*, *OX 18* и *ICAM-1*) для селекции ED13 клеток печени зародыша крысы, которые в культуре экспрессируют фенотипические маркеры для гепатоцитов (AFP и белок (альбумин)) и для эпителиальных клеток желчных протоков (СК-19). Совсем недавно [53] выделили клетки  $\beta_2\text{-m}^-/\text{Thy}1^+$  из костного мозга, которые экспрессируют гены, специфические для печени. После внутрипортального вливания эти клетки дифференцируются в зрелые гепатоциты. Интересно, что в некоторых из этих исследований [65; 76; 78; 79] клетки с подобными паттернами маркеров генной экспрессии идентифицировали или выделили из здоровой печени взрослого человека (хотя и в уменьшенном количестве),

подтверждая, что специфические стволовые клетки/клетки-предшественники ткани могут присутствовать в зрелом органе. Трансплантация этих клеток на 100 % идентифицирует те, которые являются настоящими стволовыми клетками с самым большим потенциалом для повторной репопуляции печени.

*Выделение (изоляция) предшественников клеток печени.* В нашем исследовании мы выделили клетки-предшественники печени из гепатоцитов человеческого зародыша, используя CD34 маркер, их анализировали морфологическими и биохимическими методами, используя специфические для печени маркеры [80].

*Трансдифференциация стволовых клеток печени.* Недавно большое внимание было сфокусировано на установлении пластичности стволовых клеток взрослого человека, особенно способности таких клеток трансдифференцироваться в клетки других органов. Хорошо налаженный механизм трансдифференциации лежит между печенью и поджелудочной железой и наоборот. Это подтверждается тем, что во время эмбриогенеза как печень, так и вентральная поджелудочная железа возникают из одной и той же клеточной популяции, размещенной внутри эмбриональной эндодермы [70]. L. Yang et al. (2002) [17] продемонстрировали, что стволовые клетки печени крысы могут трансдифференцироваться в клетки, выделяющие функциональный гормон поджелудочной железы, продуцирующий клетки в культуральной среде с высокой концентрацией глюкозы. Выработка инсулина была подтверждена иммуноцитохимическим исследованием и вестерн-блот-анализом. Эти трансдифференциальные клетки трансплантировали животным с индуцированным стрептозотоцином диабетом. Животные получили 200 островковоподобных кластеров клеток [16]. Аналогично, [16] продемонстрировали трансдифференциацию панкреатических клеток в гепатоциты в культурах, индуцированных дексаметазоном [81]. В обоих исследованиях трансдифференцировавшие клетки были иден-

тифицированы маркерами. Дифференцировка этих клеток или в печень, или в поджелудочную железу диктуется их местоположением в ткани. Таким образом, можно предположить, что эпителиальная популяция внутри поджелудочной железы и печени разделяет общие стволовые клетки популяции. Однако не ясно, или стволовые клетки печени трансдифференцируют в клетки поджелудочной железы, или уже существует некая малая популяция в клетках поджелудочной железы, клетки которой дифференцируются для выработки инсулина.

Трансдифференциальное свойство клеток печени в клетки поджелудочной железы четко подтверждено при добавке меди, которой не хватает в рационе животных. Недавно в некоторых исследованиях было отмечено, что стволовые клетки печени крысы могут дифференцироваться в клетки, продуцирующие гормон поджелудочной железы в насыщенной глюкозой среде.

### **Список литературы**

1. *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts* / J. A. Thompson, J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro et al. // *Science*. — 1998. — Vol. 282. — P. 1145-1147.
2. *Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo* / E. Lagasse, H. Connors, M. Al-Dhalimy et al. // *Nat. Med.* — 2000. — Vol. 6. — P. 1229-1234.
3. *Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival* / D. Orlik, J. Kajstura, S. Chimenti et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 2001. — Vol. 98. — P. 10344-10349.
4. *Turning Blood into Brain: Cells Bearing Neuronal Antigens Generated in Vivo from Bone Marrow* / E. Mezey, K. J. Chandross, G. Harta et al. // *Science*. — 2000. — Vol. 290. N 5497— P. 1779-1782.
5. *Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell* / D. S. Krause, N. D. Theise, M. I. Collector et al. // *Cell*. — 2001. — Vol. 105. — P. 369-377.
6. *Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system* / C. B. Johanson, S. Momma, D. L. Clark et al. // *Cell*. — 1999. — Vol. 96. — P. 25-34.
7. *Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells* / M. J. Shamblott, J. Axelman, S. Wang et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1998. — Vol. 95. — P. 13726-13731.
8. *Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells* / A. Nagy, J. Rossant, R. Nagy et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1993. — N 90. — P. 8424-8428.
9. *Blitzer B. J., Waggoner J. G., Jones E. A.* A model of fulminant hepatic failure in the rabbit // *Gastroenterology*. — 1978. — Vol. 74. — P. 664-671.
10. *Site-specific migration and neuronal differentiation of human neural progenitor cells after transplantation in the adult rat brain* / R. A. Fricker, M. K. Carpenter, C. Winkler et al. // *J. of Neurosci.* — 1999. — Vol. 19. — P. 5990-6005.
11. *Direct isolation of human central nervous system stem cells* / N. Uchida, D. W. Duck, D. He et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 2000. — Vol. 97. — P. 14720-14725.
12. *Chimeric brains generated by intraventricular transplantation of fetal human brain cells into embryonic rats* / O. Brüstle, K. Choudhary, K. Karram et al. // *Nature Biotechnol.* — 1998. — Vol. 16. — P. 1040-1044.
13. *Li M., Sendtner M., Smith A.* Essential function of LIF receptor in motor neurons // *Nature*. — 1995. — Vol. 378. — P. 724-727.
14. *Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes* / I. Kehat, D. Kenyagin-Karsenti, M. Snir et al. // *J. Clin. Invest.* — 2001. — Vol. 108 (3). — P. 407-414.
15. *Generation of completely embryonic stem cell-derived mutant mice using tetraploid blastocyst injection* / Z. O. Wang, F. Kiefer, P. Urbanek et al. // *Mech. Dev.* — 1997. — Vol. 62. — P. 137-145.
16. *Tosh D., Shen C. N., Slak J. M. W.* Differentiated properties of hepatocytes induced from pancreatic cells // *Hepatology*. — 2002. — Vol. 36. — P. 534-543.
17. *In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells* / L. Yang, S. Li, H. Hatch et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 2002. — Vol. 99 (12). — P. 8078-8083.
18. *Mito M., Kusano M.* Hepatocyte transplantation in man // *Cell transplant.* — 1993. — Vol. 2. — P. 65-74.
19. *Human embryonic germ cell derivatives*

express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro / M. S. Shambloot, S. Axelman, S. W. Littlefield et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2001. — Vol. 98. — P. 113-118.

20. *Kepler B., Lesh R., Reutter W.* Experimental hepatitis induced by O-galactosamine // *Exp. Mol. Pathol.* — 1968. — Vol. 9. — P. 279-290.

21. *Zenoroli M. L.* Hepatic encephalopathy. Experimental studies in a rat model of fulminant hepatic failure // *J. Hepatol.* — 1985. — Vol. 2. — P. 301-312.

22. *Traber F. G., Ganger D. R., Blei A. T.* Brain edema in rabbits with galactosamine induced fulminant hepatitis // *Gastroenterology.* — 1986. — Vol. 92. — P. 1347-1356.

23. *McCung H. J., Sloan H. R., Powers P.* Early changes in the permeability of the blood brain barrier produced by toxins associated with liver failure // *Pediatric Research.* — 1990. — Vol. 28. — P. 327-331.

24. *Dixit V., Chang T. M. S.* Brain edema and the blood brain barrier in galactosamine-induced fulminant hepatic failure rats. An animal model for evaluation of live support systems // *ASAIO Trans.* — 1990. — Vol. 36 (1). — P. 21-27.

25. *Zimmerman C., Ferenci P., Pifi C.* Hepatic encephalopathy in thioacetamide-induced acute liver failure in rats: characterization of an improved model and study of aminoacid-ergic neurotransmission // *Hepatology.* — 1999. — Vol. 9. — P. 594-601.

26. *Peeling J., Schoemaker L., Gauthier T.* Cerebral metabolic and histologic effects of thioacetamide-induced liver failure // *Am J. Physiol.* — 1993. — Vol. 265. — P. 572-578.

27. *Hilgier J. W., Haugvicova R., Albrecht J.* Decreased potassium stimulated release of [3H] D aspartate from hippocampal slices distinguishes encephalopathy relate to acute liver failure from that induced by simple hyperammonemia // *Brain. Res.* — 1991. — Vol. 567. — P. 165-168.

28. *Yurdaydin C., Hortnagl H., Steindl P.* Increased serotonergic and noradrenergic activity in hepatic encephalopathy in rats with thioacetamid-induced acute liver failure // *Hepatology.* — 1990. — Vol. 12. — P. 695-700.

29. *Gammal S. H., Basile A. S., Geller D.* Reversal of the behavioral and electrophysiological abnormalities of an animal model of hepatic encephalopathy by benzodiazepine receptor ligands // *Hepatology.* — 1990. — Vol. 11. — P. 371-378.

30. *Sutherland D. E. R., Numata M., Matas A. J.* Hepatocellular transplantation in acute liver failure // *Surgery.* — 1977. — Vol. 82. — P. 124-32.

31. *Hepatocellular transplantation for treatment of D-galactosamine-induced acute liver failure in rats / B. G. Sommer, D. E. R. Sutherland, A. J. Matas et al. // Transplantation.* — 1979. — Vol. 11. — P. 578-584.

32. *Makowka I., Falk R. E., Rotstein L. E.* Cellular transplantation in the treatment of experimental hepatic failure // *Science.* — 1980. — Vol. 210. — P. 901-903.

33. *Bamgartner D., La Plante-O'Neill P. M., Sutherland D. E. T.* Effects of intrasplenic injection of hepatocytes, hepatocytes fragments and hepatocytes culture supernatants on D-galactosamine-induced liver failure on rats // *Eur. Surg. Res.* — 1983. — Vol. 15. — P. 129-135.

34. *Xenotransplantation of UV-B irradiated hepatocytes survival and immune response / C. M. Habibullah, Q. Ayesha, A. A Khan. et al. // Transplantation.* — 1995. — Vol. 59. — P. 1495-1497.

35. *Human fetal hepatocyte transplantation in patients with fulminant hepatic failure / C. M. Habibuilah, I. H. Syed, A. Qamar, Z. Taher-Uz // Transplantation.* — 1994. — Vol. 58. — P. 951-952.

36. *Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure / S. C. Storm, R. A. Fisher, M. X. Thompson et al. // Transplantation.* — 1997. — Vol. 63. — P. 559-69.

37. *Sorino H. E., Wood R. P., Kang D. C.* Hepatocellular transplantation (HCT) in children with fulminant hepatic failure // *Hepatology.* — 1997. — Vol. 26. — P. 239A.

38. *Bilir B., Dinrham J. D., Kristal J.* Transjugular intraportal transplantation of cryopreserved human hepatocytes in a patient with acute liver failure // *Hepatology.* — 1996. — Vol. 24. — P. 728.

39. *Peritoneal transplantation of human fetal hepatocytes for the treatment of acute fatty liver pregnancy; a case report / A. A. Khan, A. Habeeb, N. Parveen et al. // Tropical Gastroenterology.* — 2004. — Vol. 25 (3). — P. 141-143.

40. *Fox I. J., Roy Chowdhary J., Kauffman S. S.* Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocytes transplantation // *N. Eng. J. Med.* — 1998. — Vol. 338. — P. 1422-1426.

41. *Hepatocyte* transplantation in a 4-year girl with peroxisomal biogenesis disease technique, safety and metabolic follow-up / E. M. Sokai, F. Smets, A. Bourgos et al. // *Transplantation*. — 2003. — Vol. 76. — P. 735-743.
42. *Bioartificial* liver using hepatocytes on biosilon microcamers. Treatment of chemically induced acute hepatic failure in rats / A. Shynra, A. Bochrarov, N. Bochokova, V. Spirov // *Artif. Organs*. — 1991. — Vol. 15. — P. 189-197.
43. *A novel* multicoaxial hollow fiber bioreactor for adherent cell types part 1: hydrodynamic studies / W. P. Stephan, H. S. U. Edward, M. L. Reid, J. M. Macdonald // *Biotech. and Bioeng.* — 2002. — Vol. 77. — P. 1.
44. *Sielaff T. D., Hu My, Amiot B.* Gel-entrapment bioartificial liver therapy, in galactosamine hepatitis // *J. Surg. Res.* — 1995. — Vol. 59. — P. 179-184.
45. *Nagaki M., Kim Y. I., Miki K.* Development and characterization of hybrid bioartificial liver using primary hepatocytes entrapped in a basement membrane matrix (abstract) // *Hepatology*. — 1996. — Vol. 24. — P. 435A.
46. *Sheil A. J., Sun J., Meats D. C.* Preclinical trials of a bioartificial liver support system in a porcine fulminant hepatic failure model // *Aust. NZ J. Surg.* — 1996. — Vol. 66. — P. 547-552.
47. *Chen S. C., Hewin W. R., Egachi S.* Hepatocyte-based artificial liver prolongs survival in anhepatic pigs (abstract) // *Hepatology*. — 1996. — Vol. 24. — P. 436A.
48. *Gerlach G. C.* Development of a hybrid liver support system: a review // *Artif. Organs*. — 1996. — Vol. 19. — P. 645-654.
49. *Development* of a new bioartificial liver module filled with porcine hepatocytes immobilized on non-woven fabric / K. Naruse, Y. Sakai, I. Nagashirna et al. // *Artif. Organs*. — 1995. — Vol. 19. — P. 347-352.
50. *Nyberf S. L., Shierabe K., Peshwa M. V.* Extracorporeal application of a gel entrapment, bioartificial liver: demonstration of drug metabolism and other biochemical function // *Cell Transplantation*. — 1993. — Vol. 2. — P. 441-452.
51. *Jauregui H. O., Mullan C. J., Treankler D.* In vivo evaluation of a hollow fiber liver assists devise // *Hepatology*. — 1995. — Vol. 21. — P. 460-469.
52. *Uchino J., Suburaya T., Kumagai F.* A hybrid bioartificial liver composed of multiplicated hepatocyte monolayers // *ASIO Trans.* — 1988. — Vol. 34. — P. 972-977.
53. *Survival*, organisation and function of microcarrier attached hepatocytes transplanted in rats / A. A. Demetriou, S. M. Levenson, P. M. Novikoff et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1986. — Vol. 83. — P. 7475-7479.
54. *In vitro* studies of bionsactor nodule containing encapsulated goat: hepatocytes for the development of bioartificial liver / A. A. Khan, A. Capoor, N. Parveen et al. // *Indian Journal of Gastroenterology*. — 2002. — Vol. 21. — P. 55-58.
55. *Khan A. A., Capoor A., Habibullah C. M.* In vitro assessment for microencapsulation; providing immunoprotection against antibody mediated cell lysis // *Acta Medica et Biologica*. — 1999. — Vol. 47 (3). — P. 97-102.
56. *The human* natural anti-alpha galactosyl IgG. III. The specific recognition of alpha (1-3)-linked galactose residues / U. Galili, B. A. Macher, J. Beuhter, S. B. Shohet // *J. Exp. Med.* — 1985. — Vol. 162. — P. 573-582.
57. *The human* natural anti-Gal IgG III subtly of immune tolerance in man as demonstrated by cross reactivity between natural anti-Gal and anti-B antibodies / J. Galili, J. Buehler, S. B. Shohet, B. A. Macher // *J. Exp. Med.* — 1987. — Vol. 165. — P. 693-704.
58. *Man*, apes and old world monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells / U. Galili, S. B. Shohet, E. Kobrin et al. // *J. Biol. Chem.* — 1988. — Vol. 263. — P. 17755-17762.
59. *Sandrin M. S., McKenzie I. F. C.* Gal $\alpha$ (1,3)Gal, the Major Xenoantigen(s) Recognized in Pigs by Human Natural Antibodies // *Immunol. Rev.* — 1994. — Vol. 141. — P. 169-190.
60. *Xenogenic* transplantation of microencapsulated hepatocytes: Ureagenesis of retrieved, encapsulated hepatocytes / A. A. Khan, C. M. Habibullah, Q. Ayesha, S. Lahiri // *International Hepatology Communications*. — 1995. — Vol. 4. — P. 183-189.
61. *In vivo* identification, survival and functional efficacy of transplanted hepatocytes in acute liver failure mice model by fish usiny-chromosome probe / D. K. Vanaja, B. Sivakumar, R. A. Jesudasan et al. // *Cell*

Transplantation. — 1998. — Vol. 7 (3). — P. 267-273.

62. *Embryonic* stem cell lines derived from human blastocysts / J. A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro et al. // *Science*. — 1998. — Vol. 282. — P. 1145-1147.

63. *Wilson J. W., Leduc E. H.* Roles of cholangiosis in restoration of the liver of the mouse after dietary injury // *J. Pathol. Bacteriol.* — 1958. — Vol. 76. — P. 441-449.

64. *Studies* on the proliferation and fate of oval cells in the liver of rats treated with 2-acetylaminofluorene and partial hepatectomy / M. Tatematsu, R. H. Ho, T. Kaku et al. // *Am. J. Pathol.* — 1984. — Vol. 114. — P. 418-430.

65. *Crosby H. A., Kelly D. A., Strain A. J.* Human hepatic stem-like cells isolated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium // *Gastroenterology*. — 2001. — Vol. 120. — P. 534-544.

66. *Partial* cloning of rat CD34 CDNA and expression during stem cell-dependent liver cell regeneration in adult rats / N. Omori, M. Omori, R. P. Evarts et al. // *Hepatology*. — 1997. — Vol. 26. — P. 720-727.

67. *Co-expression* of flt-3 ligand/flt-3 and SCF/C-kit signal transduction systems in bile duct-ligated SI and W mice / M. Omori, N. Omori, R. P. Evarts et al. // *Am. J. Pathol.* — 1997. — Vol. 150. — P. 1179-1187.

68. *Lemire J. M., Shiojiri N., Fausto N.* Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine // *Am. J. Pathol.* — 1991. — Vol. 139. — P. 535-552.

69. *Roskams T., De Vos R., Desmet V.* Undifferentiated progenitor cells in focal nodular hyperplasia of the liver // *Histopathology*. — 1996. — Vol. 28. — P. 291-299.

70. *Isolation* of human progenitor liver epithelial cells with extensive replication capacity and differentiation into mature hepatocytes / Harmeet Malhi, Adil Irani N., Singh Gagandeep, Sanjeev Gupta // *Journal of Cell Science*. — 2002. — Vol. 115. — P. 2679-2688.

71. *Hepatic* stem-like cells in hepatoblastoma: expression of cytokeratin 7, albumin and oval cell antigens detected by OV-1 and OV-6 / P. Ruck, J. Xiao, T. Fietsch et al. // *Histopathology*. — 1997. — Vol. 31. — P. 324-329.

72. *Liver-specific* gene expression in cultured human hematopoietic stem cells / H. C. Fiegel et al. // *Stem Cells*. — 2003. — Vol. 21. — P. 98-104.

73. *Expression* of leukemia inhibitory factor and its receptor during liver regeneration in the adult rat / N. Omori, R. P. Evarts, M. Omori et al. // *Lab. Invest.* — 1996. — Vol. 75. — P. 15-24.

74. *Hepatic* Oval Cells Express the Hematopoietic Stem Cell Marker Thy-1 in the Rat / B. E. Petersen, J. P. Goff, J. S. Greenberger, G. K. Michalopoulos // *Hepatology*. — 1998. — Vol. 27. — P. 433-445.

75. *Characterization* and enrichment of fetal rat hepatoblasts by immunoadsorption (panning) / S. H. Sigal, S. Brill, L. M. Reid et al. // *Hepatology*. — 1994. — Vol. 19. — P. 999-1006.

76. *Flow* cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver / A. Suzuki, Y. W. Zheng, R. Konco et al. // *Hepatology*. — 2000. — Vol. 32. — P. 1230-1239.

77. *Expression* of stem cell factor and its receptor, c-kit, during liver regeneration from putative stem cells in the adult rat / I. K. Fujio, R. P. Evarts, Z. Hu et al. // *Lab. Invest.* — 1994. — Vol. 704. — P. 511-516.

78. *Kubota H., Reid L. M.* Clonogenic hepatoblasts, common precursors for hepatocytic and biliary lineage are lacking classical major histocompatibility complex class I antigen // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 2000. — Vol. 97. — P. 12132-12137.

79. *Isolation*, characterization and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells / I. Avitai, D. Inderbitzin, T. Aoki et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2001. — Vol. 288. — P. 156-164.

80. *Enrichment* of hepatic progenitor cells using CD34 / A. A. Khan, A. Parveen, M. A. Habeeb et al. // *Indian Journal of Gastroenterology*. — 2004. — Vol. 23. — P. 207 (Suppl.)

81. *Differentiation* of pancreatic epithelial progenitor cells into hepatocytes following transplantation into rat liver / M. D. Dabeva, S. G. Hwang, S. R. Vasa et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1997. — Vol. 94. — P. 7356-7361.

## Глава 9. Генная инженерия и генетическая терапия

---

---

---

A short historical information on application of gene-engineering technologies in treatment of severe inherited diseases, as well as diseases having the hereditary predisposition, is given. Essence of the basic technologies applied in gene therapy is briefly described: modulation of gene expression; viral delivery of genes; physical methods for gene transfer; methods based on biomolecules. Advantages and technological shortcomings of each genetic therapy are critically estimated.

---

Генетическая терапия продолжает оставаться одним из ведущих направлений молекулярной медицины, которая в ближайшее время будет оказывать значительное влияние на здоровье человечества.

С расшифровкой человеческого генома (Human Genome Project – HGP) появляющиеся и совершенствующиеся сегодня ДНК-технологии достигли новых высот. Обширные знания о полном наборе генов человека и их хромосомной организации уже используются на практике в диагностических лабораториях, что позволяет ученым и клиницистам исследовать врожденные генетические ошибки и давать более точные генетические рекомендации пострадавшим семьям.

В последние годы возможности и суть генетической терапии претерпели изменения и получили значительное распространение. Наряду с осуществимостью коррекции наследственных генетических нарушений (муковисцидоз, гемофилия и др.), технологии генетической терапии направлены также на борьбу с приобретенными заболеваниями (рак, СПИД, сосудистые заболевания, остеоартриты, диабет, болезни Паркинсона и Альцгеймера). Тем не менее, проявляются нежелательные эффекты генетической терапии в случаях лечения детей. Несмотря на возможный успех этого лечения, из 22 детей, страдающих тяжелыми первичными комбинированными им-

мунодефицитами, у 3 детей развилась лейкемия, 1 ребенок умер. Позднее было установлено, что применение ретровирусов для восстановления поврежденных или неполных генов повышает риск возникновения рака. Это возможно из-за проникновения ретровирусов в активные гены, раскрытия конденсированного хроматина в этих регионах хромосом. Такой же вывод можно сделать и в отношении генетической инженерии стволовых клеток, так как генетический материал вводится в гены, которые вовлечены в клеточную пролиферацию. В то же время описаны случаи успешного лечения пациентов с хроническим гранулематозом, когда активность NADPH-оксидазы была практически полностью восстановлена после инфузии им генетически модулированных стволовых клеток крови. До настоящего времени генная терапия клеток зародышевых линий, в силу технических сложностей и этических соображений, недостаточно изучена. Пока что исследователи сосредоточили свое внимание на генной терапии соматических клеток, приемлемых для каждого индивидуума, но не передающихся последующим поколениям. Основное требование, предъявляемое к генной терапии, – непрерывное воспроизводство терапевтических продуктов генов без каких-либо вредных побочных эффектов. Однако эффективное использование стволовых клеток в генной

терапии все еще требует тщательной разработки стратегии модуляции экспрессии генов, а также эффективности методов доставки чужих генов в стволовые клетки. Модуляция экспрессии генов в стволовых клетках необходима для точного контроля их дифференцировки в различные линии; поддержки их недифференцированного состояния для дальнейшей трансплантации; контроля их размножения и регуляции секреции различных цитокинов и факторов роста.

Как правило, модуляция генной экспрессии проводилась с использованием ДНК-технологий, изменяющих генетическую структуру клеток.

Ниже приведены примеры различных методов модуляции экспрессии генов и внедрение последних во взрослые стволовые клетки. Даже с применением новейших технологий и приборов для генетической модуляции все еще сложно проводить на достаточном уровне трансфекцию генов, поддерживая одновременно недифференцированные фенотипы. Требуется решения вопрос о безопасности в плане последствий введения чужих генов в стволовые клетки.

**Модуляция экспрессии генов.** Паттерны генной экспрессии в стволовых клетках модулируются с использованием рекомбинантной ДНК. Если существует чрезмерная опасность использования генетически модифицированных стволовых клеток для генной терапии у человека, то необходимо соблюдать безопасность при контроле экспрессии паттернов в стволовых клетках. Кроме того, что у этих клеток есть риск стать злокачественными, так как у них наблюдается тенденция к непредсказуемому поведению после трансплантации в организм хозяина. Разработано несколько альтернативных технологий рекомбинантной ДНК, которые способствуют прямой доставке белков, РНК и синтетических молекул, подобных пептидам нуклеиновой кислоты (ПНК), в клетки. Эти молекулы имеют непродолжительный срок жизни в цитозоле. Они не могут интегрировать в геном хозяина, поэтому не изменяют его ге-

нетическую структуру. Самыми интересными кандидатами среди внутриклеточных белков, способных модифицировать паттерны генной экспрессии, могут быть факторы транскрипции. Эти молекулы обладают продолжительным эффектом на транскрипционные механизмы клетки, поэтому их введение в стволовые клетки стимулирует экспрессию определенного набора генов [1].

Использование бессмысленной РНК также может блокировать экспрессию определенных генов в стволовые клетки. Эти небольшие молекулы РНК комплементарно взаимодействуют с рядом определяющих иРНК и могут формировать комплекс двойной спирали РНК-иРНК, угнетая процессы трансляции рибосомой.

Другой перспективный кандидат, модулирующий генную экспрессию, — siРНК. Эти маленькие молекулы, содержащие 21–25 п. н. образуются путем разрезания длинных двойных цепей РНК с помощью ферментов. Затем они включаются в РНК-индуцируемый молчащий комплекс, который разрушает гомологичные молекулы тРНК в клетке. Бессмысленные РНК и siРНК имеют непродолжительный период существования в цитозоле. В этом смысле в модуляции генной экспрессии более эффективны аналоги синтетической РНК. Например, ПНК — синтетические молекулы, имеющие подвижную псевдопептидную полимерную основу, вместо естественной фосфат-сахар основы. Эта химерная структура помогает им противостоять внутриклеточным РНКазам и протеиназам, так как, обладая нуклеотидными основаниями, связанными с псевдопептидной основой, они могут специфически гибридизироваться с высоким аффинитетом с комплементарными участками РНК. Эта основа также позволяет ПНК ковалентно связываться с доменами белковых переносчиков, которые облегчают их направленный перенос в клетку [2]. Доставка по месту назначения протеинов, РНК и ПНК — сложная задача, требующая разработки эффективных методов их введения в стволовые клетки. Методы доставки генов в

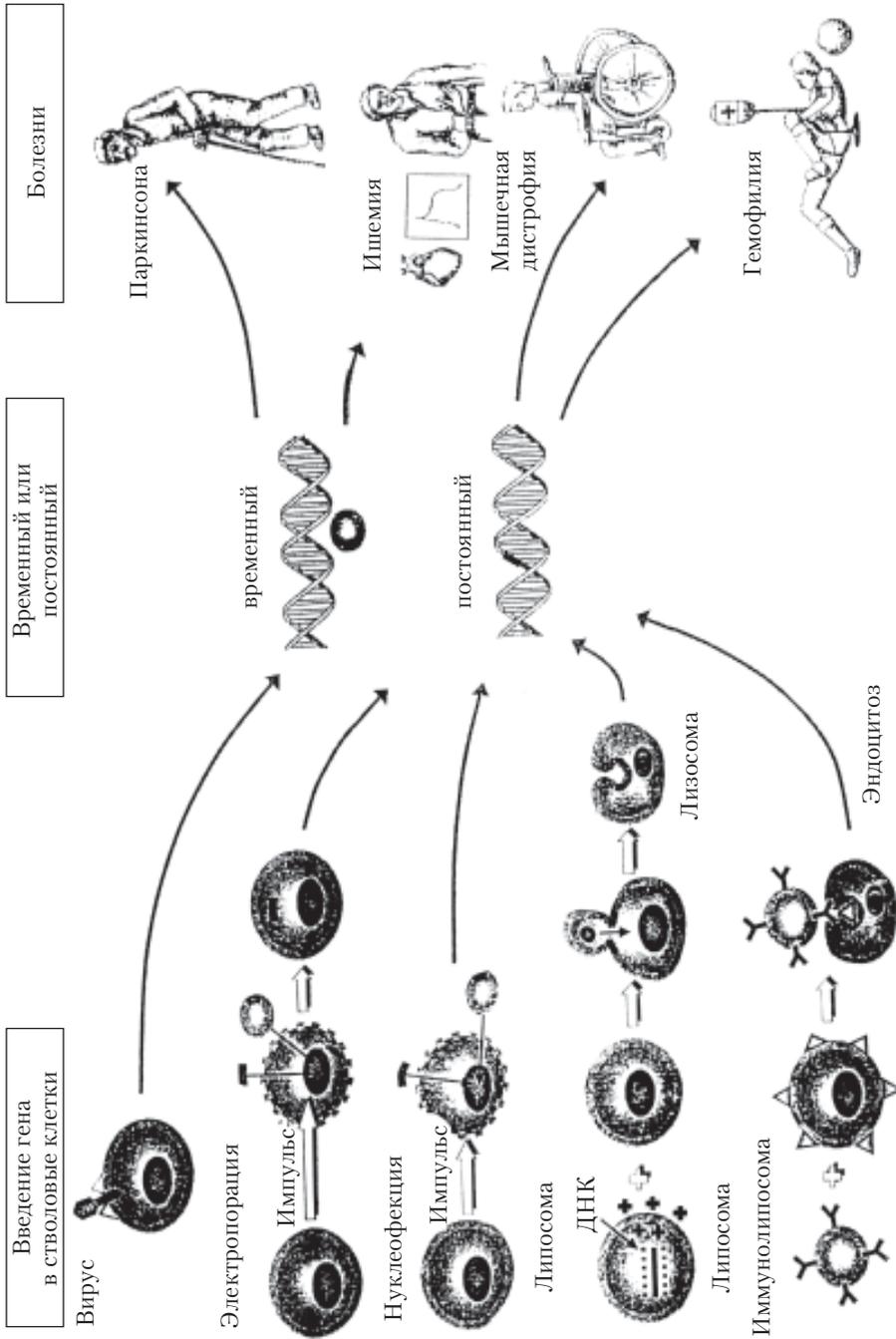


Рис. 9.1. Различные методы создания генноинженерных стволовых клеток.

Стволовые клетки можно выделить у конкретного больного, нуждающегося в лечении. К этим методам относятся: перенос гена с помощью вирусов; электропорация; нуклеофекция и перенос гена с использованием липосом и нуклеосом. Средства трансфекции могут быть постоянными или временными. После систематического введения в организм больного, модифицированные стволовые клетки возвращаются в соответствующее место и начинают продуцировать недостающий белок либо замещают поврежденный тип клеток

стволовые клетки разделяются на постоянные и кратковременные, с помощью вирусов и без вирусов, с помощью биологических компонентов, а также физических и химических средств (рис. 9.1).

### **Система вирусной доставки генов.**

Для переноса генов в стволовые клетки долгое время предпочтение отдавалось генетически модифицированным вирусам. Это связано с их природной способностью встраивать свой генетический материал в геном хозяина, а также принимать участие в процессах репликации, транскрипции, трансляции в организме хозяина с целью своего выживания.

**Лентивирусы.** Вирусы были получены из вируса иммунодефицита человека (HIV-1) путем перемещения генов, необходимых для репликации вирусов. Это гарантирует, что вирус не вызовет заболевание при трансфекции. Хотя лентивирусы и лишены таких генов, они все же могут интегрироваться в хромосомы хозяина с высокой эффективностью и обеспечивать стабильную экспрессию введенных генов. Достаточно успешное использование этих вирусов обусловлено их способностью инфицировать большое количество клеток различных типов, имеющих низкую цитотоксичность. Под различными промоторами доставленные гены типа GFP экспрессируются достаточно длительный период в стволовых клетках человека и мыши без существенного снижения их активности [3].

**Аденовирусы.** Эти вирусы также постоянно используются для доставки генов во взрослые стволовые клетки. У них есть много и преимуществ, и недостатков. Наиболее важное преимущество, благодаря которому они и используются, — это то, что данные вирусы могут размножаться до высоких титров. Они легко управляемы благодаря стабильности в различных условиях. Как и лентивирусы, они также инфицируют разнообразные делящиеся и неделяющиеся клетки [4]. Аденовирус типа 5 (Ad 5) был успешно использован для доставки генов в стволовые клетки человека и мыши. Недостаток их в том, что они не

могут интегрироваться в геном клеток хозяина, поэтому экспрессия трансфицированных генов проявляется кратковременно.

Для терапии и экспериментов практически нет надобности в стабильной экспрессии генов. В таких случаях используются аденовирусы, так как хорошо зарекомендовавшая себя экспрессия гена ослабевает спустя некоторое время. Известно также, что они вызывают выраженную иммунную реакцию после введения в организм хозяина [4].

**Аденоассоциированные вирусы.** Они, подобно аденовирусам, инфицируют в значительном количестве различные группы делящихся и неделящихся клеток, но отличаются способностью интегрироваться в геном хозяина. Важная отличительная особенность этих вирусов — это то, что они способны интегрироваться только в определенный сайт человеческой хромосомы 19, что исключает их использование для широкого спектра мутаций. Громоздкость генома этих вирусов также накладывает значительные ограничения на их применение в терапии [5].

## **Система невирусной доставки генов**

### **Физические методы**

**Электропорация** клеточной мембраны осуществляется кратковременным электрическим импульсом высокого напряжения. Подобные импульсы образуют кратковременные поры в мембране, делая ее проницаемой. Такая мембрана легко пропускает в клетку многочисленные молекулы. Большинство маленьких незаряженных молекул проникают в клетку путем простой диффузии, большие же заряженные молекулы, такие как ДНК и РНК, попадают в клетку по их электрофоретическому градиенту. Амплитуда этих импульсов охватывает всю область клеточной поверхности, которая пронизывается, а продолжительность импульсов детерминирует

ет распространенность данного пронизывания. После проникновения в клетку ДНК процессируется клеточными АТФ-зависимыми механизмами.

Проницаемость клеток зависит от интенсивности импульса. Сильный импульс может привести к повреждению, которое вызывает необратимые последствия, приводящие, в конечном итоге, к смерти клетки. Возможно, по этой причине электропорация считается наиболее опасным методом переноса генов. Очевидно также, что электропорация индуцирует повреждения, более выраженные *in vitro*, чем *in vivo*, из-за межклеточных взаимодействий и уменьшенного внеклеточного пространства в тканях. Эффективность этого метода зависит от многих взаимосвязанных показателей, например, размера клеток и температуры в течение импульсного воздействия [6].

*Нуклеофекция* — один из наиболее эффективных невирусных переносов генов, основанный на методе электропорации. Он более эффективен, чем последний. Наиболее существенное преимущество этой технологии — то, что ДНК может быть перенесена прямо в ядро клетки. Это, в свою очередь, повышает вероятность интеграции ее в геном хозяина. Следовательно, данный метод наиболее подходит для труднотрансфецируемых клеток [7].

### Методы, основанные на биомолекулах

*Домены белковой трансдукции (Protein transduction domain — PTD)* — это короткие пептиды, которые внедряются в клетку, минуя пути эндоцитоза и протеиновые каналы. Настоящий механизм их проникновения в клетку не вполне ясен, но этот процесс происходит даже при низкой температуре [8; 9]. В природе наиболее распространены два домена: домен ТАТ-трансактиватора вируса иммунодефицита человека; гомеодомен транскрипционного фактора *Antennapedia*. Кроме этих двух доменов, существует ряд искусственных пептидов, обладающих способностью к спонтанному

пересечению клеточной мембраны [10]. Эти пептиды могут ковалентно связываться с псевдопептидным каркасом ПНК и доставлять их в клетку.

*Липосомы*, как давно известно, используются для доставки генов, лекарств, белков-репортеров и других молекул в клетку в течение длительного времени. Липосомы, подобно клеточной мембране, окружены двойной мембранной структурой, отделяющей их от окружающей водной среды, но они намного проще, чем клеточные мембраны. Липидные молекулы в водной среде спонтанно формируют сферические структуры липосом, в центре которых находится вода. В них могут внедряться во время формирования гидрофильные молекулы. Например, когда липиды с положительно заряженной головкой смешиваются в растворе с рекомбинантной ДНК, они могут формировать липоплексии (*lipoplexes*), где отрицательно заряженная ДНК формирует комплекс с положительно заряженными головками липидных молекул. Эти комплексы способны проникать в клетку путем эндоцитоза и попадать в лизосомы. Молекулы ДНК высвобождаются из липосом с помощью диолеоэтаноламина и проникают в ядро, где могут быть транскрибированы [11].

Несмотря на простоту своего строения, липосомы обладают незначительной трансфекцией, так как не всегда способны проникнуть в клетку путем эндоцитоза. Даже если они могут внедриться в клетку, то на последних этапах ДНК не может выйти из эндосомы и разрушается там под действием нуклеаз.

*Имунолипосомы* — это липосомы, в мембрану которых встроены антитела к поверхностным молекулам клетки-мишени. Кроме того, что эти липосомы обеспечивают доставку гена, они также образуют защитный слой, оберегающий их от разрушающего действия РНКаз и протеиназ [12].

*Стволовые клетки как генные векторы.* Введение вирусных частиц *in vivo*, так же как и введение невирусных нуклеиновых кислот, имеет определенную степень рис-

ка неконтролируемой интеграции генетической информации в различных тканях. Это может проявиться в виде разрушения гена, промотора или энхансера. Обычно есть два пути контроля этого потенциально высокого риска: а) использование системы интеграции фагов; б) трансфекция стволовых клеток как векторов генов [13].

Такой подход используют при лечении многих дегенеративных расстройств, а также в противоопухолевой терапии.

Стволовые клетки способны дифференцироваться в клетки различных тканей и органов и, благодаря выраженным механизмам хоуминга, доставлять гены или белки туда, где они необходимы. Трансфицированные стволовые клетки могут быть использованы в качестве механизма транспорта селективных генов в пораженные участки, так как они освобождают трансфицированную частицу только там, где в этом есть необходимость.

К заболеваниям, в лечении которых в будущем можно применить сконструированные с помощью генной инженерии стволовые клетки, можно отнести болезни, характеризующиеся полным дефицитом какого-либо белка или фермента, нарушением функции какого-либо органа или наличием определенных необходимых факторов, улучшающих функции поврежденных органов.

Уже завершены первый и второй этапы исследований в лечении рака, нейродегенеративных расстройств (болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера), ишемической болезни мозга и сердца, инфекционных заболеваний. Наибольший прогресс с использованием генноинженерных стволовых клеток достигнут при болезни Альцгеймера и травме спинного мозга. Болезнь Альцгеймера — это заболевание, при котором наблюдается распространенная дегенерация нейронов ЦНС, а именно холинэргических нейронов переднего мозга. Прямая инъекция стимулятора роста нейронов в желудочки мозга не дала ожидаемых результатов, однако есть надежда, что доставка фактора роста нейронов в мозг с помощью стволовых клеток будет более результативной.

Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что трансфицированные стволовые клетки оказывают положительный эффект на пораженные проводящие пути спинного мозга. В отдельных случаях наблюдали частичное восстановление функций комбинированной со стволовыми клетками генной терапией [14]. Эти данные свидетельствуют о том, что генетически сконструированные стволовые клетки как форма комбинации стволовых клеток и генной терапии могут быть перспективным методом в лечении заболеваний в будущем.

### Список литературы

1. *Urnov F. D., Rebar E. J.* Designed transcription factors as tools for therapeutics and functional genomics // *Biochem Pharmacol.* — 2002. — Sep. — Vol. 64 (5-6). — P. 919-923.
2. *Marin V. L., Roy S., Armitage B. A.* Recent advances in the development of peptide nucleic acid as a gene-targeted drug // *Expert. Opin. Biol. Ther.* — 2004. — Mar. — Vol. 4 (3). — P. 337-348.
3. *Lentivirus-based gene delivery in mouse embryonic stem cells / Y. Kosaka, N. Kobayashi, T. Fukazawa et al.* // *Artif Organs.* — 2004. — Mar. — Vol. 28 (3). — P. 271-277.
4. *Bradfute S. B., Goodell M. A.* Adenoviral transduction of mouse hematopoietic stem cells // *Mol. Ther.* — 2003. — Mar. — Vol. 7 (3). — P. 334-340.
5. *Wu N., Ataai M. M.* Production of viral vectors for gene therapy applications // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2000. — Apr. — Vol. 11 (2). — P. 205-208.
6. *Nucleofection* is an efficient non-viral transfection technique for human bone marrow-derived mesenchymal stem cells / *M. P. Rols, J. Teissie, M. Aluigi et al.* // *Stem Cells.* — 2005. — Aug. — Vol. 11 [Epub ahead of print].
7. *Suppression* of endothelial adhesion molecule up-regulation with cyclopentenone prostaglandins is dissociated from I kappa B-alpha kinase inhibition and cell death induction / *A. Zernecke, W. Erl, L. Fraemohs*

- et al. // *FASEB J.* — 2003. — Jun. — Vol. 17 (9). — P. 1099-1101.
8. *Potential* utility of cell-permeable transcription factors to direct stem cell differentiation / B. C. Heng, T. Cao, G. Q. Tong, S. C. Ng // *Stem Cells Dev.* — 2004. — Oct. — Vol. 13 (5). — P. 460-462.
9. *Cell* internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent / D. Derossi, S. Calvet, A. Trembleau et al. // *J. Biol. Chem.* — 1996. — Vol. 26. — P. 18188-18193.
10. *Joliot A., Prochiantz A.* Transduction peptides: from technology to physiology // *Nat. Cell. Biol.* — 2004. — Mar. — Vol. 6 (3). — P. 189-196.
11. *DNA* complexing lipopolythiourea / I. Tranchant, N. Mignet, E. Crozat et al. // *Bioconjug Chem.* — 2004. — Nov-Dec. — Vol. 15 (6). — P. 1342-1348.
12. *Bendas G.* Immunoliposomes: a promising approach to targeting cancer therapy // *BioDrugs.* — 2001. — Vol. 15 (4). — P. 215-224.
13. *Ginsburg D. S., Calos M. P.* Site-specific integration with phiC31 integrase for prolonged expression of therapeutic genes // *Adv. Genet.* — 2005. — Vol. 54. — P. 179-187.
14. *Grill R. J., Blesch A., Tuszynski M. H.* Robust growth of chronically injured spinal cord axons induced by grafts of genetically modified NGF-secreting cells // *Exp. Neurol.* — 1997. — Dec. — Vol. 148 (2). — P. 444-452.

## Глава 10. Метаболические основы «доминантности» и «рецессивности» в наследовании генетических нарушений

The metabolic basics for «dominant» and «recessive» entities in genetic disorder inheritance are highlighted in the chapter. Dramatic examples show that many factors are involved in the genetic mechanism for development. Fallacious understanding of such factors may lead to mistakes in their interpretation and application. The issue of correct understanding of dominant and recessive is raised.

The correct understanding of this aspect will have an important role in determination of gene interaction pathways and their effect on human body.

Гены — это молекулярные коды, определяющие последовательности, по которым аминокислоты включены в каждый из многих сотен различных белков в клетке. Считают, что ген кодирует определенный полипептид (белок). Этот полипептид синтезируется при экспрессии данного гена. Вовлекая в процесс синтеза ряд компонентов клетки, экспрессия гена находится под влиянием окружающей ее среды. В свою очередь, все это затрагивает структуру и функцию целостной клетки, так как связанные с особенностями генов белки ответственны практически за каждый аспект структуры и функции клетки.

При нарушении генов возможны три последствия:

- 1) ничего значимого не происходит;
- 2) проявляются нарушения во всем организме как специфические изменения или наблюдается ряд изменений в некоторых тканях или органах;
- 3) организм не может существовать без продукта этого гена, ситуация становится летальной и организм погибает.

Указанные события могут случиться на раннем этапе развития организма или намного позже, в зависимости от различных обстоятельств. Эти обстоятельства будут

различными у представителей разных видов. Таким образом, основываясь на знании того, что кодирует ген, нельзя делать заключение о значимости сбоя в его работе вне особенностей конкретного вида.

### 10.1. Мендель и его работа с растительными гибридами

Некоторые отличительные фенотипические признаки трудно улавливаемые, тогда как другие очевидны — это желтизна или форма семян, высота стебля у гороха — растения, хорошо изученного Менделем. Более чем столетние исследования, косвенно начатые Менделем, привели к современной генетике, которая гласит, что гены определяют фенотипические отличительные признаки (хотя один отличительный признак может определяться многими генами).

Мы использовали здесь термин «отличительный» преднамеренно, потому что Мендель был высококвалифицированным

и дотошным селекционером, а не генетиком. Гены были обнаружены и названы спустя полстолетия после того, как была издана его работа. Мендель работал с отличительными признаками или чертами. Он хотел знать, почему при скрещивании двух чистых линий в потомстве проявлялся только один из отличительных признаков. Скрещивание растений с красными и белыми цветами всегда давало потомство исключительно с красными, а не с розовыми цветами. В некоторых экспериментах он проводил обратное скрещивание между потомками. Эти исследования приводили к восстановлению первоначальных признаков в соотношении, которое почти всегда было близко к 3 : 1. Признак, появившийся (в среднем) в трех из каждых четырех потомков, он назвал доминантным, а признак, который возникал в оставшейся 1/4 потомства, — рецессивным.

Почему один признак исчезал в первоначальных гибридах? Почему Мендель не получал смесь отличительных признаков? Как объяснить доминантность и рецессивность? Сейчас мы знаем много о генах, но эти вопросы остаются нерешенными и сегодня, и немногие из нас действительно понимают физиологическую или метаболическую основу функционирования определенного гена в определенном организме [1]. Известно, что доминирующие и рецессивные признаки одной и той же фенотипически отличительной черты каким-то образом следуют из экспрессии двух различных вариантов (аллелей) того же самого гена. Но какой смысл в фразе «каким-то образом следует из...»? Известно, что особи чистых линий, всегда проявляющие тот же самый отличительный признак, — гомозиготы, то есть они содержат две копии одного и того же аллеля (если организм воспроизводится половым путем). В то же время гибриды, полученные в результате скрещивания двух чистых линий, — гетерозиготы, то есть они содержат два различных аллеля соответствующего гена (по одному от каждого родителя). Отвечают ли эти хорошо проверенные факты на поставленные выше вопросы? Данная про-

блема должна быть исследована с помощью новых подходов, потому что обычные ответы ненадежны [1; 2].

## **10.2. Доминантные и рецессивные признаки, а не доминантные и рецессивные аллели**

В действительности, хотя пары признаков часто оказываются доминантными / рецессивными, как описывал Мендель, это не всегда так. У шортгорнского рогатого скота при скрещивании красных гомозигот с белыми все гетерозиготное потомство имеет чалую масть в результате смеси красных и белых волос. При скрещивании андалусских черных кур с белыми получают синих гетерозиготных потомков, что выглядит довольно странно. Если рассмотреть более детально определенные отличительные признаки у многих гетерозигот, то можно заметить, что они могут иметь большинство черт доминирующего признака, но часто более мелкие черты указывают на их рецессивный характер. Другими словами, доминантность не всегда полная. Гетерозиготы, получаемые от скрещивания гомозигот, сами по себе однородны, но они не всегда проявляют предполагаемую «доминантную» черту или «доминантная» черта имеет неполную пенетрантность. Классический текст по генетике гласит: «... Таким образом, могут быть все стадии между полной доминантностью и ее отсутствием; и эти все разнообразные состояния могут быть обнаружены среди различных признаков у отдельного индивидуума» [3]. Удовлетворительное объяснение доминантности и рецессивности также должно, без дальнейших случайных предположений, объяснить неполную доминантность.

Несмотря на то, что многочисленные эксперименты были проведены на большом количестве видов, именно генетические нарушения у людей пролили больше света на эту проблему. Примером может

служить такая патология человека, как серповидно-клеточная анемия (дефект в гемоглобине S) [2]. Это состояние часто описывалось как наличие необычной доминантности. Серповидная форма эритроцитов — рецессивный признак. Гомозиготы не доживают до периода полового созревания. Однако в эндемичных по малярии ареалах гетерозиготы имеют преимущество (селективное преимущество гетерозигот). Очевидно, хотя они и синтезируют достаточно нормального гемоглобина, чтобы дожить до периода полового созревания, гетерозиготы тем или иным образом отличаются от «нормальных» гомозигот.

Мы описали характерные признаки или особенности как доминантные / рецессивные так же, как и Мендель. Но мы не характеризовали аллели таким образом, как это изложено, к сожалению, во многих учебниках. Аллели не бывают «доминантными» или «рецессивными». Эти термины лишены смысла применительно к аллелям; они имеют его только касательно характерных признаков. Аллели — это «параметры» системы. Когда они установлены, то «переменные» — характерные признаки развиваются как следствие. Описывать аллель как «доминантный» или «рецессивный» — значит совершать существенную ошибку, путая параметры с переменными. Это неправильное понимание или неправильное использование слов влечет за собой значительные погрешности и заблуждения в традиционных работах по генетике. Наша цель в данный момент, вслед за J. W. Porteous (2004), — исправить эту ошибку. Хотя фенотипический признак может отражать несколько кажущихся независимых черт — действие нескольких генов, — принцип «один ген — один белок — одна цепочка действий» сохраняется везде и является основой правильного понимания генетики. Пока мы не исправим это ошибочное представление, мы рискуем упустить из поля зрения этот фундаментальный факт.

До настоящего времени в некоторых работах по генетике, в том числе по медицинской генетике, предлагалось современ-

ное объяснение данного вопроса с точки зрения биохимии, что позволяет нам быть уверенными в происходящем, когда в клетке одновременно находятся разные аллели. Однако ученым не удалось объяснить настоящее значение «пенетрантности» и «варьирующей экспрессивности», а также истинной «доминантности» и «рецессивности». Возможно, авторы полагали, что вообще не нужно никакого объяснения. Для того чтобы понять экспрессию генов и использовать новые факты в медицинской генетике, нам необходимо найти рациональное объяснение этого фундаментального положения генетики.

### 10.3. Ведущие ученые-биохимики ищут метаболический эффект генов

Исследования изменений метаболизма были впервые проведены А. Гарродом [4], который изучал медицинские аспекты алькаптонурии (продукт этого нарушения — темная моча). У больного алькаптонурией — дефицит одного из ферментов, необходимого для расщепления фенилаланина и тирозина, поэтому промежуточное звено на этом пути — гомогентизиновая кислота — накапливается и выделяется, образуя черный полимер при контакте с воздухом. На основании своих исследований А. Гаррод сделал важный вывод: при метаболизме нет обходных путей; ни один продукт не может быть дальше усвоен посредством альтернативного пути. Алькаптонурия была случаем проявления метаболического дефекта на ранней стадии жизни, и А. Гаррод начал искать похожие состояния, которые впоследствии стали известны как «врожденные нарушения метаболизма». Сейчас есть вебсайт, регистрирующий генные нарушения, ведущие ко многим патологическим состояниям. К настоящему времени накоплено около 10 000 записей в базе данных [5].

Эта работа А. Гаррода четко указывает, где мы должны искать нарушения, вызванные изменениями в генах, так как многие протеины — это ферменты, которые катализируют реакции в метаболических путях (рис. 10.1). Хотя метаболические пути сложные, рассмотрение любой биохимической схемы, например в Интернете, показывает, насколько обширной может быть физиологическая функция даже в самом простейшем организме [6].

Метаболический путь превращает субстрат посредством промежуточных соединений в конечный продукт. Каждая реакция на конкретном этапе катализируется специфическим ферментом. Следует помнить о двух важных факторах:

1. Реакции протекают не изолированно. Действительно, все реакции, в конечном счете, связаны друг с другом. Клетка и весь организм — взаимосвязанные системы. Это означает, что при нарушении одного элемента, потенциально отреагирует вся система. Другими словами, если изменить один ген, то вся система может перестроиться.

2. В клетке изменение в гене может привести к изменению в ферменте, который он кодирует, и это может повлиять на метаболический путь, в котором данный фермент участвует.

Мутация гена — это образование нового аллеля данного гена. Она может нарушать всю живую систему от роста до инволюции (от деления клетки до апоптоза), чтобы оценить такой факт в полном объеме потребуются, как мы понимаем, провести анализ контроля метаболического пути (АКМП). Без этого нельзя объяснить влияние генов на метаболизм. Если мы не будем понимать генетических основ заболевания или какого-либо нарушения, то не наступит то время, когда можно будет достичь максимального эффекта в диагностике болезней и лечении больных в будущем.

## **10.4. Анализ контроля метаболического пути и проявление фенотипических признаков**

Работы R. Heinrich, J. A. Rapoport [7], H. Kacser, J. Burns [8], а также альтернативный путь, который в дальнейшем был развит в работах M. A. Savaglau [9], рассматривают суть этого подхода, который постепенно начинают воспринимать биологи. D. A. Kell [10] изложил общие принципы АКМП, во многом сходного с «системным анализом» в биологии. По сути, АКМП — это количественная оценка ответа молекулярных и метаболических систем на изменение их внутренних или внешних параметров. Такой подход применим ко всем биологическим системам. (Более детальная информация об этом представлена на рис. 10.1). С помощью количественных молекулярных параметров метаболизма можно увидеть, как изменения в генах влияют на метаболические пути. Понимание данного вопроса даст нам возможность объяснить доминантность, рецессивность и неполную доминантность. При этом следует обратить внимание на следующее:

1. Общая скорость образования продукта метаболического пути всецело зависит от скорости отдельных реакций, катализируемых ферментами этого пути.

2. Если один из этих ферментов изменится, то, вероятно, скорость его реакции также изменится и, следовательно, поток в целом будет меняться.

3. Молекулы, ответственные за все характерные фенотипические признаки во всех клетках, — продукты потока метаболических путей.

Таким образом, изменение в одном ферменте метаболического пути, по всей

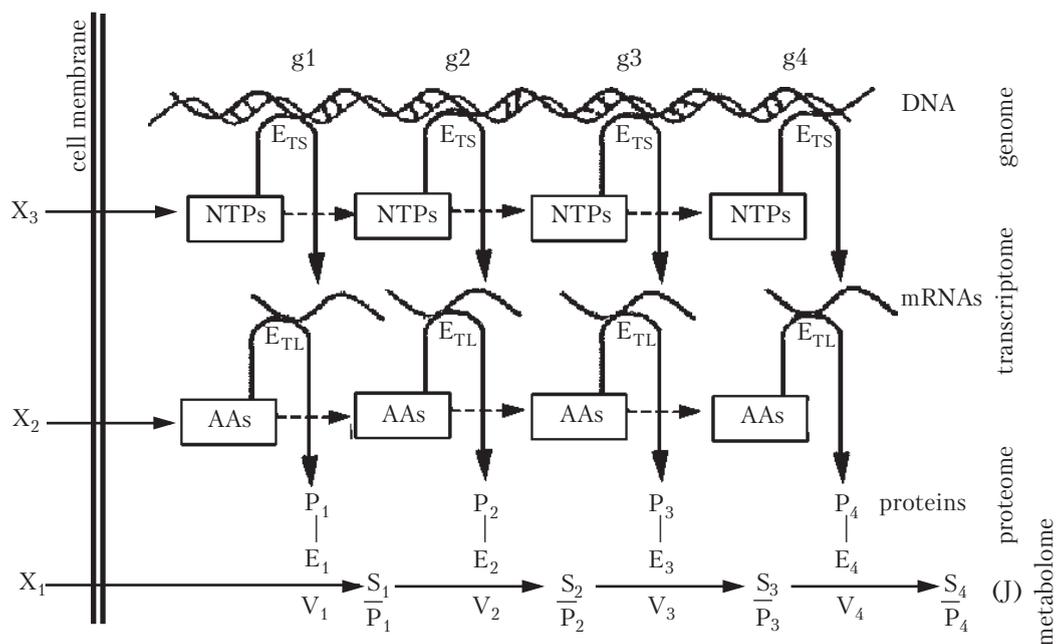


Рис. 10.1. Эта диаграмма изменена по сравнению с таковой Porteous [2] и отображает способ связи биохимии и генетики, вводятся понятия «геном», «транскриптом», «протеом» и «метаболом», хотя теоретически метаболом должен включать все (см. текст). Субстанции, поступающие через клеточную мембрану, используются ферментами в клетке для получения информационной РНК (верх), белков (середина) или тысяч других реакций, которые происходят в общем метаболизме (метаболические пути всей клетки). С генов ( $g_1$ ,  $g_2$  и др.) считается генетический код, чтобы сформировать иРНК, которые предназначены для создания белков ( $p_1$ ,  $p_2$  и др.). Они изображены как полипептиды, закодированные соответствующими генами. Здесь мы рассматриваем их как ферменты, включенные в метаболические пути: каждый из  $E_1$ ,  $E_2$  и т. д. в диплоидной клетке мог бы быть парой белков, синтезированных каждой парой аллелей. Первый фермент преобразует субстрат  $X_1$  в промежуточное звено —  $S_1$ , которое теперь действует как субстрат для  $E_2$ . Поэтому  $S_1$  можно было бы также назвать «продуктом 1» и присвоить ему альтернативный символ  $P_1$ . На него действует, в свою очередь,  $E_2$  и преобразует в  $S_2$  или  $P_2$ . Реакции проходят по этому метаболическому пути слева направо. Ферменты часто организовываются в метаболомы, работающие так, чтобы промежуточные звенья никогда не обнаруживались на общей внутренней поверхности клетки — этот процесс известен как направленная передача. То, что мы видим — конечный продукт, здесь  $S_4$  или  $P_4$ , степень формирования которого зависит от поступления веществ в клетку через метаболические пути ( $J$ ). Степень производства  $S_4$  —  $J$  зависит одновременно от скорости всех шагов реакции, катализирующей  $E_1$ ,  $E_2$ , и т. д. Регулирование  $J$  зависит от уровней и активности каждого из этих ферментов и, следовательно, от экспрессии пары аллелей (генов), кодирующей каждый фермент. Это, в свою очередь, находится под влиянием внутренней среды клетки и внешней окружающей среды. Фенотипические признаки — результаты конечных продуктов метаболических путей типа  $S_4$  или  $P_4$

вероятности, в результате генной мутации, может изменить этот признак. При известных кинетических свойствах измененного фермента АКМП позволит предсказать изменения в потоке метаболического пути и, следовательно, количественно и точно результат формирования фенотипического признака.

Все фенотипические признаки определяются либо продуктами метаболических путей (например, количество меланина в коже), либо определенными белками (например, гемоглобин при серповидно-клеточной анемии). Приведенные выше объяснения показывают, как различные аллели гена, кодирующего ферменты, создают разнообразные потоки метаболического пути и, следовательно, формируют различные признаки. Различные аллели гена, кодирующего белок (например гемоглобин), увеличивают число вариантов данного белка. Биохимические связи между генотипом (набор всех генов организма) и фенотипом (совокупность характерных свойств или отличительных признаков) в связи с этим становятся ясными, но не всегда явными. Кроме того, это еще не объясняет доминантности, неполной доминантности и рецессивности.

## 10.5. Объяснение доминантности и рецессивности

Ключ к объяснению этих явлений основан на неподтвержденном допущении того, что большинство ферментов метаболизма присутствуют в клетке в больших концентрациях. Концентрация отдельного фермента может быть уменьшена без какого-либо улавливаемого изменения в метаболическом потоке [8]. Предположим, что ген, кодирующий этот фермент, существует в двух аллельных формах: форма « $U$ », функциональная в полном объеме, и форма « $u$ », абсолютно не функциональная.

У гомозиготы  $UU$  две копии аллели  $U$ , поэтому в результате экспрессии обоих

аллелей продуцируется функционирующий фермент. Примем концентрацию функционирующего фермента в клетке такой гомозиготы за 100 %. У гомозиготы « $uu$ » (две копии аллеля  $u$ ) ни один из аллелей не кодирует функционирующий фермент, поэтому концентрация такого фермента в клетке составляет 0 %. У гетерозиготы « $Uu$ » (по одной копии каждого аллеля) концентрация функционирующего фермента составляет 50 %, и этого достаточно, чтобы характер метаболического пути оставался таким же, как у гомозиготы  $UU$  (рис. 10.2). Таким образом, выработка молекулярного компонента для фенотипического признака у  $Uu$  приводит к идентичному результату  $UU$ . Но  $uu$  не будет вырабатывать молекулярный компонент данного признака, поэтому функционирующий фермент полностью отсутствует и метаболический путь становится не действующим.

Если особи чистой линии  $UU$  скрещиваются с особями чистой линии  $uu$ , все потомство будет гетерозиготным ( $Uu$ ). Потомки имеют такие же признаки фенотипа, как гомозиготный родитель  $UU$ , то есть рецессивные признаки у этих гибридов исчезают и остаются только доминантные. Обратное скрещивание  $Uu \times Uu$  даст потомство, состоящее из  $1/4 UU$ ,  $1/4 uu$  и  $1/2 Uu$ . Таким образом, доминантный признак проявляется у  $3/4$  потомков ( $UU$  и  $Uu$ ), а рецессивный — у оставшихся  $1/4$  ( $uu$ ). Обращаем внимание на то, что парные буквы  $UU$ ,  $Uu$  и  $uu$  символизируют аллели, но не признаки. В то же время во многих учебниках парные буквы используются для обозначения признаков, хотя Мендель этого не делал. В результате ситуация остается запутанной, поэтому необходимо обратиться к обозначениям АКМП. Мендель использовал единичные буквы (например,  $A$  и  $a$ ) для характеристики доминантных и рецессивных признаков у особей чистых линий и спаренные буквы ( $Aa$ ) для гибридов, у которых один признак ( $A$ ) был явным, а другой ( $a$ ) неким образом присутствовал, но был незаметным. Он не употреблял парные буквы,

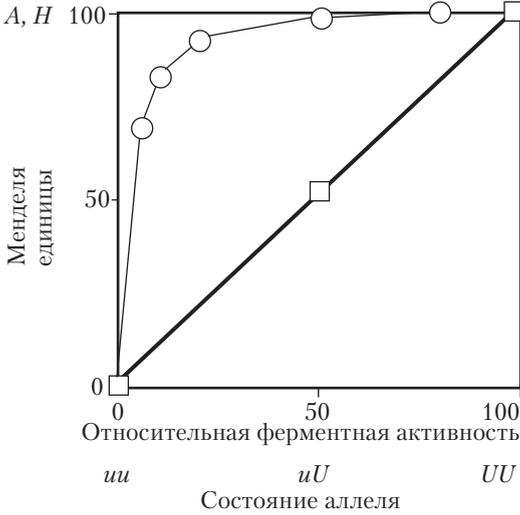


Рис. 10.2. Деятельность фермента в клетке (предполагающая, что ген, кодирующий фермент, экспрессируется) будет зависеть от форм этого фермента, закодированного в каждом аллеле гена. Предположим, что форма, закодированная одним аллелем, имеет  $x$  % активности от самой активной формы при условии насыщения субстратами; предположим, что форма, закодированная другим аллелем, имеет  $y$  % той максимальной активности; тогда относительная активность фермента в клетке будет  $1/2(x+y)$ . Предположим, что активность, требуемая для максимального потока через метаболический путь, —  $z$ . Тогда, если  $1/2(x+y) < z$ , поступление веществ в клетку через метаболические пути будет максимальным. Значение этого в отношении доминантности и рецессивности объясняется в тексте

которыми мы сейчас обозначаем гомозигот. Из этого следует [1; 2], что необходимо с осторожностью подходить к символам признаков ( $A, a$ ) и аллелей ( $U, u$ ); во многих учебниках не указано это отличие. Менделю не были известны понятия, которыми мы обозначаем термины «гомозигота», «гетерозигота», «ген» или «аллель»; их не существовало в XIX в. Но он не путал признаки — переменные с тем, что могло быть ответственным за признаки — параметрами.

Понятие «доминантный» аллель  $U$  «угнетает» «рецессивный аллель»  $u$ , о кото-

ром обычно говорится в учебниках по генетике, несостоятельно.

В объяснении доминантного / рецессивного соотношения 3 : 1 мы предположили, что один аллель кодирует полностью функционирующий фермент, а второй аллель — совсем не функционирующий фермент (крайние проявления). Некоторые аллели кодируют частично функционирующие ферменты. Через ряд поколений может произойти несколько мутаций в определенном гене и тем самым увеличится количество различных аллелей, кроме двух. Каждый индивидуум имеет пару аллелей. В зависимости от активности ферментов, закодированных в аллелях этой пары, относительная концентрация «функционирующего фермента» в клетке конкретного индивидуума займет одно из многих возможных значений в пределах от 0 до 100 %. Если значение концентрации выше 50 %, то выработка молекулярного компонента будет максимальной, а если оно ниже 50 %, то продукция данного компонента будет меньше максимальной. Поток метаболического пути не реагирует на поэтапные мутации в гене, который кодирует любой входящий в него фермент. Исходя из этого, нетрудно понять, как может возникнуть неполная доминантность и отклонение от классического соотношения 3 : 1. Если эта информация непонятна, то вместо того, чтобы объяснить какое-то необычное генетическое состояние, мы немного отойдем от простого описания фенотипа.

Почему, говоря языком биохимии, различные формы ферментов — продукты разных мутировавших аллелей гена — могли проявить градацию активности? М. Perutz [11] считает, что модификации в белке — результат точковой мутации. Если точковая мутация изменяет активный центр фермента, то результатом может быть полная потеря его функции. Напротив, небольшая модификация, такая как замена остатка глютаминовой кислоты на остаток аспарагиновой кислоты в периферической части белка может быть незамеченной, поэтому функция не нарушается или нарушается незначительно.

Таким образом, большое количество незначительных изменений может происходить в аллелях, кодирующих ферменты, каждый из которых имеет разное воздействие на метаболический поток и, следовательно, на фенотипические признаки. Небольшие модификации могут не менять фенотип в обычных условиях, но при изменившихся обстоятельствах ранее скрытая модификация может внезапно проявиться либо во вред, либо с пользой в большей или меньшей степени для индивидуума. Это молекулярная основа эволюции: видоизменение может обнаружиться в свое время, а различное давление отбора, отображающее перемену условий среды может либо сохранить его в популяции, либо потерять навсегда.

Кажется, что некоторые части нашей ДНК более подвержены изменениям, чем другие, на которые воздействуют внешне мутагенные факторы (химикаты, радиация и др.). Поэтому определенные нарушения, не являющиеся летальными, приводят к каким-то нарушениям и проявляются чаще, чем можно было бы ожидать от «случайного попадания в цель». В наши дни, во времена «омов», предрасположенность хромосом к разрыву ДНК и другим химическим изменениям объясняется «фрагиломами», описанными M. Schwab et al. [12]. Только время покажет, как это повлияет на наше понимание генетических болезней человека.

## **10.6. Неполная пенетрантность и другие выводы**

Когда ожидаемая доминантная черта не проявляется, тогда говорят, что у нее слабая пенетрантность. Иногда же признак фенотипа обнаруживается при одних условиях и отсутствует при других. Например, шерсть горного зайца белая зимой, но становится серой, когда наступает теплая погода. С возрастом у человека некоторые

мутировавшие гены начинают обнаруживаться фенотипически, как, например, болезнь Гентингтона. В таких случаях задействуются несколько механизмов, но понять мы их сможем только с точки зрения АКМП.

Предположим, что два аллеля  $U$  и  $u$ , соответственно, закодировали формы фермента с 65 % и 5 % максимальной активности. Относительная активность фермента, таким образом, в клетках индивидуумов будет, соответственно: 65 % ( $UU$ ), 35 % ( $Uu$ ), 5 % ( $uu$ ). Если выход продукта  $J$  из метаболического пути уменьшится только при условии снижения активности фермента  $< 50$  % от максимальной (а экспрессия фенотипического признака зависит от  $J$ ), то фенотипы индивидуумов  $Uu$  будут промежуточными между  $UU$  и  $uu$ . Очевидно, это упрощенное объяснение, так как большинство фенотипических признаков зависят от активности более чем одного гена. Становится понятным, что такой механизм может дать объяснение таким фенотипам, как «чалая» гетерозигота шортгорнской породы скота и «голубая» гетерозигота андалусских кур, упомянутых выше.

Объяснение «доминантности» и «рецессивности», выделенное в этой главе, объясняет также неполную пенетрантность.

Рассмотрим случай разветвленного метаболического пути, представленного на рис. 10.3. Предположим, что фермент  $E5$  активно экспрессируется только при определенных условиях. Предположим также, что когда экспрессируется  $E5$ , он катализирует превращение  $S2$  немного быстрее, чем  $E3$ . Таким образом, при условиях, когда экспрессируется  $E5$ , образуется  $P2$  и небольшое количество  $P1$ . Поток образования  $P2$  происходит намного быстрее, чем  $P1$ . В условиях, при которых  $E5$  не экспрессируется, продукция  $P2$  равна нулю и весь поток направлен на формирование  $P1$ . Опять же, это упрощенное представление, но с помощью такого механизма можно объяснить изменения в фенотипе, как, например, смена окраски шерсти у горных

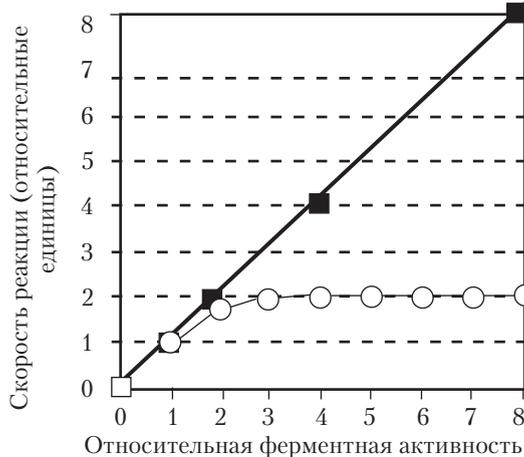


Рис. 10.3. Пример разветвленного метаболического пути, в котором поток веществ будет определяться внешними условиями, что может повлиять на ферментную активность по-разному (для дальнейшего объяснения см. соответствующий раздел текста)

зайцев. Подобным образом возрастные изменения экспрессии одного или нескольких ферментов могут объяснить развитие или утрату признаков с возрастом, как в случае с болезнью Гентингтона.

## 10.7. Уровни клеточной организации: геном, транскриптом, протеом и метаболом

На рис. 10.1 схематически представлены клеточные механизмы, соединяющие генный уровень с уровнем метаболизма, а также термины, часто встречающиеся в исследованиях по биологии. Геном — это общий набор всех генов клетки. Транскриптомом названа вся популяция молекул иРНК в клетке, указывающая на то, какие гены активно экспрессируются. Протеом — набор всех белков клетки, синтезированных в результате трансляции иРНК.

Метаболом — это полный набор всех метаболических процессов, происходящих в клетке (связывающие субстраты, конечные и промежуточные продукты), вместе с белками и иРНК, ответственными за эти процессы, и молекулы, которые их регулируют.

Следует помнить, что геном постоянен на протяжении жизни клетки; гены не изменяются. Транскриптом, протеом и метаболом могут, в принципе, а иногда и практически изменяться время от времени, так как экспрессируются различные гены, а существующие белки разрушаются.

Слово «метаболом» вошло в обиход в результате использования Р. А. Srege [14] термина «метаболон». Метаболон — это функциональная метаболическая единица. Один тип метаболона связан с углеводами, другой — с синтезом и обменом липидов, третий — с синтезом белков, еще один — с расщеплением белков (в последнем случае одной единицей будет протеосома). Метаболон, будучи функциональным, а иногда и структурными единицами, связаны в единую сеть, которая интегрирует все их функции и формирует метаболом.

Метаболом — это нечто большее, чем только макромолекулярное множество (см. рис. 10.1). Он включает и небольшие информационные молекулы, а также многие другие вещества, которые формируют пулы в клетке, служащие источниками и вместилищем для субстратов, промежуточных и конечных продуктов, коэнзимов и т. д. В гомеостатической системе при стабильных внешних условиях метаболом имеет относительно постоянный состав, хотя он может колебаться вокруг среднего. На срезе, охватывающем сотни тысяч молекул, которые составляют клетку, в конкретный момент можно увидеть (но только на данный момент) «отличительную черту» функционального состояния клетки при определенных специфических условиях. Каскад мутаций может случиться при изменении условий, что проявится другими признаками. Если бы мутация произошла в одном аллеле гена, кодирующего фермент метаболизма, метаболом мог стать другим, возможно, даже иным, из-за

реакции последовательного целого на одно небольшое изменение. С другой стороны, как мы видим, фенотип мог бы остаться неизменным в результате мутации, так как активность энзима, кодированного тем геном, не нарушилась настолько, чтобы изменить поток метаболического пути.

Чем больше мы узнаем об этих механизмах и получим больше информации о метаболизме, тем более мощный инструмент будем иметь для диагностики и прогноза нарушений. Это дало бы несравненно более глубокое понимание этиологии заболевания, развития патологического процесса, чем мы получаем при биопсии или выполнении традиционных клинических биохимических анализов. Такой урок уже изучен, так как терапевты иногда запрашивают исследовать несколько десятков показателей в образцах плазмы крови и мочи. Но опыт показывает, что лишь отдельные небольшие молекулы указывают на природу данной патологии.

Существуют такие регуляторные механизмы, которые восстанавливают нарушенный обмен веществ до его нормального состояния: живые организмы предотвращают функциональные и структурные нарушения. Этот феномен — гомеостаз, известен в физиологии. Он существует и на клеточном уровне. Тем не менее, высказанное К. Бернардом предположение о том, что «*milieu interieur*» (внутренняя среда) стремится достичь определенной нормы, логично только в общих чертах (это понятие часто неточно описано метаболическими терминами в современной литературе) [15]. Если отклонение слишком велико, то гомеостатические механизмы могут ухудшать, а не улучшать внутреннюю среду. Если вся клеточная система перестает работать синхронно, то можно ожидать худший исход — смерть клетки. Более полезно рассматривать изменение метаболизма в другом ракурсе: наличие внешнего (например облучение) или внутреннего (например мутация) отклонения, которые могут воздействовать на обмен веществ. Воздействие может быть неопределимым или, в крайнем случае, разрушительным. Но

чаще случается то, что мы раньше называли «изменением в метаболической схеме», когда клетка переходит в новое для нее устойчивое состояние.

Итак, прошло около 150 лет с тех пор, как Мендель проделал свою важную работу о наследственных признаках, однако всестороннее понимание генетических механизмов, чрезвычайно важное в медицинской генетике, начинается только сейчас. Например, всегда существовала определенная сложность при консультировании пациентов и их родственников в случае, когда найдена неполная доминантность, никак не связанная с патофизиологическими состояниями, включая многие из тех, которые классифицируются как врожденные отклонения метаболизма. Наиболее очевидные сложности возникают в случаях, когда патологический признак как будто «перескакивает через поколение»: можно ожидать, что у гетерозиготного представителя проявится абберрация, но этого не происходит. Раньше это приписывалось метаболическому процессу пациента, превышающему «порог чувствительности», — переописание проблемы, а не ее объяснение. Будущее медицинской генетики станет более качественным, если мы научимся давать объяснения, а не просто описание.

Цена этому — огромное количество работы, которую нужно проделать в сфере системного анализа, АКМП и детализации метаболизма, — для лучшего понимания регулярного механизма на уровнях генома, транскриптома и протеома (см. рис. 10.1).

Сейчас мы больше понимаем, что хромосомы — носители генома — сами по себе дифференциально чувствительны к изменениям (мутации), которые должны рассматриваться как необходимое условие для эволюции всех видов. Основа понимания заложена, но большое количество деталей еще необходимо выяснить.

Мы настоятельно рекомендовали бы желающим глубже понять объяснения Менделевской генетики изучить статьи, ставшие основой нашей главы [1; 2]. Эти работы рассказывают об источниках за-

блуждений, которые изобилуют в стандартных учебниках, и описывают релевантность АКМП для правильного понимания «доминантности» более подробно.

### Список литературы

1. *Porteous J. W.* We still do not account for Mendel's observations // *Theoret. Biol. Med. Mod.* — 2004. — Vol. 1. — P. 1-4.
2. *Porteous J. W.* A rational treatment of Mendelian genetics // *Theoret. Biol. Med. Mod.* 1; 6 doi 10.1186/1742-4682-1-6, 2004.
3. *Sinnott E., Dunn L. C., Dobzhansky T.* Principles of Genetics. — 6th Edition. — N.-Y.: McGraw-Hill Book Co Ltd., 1958.
4. *Garrod A. E.* The incidence of alkaptonuria: a study of chemical individuality // *Lancet (ii)*. — 1902. — P. 1616-1620.
5. <http://web.indstate.edu/thcme/mwking/inborn.html>
6. <http://www.gwu.edu/~mpb/index.html>
7. *Heinrich R., Rapoport J. A.* Linear theory of enzymatic chains; its application for the analysis of the cross-over theorem and the glycolysis of human erythrocytes // *Acta Biol. Med. Germanica*. — 1973. — Vol. 341. — P. 479-494.
8. *Kacser H., Burns J.* The control of flux // *Symp. Soc. Exp. Biol.* — 1973. — Vol. 27. — P. 65-104.
9. *Savageau M. A.* Biochemical Systems Analysis: a Study of Function and Design in Molecular Biology. — Addison-Wesley, Reading, MA, USA, 1976.
10. *Kell D. A.* Understanding the Control of Metabolism. — London: Portland Press, 1997.
11. *Perutz M.* Fundamental research in molecular biology: relevance to medicine // *Nature*. — 1976. — Vol. 262. — P. 449-453.
12. *Schwab M.* Fragilome — fragile sites, genetic instability and human disease. — *Cancer Lett In Press*, 2006.
13. *Mueller R. F., Young I. D.* Emery's Elements of Medical Genetics. — 10<sup>th</sup> Ed. — Edinburgh: Churchill Livingstone, 1998.
14. *Srere P. A.* The metabolon // *Trends Biochem Sci.* — 1985. — Vol. 10. — P. 109-113.
15. *Eckert R., Radall D.* Animal Physiology / W. H. Freeman and Co. — San Francisco, 1983. — P. 5.

---

## Глава 11. Генетические аспекты старения и возрастной патологии

---

---

The role of inherited factors in life-span of a man is considered. By the example of inherited diseases, which are notable for shortening of patient's life-span, the role of certain genes in the mechanisms of aging is shown. The molecular changes at the level of gene structure, epigenetic modifications of DNA, RNA interference, and other factors studied in appropriate models of laboratory animals are described. Experimental model of aging allows to reveal the markers of aging that can have an important clinical value. The changes in a genome at different stages of ontogenesis are considered in detail, in particular in the period of aging.

---

Рассматривая роль генетических факторов в механизмах старения, необходимо иметь в виду, что продолжительность индивидуальной жизни многоклеточных организмов ограничена характерным для каждого вида пределом, после которого неизбежно наступает смерть даже в том случае, когда организм находится в максимально благоприятных условиях среды обитания. А поскольку видовые различия между организмами обусловлены генетически, то и разница в продолжительности жизни у них имеет четкую генетическую основу. В этой проблеме следует выделить, по крайней мере, два аспекта — межвидовые различия в продолжительности жизни и, следовательно, старении и внутривидовые вариации в темпах старения и длительности жизни. Различия в продолжительности жизни между далекими таксономическими группами организмов могут варьировать в миллионы раз, хотя даже в пределах класса млекопитающих они отличаются в десятки раз от землеройки, срок жизни которой едва достигает одного года, до человека, максимальная продолжительность жизни которого превышает 100 лет [1]. В различных филогенетических группах организмов наблюдаются разные варианты старения [2]. Лишь у немногих видов животных смерть, если только она не обус-

ловлена насильственными причинами, наступает на фоне их полной функциональной полноценности, как, например, у некоторых бабочек-однодневок, лишенных в стадии имаго пищеварительного аппарата, ряда моллюсков и рыб, погибающих вскоре после воспроизведения потомства. У большинства же животных смерти предшествует более или менее длительный период снижения их функциональных способностей, возможности адаптироваться к нагрузкам, что зачастую сопровождается проявлением ряда характерных для этого периода жизни патологических изменений, обозначаемых как возрастзависимые заболевания, возрастная патология. Этот процесс постепенного необратимого снижения функциональных возможностей организма, сопровождаемый увеличением вероятности болезни и смерти, получил название старения. Старение филогенетически очень древний и консервативный процесс, имеющий много общих черт среди организмов различного уровня организации — от червей и насекомых до позвоночных и высших млекопитающих. Это обстоятельство дает возможность изучать механизмы старения на таких модельных системах, как нематода *Caenorhabditis elegans*, плодовая мушка *Drosophila melanogaster*, мышь и другие млекопитающие, в

том числе различные виды приматов, с целью познания старения человека, у которого такие исследования провести бывает невозможно в силу этических или технических (например, большая, по сравнению с исследователем, продолжительность жизни) причин. К сожалению, до настоящего времени не удалось расшифровать генетические основы межвидовых различий в продолжительности жизни, что дало бы возможность перешагнуть через видовой лимит долголетия. Это цель, к которой человечество стремится на протяжении многих веков. Например, человек отличается от шимпанзе, своего ближайшего сохранившегося родственника в мире животных, всего 2 % генетического материала, имея вдвое большую продолжительность жизни, что дает основание для предположения о вовлечении в регуляцию темпа процесса старения сравнительно небольшого числа генов. Но и внутри человеческой популяции имеется достаточно большая варибельность как скорости старения, так и продолжительности жизни.

### **11.1. Роль наследственных факторов в продолжительности жизни человека**

Продолжительность жизни организма, его сопротивляемость к действию внешней среды зависят от двух составляющих: степени агрессивности факторов внешней среды и способности организма противостоять этим неблагоприятным воздействиям, адаптироваться к ним. Ясно, что чем более жесткие влияния среды, тем короче при равных адаптационных возможностях будет продолжительность жизни. Именно неблагоприятными внешними воздействиями объясняется разная продолжительность жизни человека в различные исторические эпохи, предшествующие современности [3], а также различия в продолжительности жизни в разных регионах совре-

менного мира, в странах с различным уровнем экономического и культурного развития. Старые люди в гораздо большей степени, чем молодые и взрослые, чувствительны к действию неблагоприятных, токсических факторов внешней среды: то, что переносят молодые, для стариков является повреждающим или даже фатальным [4; 5].

Сегодня в ряде развитых стран (Япония, Исландия, Швеция) средняя продолжительность жизни человека почти достигла своего видового предела, так что дальнейшее увеличение продолжительности жизни будет уже зависеть от изменения природы человека. В то же время внутри каждой из популяций продолжает сохраняться значительная гетерогенность продолжительности жизни, обусловленная фенотипическим разнообразием людей в популяции, существенная часть которого связана с генетическими особенностями каждого индивидуума, его генетическим полиморфизмом, определяющим исходный уровень здоровья, предрасположенность к определенным формам патологии, индивидуальный темп возрастных изменений систем и органов. Оценивая особенности старения человека [6], считают, что и темп возрастных изменений, и связанная со старением патология находятся под полигенным контролем. На участие генетических факторов в механизмах старения и долголетия указывают многие исследователи [7; 8]. По статистическим моделям, основанным на близнецовых исследованиях, оценивают вклад генетической составляющей в индивидуальную варибельность возраста наступления смерти примерно в одну четвертую [9]. Обращает на себя внимание наличие так называемого семейного долголетия, то есть относительного числа пробандов, среди родственников которых есть лица, прожившие более 80 лет. Отмечено, что с увеличением возраста пробандов частота семейного долголетия закономерно повышается [10].

Посемейный генеалогический анализ указывает на существование семейств долгожителей с чрезвычайно низкой вероят-

ностью (от  $1 : 10^{-8}$  до  $1 : 10^{-12}$ ) случайного возникновения таких семей, что говорит о врожденной предрасположенности к долгожительству. Об этом же свидетельствует исследование sibлингов [11]. Очевидно, в популяции скорость старения у различных лиц весьма отличается. Если в целом скорость старения, оцениваемая по популяционной смертности, начиная с третьей декады жизни экспоненциально увеличивается, так что вероятность смерти удваивается каждые 8 лет, то после девятой декады кривая смертности отклоняется от закона Гомпертца и выходит на плато. Это может свидетельствовать о том, что люди, дожившие до столь почтенного возраста (долгожители), стареют более медленно. Вероятно, долгожители — это селективная группа, у которых старение происходит медленнее не только в преклонном возрасте, но и на протяжении всей жизни [12]. Эти люди и в преклонном возрасте имеют лучшие функциональные показатели и состояние здоровья, несмотря на то, что они, как и другие представители их когорты, испытывали на протяжении жизни действие многих неблагоприятных факторов — бытовые трудности, войны, притеснения, эмиграцию и прочее [13]. Их пропорция в популяции весьма мала: число людей, перешагнувших 100-летний рубеж, в конце XX ст. составляет от  $1 : 20\,000$  до  $1 : 40\,000$ , хотя их число в современном обществе, в странах с низкой смертностью (Западная Европа, Япония) имеет тенденцию к увеличению, удваиваясь каждые 10 лет [14].

Наряду с примерами значительного долголетия в популяции наблюдаются и случаи ускоренного старения. Прежде всего сюда необходимо отнести так называемые прогерии — наследственные синдромы с чертами ускоренного старения. Наиболее известны среди них — синдромы Гатчинсона — Гилфорда (Hutchinson—Gilford) и Вернера (Werner).

Синдром Гатчинсона — Гилфорда — редкое наследственное заболевание с аутосомно-доминантным типом наследования, в основе которого лежит единичная гете-

розиготная сплайсинговая мутация в гене *LMNA*, расположенном на I (1q) хромосоме с нуклеотидной заменой в 11 экзоне кодирующей последовательности GGC на GCT или AGC, что приводит к делеции 50 аминокислот возле C конца белка ламина А [15]. Ламин А — главный убиквитарный компонент ядерных пластинок, который покрывает и организует внутреннюю поверхность оболочку ядра, его изменение приводит к нарушению функционирования ядра. Мутации в *LMNA*-гене у человека приводят к ряду заболеваний, среди которых мандибулоакральная дисплазия, напоминающая синдром Гатчинсона — Гилфорда, но без укорочения продолжительности жизни [16]. Фибробласты кожи от больных с синдромом Гатчинсона — Гилфорда характеризуются ускоренным репликативным старением в культуре клеток, не связанным с потерей теломер [17]. Клинически при рождении рост и масса детей нормальны. Заболевание начинается в возрасте 8–12 мес и к 3 годам большинство его симптомов отчетливо выражены: постнатальное замедление роста, гипоплазия лица с резко уменьшенной нижней челюстью, отсутствие подкожного жира, частичное или полное облысение с быстрым поседением остатков волос, генерализованная остеодисплазия с остеолизом и патологическими переломами, раннее развитие атеросклероза с гиперхолестеринемией, признаками сердечно-сосудистой патологии и инфарктом миокарда. Самый ранний инфаркт зафиксирован в возрасте 7 лет. Преобладают системные нарушения структур мезодермального происхождения. Средняя продолжительность жизни таких пациентов — 13,4 года; максимальная — 26 лет. Смерть, как правило, наступает в результате коронарной патологии.

Синдром Вернера — это аутосомно-рецессивное наследственное заболевание, основные признаки которого развиваются в возрасте 15–25 лет (прогерия взрослых). Ген, с которым связан синдром Вернера, относится к суперсемейству геликаз — *RecQ*, принимающих участие в репарации

и рекомбинации ДНК. Из 5 известных генов этого семейства дефектность в трех из них связана с заболеваниями, включающими нестабильность генома и склонность к злокачественным опухолям. К ним относятся ген *BLM* с синдромом Блума, ген *RTS* с синдромом Ротмунда — Томсона и ген *WRN* с синдромом Вернера. Ген *WRN* расположен на коротком плече 8-й хромосомы (8p12). Известно 4 мутации, повреждающих его у пациентов с синдромом Вернера. Данный ген ответственен за кодирование геликазы — фермента, состоящего из 1432 аминокислот и раскручивающего парную спираль ДНК, что служит прелюдией для репарации, репликации, экспрессии генов, рекомбинации хромосом и перегасовки генетического материала, предшествующей мейозу [18]. Он также связан с активностью 3′–5′ экзонуклеаз [19]. При синдроме Вернера наблюдается дефект в метаболизме ДНК в виде нестабильности хромосом, увеличения частоты мутаций отдельных генов, повышения частоты негомологичных рекомбинаций, уменьшения скорости репарации и быстрого сокращения длины теломер. Фибробласты кожи в культуре напоминают таковые старика [20]. Клинически синдром Вернера проявляется в замедлении роста в период пубертатности, хотя и без медицинских проблем в детстве. Рано развиваются поседение и потеря волос, атрофия кожи, катаракта, атеросклеротические поражения сосудов, диабет 2 типа, остеопороз, злокачественные опухоли с преобладанием неэпителиальных форм, изъязвления на лодыжках, кальцификация мягких тканей, общий старческий вид. Средняя продолжительность жизни не превышает 50 лет. Оба синдрома прогерии, как это видно из описания, многими своими чертами напоминают картину обычного старения, хотя имеются и определенные отличия. Тем не менее, основной вывод из изучения этих прогерий, равно как и ряда парциальных прогерий и прогероидных синдромов, заключается в том, что в основе возникновения черт преждевременного старения лежат нарушения в генетическом аппарате.

Таким образом, можно сделать вывод, что вариации в продолжительности жизни человека, будут ли они относиться к фактам исключительного долголетия или преждевременного старения, имеют генетическую природу. Поэтому следует рассмотреть те изменения в наследственном аппарате, которые сопровождают старение и, вероятно, ответственны за внешние его проявления. При этом нужно различать те генетические механизмы, которые вызывают и сопровождают старение, от генетических факторов, ответственных за возникновение болезней позднего возраста, хотя, очевидно, провести четкую границу между двумя этими категориями вряд ли будет возможно.

Нестабильность ядерного генома — весьма широкая концепция. Каждая клетка теряет ежедневно за счет спонтанных поломок ДНК при температуре тела более 10 000 оснований. Это происходит как следствие действия канцерогенов, ионизирующей и ультрафиолетовой радиации, ряда химических веществ пищи, а также за счет происходящих при температуре тела гидролизе образующих спираль ДНК сахаров, фосфатов и неэнзиматического метилирования. Сюда добавляются нарушения копирования при делении и эпигенетические изменения. Все это ведет к нарушению способности ДНК служить достоверной информационной матрицей для репликации и транскрипции. Клетка при сохранении этих поломок ДНК нежизнеспособна, поэтому непрерывное условие сохранения жизни клетки — непрерывная работа ферментов репарации [21]. При неспособности процессов репарации полностью восстановить повреждения в молекуле ДНК возникают мутации, то есть такие изменения в геноме, которые передаются дочерним клеткам или потомкам. Они могут варьировать от точечных мутаций, включающих единичные или небольшое число пар оснований, до больших делеций, инсерций, дупликаций и инверсий. Сюда входят эпигенетические модификации ДНК в виде метилирования, которые изменяют экспрессию генов без нарушения последова-

тельностью пар оснований. В последние годы внимание исследователей привлекает регуляторное и, возможно, патогенетическое влияние различных видов интерферирующих РНК (RNAi, siRNA, miRNA) на уровне транскрипции и трансляции [22; 23]. Связанное с проектом «Геном человека» [24] бурное развитие экспериментальных технологий в виде секвенирования генома, полимеразной цепной реакции, микрочиповых технологий для определения полиморфизма генов, мутаций и профиля экспрессии генов [25], а также протеомный анализ всех белков, экспрессируемых геномом или определенным типом клеток или тканей на определенном этапе их онтогенетического развития [26], позволяют глубже понять генетические изменения, сопровождающие старение, определить набор экспрессируемых генов, вычленив гены старения, аллели здорового и патологического старения, индивидуальные конституции генетического риска, предрасположенности к опухолям и прочие вопросы, еще недавно недоступные для анализа. Большую помощь при этом предоставляют исследования на экспериментальных моделях с использованием долго- или короткоживущих линий животных, живых организмов, склонных к определенным формам патологии, трансгенных и нокаутных животных, а также эксперименты, проводимые в краткосрочных или долгосрочных клеточных культурах. Сегодня практически полностью секвенирован геном человека и основной генетической и геронтологической модели — мыши. При этом пришлось пересмотреть некоторые установившиеся взгляды и представления. Например, положение один ген — один полипептид рассматривается как свехупрощение. Исследователи по-разному оценивают количество генов, так как нет окончательной договоренности по этому поводу. Так, непонятно, как учитывать гены, потерявшие свою функцию вследствие аберрации (псевдогены), гены, кодирующие сложные белки, синтезирующие регуляторные РНК. В ДНК человека белок-кодирующие последовательности составля-

ют всего около 2 %, не исключено, что в остальной «темной материи» скрыто много еще неизвестных генов. Первоначально оцениваемое число генов порядка 100 000 уменьшилось до 24 500 белок-кодирующих последовательностей [18]. В молекулярных терминах ген скорее надо определять как сложный сегмент хромосомы, ответственный за образование определенного функционального продукта. Один из вызовов современной науке — расшифровка молекулярных основ генетического полиморфизма, что создало бы базу для понимания механизмов приспособления к окружающей среде, предрасположенности к определенным формам патологии и различий в динамике старения, которые часто обуславливаются комбинацией генетических причин и факторов среды [27]. Исходя из вопросов о том, как регулируется продолжительность жизни, как гены включаются в старение и что это за гены, теоретически можно выделить четыре типа генов:

1. Гены старения как таковые, которые обрывают жизнь.
2. Разрушаемые гены, накопление мутаций в которых нейтрально на ранних стадиях жизни и дает нежелательные эффекты в позднем периоде.
3. Плейотропные гены как результат баланса между селекционным преимуществом в раннем периоде жизни и неблагоприятным влиянием в старости.
4. Гены долгожительства как возникшие в эволюции вторично, например, связанные с необходимостью ухода за потомством.

При этом изучение генетической основы различных форм возрастной патологии может указать путь к генам, потенциально вовлеченным и в сам процесс старения [28].

Хотя подобная классификация генетического материала представляется весьма логичной, практическое осуществление такого разделения сталкивается с вполне понятными затруднениями. Поэтому в настоящее время легче просто каталогизировать гены, оказывающие существенное влияние на продолжительность жизни.

Недавно А. В. Халявкин и А. И. Яшин [29; 30] представили обзор известных генов, сопровождающих увеличение продолжительности жизни у основных животных моделей, которые используются в геронтологических исследованиях. Так, у дрожжей *S. cerevisiae* они насчитали 29 таких генетических модификаций, у круглых червей *C. Elegans* — 56, у плодовой мушки *D. melanogaster* — 22, у лабораторных мышей *M. musculus* — 8. И число описываемых генов, связанных с увеличенной продолжительностью жизни, стремительно возрастает. Интересно, однако, отметить, что величина прироста продолжительности жизни снижается по мере усложнения организации животного: от двух-трехкратного у нематод до 15–30 % у мышей. Комбинация нескольких генетических модификаций у нематод способствует еще большему удлинению жизни. Так, мутация *daf-2* у *C. elegans*, тормозящая экспрессию рецептора инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1), способствует увеличению продолжительности жизни в 1,5–2 раза в зависимости от типа мутации. Удаление клеток-предшественниц зародышевой линии за счет изменения эндокринной регуляции увеличивает продолжительность жизни на 60 %. Комбинация же этих двух воздействий сопровождается увеличением продолжительности жизни в 4 раза. В другой серии экспериментов, где выключение *daf-2* осуществлялось при помощи воздействия соответствующей RNAi, удаление репродуктивной системы увеличивало продолжительность жизни в 6 раз (что соответствовало бы 500 годам у человека). При этом животные оставались активными [31]. Следует обратить внимание на то, что через сигнальный путь рецептор-IGF-1 — инсулиноподобный фактор роста-1 осуществляется влияние гипофизарного гормона роста. Гормональная система инсулин/инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1) происходит от очень раннего общего предшественника и включает много функций, необходимых для регуляции метаболизма, роста и размножения [32]. Вероятно, именно с подобным эффектом было связано ис-

чезновение запрограммированного старения параллельно с потерей репродуктивного поведения и репродуктивной функции при удалении аналога гипофиза — оптической железы у осьминогов [33]. Эволюционно у млекопитающих эта система разделилась на систему инсулина, регулиующую метаболизм, и систему GH / IGF-1, регулиующую клеточное размножение, дифференцировку, рост, развитие и продолжительность жизни. Уменьшение активности IGF-1 у беспозвоночных и грызунов способствует увеличению продолжительности жизни. У человека же снижение IGF-1 повышает заболеваемость во взрослом возрасте, увеличивает риск сердечно-сосудистых заболеваний, диабета 2 типа, остеопороза и нейродегенеративных болезней. В то же время возрастание уровня IGF-1 повышает риск развития рака и оксидативного стресса. Очевидно, что максимальная продолжительность жизни у человека зависит от оптимального соотношения регуляторной оси гипоталамус — гормон роста — IGF-1 [34]. Увеличение продолжительности жизни у мышей в результате различных мутаций, приводящих к прерыванию передачи сигнала от гипофиза через гормон роста и другие гипофизарные гормоны, свидетельствует о регуляторных влияниях эндокринной системы на развертывание программы развития и старения у этих животных [35–37]. Ускоренное или замедленное старение у мышей обусловлено доминантным или аддитивным эффектом комплекса генов, расположенных на разных хромосомах, главным образом на хромосоме 1, но также на хромосомах 8, 14, 16, 17 [38].

Связь долголетия человека с определенными генетическими маркерами не столь очевидна. Учитывая значительное влияние на заболеваемость и продолжительность жизни состояния иммунной системы и, в свою очередь, зависимость между иммунной реактивностью и системой главного комплекса тканевой совместимости (МНС), большинство исследований было направлено на изучение сравнительной частоты аллелей этой системы в раз-

личных возрастных группах. В большинстве случаев четкой разницы между частотой аллелей HLA-A, B, C и DR в разных возрастных группах обнаружено не было или данные различных исследований были противоречивыми [39]. В некоторых работах пытались выявить роль комбинации аллелей системы MHC в группах с ограниченной миграцией, хотя понятно, что на протяжении жизни разных возрастных когорт менялись условия проживания, вредные воздействия, инфекционные агенты и средства борьбы с ними. Так, в одной североирландской популяции было обнаружено трехкратное увеличение частоты кластера HLA-A1, B8, Cw7, DR3 у мужчин старше 90 лет по сравнению с молодыми мужчинами из этой же общины и 90-летними женщинами [40].

В других исследованиях была найдена связь долголетия с разными антигенами комплекса MHC, специфичная для каждой исследуемой популяции. На этом основании был сделан вывод, что подобная зависимость обуславливается характерной для каждой популяции генетической и средовой историей, то есть HLA-генотип может обеспечивать не столько долголетие как таковое, сколько выживаемость в специфической среде [41]. Поэтому внимание исследователей было обращено на полиморфизм в других генных системах и их связь не столько с продолжительностью жизни, сколько с различными формами патологии, сопровождающей старение. В частности, значительное количество работ посвящено изучению полиморфизма генов цитокинов, участвующих в иммунном ответе и воспалительной реакции. Исследователями было показано, что при старении формируется «провоспалительный» цитокиновый фенотип с повышением уровня провоспалительных цитокинов типа ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$  и других [42; 43]. Было показано, что высокий уровень ИЛ-6 сопровождается искажением иммунных реакций, повышенной заболеваемостью и смертностью от разных причин. Старые люди с GG (C-) генотипом в 174-м локусе

промотора ИЛ-6 имеют более высокий уровень ИЛ-6 в крови, чем носители CG и CC (C+) генотипа, что коррелирует с более высокой заболеваемостью артерио-атеросклерозом, болезнью Альцгеймера и мультиинфарктной деменцией [44]. Генотип C(-) сопровождается также повышением уровня и других провоспалительных цитокинов, снижением цитотоксичности естественных киллеров (ЕК) и возрастанием содержания связывающего цинк белка (металлотионеина), что снижает его биодоступность. Цинк, как известно, играет важную роль в функционировании иммунной системы. У C(-) пациентов чаще наблюдаются высокая степень двустороннего стеноза сонных артерий, хроническое воспаление, нарушения иммунитета. Частота C(-) генотипа уменьшается у столетних [45]. В группе сицилийцев показано прогрессирующее уменьшение с возрастом частоты аллеля ИЛ-2-330G, гомозиготности по аллелю ИФН- $\gamma$  874 TT и ИЛ-10 1082 GA, указывающее на то, что цитокиновый профиль, связанный с балансом про- и антиинфламаторных генов, контролирует специфический и неспецифический ответы на стрессорные воздействия и тем самым влияет на продолжительность жизни [46].

Изучение роли генетического полиморфизма в других системах дает нередко противоречивые результаты. Тем не менее, становится понятной и доказанной роль гена, кодирующего Апо-Е. Наличие *apo-e-4* в гомозиготном виде — фактор, ассоциированный с высоким уровнем холестерина в крови, атеросклерозом, риском болезни Альцгеймера. Апо-Е чаще встречается у столетних. Сходные связи обнаружены с генами ангиотензин-превращающего фермента (АСЕ), оказывающего влияние на развитие гипертонии, инфаркта миокарда, деменции [47]. Имеются многочисленные иные генетические ассоциации с заболеваниями, встречающимися преимущественно в среднем и пожилом возрасте, которые оказывают влияние на заболеваемость и продолжительность жизни в раз-

личных этнических популяциях [48; 49]. Например, немало работ посвящено изучению роли генетического полиморфизма в развитии такого связанного с возрастом заболевания, как остеопороз. Найдены ассоциации с полиморфизмом генов белка остеокальцина, разных типов коллагена, генов цитокинов, генами рецепторов к витамину D, эстрогенам, тестостерону, IGF-1, интерлейкинам. И если связь между полиморфизмом определенных генов и состоянием костной ткани в одних работах обнаруживается, то в других такой связи не находят [50]. Вероятно, такие различия могут быть объяснены либо различием во влиянии факторов внешней среды, либо одновременным воздействием других участков генома. Так, в одном из исследований по изучению роли взаимодействия разных генов в развитии остеопороза было показано значение комбинации генов ИЛ-1- $\alpha$ , рецептора паратиреоидного гормона 1-го типа, ИЛ-6, генов коллагена ПА1 и рецептора витамина D [51].

Для более углубленного анализа связи между склонностью к патологии и геномом служат экспериментальные модели, основанные на выведении инбредных линий животных, а также особей с удаленными (нокаутные) или добавленными (трансгенные) определенными генами. Так, если, как уже указывалось ранее, мыши с уменьшенной экспрессией гормона роста или IGF-1 жили дольше соответствующих нормальных мышей, то животные с гиперэкспрессией гормона роста (*GH+/+*) и повышенной его продукцией, равно как и мыши с дополнительным геном *IGF-2*, жили почти вдвое меньше мышей дикого типа, у них раньше наблюдались возрастные изменения в различных физиологических системах и органах [52]. Выведены мутантные и трансгенные породы мышей с расстройством различных систем репарации ДНК, нарушением систем обезвреживания продуктов свободнорадикального окисления, изменением работы и ускоренным старением системы иммунитета, ранним развитием возрастных нейродегенеративных заболеваний, а также мыши с нарушением

процессов программируемой гибели клеток (апоптоза) вследствие изменения процесса контроля за клетками с дефектными молекулами ДНК (гены белка p53, p21) или взаимоотношения между теломерами и теломеразой, регулирующими величину экспансии клеточных клонов путем ограничения числа последовательных клеточных делений. Все эти нарушения сопровождаются появлением различного рода заболеваний и, соответственно, укорочением продолжительности жизни. Выведены также линии мышей с ускоренным старением (SAM) и нарушениями обмена веществ, в частности, с генетическим ожирением (*ob/ob*). Эти животные страдают рано развивающимися заболеваниями типа сахарного диабета, остеопороза, нарушениями нервной, иммунной и эндокринной систем, которые приводят к явлениям, сходным с таковыми при старении у человека [53–55]. Доказано, что у мышей с ускоренным старением чаще и раньше возникают повреждения ДНК в виде однонитевых разрывов во всех органах (легкие, толстый кишечник, печень, мозг, мышцы, сердце), начиная с ранних сроков жизни [54].

Недавно был выведен новый мышинный мутант — *Klotho*, у которого проявляется синдром, напоминающий преждевременное старение у человека: сокращение продолжительности жизни, уменьшение активности, остеопороз, артериосклероз, бесплодие, атрофия кожи. Причина всех этих признаков — разрушение единственного гена *klotho*, названного так в честь древнегреческой богини, одной из Парк, ткающей нить жизни. Этот ген имеет нуклеотидные последовательности, сходные с ассоциированной со старением бета-галактозидазой, и кодирует мембранные белки, экспонируемые на наружной поверхности клетки [56–58]. Эксперименты с парабиозом показали, что продукты гена *klotho* проявляют свое действие, по крайней мере частично, гуморальным путем [59]. С этой позиции могут найти определенное объяснение наши экспериментальные данные об ускоренном старении молодых мышей, «сшитых» в парабиотические гетерохронные

пары со старыми партнерами [60; 61]. У человека локус *klotho* ассоциирован с ожидаемой продолжительностью жизни [62].

## 11.2. Изменения в геноме в процессе старения

В течение жизни организм проходит различные этапы своего развития и старения, каждый из которых отличается определенными биохимическими характеристиками и сопровождается экспрессией конкретного набора генов. Эти явления более подробно изучены в период раннего развития организма от зиготы до формирования дифференцированных клеточных систем и органов. В последние годы достаточно много внимания уделяется и экспрессии генов в процессе старения, характеристике транскрибируемой РНК. Данные об изменении рибосомальной РНК достаточно противоречивы, вероятнее всего, она с возрастом мало изменяется. Что же касается изменения специфических иРНК, то их транскрипция меняется разнонаправленно в зависимости от характера кодируемого белка — некоторые транскрипты увеличиваются с возрастом, другие — уменьшаются, иные — не меняются вовсе. Кроме того, влияние старения на транскрипцию специфических иРНК варьирует в разных тканях по-разному [63]. Например, при изучении экспрессии генов в поперечнополосатых мышцах молодых и старых мышей в 58 генах (0,9 % функционирующего генома) было обнаружено более чем двукратное увеличение уровня экспрессии и в 55 генах — более чем двукратное его уменьшение. Среди генов с увеличенной экспрессией значительная часть относилась к отвечающим на стресс, в то время как уменьшенная экспрессия захватывала гены, связанные с энергетическим обменом [64].

Различия в экспрессии генов при старении наблюдаются даже в органах одной системы, например, между клетками двенадцатиперстной кишки и толстым кишеч-

ником у крыс [65]. В работе [66] с применением методов отъемной гибридизации, ДНК микрочипов и обратной ПЦР было показано, что у старых крыс Wag/Rij в почке появляется только один новый ген (*Kage-1*), в то время как в гипофизе увеличивается экспрессия 11 генов, в том числе таких важных для регуляции, как предшественников нейромедина U-23 и нейромедина В, а также предшественника белка, регулируемого кокаином и амфетамином, и уменьшается экспрессия 6 генов. Интересно, что в стареющей почке уменьшается также содержание ряда белков, что объясняется посттрансляционными изменениями. Хотя во многих исследованиях показана хорошая корреляция между возрастными изменениями транскрипции иРНК и синтезом соответствующего белка, в ряде случаев имеются существенные расхождения между изменением транскрипции иРНК и синтезом белка. Эти результаты подробно проанализированы [63].

Следовательно, для правильной оценки влияния старения на экспрессию специфических генов и синтез соответствующих белков необходимо проводить параллельное определение как уровня иРНК, так и содержания белка. При этом нужно учитывать, что уровни и того, и другого в клетке характеризуются не только скоростью синтеза, но и посттранскрипционным и посттрансляционным процессингом, а также скоростью деградации. В разных клетках и для разных веществ эти три процесса изменяются при старении по-разному, нередко разнонаправленно, что, в конечном счете, определяет уровень иРНК и белка в клетке. Как известно, для осуществления транскрипции должно произойти распознавание специфической последовательности ДНК фактором транскрипции, который образует комплекс с РНК-полимеразой II. Для дальнейшего синтеза необходимо, чтобы ДНК в хроматине была доступна для фактора транскрипции и РНК-полимеразы II и происходило продвижение этого комплекса вдоль молекулы ДНК. Пока что не определено, что старение сопровождается изменением активности

РНК-полимеразы II. Но структура хроматина и факторы транскрипции меняются существенно. Так, на структуру хроматина значительное влияние оказывают возрастное уменьшение ацетилирования гистонов, что делает ДНК менее доступной для РНК-полимеразы II. Метилирование ДНК — еще один фактор, играющий роль в регуляции транскрипции, — между уровнем метилирования, экспрессией генов и их транскрипцией существуют обратные соотношения. Описано как гипер-, так и гипометилирование ДНК с возрастом, причем последнее, похоже, преобладает, хотя нет прямых доказательств, что возрастные изменения транскрипции генов в целом организме, а не в стареющих культурах клеток, — следствие изменения метилирования ДНК [63]. Ранее было выявлено существование связи между замедлением пролиферации лимфоцитов, скорости разрушения и РНК протоонкогенов *c-myc* и сниженным уровнем метилирования *c-myc* генов [67].

Наиболее изучены возрастные изменения факторов транскрипции, таких как AP-1, NF-κB, HSF-1. Доказано, что фундаментальную роль в обусловленных возрастом изменениях в экспрессии специфических генов играют два фактора — NFAT и HSF-1. Если AP-1 и NF-κB значительно варьируют в зависимости от типа клеток, то падение связывающей ДНК способности HSF-1 (heat shock transcription factor-1) универсально и ведет к нарушению синтеза важных для выживания клетки в критических условиях белков теплового шока (hsp70). Возрастное снижение индукции транскрипции ИЛ-2 Т-лимфоцитами возникает вследствие нарушения образования NFAT и NF-κB в результате дефекта в передаче активирующего сигнала внутри Т-лимфоцита [68]. В то же время HSF-1 нарушается вследствие изменения в его белковой части, что ведет к падению его связывающей способности с высококонсервативной последовательностью HSE на гене белка теплового шока молекулы ДНК [69]. Нарушение трансляции при старении проявляется в виде уменьшения числа по-

лирибосом и увеличения количества мономерных рибосом, что связано с дефектом инициации синтеза белка вследствие увеличения фосфорилирования eIF2α, главного звена, лимитирующего трансляцию и РНК [70]. Снижается также активность фактора элонгации EF-1α [71].

Являются ли подобные изменения универсальными и необратимыми? В обзоре [72] приведены данные о получении клонированных организмов трех видов животных — коровы, овцы и мыши — путем переноса ядра соматических клеток, взятых от взрослого и даже стареющего животного или из клеточных культур с явными признаками старения, в энуклеированный ооцит с последующей его активацией. Во всех случаях было получено перепрограммирование генетической информации ядра с развитием организмов, которые почти ничем не отличались от животных, появившихся на свет естественным путем. В клетках животных с перенесенными ядрами наблюдалось удлинение теломера и повышение активности теломеразы до уровня контроля, хотя в клетках доноров теломеры были резко укорочены, а теломераза подавлена. Эти животные развивались нормально, признаки преждевременного старения у них отсутствовали, хотя в ряде случаев наблюдалась патология, связь которой с повреждением перенесенного ядра-донора нуждается в доказательстве. Впрочем, существует значительное количество работ, в которых показаны изменения ДНК ядра и митохондрий в процессе старения, объясняемые повреждающим влиянием разнообразных факторов и неспособностью репаративных систем восстанавливать эти повреждения.

### 11.3. Нарушения при старении митохондриального генома

Центральная роль митохондрий в окислительном энергетическом метаболизме клетки делает ее постоянным источником образования свободных радикалов и в то

же время объектом их действия. Многие черты генома митохондрий, его структуры и локализации имеют важные последствия для его возрастных изменений.

Как известно, митохондриальная (мт)ДНК млекопитающих представляет собой двунитевую кольцевую замкнутую молекулу, состоящую из 16 569 пар нуклеотидов, распределенных асимметрично в тяжелой и легкой комплементарных цепях. Расположена мтДНК в митохондриальном матриксе, пространственно вблизи находящейся в мембране системы транспорта электронов, генерирующих большое количество свободных радикалов. В митохондриях отсутствуют гистоновые белки, защищающие от повреждения ДНК ядра; механизмы репарации повреждений ДНК в митохондриях менее мощные, чем в ядре [73]. В результате мтДНК оказывается примерно в 100 раз более чувствительной к повреждающему действию реактивных молекул в митохондриальном матриксе [74]. Кодирует мтДНК 22 транспортных РНК, 2 рибосомальных РНК и 13 белков, входящих в состав 5 комплексов, обеспечивающих окислительное фосфорилирование (НАД-Н дегидрогеназы, сукцинат-дегидрогеназы, убиквинол-цитохром с редуктазы, цитохром с редуктазы и АТФ-синтазы). Остальные 65 белков этих комплексов кодируются ДНК ядра. Поэтому понимание взаимодействия между митохондриальным и ядерным геномом представляется существенным для определения механизмов старения.

Более частое повреждение мтДНК ведет к накоплению мутаций, которые могут существовать в виде точечных изменений, дупликаций или делеций. Эти мутации имеют следствием образование аномальных белков со стехиометрическим несоответствием компонентов, кодируемых в митохондриях и ядре, что влечет за собой нарушение функции компонентов системы окислительного фосфорилирования. Это, в свою очередь, сопровождается уменьшением продукции АТФ и повышением уровня реактивных форм кислорода с последующим развитием оксидативного

стресса, окислением белков и липидов [75].

Повреждение же митохондрий, нарушение проницаемости их мембран ведет к выходу в цитозоль прокаспаз, цитохрома с — активатора каспаз, проактиваторов каспаз, апоптоз индуцирующего фактора (AIF), которые запускают механизмы апоптоза и гибели клетки [76]. Вопрос о роли повреждения мтДНК в процессе старения во многом связан с особенностями репликации митохондриального генома и накопления возникших мутаций, резко отличающихся от таковых в геноме ядра. Репликация мтДНК характеризуется асинхронностью для каждой из цепей ДНК, противоположным направлением и, в связи с кольцевой формой молекулы мтДНК, отсутствием потери теломеров при последующих циклах репликации, каждый из которых длится около 2 ч [77]. Для понимания возможной роли накопления мутаций в мтДНК при старении важную информацию предоставляют так называемые митохондриальные болезни, врожденные заболевания нервной и мышечной систем, связанные с накоплением мутаций в значительной части митохондрий — 70–90 % [78]. Когда величина нарушения окислительного фосфорилирования превышает определенный пороговый уровень, это ведет к нарушению функционирования клетки и клиническому проявлению заболевания. При подпороговых уровнях нарушений клинической манифестации болезни может не быть, однако зависимое от возраста накопление мутаций может снижать эффективность окислительного фосфорилирования и увеличивать недостаточность последнего, обусловленную наследственными мутациями мтДНК, что, в конечном итоге, может привести к включению механизмов апоптоза [79].

Вероятно, мутации в мтДНК накапливаются, начиная с половых клеток. Но появление новых спонтанных точечных мутаций в течение жизни, по крайней мере у крыс, сравнительно меньшее, чем можно было бы ожидать, и составляет до половины всех изменений. Интересно, что часто-

та мтДНК мутаций в мозге в 10 раз выше, чем в мышцах, и у молодых, и у старых крыс [80]. У человека внутри европейской популяции все многочисленные варианты гаплотипов мтДНК, определяемые на основании анализа рестрикционными энзимами, собраны в 9 гаплогрупп: H, I, J, K, T, U, V, W, X [81]. Выявлено, что митохондриальный гаплотип оказывает влияние на темп и качество старения. Так, столетние итальянские мужчины имеют значительно большую частоту J гаплогруппы, определяемой по полиморфному рестрикционному сайту 16065g, чем молодые мужчины той же этнической принадлежности и географической области [82]. Более того, внутри гаплогруппы J есть варианты, связанные с долгожительством и короткожительством. Например, в ирландской популяции сайт 16389g встречается в молодой группе в 1 % случаев, а среди лиц старше 80 лет — в 8 %, наоборот, сайт 16000g имеет частоту в молодой группе в 13 %, а в старой — в 4 % случаев [83]. Увеличение частоты митохондриального полиморфизма описано у французских столетних жителей в положении mt5178, происходит замена C на A [84]. В других этнических группах эта связь может быть иной, например, среди японских столетних жителей частота полиморфизма мтДНК связана с положением mt9055, замена G на A [85]. Естественно, что только изменениями в митохондриальном геноме нельзя объяснить все наблюдаемые при старении изменения в генетическом аппарате, так как параллельно значительные повреждения происходят и в ядре.

#### 11.4. Возрастные нарушения в геноме ядра

Еще в 60-е годы прошлого столетия Леонард Хейфлик [86] установил, что клетки в культуре имеют определенный лимит клеточных делений, поэтому после известного числа удвоений, различного для кле-

ток, полученных от животных разных видов, они перестают делиться и подвергаются процессу дегенерации — клеточному старению. Причем число удвоений клеточной массы уменьшалось по мере увеличения возраста организма, из которого были получены клетки. В 1971 г. А. М. Оловников высказал предположение о том, что при репликации линейной ДНК концы ее не способны к полному воспроизведению линейной матрицы вследствие особенностей структуры ДНК-полимеразы, и вновь образованная молекула ДНК всегда короче первоначальной — гипотеза маргинотомии. Анализ этого феномена показал, что ограничение репликативной способности клеток коррелирует с укорочением концов линейных хромосом, носящих название теломер. Теломеры человека представлены последовательностями  $(TTAGGG)_n$  длиной до 20 тыс. оснований, которые заканчиваются на 3'-конце одноцепочечно с образованием T-петли, защищающей концы хромосомы от действия ферментов репарации, восстанавливающих двунитевые разрывы, секвестрирующих естественные концы хромосом и приводящих к геномной нестабильности. Репликация линейной ДНК сопровождается укорочением теломер, что, в конечном итоге, приводит к их исчезновению и возникновению репликативного старения. Предполагается, что такой механизм препятствует бесконечному делению клеточного клона и тем самым предупреждает развитие опухолей.

Однако некоторые клетки содержат фермент теломеразу, способный восстанавливать утраченные теломеры (клетки герминативные, стволовые, активированные лимфоциты, ряд опухолевых клеток). Теломераза в большинстве клеток взрослого организма не экспрессируется. Данные об ограничении репликативной способности культивируемых клеток, полученных от человека или мышей различного возраста, указывают на существование связи между феноменом репликативного старения в клеточной культуре и событиями, происходящими в стареющем организме. Следует только иметь в виду существова-

ние различий между конечно дифференцированными неделяющимися клетками (нервными, мышечными) и постоянно обновляемыми клеточными популяциями (кроветворными, эпителиальными), в которых остановка деления может быть обусловлена различными механизмами [87].

Клетки с высоким пролиферативным потенциалом, например, клетки базального слоя эпидермиса, несмотря на то, что они экспрессируют теломеразу, все равно теряют теломеры каким-то дополнительным путем. Накопление с возрастом стареющих клеток наряду с понятным снижением их пролиферативной способности нарушает функцию тканей за счет изменения экспрессии генов со сдвигом в катаболический и проинфламаторный фенотип. Так, стареющие фибробласты, подавляя тканевые ингибиторы матричных металлопротеиназ, приводят к деградации экстрацеллюлярного матрикса, а также стимулируют пролиферацию премалигнизированных эпителиальных клеток [88]. Существует тесная взаимосвязь между дисфункцией митохондрий вследствие накопления в них мутаций с возрастом и укорочением теломер, которые служат своеобразным «сенсором» функции митохондрий. Кроме того, возникающий при этом оксидативный стресс и нарушенный метаболизм оказывают повреждающее влияние и на гены, расположенные в ядре клетки [89].

Нарушения в ядерном геноме могут проявляться в виде повреждения, мутаций и эпигенетических изменений ДНК. Повреждаться ДНК может в результате действия на нее самых разнообразных эндогенных и экзогенных физических, химических и биологических факторов, таких как тепловое движение молекул, свободнорадикальное окисление, ионизирующее и ультрафиолетовое излучение, химические соединения, в том числе находящиеся в пищевых продуктах, ряд вирусов. Кроме того, может изменяться метилирование и гликозилирование как самой молекулы ДНК, так и гистоновых и негистоновых белков, входящих в состав хромосомы. Все

это способствует возникновению точечных мутаций, включающих одиночные или несколько пар оснований, а также более масштабные изменения в виде делеций, инсерций, дупликаций и инверсий, которые изменяют матричную структуру молекулы ДНК, так что она становится неспособной к дальнейшей репликации и транскрипции. При существующей частоте мутаций в генетическом аппарате ядра сохранение стабильности генома было бы невозможно без непрерывной работы систем, восстанавливающих и репарирующих эти повреждения.

В настоящее время имеется достаточное количество данных, подтверждающих как накопление повреждений ДНК при старении, так и возрастзависимых нарушений в системах репарации этих повреждений [90]. Так, в наблюдении за нестабильностью микросателлитов в клетках периферической крови, взятой у молодых и старых людей с интервалом в 10 лет, было обнаружено существенное накопление ошибок спаривания у старых пациентов, оцениваемое по 8 локусам, включающим гены *p53* и *RB* (ретинобластомы), у 45 % лиц старшей группы — в 40 % тестируемых локусов [91]. Как известно, гены *p53* и *RB* играют важную роль в контроле за клеточным циклом, оба они останавливают деление клетки в G1 фазе, вызывают апоптоз и тем самым предупреждают развитие опухоли [92]. Ген *bcl-2* противодействует развитию апоптоза. Выявлено, что у людей старше 60 лет в 40 раз увеличивается частота транслокации этого гена с 18-й хромосомы на 14-ю, на которой расположен постоянно экспрессируемый ген тяжелой цепи иммуноглобулина G (IgG). Причем увеличивается не только частота транслокаций на 1 млн клеток, но и ее встречаемость на 100 тыс. людей. Это обстоятельство — при наличии антигенной стимуляции или других онкогенов — может приводить к развитию происходящих из В-лимфоцитов опухолей (лейкемий, лимфом), что и наблюдается при старении [93].

Однако, как это очень часто встречается в биологии, определенное явление не

может иметь однозначной оценки. Мутации, в большинстве случаев ведущие к нарушению считывания генетической информации и чаще всего бывающие болезнетворными, в то же время на уровне популяции выступают фактором изменчивости и материалом для естественного отбора и, следовательно, эволюции [94]. На уровне отдельного организма мутации и даже гипермутации в отдельных клетках, например генах, кодирующих антиген-связывающие рецепторы в Т- и В-лимфоцитах, используются для воспроизводства разнообразия репертуара распознающих антиген структур, чем обеспечивается максимальная приспособляемость и адекватная реакция на непрерывно изменяющийся мир микроорганизмов [95; 96]. Парадоксально, но именно эти мутации у старых пациентов существенно уменьшаются, что ведет к снижению разнообразия антител, эффективности связывания антигенов и нарушениям в иммунном ответе [97].

Таким образом, рассматривая роль генетических факторов в механизмах старения и возрастной патологии, мы имеем дело с несколькими уровнями генетических исследований. Уровень молекулярно-генетический позволяет оценить глубинные механизмы возникающих изменений. На этом уровне развиваются два рода событий: нарушение передачи генетической информации вследствие возникновения повреждения ДНК как в ядре, так и в митохондриях, а также изменение в экспрессии генов как результат морфогенетических процессов, сопровождающих развитие и старение организмов. Что из них первично и главное — предмет споров и разногласий среди исследователей до настоящего времени. Другой уровень исследований — изучение индивидуальных особенностей генотипа того или иного организма с целью оценки роли набора генов и их комбинации в протекании как процесса старения, так и сопровождающей его патологии. И, наконец, третий, популяционный уровень исследований предполагает определение влияния генетических особенностей, генетического полиморфизма в группах орга-

низмов на процессы старения, взаимодействие их с факторами окружающей среды, склонность к тем или иным видам патологии или, наоборот, к благоприятному, «успешному» старению и долгожительству. Эти подходы предполагают поиск оптимальных условий для жизни и функционирования организма на протяжении всего его жизненного маршрута, и особенно, на поздних этапах жизнедеятельности, равно как и подбор различных факторов воздействия, в том числе и медикаментозных, с целью замедления старения, предупреждения развития патологических явлений или воздействия на уже развившиеся возрастные явления с учетом генетических особенностей каждого организма. Это и есть задача исследований в этой области на ближайшее будущее.

### Список литературы

1. *Комфорт А.* Биология старения. — М.: Мир, 1967. — 398 с.
2. *Cooper E. L.* Invertebrates can tell us something about senescence // *Aging Clin. Exper. Res.* — 1994. — Vol. 6. — P. 5-23.
3. *Гаврилов Л. А., Гаврилова Н. С.* Биология продолжительности жизни. — М.: Наука, 1986. — 169 с.
4. *Aging in today's environment* // WHO Committee on chemical toxicity and aging. *Natl. Acad. Press.* — Washington: DC, 1987. — 219 p.
5. *Нариси вікової токсикології* / І. М. Трахтенберг, М. М. Коршун, М. Г. Проданчук та ін. — К.: Авіценна, 2005. — 256 с.
6. *Martin G. M.* Genes that modulate longevity and senescence // *The paradoxes of longevity.* — Springer Verlag, 1999. — P. 11-21.
7. *Войтенко В. П.* Наследственность, старение и болезни // *Современные проблемы геронтологии.* — К., 1978. — С. 109-113.
8. *Анисимов В. Н.* Молекулярные и физиологические механизмы старения. — СПб.: Наука, 2003. — 468 с.

9. *The heritability of human longevity* / A. M. Herskind, M. Mc Gue, N. W. Holm et al. // *Human Genet.* — 1996. — Vol. 97. — P. 319-323.
10. *Бутенко Г. М., Войтенко В. П.* Генетические и иммунологические механизмы возрастной патологии. — К.: Здоров'я, 1983. — 144 с.
11. *Perls T., Terry D.* Genetics of exceptional longevity // *Exp. Gerontol.* — 2003. — Vol. 38. — P. 725-730.
12. *Wilmoth J. R., Horiuchi S.* Do the oldest old grow old more slowly? // *The paradoxes of longevity.* — Springer Verlag, 1999. — P. 35-60.
13. *Greek centenarians: assessment of functional health status and life-style characteristics* / D. Stathakos, H. Pratsinis, I. Zachos et al. // *Exp. Gerontol.* — 2005. — Vol. 40. — P. 512-518.
14. *Jeune B., Kannisto V.* Emergence of centenarians and super-centenarians // *To the limit and beyond.* — Springer Verlag, 1997. — P. 77-89.
15. *Recurrent de novo point mutation in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrom* / M. Eriksson, W. T. Brown, L. B. Gordon et al. // *Nature.* — 2003. — Vol. 423. — P. 293-298.
16. *Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria* / A. De Sandre-Giovannoli, R. Bernard, P. Cau et al. // *Science.* — 2003. — Vol. 300. — P. 2055.
17. *Fibroblast clones from patients with Hutchinson-Gilford progeria can senesce despite the presence of telomerase* / C. V. Wallis, A. N. Sheerin, M. H. L. Green et al. // *Exp. Gerontol.* — 2004. — Vol. 39. — P. 461-467.
18. *Pennisi E.* Gene counters struggle to got the right answer // *Science.* — Vol. 301. — P. 1040-1041.
19. *The premature aging syndrom protein, WRN, is a 3'→5' exonuclease* / S. Huang, B. Li, M. D. Gray et al. // *Nature Genetics.* — 1998. — Vol. 20. — P. 114-116.
20. *Positional cloning of the Werner's syndrom gene* / Ch.-E. Yu, J. Oshima, G. D. Schellenberg et al. // *Science.* — 1996. — Vol. 272. — P. 258-262.
21. *Culitta E., Koshland D. E.* DNA repair works its way to the top // *Science.* — 1994. — Vol. 266. — P. 1926-1929.
22. *Geley S., Muller C.* RNAi: ancient mechanism with promising future // *Exp. Gerontol.* — 2004. — Vol. 39. — P. 985-998.
23. *Springer M.* Regulation of gene expression by microRNAs // *Bio. Tech. Internatl.* — 2005. — Vol. 17. — P. 6-9.
24. *Lander E. S.* The new genomics: global views of biology // *Science.* — 1996. — Vol. 274. — P. 536-539.
25. *Helmbert A.* DNA-microarrays: novel techniques to study aging and guide gerontologic medicine // *Exp. Gerontol.* — 2001. — Vol. 36. — P. 1189-1198.
26. *Proteomics in experimental gerontology* / J.-F. Diericki, M. Dieu, J. Remacle et al. // *Exp. Gerontol.* — 2002. — Vol. 37. — P. 721-734.
27. *Kahn P.* Gene hunters close in on elusive prey // *Science.* — 1999. — Vol. 271. — P. 1352-1354.
28. *Vijg J., Papaconstantinou J.* Aging and longevity genes: strategies for identifying DNA sequences controlling life span // *Js Gerontology.* — 1990. — Vol. 45. — P. B179-182.
29. *Khalyavkin A. V., Yashin A. I.* How the analysis of genetic mutations can help us to solve basic problems in gerontology? I. Life extending genetic modifications in round worm *C. elegans* // *Adv. Gerontol.* — 2003 a. — Vol. 11. — P. 34-42.
30. *Khalyavkin A. V., Yashin A. I.* How the analysis of genetic mutations can help us to solve basic problems in gerontology? II. Life extending genetic modifications in budding yeast *S. cerviseae*, fruit fly *D. melanogaster*, and laboratory mice *M. musculus* // *Adv. Gerontol.* — 2003 b. — Vol. 12. — P. 46-56.
31. *Arantes-Oliveira N., Berman J. R., Kenyon C.* Healthy animals with extreme longevity // *Science.* — 2003. — Vol. 302. — P. 611.

32. Rincon M., Rudin E., Berzilai N. The insulin/IGF-1 signaling in mammals and its relevance to human longevity // *Exp. Gerontol.* — 2005. — Vol. 40. — P. 873-877.
33. Wodinsky J. Hormonal inhibition of feeding and death in octopus: control by optic gland secretion // *Science.* — 1977. — Vol. 198. — P. 948-951.
34. Yang J., Ango M., Cohen P. Control of aging and longevity by IGF-1 signaling // *Exp. Gerontol.* — 2005. — Vol. 40. — P. 867-872.
35. *The p66* shr adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals / E. Migliaccio, M. Giorgio, S. Mele et al. // *Nature.* — 1999. — Vol. 122. — P. 1361-1365.
36. *Prolonged* longevity of hypopituitary mice / A. Bartke, H. Brown-Borg, J. Mattison et al. // *Exp. Gerontol.* — 2001. — Vol. 36. — P. 21-28.
37. *Life-span* extension and delayed immune and collagen aging in mutant mice with defects in growth hormone production / K. Flurkey, I. Papaconstantinou, R. A. Miller, D. E. Harrison // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2001. — Vol. 98. — P. 6736-6741.
38. *Genetic* analysis of lifespan in hybrid progeny derived from SAMP1 mouse strain with accelerated senescence / Z. J. Guo, E. Toichi, M. Hosono et al. // *Mech. Aging Dev.* — 2000. — Vol. 118. — P. 35-44.
39. *Immunogenetics* of longevity. Is major histocompatibility complex polymorphism relevant to the control of human longevity? / C. Caruso, G. Candore, G. C. Romano et al. // *Mech. Ageing Dev.* — 2001. — Vol. 122. — P. 445-467.
40. Rea I. M., Middleton D. Is the phenotypic combination A1B8Cw7DR3 a marker for male longevity? // *J. Am. Geriatr. Soc.* — 1994. — Vol. 42. — P. 978-983.
41. *Association* between the HLA-DR alleles and longevity: a study in Sardinian population / D. Lio, G. M. Pes, C. Carru et al. // *Exp. Gerontol.* — 2003. — Vol. 38. — P. 313-317.
42. Krabbe K. S., Pedersen M., Bruunsgaard H. Inflammatory mediators in the elderly // *Exp. Gerontol.* — 2004. — Vol. 39. — P. 687-699.
43. *Marked* increase with age of type 1 cytokines within memory and effector / cytotoxic CD8+ T cells in humans: a contribution to understand the relationship between inflammation and immunosenescence / F. Zanni, R. Vesconini, C. Biasini et al. // *Exp. Gerontol.* — 2003. — Vol. 38. — P. 981-987.
44. *174 G/C* interleukin-6 gene polymorphism and increased risk of multi-infarct dementia: case-control study / R. Pola, E. Gaetani, A. Flex et al. // *Exp. Gerontol.* — 2002. — Vol. 37. — P. 949-955.
45. *The 174G/C* polymorphism of IL-6 is useful to screen old subjects at risk for atherosclerosis or to reach successful aging / R. Giacconi, C. Cipriano, F. Albanese et al. // *Exp. Gerontol.* — 2004. — Vol. 39. — P. 621-628.
46. *Polymorphism* of interleukin 2, interleukin 10 and interferon- $\gamma$  genes in sicilian elderly: implications for longevity / G. Candore, L. Scola, A. Crivello et al. // *Biogerontology.* — 2002. — Vol. 3. — Suppl. 1. — P. 36-37.
47. *Genetic* association with human longevity at the ApoE and ACE loci / F. Schachter, L. Faure-Delanef, F. Guenot et al. // *Nature Genetics.* — 1994. — Vol. 6. — P. 29-32.
48. *Анализ* распределения в российской популяции некоторых генетических маркеров, ассоциированных с мультифакториальной патологией среднего и пожилого возраста / В. Х. Хавинсон, Д. В. Соловьева, Д. Л. Стрекалов и др. // *Мед. акад. журнал.* — 2002. — Т. 2. — С. 56-66.
49. *Recent* advances in human gene-longevity association studies / G. De Benedictis, Q. Tan, B. Jeune et al. // *Mech. Ageing Dev.* — 2001. — Vol. 122. — P. 909-920.
50. *Пішель І. М., Пашинян Л. Н., Бутенко Г. М.* Роль генетичних факторів у розвитку остеопорозу // *Фізіол. журнал.* — 2005. — Т. 51. — С. 99-108.

51. *Suggestive linkage of the parathyroid receptor type I to osteoporosis* / E. I. Duncan, M. A. Brown, J. Sinshemer et al. // *J. Bone Miner. Res.* — 1999. — Vol. 14. — P. 1993-1999.
52. *Steger R. W., Bartke A., Cecim M. Premature aging in transgenic mice expressing growth hormone genes* // *J. Repr. Fertil.* — 1993. — Vol. 46. — Suppl. — P. 61-75.
53. *Increased adipogenesis and myelopoiesis in the bone marrow of SAMP6, a murine model of defective osteoblastogenesis and low turnover osteopenia* / O. Kajkenova, B. Lecka-Czernik, I. B. Gubrii et al. // *J. Bone Mineral Res.* — 1997. — Vol. 12. — P. 1772-1779.
54. *Age-associated DNA damage is accelerated in the senescence — accelerated mice* / M. Hosokawa, H. Fujisawa, S. Ax et al. // *Mech. Ageing Dev.* — 2000. — Vol. 118. — P. 61-70.
55. *Butterfield D. A., Poon H. F. The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): a model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease* // *Exp. Gerontol.* — 2005. — Vol. 40. — P. 774-783.
56. *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo* / G. P. Dimri, X. H. Lee, G. Basile et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1995. — Vol. 92. — P. 9363-9367.
57. *Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling aging* / M. Kuro-o, Y. Matsumura, H. Aizawa et al. // *Nature.* — 1997. — Vol. 390. — P. 45-51.
58. *Takahashi Y., Kuro-o M., Ishikawa F. Aging mechanisms* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2000. — Vol. 97. — P. 12407-12408.
59. *Klotho proteins protects against endothelial dysfunction* / Y. Saito, T. Yamagishi, T. Nakamura et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1998. — Vol. 248. — P. 324-329.
60. *Butenko G. M., Gubrii I. B. Inhibition of the immune responses of young adult CBA mice due to parabiosis with their old partners* // *Exp. Gerontol.* — 1980. — Vol. 15. — P. 605-610.
61. *Butenko G. M. Heterochronic chimeras as a model in gerontological research* // *The theoretical basis of aging research.* Eds: L. Robert, G. Hofecker. — Wien: Facultas Verlag, 1990. — P. 65-67.
62. *Arking D. E., Krebsova A., Macek S. M. Association of human aging with a functional variants of klotho* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2002. — Vol. 99. — P. 856-861.
63. *Effect of age on gene expression* / E.-S. Han, H. van Remmen, M. Steinhilper et al. // *Handbook of the biology of aging;* Eds. E. J. Masoro, S. N. Austad. — Acad. Press, 2001. — P. 140-178.
64. *Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction* / C. K. Lee, R. G. Klopp, R. A. Weindruch, T. A. Prolla // *Science.* — 1999. — Vol. 285. — P. 1390-1393.
65. *Lee H.-M., Greeley G. H., Englander E. W. Age-associated changes in gene expression patterns in the duodenum and colon of rats* // *Mech. Ageing Dev.* — 2001. — Vol. 122. — P. 355-371.
66. *Gene expression in aging kidney and pituitary* / L. Preisser, L. Houot, L. Teiller et al. // *Biogerontology.* — 2004. — Vol. 5. — P. 39-47.
67. *Age-related changes of proliferative response, kinetics of expression of proto-oncogenes after the mitogenic stimulation and methylation level of the protooncogene on purified human lymphocyte subsets* / Y. Deguchi, S. Negoro, H. Hara et al. // *Mech. Ageing Dev.* — 1988. — Vol. 44. — P. 153-168.
68. *Trebilcock G. U., Ponnappan U. Evidence for lowered induction of nuclear factor kappa B in activated human T-lymphocytes during aging* // *Gerontology.* — 1996. — Vol. 42. — P. 137-146.
69. *Age-related alterations in the activations of heat shock transcription factor 1 in rat hepatocytes* / A. R. Heydari, S. You, R. Takahashi et al. // *Exp. Ctl Res.* — 2000. — Vol. 256. — P. 83-93.

70. *Kimball S. R., Vary T. C., Jefferson L. S.* Age-dependent decrease in the amount of eukaryotic initiation factor 2 in various tissues // *Biochem. J.* — 1992. — Vol. 286. — P. 263-268.
71. *Effect of age on gene expression and protein degradation* / H. van Remmen, W. Ward, R. V. Sabia, A. Richardson // *Handbook of physiology, volume on aging*; Ed. E. J. Masoro. — Oxford Univ. Press, 1995. — P. 171-234.
72. *Kuhholzer-Cabot B., Brem G.* Aging of animals produced by somatic cell nuclear transfer // *Exp. Gerontol.* — 2002. — Vol. 37. — P. 1317-1323.
73. *Sequence and organization of the human mitochondrial genome* / S. Anderson, A. T. Bankier, B. G. Barrell et al. // *Nature.* — 1981. — Vol. 290. — P. 457-465.
74. *Wanagat J., Lopez M. E., Aiken J. M.* Alterations of the mitochondrial genome // *Handbook of the biology of aging*; Eds. E. J. Masoro, S. N. Austad. Acad. Press. — 2001. — P. 114-139.
75. *Ballard J. W. O.* *Drosophila simulans* as a novel model for studying mitochondrial metabolism and aging // *Exp. Gerontol.* — 2005. — Vol. 40. — P. 763-773.
76. *Brenner C., Kroemer G.* Mitochondria — the death signal integrators // *Science.* — 2000. — Vol. 289. — P. 1150-1151.
77. *Clayton D. A.* Replication of animal mitochondrial DNA // *Cell.* — 1982. — Vol. 28. — P. 693-705.
78. *Simon D. K., Johns D. R.* Mitochondrial disorders: clinical and genetic features // *Ann. Rev. Med.* — 1999. — Vol. 50. — P. 111-127.
79. *Литошенко А. Я.* Митохондриальний геном: біологічні та медичні аспекти // *Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть.* — Т. 4. — К.: Логос, 2001. — С. 640-656.
80. *Contribution of de novo point mutations to the overall mutational burden in mitochondrial DNA of adult rats* / M. Khaidakov, N. Chavannes-Turesky, C. A. Cooney et al. // *Exp. Gerontol.* — 2005. — Vol. 40. — P. 396-402.
81. *Classification of European mtDNA from an analysis of three European populations* / A. Torroni, K. Huoponen, P. Francalacci et al. // *Genetics.* — 1996. — Vol. 144. — P. 1835-1850.
82. *Inherited variability of the mitochondrial genome and successful aging in humans* / G. de Benedictis, G. Carriari, O. Varcasia et al. // *Ann. NY Acad. Sci.* — 2000. — Vol. 908. — P. 208-218.
83. *Mitochondrial DNA polymorphism: its role in longevity of the Irish population* / O. A. Ross, R. McCormack, M. D. Curran et al. // *Exp. Gerontol.* — 2001. — Vol. 36. — P. 1161-1178.
84. *Mitochondrial genotype associated with French caucasian centenarians* / R. Ivanova, V. Lepage, D. Charron, F. Gyllenstein // *Gerontology.* — 1998. — Vol. 44. — P. 349.
85. *Mitochondrial genotype associated with longevity* / M. Tanaka, J-S. Gong, J. Zhang et al. // *Lancet.* — 1998. — Vol. 35. — P. 185-186.
86. *Hayflick L.* Current theories of biological aging // *Federation Proc.* — 1975. — Vol. 34. — P. 9-13.
87. *Hornsby P. J.* Cell proliferation in mammalian aging // *Handbook of the biology of aging*; Eds. E. J. Masoro, S. N. Austad. — Acad. Press. — 2001. — P. 207-245.
88. *Baird D. M.* New developments in telomere length analysis // *Exp. Gerontol.* — 2005. — Vol. 40. — P. 363-368.
89. *Passos J. F., von Zglinicki T.* Mitochondria, telomeres and cell senescence // *Exp. Gerontol.* — 2005. — Vol. 40. — P. 466-472.
90. *Vijg J., Dolle M. E. T.* Instability of the nuclear genome and role of DNA repair // *Handbook of the biology of aging*; Eds. E. J. Masoro, S. N. Austad. — Acad. Press. — 2001. — P. 84-113.
91. *Aging and mismatch repair system* / A. B. Yehuda, A. Globerson, S. Krichevsky et al. // *Mech. Ageing Dev.* — 2000. — Vol. 121. — P. 173-179.

92. *Jazwinski S. M., Howard B. H., Nayak R. K.* Cell cycle progression, aging, and cell death // *J. Gerontol.* — 1995. — Vol. 50A. — P. B1-B8.

93. *BCL-2* translocation frequency rises with age in humans / *Y. Lii, A. M. Hernandez, D. Shibata, G. A. Cortopassi* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1994. — Vol. 91. — P. 8910-8914.

94. *Muller H. J.* The relation of recombination to mutational advance // *Mutation Res.* — 1964. — Vol. 1. — P. 2-9.

95. *Roth D. B., Craig N. L.* VDJ-recombination: a transposase goes to work // *Cell.* — 1998. — Vol. 94. — P. 411-414.

96. *Wiesendanger M., Scharff M. D., Edelmann W.* Somatic hypermutation, transcription, and DNA mismatch repair // *Cell.* — 1998. — Vol. 94. — P. 415-418.

97. *Differences* in hypermutation of human antibody genes with age / *M. Benerjee, J. D. Sanderson, J. Spencer, D. K. Duun-Walters* // *Mech. Ageing Dev.* — 2001. — Vol. 122. — P. 1347.

---

## Глава 12. Нооэтика и генетическая медицина

---

---

---

The article gives a definition of the subject and theoretical bases of bioethics as a discipline. The methods of bioethics, ethic aspects of relations between doctor and patient and his relatives are described. Bioethic and legal problems are briefly highlighted: death, reproduction of man, new genetic technologies and others. The modern questions of bioethics related to development of transplantology, AIDS epidemic are represented. Attention is focused on nooethics — a new scientific trend, the founder of which the author of the article is.

---

Важнейшая задача современной биоэтики — контроль генетических технологий и модификаций природы человека. Биоэтические проблемы медицинской генетики возникают прежде всего в процессе генетического обследования, консультирования и скрининга популяции. Бурное развитие генетической науки открыло перед человечеством неограниченные возможности диагностики и лечения многих наследственно обусловленных заболеваний, раскрытия механизмов старения и увеличения продолжительности жизни. По мере накопления точных данных о геноме человека становится возможным прогнозировать вероятность развития тяжелых приобретенных заболеваний. В недалеком будущем станет доступным прекоцепционный прогноз роста, цвета глаз, интеллектуальных и поведенческих особенностей человека. В то же время практическое применение генетических исследований сталкивается с целым рядом научных и биоэтических проблем. Возможности генетической диагностики заметно опережают прогресс в области радикального лечения генетически обусловленных заболеваний. Возникающие дилеммы затрагивают как личность пациента, так и внутрисемейные и общественные взаимоотношения, религиозную мораль. Очень сложны для разрешения вопросы о возможности и готовности пациента узнать о высокой вероят-

ности или неизбежности развития у него в будущем какого-либо тяжелого или смертельного заболевания, о том, в каких случаях необходимо информировать человека о найденных генетических дефектах, может и обязан ли врач проинформировать членов семьи о возникших проблемах [1].

В контексте медико-генетического консультирования возникают традиционные биоэтические проблемы, касающиеся проведения аборта, регуляции репродукции, информированного согласия, конфиденциальности, проведения поддерживающей терапии и социальной справедливости в распределении ограниченных ресурсов здравоохранения.

Сложен вопрос и о характере взаимодействия врача-генетика с пациентом и его семьей. Существует точка зрения, что информация не должна носить директивный характер и не следует пытаться навязать пациенту свои моральные взгляды. Необходимо предоставить научную социальную и психологическую информацию и дать возможность больному и семье принять собственное решение [2]. Однако такая нейтральная позиция все в большей степени ставится под сомнение. Фактически врачи-генетики не могут оставаться полностью нейтральными, особенно в отношении этического выбора, представляющегося им несомненно аморальным. Для того

чтобы пациенты могли сохранить автономию в принятии решения, им следует обсудить этическую проблему с другими специалистами, особенно с теми, чье мнение в данном вопросе прямо противоположно.

Медико-генетическое консультирование перешло на качественно новый уровень при внедрении программ генетического скринирования. Проведение массового тестирования крови или иных биологических образцов с помощью простых недорогих технологий позволяет осуществить раннюю диагностику наследственного заболевания. Первоначально массовый скрининг был успешно проведен среди афроамериканцев с целью выявления серповидно-клеточной анемии в еврейских общинах (болезни Тея — Сакса). В дальнейшем превосходные результаты были получены при внедрении популяционного скрининга на фенилкетонурию, муковисцидоз, гипотиреоз [3]. Тем не менее, это не устранило определенную предубежденность в отношении генетического скрининга и его оценок как инструмента евгеники.

В последние годы доказана возможность проведения специфического генетического тестирования для идентификации лиц, обладающих повышенным риском заболевания раком груди и толстой кишки. Регулярный мониторинг таких людей позволяет диагностировать ранние стадии опухоли.

Проведение скринирующих исследований с вовлечением в них большого числа людей делает актуальной проблему сохранения врачебной тайны. Возможность доклинической диагностики заболеваний будет сопровождаться ростом числа третьих лиц, заинтересованных в доступе к результатам генетических исследований. К ним, прежде всего, относятся медицинские страховые компании и работодатели. В этой ситуации вероятно возникновение нарушения конфиденциальности и дискриминации по генетическим признакам [4].

Двойственный характер имеют также методы пренатальной (дородовой) диагностики, позволяющие определить наследственную болезнь на ранних стадиях внут-

риутробного развития. Некоторые из этих методов могут представлять угрозу для жизни и целостности тестируемого эмбриона или плода. Выявление неизлечимого или трудноизлечимого генетического заболевания нередко становится побуждением к прерыванию зародившейся жизни; известны случаи, когда на родителей оказывалось моральное давление. Пренатальная диагностика может считаться нравственно оправданной, если она нацелена на лечение выявленных недугов, по возможности на ранних стадиях, а также на подготовку родителей к особому попечению о больном ребенке [5]. Правом на жизнь, любовь и заботу обладает каждый человек, независимо от наличия у него тех или иных заболеваний.

Таким образом, биоэтические проблемы медицинской генетики могут и должны рассматриваться с позиций принципов уважения автономии и информированного согласия, а также доверия и правдивости во взаимоотношениях врач — пациент. В полной мере присутствует необходимость следования принципу социальной справедливости при распределении ограниченных медицинских ресурсов общества в отношении возможности применения наукоемких дорогостоящих медицинских технологий. Непременное условие при этом — невмешательство в частную жизнь и соблюдение конфиденциальности во взаимоотношениях между врачом и пациентом [6]. Проблема конфиденциальности связана с необходимостью обсуждения и решения следующих практических вопросов, существующих в сфере медицинской генетики:

- 1) соблюдение конфиденциальности медицинской документации в процессе ведения больного и выполнения медико-биологических исследований;

- 2) ограничение доступа к медицинской информации и исключение возможности манипуляций со стороны страховых компаний и работодателей;

- 3) разработка стандартов предоставления информации о наследственных заболеваниях членам семьи;

4) защита генетической информации путем кодирования и анонимности образцов ДНК, взятых в процессе обследования и лечения больного либо с исследовательской целью.

Успехи в расшифровке генома человека создают реальные предпосылки для широкого генетического тестирования с целью выявления информации о природной уникальности каждого индивида, а также его предрасположенности к определенным заболеваниям. Создание «генетического паспорта» при разумном использовании полученных сведений помогло бы своевременно корректировать развитие наиболее вероятных для конкретного человека заболеваний. Однако имеется реальная опасность злоупотребления генетическими сведениями, могущими послужить различным формам дискриминации. Кроме того, обладание информацией о наследственной предрасположенности к тяжелым заболеваниям может стать непосильным моральным грузом. Поэтому генетическая идентификация и генетическое тестирование должны осуществляться лишь на основе уважения свободы личности.

Морально-этические и научно-практические проблемы генетических исследований очень тесно переплетаются. По мере картирования генома человека, повышения доступности генетических исследований возникает потребность установления диагностической достоверности тестов. Это очень трудная задача в связи с генетической гетерогенностью наследственных заболеваний. Важная научная проблема, требующая многолетних исследований, — определение диагностической значимости признаков генетической предрасположенности к семейным формам онкологических заболеваний, сахарному диабету, ишемической болезни сердца. Вероятностный характер результатов генетического исследования обрекает пациента на неопределенность, накладывает негативный отпечаток на всю его дальнейшую жизнь.

Международное регулирование вопросов генетических исследований происходит на основании ряда важных докумен-

тов, получивших признание и практическое применение в различных государствах мира. Одним из таких документов стала Декларация о генетическом консультировании и генной инженерии, которая была принята 39-й Всемирной медицинской ассамблеей (Мадрид, 1987) и дополнена в 1992 г. Положения Декларации касаются генетического консультирования и генной инженерии. Этот документ призван помочь врачам в решении этических и профессиональных проблем в области медицинской генетики.

Всемирная организация здравоохранения в 1995 г. обобщила международный опыт решения этических проблем, возникающих в ходе медико-биологических исследований, в «Руководстве по этическим подходам в медицинской генетике и предоставлении генетических услуг». В документе изложены основные положения по оказанию медико-генетической помощи с целью помочь людям с генетическими нарушениями жить и иметь нормальное потомство. Основополагающими этическими подходами признаны:

- равное и беспристрастное распределение общественных средств среди тех, кто нуждается в них;

- свобода выбора, основанная на полной информации. При осуществлении репродуктивного выбора женщина должна иметь право на окончательное решение;

- добровольность, исключение всякого давления со стороны правительства, общества, медицинских работников и др.;

- уважение различий между людьми и тех, чье мнение в меньшинстве;

- уважение интеллекта консультирующегося, независимо от уровня его знаний;

- обучение основам генетики населения, медиков, учителей, священнослужителей;

- тесное взаимодействие с организациями, объединяющими больных с генетическими болезнями, членов их семей;

- предупреждение дискриминации или фаворитизма при трудоустройстве, страховании или обучении, основанных на генетических признаках;

— комплексное решение проблем с другими профессионалами, в том числе с медицинскими работниками разных специальностей, социальными работниками и др., при возможности, вовлечение консультирующихся в обсуждение их проблем, чтобы они стали информированными участниками процесса выработки решения;

— использование недискриминирующих терминов, уважение личности пациента.

В 1997 г. 29-я сессия Генеральной конференции ЮНЕСКО приняла Всеобщую Декларацию о геноме и правах человека, направленную на предотвращение использования генетической информации с нарушением прав и фундаментальных свобод человека, его человеческого достоинства или же с целью общественной изоляции отдельных индивидуумов, семейств, групп или общин. В Декларации подчеркнуто, что генетическая информация, полученная при исследовании различных биологических образцов, играет все более важную роль в жизни общества. Количество генетических банков данных увеличивается во всем мире, а некоторые государства проводят генетическую перепись населения. Ввиду быстрого и не всегда организованного развития данной отрасли научных знаний появилась необходимость в разработке единых этических руководящих принципов [7].

Принятая ЮНЕСКО Декларация — юридически не обязательный документ, что позволяет государствам адаптировать ее положения в соответствии с разнообразными ситуациями и новыми научными открытиями. Декларация определяет принципы, которыми государства должны руководствоваться в процессе совершенствования законодательства и политики в этой области. Документ призывает к сбору, обработке, использованию и хранению генетического материала на основе прозрачных и этически приемлемых принципов. Это предполагает учреждение независимых, мультидисциплинарных и плюралистических комитетов по вопросам этики на на-

циональном, региональном, местном или институциональном уровнях. Сбор материала для генетических исследований должен осуществляться при условии получения «предварительного, свободного, информированного и специального согласия без финансовой или другой личной выгоды» человека, предоставляющего генетический материал. Исключения возможны, но «должны разрешаться только в крайних случаях в соответствии с национальным законодательством и международным правом в области защиты прав человека». Декларация подтверждает право человека отказаться от сотрудничества, «если его генетические данные не связаны с опознаваемым человеком». Право на информацию о результатах исследований также затрагивается в Декларации, рекомендующей проводить в этой области культурно адаптированные и защищающие интересы человека консультации, если генетические исследования могут иметь существенное значение для здоровья человека.

Основной вопрос стадии обработки полученной генетической информации — конфиденциальность. Декларация предусматривает, что информацией о генетических данных, связанных с опознаваемым человеком, не должны обладать третьи лица, в частности работодатели, страховые компании, образовательные учреждения и семьи. Исключение может быть сделано лишь в интересах общества и только в случаях, предусмотренных законодательством и в соответствии с международным правом.

На стадии использования результатов генетических исследований одна из основных морально-этических проблем — изменение цели исследования. В Декларации утверждается, что данные, собранные для одной цели, не должны использоваться для другой, несовместимой с первоначальным намерением.

Декларация рекомендует принимать соответствующие меры в сфере образования, обучения и общественной информации и призывает присоединиться к двусторонним и многосторонним соглашениям,

позволяющим развивающимся странам расширить свои возможности для участия в создании научных знаний и обмене сведениями о генетических данных человека. Целью Международного комитета ЮНЕСКО по биоэтике и Межправительственного комитета по биоэтике признано содействие выполнению Декларации и распространению принципов, изложенных в этом документе.

Процесс интеграции Украины в европейское сообщество вызывает необходимость совершенствования законодательной регламентации биомедицинских прав человека с принятием закона о защите генома человека, соответствующего нормам международного права. Базовым документом Совета Европы, направленным на защиту прав и свобод человека в связи с использованием достижений биологии и медицины, служит «Конвенция о защите прав и достоинства человека в связи с применением достижений биологии и медицины», принятая 4 апреля 1997 г. Подготовка проекта Конвенции велась с 1990 г. специально созданным Комитетом, который с 1993 г. был преобразован в Руководящий комитет по биоэтике. В настоящее время из 42 стран — членов Совета Европы более 30 присоединились к Конвенции [7]. Украина подписала ее в марте 2002 г.

Конвенция выступает на защиту прав человека при проведении генетических исследований, клонирования и внедрения генной терапии, провозглашает запрет любых форм дискриминации на основании результатов генетических исследований. Запрет касается дискриминации по признакам пола, расы, цвета кожи, языка, религии, политических и иных убеждений, национального или социального происхождения, принадлежности к меньшинствам, имущественного положения, генетического наследия и др.

Следует также уважать право не быть информированным. Генетические тесты могут проводиться только после добровольного и осознанного согласия соответствующего лица и должны сопровождать-

ся необходимыми генетическими консультациями. В Конвенции не предусматривается какого-либо ограничения права осуществлять диагностическое вмешательство на стадии зародыша для того, чтобы определить возможное наличие генетической предрасположенности к тяжелым заболеваниям у будущего ребенка.

Украинское законодательство в основном соответствует положениям Конвенции, однако механизмы выполнения законов пока несовершенны.

Серьезные биоэтические проблемы связаны с реализацией проекта «Геном человека». Самый крупный биологический проект в истории человечества был начат в 1990 г. и предполагал расшифровку всех генов в течение длительного периода времени, который первоначально оценивался в столетие. Однако в 1999 г. после расшифровки большей части генома был сделан прогноз о возможной полной его расшифровке к 2005 г. Деятельность 20 стран мира, участвующих в проекте, координирует Международный банк генетических данных, создана международная организация HUGO (Human Genom Organization), в которую вошли страны, располагающие передовыми биотехнологиями. На развитие проекта в США было выделено 3 млрд долларов, 5 % от этой суммы — на решение социальных и биоэтических проблем, возникающих при его осуществлении. Большая часть проводимых по проекту «Геном человека» исследований выполняется в США, в программе также принимают активное участие Россия, Япония, страны Западной Европы. Задача проекта заключалась в том, чтобы картировать и установить последовательность около 80 000 генов и 3 млрд нуклеотидов, составляющих ДНК человека [8].

Реализация программы имеет серьезное значение для фундаментальной науки, поскольку значительно углубит знания об организации и функционировании генетического аппарата человека. Зная сходство и различие в строении ДНК человека и приматов, можно будет более точно реконструировать процесс антропогенеза. Пол-

ная расшифровка генома с возможностью молекулярно-генетической диагностики наследственных заболеваний позволит сделать реальным их пренатальное распознавание на ранних сроках беременности. Уже сейчас такая возможность существует для фенилкетонурии, муковисцидоза, гемофилии, болезни Тея — Сакса и др. Важность расшифровки генома для медицинской практики заключается не только в осуществимости молекулярно-генетической диагностики, но и в открывающейся перспективе генной терапии. Выполнение проекта «Геном человека» сопряжено с революционными темпами развития молекулярно-генетических и смежных биотехнологий, которые находят свое применение не только в медицине, но и селекции растений и животных, фармацевтической промышленности и других областях.

Однако неизбежность этических, юридических и социальных проблем при осуществлении этого проекта требует детальной разработки этических аспектов исследования, дальнейшего совершенствования нормативных положений, связанных с анализом генома человека. Программа европейского сообщества «Анализ генома человека» сформулировала следующие биоэтические предпосылки проведения изысканий в этой области:

— право на генетическую информацию о себе — составная часть прав личности; данный принцип трактуется конституциями и законодательством государств — членом сообщества как составная часть прав человека;

— должна быть разработана единая система, учитывающая медицинские, этические, социальные и юридические аспекты любого использования результатов, к которым могут привести исследования генома человека, и предупреждения их неприемлемого употребления;

— отсутствие четких стандартов и правил, определяющих конкретные аспекты возможного развития анализа генома, порождает опасность попыток вторжения в геном человека с целью придания вносимым изменениям наследст-

венного характера, а также для проведения генетических исследований для целей мониторинга. И то и другое может иметь тяжелые последствия для общества, поэтому крайне необходимо усовершенствовать меры во избежание неприемлемых последствий;

— в процессе разработки программы возникает потребность вычленения комплекса надежных научных данных для использования политическими властями как основы для принятия состоятельных, ясных и ответственных юридических решений.

Программа «Геном человека» сталкивается со следующими основными проблемами молекулярно-генетических исследований: конфиденциальность информации о результатах поиска, трудности массового скрининга и тестирования пациентов [9]. Эти глобальные проблемы требуют решения вопросов о правомочности использования генетической информации (работодателями, медицинскими страховыми компаниями и т. д.); надежности хранения конфиденциальных сведений в банках данных; возможности использования полученных материалов в немедицинских целях (судебная практика); патентовании генетической информации и т. д.

В специальной Декларации Ассамблеи Всемирной организации здравоохранения, которая проходила в сентябре 1992 г., посвященной проекту «Геном человека», этические и юридические принципы представлены следующим образом:

1) генетическая служба должна быть общедоступной, чтобы избежать ее использования лишь состоятельными лицами, что увеличит социальное неравенство;

2) необходимы международная информация и обмен технологиями и знаниями между всеми странами;

3) следует уважать волю скринируемых лиц и их право решать вопрос о своем участии и использовании полученных данных;

4) полная информация предоставляется пациенту или его юридическому представителю. Медицинская тайна должна

сохраняться, а сведения не могут передаваться третьим лицам без согласия пациента. Даже если члены семьи пациента относятся к группе риска, медицинская тайна должна сохраняться, кроме случаев, когда кто-либо из членов семьи подвергается опасности и этого ущерба можно избежать, раскрыв информацию. Конфиденциальность может быть нарушена только как «последний шаг», когда попытки убедить пациента самому открыть результаты исследований потерпели неудачу; даже в таком случае допустимо раскрывать только необходимую генетическую информацию;

5) передача сведений изыскания третьему лицу или допуск к личным генетическим данным может осуществляться только с информированного согласия пациента.

Характерная тенденция современного этапа молекулярно-генетических исследований в области генома человека — их коммерциализация. Она несет опасность основополагающей научной ценности — принципу объективности научного знания. Уже сейчас растет число частных фирм, вкладывающих значительные ресурсы в развитие геномных изысканий с целью получения грандиозной прибыли. Острые дискуссии о праве на патентование генов человека и нуклеотидных последовательностей, разгоревшиеся между конкурирующими участниками геномных исследований, — результат глубинной деформации современной науки. Если учесть, что частные компании уже вложили в разработку проекта многие сотни миллионов долларов, то понятно их стремление получить максимально возможную прибыль от его реализации. В этом смысле программа «Геном человека» в концентрированной форме отражает формирование новой разновидности науки, парадоксальным образом сочетающей в себе фундаментальные изыскания, производство и коммерческую деятельность.

Проект «Геном человека» создает чрезвычайно важный прецедент для развития науки и ее сотрудничества с общественностью. Впервые реализация крупной меж-

дународной научной программы проводится одновременно с исследованием социальных последствий и моральных правил ее разработки. Это первый научный проект, в котором с самого первого шага в контекст научной разработки вписан аспект морального обсуждения. В генетике человека, как и в других отраслях науки, значительное место занимают гипотезы и теоретические модели, еще не получившие достаточного эмпирического подтверждения и теоретического обоснования. Это результат необходимого творческого процесса выдвижения гипотез, впоследствии подвергающихся «отбору» в соответствии с установленными в науке процедурами верификации и исключения фальсификации. Часть из них вполне закономерно становится достоянием общественности как свидетельство академической свободы и захватывающего разум полета творческого воображения. Однако следует иметь в виду, что, став феноменом массового сознания, научные гипотезы выходят из-под контроля жестких механизмов научного «отбора», приобретают собственную жизнь, мотивируя и направляя социальные действия, неоднозначные по своим последствиям. Ученые должны осознавать ответственность за ущерб, который может принести выпущенная «на волю» недостаточно продуманная, а тем более ошибочная, гипотеза. Разработка проекта «Геном человека» дала почву для беспрецедентного выброса в массовое сознание огромного числа «гипотез» — некоторые из них носят откровенно дискриминационный и расистский характер.

Существующие в настоящее время представления о практическом применении и преимуществах генетических изысканий, по мнению большинства исследователей, — чрезмерно оптимистичны. Возможности прикладного медицинского применения результатов изучения генома значительны, однако предсказать, когда они приведут к существенному прогрессу в клинической практике, трудно. Хотя затраты, связанные с использованием молекулярно-генетических технологий, высо-

ки, отдельные практические аспекты их применения доказали свою экономическую эффективность. Некоторые результаты проекта «Геном человека» широко используются в пренатальной диагностике, например, моногенных заболеваний. Однако в ближайшее время вряд ли можно ожидать серьезных прорывов в области лечения онкологических и хронических заболеваний на основе знаний о наследственной предрасположенности к ним.

Патентование результатов молекулярно-генетических исследований — объективная реальность, поэтому на международном уровне необходима разработка концепции, способной обеспечить стимулирующее влияние результатов патентования ДНК и экономический прогресс посредством усиления вклада глобального научно-исследовательского сообщества в создание и применение медицинских технологий.

Проведение молекулярно-генетических исследований и биоэтические проблемы, которые их сопровождают, требует повышения информированности об этих вопросах всех слоев общества, включая политиков, сотрудников органов здравоохранения и образования, представителей средств массовой информации.

С биоэтической точки зрения, главный вопрос в том, является ли цель достижения полного знания о генетической основе человека идеалом, к которому нужно стремиться, и не станут ли эти знания злом для человечества [10].

Технологические оптимисты видят возможности устранения медицинских проблем путем последовательного вмешательства в их генетическую основу. Это позволило бы оздоровить популяцию и уменьшить расходы на здравоохранение. С другой стороны, диагностика проблемных генов будет отражать возможности их устранения и замены. Поэтому противники проекта «Геном человека» подчеркивают возможное увеличение частоты прерывания беременности по генетическим показателям. Наибольшие реалисты понимают, что большинство заболеваний не являются ге-

нетическими, а многие из связанных с наследственным материалом — полигенные, так как включают много генов в свою реализацию. Это означает, что исследователям еще предстоит определить механизм взаимодействия генов, приводящий к возникновению рака, заболеваний сердца, гипертонической болезни и психических расстройств. Не исключено, что некоторые гены, увеличивающие риск определенных нежелательных состояний, в то же время необходимы для предупреждения других, столь же неприемлемых процессов.

Широкий международный резонанс возник в связи с обсуждением медико-этических проблем клонирования человека и животных. В 1997 г. мировое сообщество было поставлено перед фактом успешного клонирования млекопитающего, при котором использовались ядра соматических клеток. О перспективах и опасностях этого научного открытия сразу разгорелись острые дебаты в научных, религиозных и политических кругах. Наибольшую обеспокоенность и сопротивление вызвала идея возможного использования этой технологии для воспроизводства человека.

Клонирование — это процесс получения генетически идентичных потомков путем неполового размножения. Термин «клон» происходит от греческого слова “klon”, что означает — веточка, побег, черенок. Это понятие использовалось прежде для определения вегетативного размножения растений. Клонирование растений черенками, почками или клубнями в сельском хозяйстве известно уже более 4 тыс. лет. Начиная с 70-х годов прошлого столетия, для клонирования растений стали широко использовать небольшие группы и даже отдельные соматические (неполовые) клетки.

Техническая суть клонирования — взятие ядра, содержащего хромосомный материал, из клетки организма и имплантация его в энуклеированную яйцеклетку или другую клетку иного организма. Такая модифицированная клетка обладает потенциалом роста и развития как новый организм, являющийся генетической копией

оригинала. Возможна аналогия с однойцовыми близнецами, с той существенной разницей, что клон в состоянии наблюдать свое биологическое будущее в пределах его генетической детерминированности. Безусловно, человек больше, чем совокупность генов. Он формируется под влиянием окружения, времени, места, воспитания. Поэтому генетический клон не имеет истинной идентичности со своим генетическим родителем. Однако этическая проблематичность клонирования состоит в том, что эта технология затрагивает основы человеческой природы и ее рационального контроля [11].

Если оценить принципиальные возможности клонирования, то в будущем технически осуществима продукция множественных копий людей, подходящих для различных целей, — воинов, интеллектуалов, сексуальных производителей. Не обсуждая этические детали таких предположений, можно лишь утверждать, что такие перспективы очень отдалены. Более вероятно использование клонирования в сельском хозяйстве, а в будущем — как метод помощи бесплодным парам, стремящимся иметь родного им ребенка, в том числе — генетическую копию умирающего ребенка [11].

С научных позиций, возможность клонирования человека обоснована успехами в клонировании млекопитающих с использованием ядер зародышевых клеток, выращиваемых в культуре на искусственной питательной среде. Следующим шагом стало использование соматических клеток взрослых животных. Первым официальным сообщением о клонировании млекопитающих (овцы) стало известие о результатах работы исследователей под руководством Я. Улмута. Донором ядра стали клетки молочной железы взрослой овцы. В Японии было проведено клонирование коров с использованием ядер эпителиальных клеток, содержащихся в молозиве (F. Golden, 1999). Беспрецедентный по своему масштабу эксперимент по массовому клонированию крупного рогатого скота начался в Китае, где ожидается появление от 20

до 50 клонированных телят. В проекте также участвуют Австралия, Канада, США, Великобритания и ряд других стран.

Существенной проблемой клонирования остается относительно высокий процент спонтанных аборт на поздних этапах эмбрионального развития и частые случаи смерти животных вскоре после рождения, особенно когда донорами ядер служили соматические клетки. Соматическое клонирование может стать причиной врожденных пороков развития. У ряда животных-клонов, в том числе и у первой клонированной овцы, наблюдается феномен преждевременного старения. Не изучено влияние клонирования на функциональные особенности и плодовитость.

Из изложенного выше следует, что технически и методически клонирование взрослых млекопитающих разработано еще недостаточно, чтобы можно было уже сейчас ставить вопрос о реальном осуществлении проекта по клонированию человека. В зависимости от цели клонирование разделяют на репродуктивное, направленное на воспроизводство человеческого существа как способа размножения, и терапевтическое — для медицинских целей. Магистральное же направление терапевтического клонирования — это исследования в области получения стволовых клеток.

Так называемое терапевтическое клонирование предполагает клонирование эмбрионов на ранних стадиях развития, которые станут своеобразными банками донорских тканей для конкретных индивидуумов. Стволовые клетки с их уникальными возможностями и потенциалом могут дифференцироваться в любые ткани и органы, давно являются объектом научных исследований. Важная особенность стволовых клеток заключается в том, что при пересадке они отторгаются организмом реципиента в гораздо меньшей степени, чем донорские органы и ткани. Такой подход в перспективе может привести к возможности выращивания в лабораторных условиях предшественников различных органов и тканей, а затем трансплантации их вместо донорских органов. Кроме того, ве-

дуются исследования по использованию стволовых клеток в качестве векторов для генной терапии.

Клонирование человека, помимо научных и технических проблем, связано с решением сложных этических вопросов. Во-первых, становление человека как личности базируется не только на биологической наследственности, оно определяется также семейной, социальной и культурной средой. При репродуктивном клонировании индивида невозможно воссоздать все те условия воспитания и обучения, которые сформировали личность его прототипа (донора ядра). Во-вторых, при бесполом размножении изначально жесткая запрограммированность генотипа предопределяет меньшее разнообразие взаимодействий развивающегося организма с изменяющимися условиями среды (по сравнению с половым размножением, когда в формировании индивида участвуют два генома, сложным и непредсказуемым образом взаимодействующие между собой и с окружающей средой). В-третьих, как репродуктивное, так и терапевтическое клонирование человека входит в непримиримое противоречие с религиозной моралью. Практически все религиозные учения настаивают на противоестественности процесса клонирования человека и животных. Представители православной церкви во всем мире остаются верными строгому пониманию сакральности человеческой жизни: каждый человек создан как уникальная личность «по образу Божию». Поэтому подавляющее большинство православных этиков настаивает, что все формы евгеники, включая манипулирование с человеческим генетическим материалом в нетерапевтических целях, в нравственном отношении отвратительны и угрожают человеческой жизни и благополучию.

О неприемлемости вмешательства в процессы репродукции и генетический материал человека и животного заявил Ватикан. Муфтий Египта и глава коптской церкви высказались, что такой вид научной деятельности противоречит моральным принципам и божественным законам.

Внедрение репродуктивного клонирования человека может привести к разрушению традиционных нравственных устоев и, прежде всего, семьи. Кроме того, эта ситуация чревата возникновением ряда социально-правовых коллизий. Взаимоотношения между людьми и клонами, правовой и имущественный статус клонов, можно ли рассматривать клонируемого и клона семей — вот лишь неполный перечень вопросов, которые станут актуальными при внедрении клонирования. Все эти правовые коллизии могут привести к серьезным изменениям в конституционном, гражданском и других отраслях права. Обращает на себя внимание факт, что большинство ученых-генетиков, критически относящихся к возможности клонирования, основные нравственные проблемы видят в нерешенности методических вопросов клонирования человека [11].

Существует также целый ряд психологических проблем, связанных с репродуктивным клонированием. Трудно прогнозируем эффект воздействия на человеческую идентичность при клонировании человека, который, являясь близнецом своего отца или матери, будет рожден в другом поколении и другой среде. Возникают вопросы, будет ли клон чувствовать, что он или она — это всего лишь копия кого-то, кто уже существовал, что у него отсутствует собственная идентичность.

Глубокие биоэтические проблемы существуют не только в сфере репродуктивного, но и на пути «терапевтического» клонирования. Техническая возможность получения органов и тканей для трансплантации приведет к дополнительному расслоению общества с выделением прослойки людей, которым они будут доступны.

Принципиален вопрос о том, насколько этически приемлема манипуляция человека с самим процессом жизни.

В настоящее время совершенно очевиден тот факт, что этическая сторона проблемы клонирования не решена и вряд ли будет решена в ближайшем будущем. Несмотря на многочисленные сообщения в средствах массовой информации об успе-

хах в репродуктивном клонировании человека, большинство исследователей склоняется к тому, что пока об этом можно говорить лишь теоретически. По сути, речь идет даже не о клонировании, а о получении копии отдельного индивида, поскольку термин «клонирование» предполагает получение некоего множества особей. Очевидно, что сегодня вероятность отрицательных последствий этой процедуры значительно перевешивает ее выгоды, поэтому решение вопроса о целесообразности продолжения работ в этом направлении требует тщательной проработки. Возможно, через какое-то время, когда будут усовершенствованы все этапы этого сложного биотехнологического метода, ученые, социологи и другие заинтересованные лица смогут вернуться к обсуждению целесообразности клонирования человека. Однако в любом случае решение вопроса о клонировании того или иного человека будет регламентироваться строгими рамками и правилами, касаясь, возможно, только некоторых медицинских проблем, скажем, непреодолимого другими методами бесплодия.

Работы же с домашними животными очень важны с практической точки зрения. Успехи в области клонирования животных открывают широкие перспективы для выживания человечества. Клонирование может использоваться, например, для создания целых стад высокопродуктивных пород домашних животных, в частности, коров. В то же время следует учитывать тот факт, что клонирование идет в направлении, обратном селекции. Последняя увеличивает биоразнообразие, а массовое клонирование его уменьшает и может привести к уменьшению генофонда и вырождаемости. Таким образом, клонирование высокопродуктивных домашних животных несомненно важно, но в разумных пределах. Клонирование ценных трансгенных животных может быстро и экономично обеспечить человечество новыми лекарственными препаратами, содержащимися в молоке специально полученных для этого генноинженерными методами овец, коров

и коз. Также клонирование может использоваться для разведения призовых спортивных лошадей, ценных пушных зверей, сохранения редких и исчезающих животных в природных популяциях. Так, например, жители Таиланда хотят клонировать диких белых слонов, из 50 000 которых, живших в 60-х годах, осталось только 2000. Однако если современные антропогенные нарушения и уничтожение местообитаний не прекратятся, та же судьба ожидает и клонов. Нельзя решать проблемы сохранения флоры и фауны только путем технологий, игнорируя их коренные причины, хотя, несомненно, клонирование с целью поддержать популяции вымирающих видов животных — перспективное и важное направление.

Отношение к клонированию в мире отличается разнообразием, но преобладает точка зрения о морально-этической и социальной недопустимости этой процедуры в отношении человека. По результатам опросов, большинство граждан США считает, что клонирование как таковое недопустимо в моральном и правовом плане и в итоге приведет к проблемам, а не к успехам, поэтому правительство должно контролировать технологии, связанные с клонированием животных. По поводу людей американцы еще более единодушны: три четверти из них полагают, что искусственное воспроизводство противоречит Божьей воле, а треть опрошенных готовы активно противодействовать экспериментам по клонированию человека. Лишь 7 % американцев одобряют гипотетическую возможность иметь двойника и продлить таким образом свою жизнь. Однако в научной среде существует мнение о порочности практики запрета клонирования как тормозящей прогресс науки. Когда президент США Б. Клинтон наложил вето на бюджетное финансирование изысканий по клонированию людей и обратился к работающим при поддержке частных фондов исследователям с просьбой «сопротивляться искушению клонировать самих себя», выдающиеся ученые, лауреаты Международной академии гуманизма, в

том числе лауреаты Нобелевской премии, обратились к нему с Декларацией в защиту клонирования и неприкосновенности научных исследований.

Возможность клонирования человека ставит человечество перед необходимостью изменения правовой регламентации многих вопросов, касающихся медико-биологических исследований. В Европе базовый документ, регулирующий деятельность человека в области клонирования, — Конвенция о правах человека и биомедицине, принятая Парламентской Ассамблеей Совета Европы в ноябре 1996 г. Разработка Конвенции до официального сообщения об успешном завершении эксперимента по клонированию объясняет отсутствие в ней прямых указаний, связанных с регламентацией таких экспериментов. Возможность клонирования человека толкуют, исходя из положений ст. 18 Конвенции. Согласно ч. 1 этой статьи, если закон разрешает проводить исследования на эмбрионах *in vitro*, он также должен предусматривать соответствующую защиту эмбриона. В ч. 2 ст. 18 содержится запрет на создание эмбрионов человека для исследовательских целей. Для конкретизации норм Конвенции применительно к отдельным областям биологии и медицины, Руководящий комитет по биоэтике Совета Европы разрабатывает Дополнительные протоколы. Неофициальное название такого документа — «Протокол о запрете клонирования человека», он был открыт к подписанию 15 января 1998 г. Этот протокол ввел запрет на клонирование человека, мотивируя это тем, что инструментализация человека путем создания генетически идентичных человеческих существ несовместима с достоинством человека и, таким образом, представляет собой злоупотребление биологией и медициной. Последствиями клонирования человека могут стать серьезные медицинские, психологические и юридические проблемы для всех вовлеченных в него индивидуумов. В ст. 1 Дополнительного протокола указано: «Любое вмешательство с целью создания человека, идентичного другому человеку,

будь то живому или мертвому, запрещается». В статье также разъясняется значение термина «человек, генетически идентичный другому» как «человек, имеющий с другим человеком одинаковый набор генов». Ставя своей целью соблюдение этических норм, Дополнительный протокол не учитывает существенной разницы понятий репродуктивного и терапевтического клонирования, что в значительной степени ограничивает его значение при создании национальной регламентирующей базы.

Другой международный документ — Всеобщая декларация о геноме человека и правах человека, принятая в 1997 г. на 29-й сессии Генеральной конференции ЮНЕСКО, также декларирует недопустимость практики клонирования человека. В ст. 11 Декларации указано на необходимость международного сотрудничества для выявления практики клонирования в целях воспроизводства человеческой особи и принятия соответствующих мер на национальном и международном уровнях для недопущения такой практики.

Национальные законы государств — членов Европейского Союза, как правило, не делают различий между понятиями репродуктивное и терапевтическое клонирование и запрещают любое из них. В Европе наиболее последовательный противник клонирования — Германия, которая отождествляет практику таких экспериментов с неэтическими экспериментами над людьми, проводившимися при нацистском режиме. Федеральный закон ФРГ о защите эмбрионов 1990 г. называет преступлением создание эмбриона, генетически идентичного другому живому или мертвому лицу. Закон Испании о процедурах, способствующих репродукции, 1988 г. также устанавливает уголовную ответственность за клонирование человеческого эмбриона. В Дании исследования в области клонирования запрещены Актом о системе научных комитетов по этике и управлению биомедицинскими исследовательскими проектами 1992 г. Аналогичное законодатель-

ство имеют Италия, Нидерланды, Швеция, Франция и Бельгия.

Наиболее сложная ситуация с запретом клонирования сложилась в Великобритании. Согласно Акту о зачатии человека и эмбриологии (1990), клонирование запрещено. В нем сказано, что «осуществлять слияние клеточных ядер человеческого эмбриона с ядрами, выделенными из клеток тканей другого человека, эмбриона, или утробного плода в последующие стадии его развития, запрещается». Этот документ, как и многие другие европейские законодательные акты, до недавнего времени не проводил дифференциации между репродуктивным и терапевтическим клонированием. Парадокс ситуации заключается в том, что Великобритания — фактическая родина клонирования млекопитающих, и идея разрешения клонирования человека в британских научных кругах очень популярна. В 2002 г. палата лордов удовлетворила апелляцию правительства и отменила решение суда, выводящее клонирование за рамки действия Акта о человеческом зачатии и эмбриологии 1990 г. В августе 2004 г. Британская государственная организация HFEA (Human Fertilisation and Embryology Authority) разрешила клонирование человеческих эмбрионов для медицинских исследований. Первыми в стране эту процедуру, вызывающую многочисленные споры, проведут специалисты из университета Ньюкасла.

В 2004 г. терапевтическое клонирование было разрешено Научным советом Японии.

В США принципы правовой регламентации экспериментов по клонированию человека формировались в процессе противостояния сторонников запрета и легализации работ в этой области. Комитет палаты представителей Конгресса США по науке 30 июля 1997 г. проголосовал за полный запрет экспериментов, связанных с клонированием людей. Он усилил указ президента, запрещающий выделение федеральных средств на любые исследования, связанные с клонированием человека. По рекомендации Национальной консуль-

тивной комиссии по биоэтике США в 1999 г. был введен 5-летний мораторий на государственное финансирование программ, связанных с экспериментами на человеческих эмбрионах, в том числе с их клонированием. Комиссия рекомендовала немедленно обратиться ко всем фирмам, практикующим врачам, исследователям и профессиональным обществам, осуществляющим свою деятельность в частном секторе или учреждениях, финансируемых не из федерального бюджета, с призывом добровольно присоединиться к объявленному федеральными властями мораторию. Однако уже в 2001 г. было возобновлено государственное финансирование исследований в области использования человеческих эмбрионов в медицинских целях.

В Российской Федерации законодательно работы по клонированию человека, как и в большинстве стран мира, приостановлены. В 1996 г. Государственной Думой был принят федеральный закон «О государственном регулировании в области генноинженерной деятельности». В 2002 г. был принят специальный Федеральный закон Российской Федерации «О временном запрете на клонирование человека». В ст. 2 этого закона определено клонирование человека как «создание человека, генетически идентичного другому живому или умершему человеку, путем переноса в лишенную ядра женскую половую клетку ядра соматической клетки человека». Как и в США, согласно существующим законодательным актам, клонирование фактически не запрещено, а заморожено при помощи моратория на клонирование человека на ближайшие пять лет.

Подводя итог изложенному опыту законодательной регламентации клонирования, можно констатировать, что в мире запрет на клонирование устанавливается в одной из трех форм: прямого или косвенного полного запрета клонирования человека; запрета исключительно репродуктивного клонирования человека; временного запрета клонирования человека.

Очевидно то, что в будущем, когда рассматриваемая проблема будет полностью

решена методически и технически, человечество признает клонирование методом помощи бесплодным парам, стремящимся иметь родного им ребенка [12]. Но для этого потребуются решение этических и юридических проблем, которые видны уже сейчас. Во всем мире биоэтика, ее нормы и правила становятся важной и неотъемлемой частью науки. Совершенно очевидно, что существующие нравственные, моральные заповеди, к сожалению, не предусматривают новых возможностей и методологии, вносимых наукой в жизнь общества. Поэтому необходимо, чтобы общественное мнение базировалось не на поверхностных представлениях о репродуктивных технологиях, а на глубоком знании предмета и социальной ответственности исследователя. Также нужно создавать новые нормы и мораль существования общества, учитывающие изменения окружающей реальности.

Важный раздел современной биоэтики — оценка генной инженерии. Речь идет о достижениях генной терапии и использовании генетически модифицированных продуктов питания. Генная терапия — область медицинских знаний, возникшая на стыке медицины, генетики и молекулярной биологии и занимающая все более существенное положение в современной генетике. Она представляет собой генноинженерную технологию, нацеленную на получение терапевтического эффекта при помощи введения в геном человека определенных генетических конструкций [13]. Результатом достижений молекулярной генетики, генной и клеточной инженерии последних десятилетий стало рождение новой области медицинских знаний, позволяющей использовать функциональные гены в качестве лекарственных веществ.

Два основных направления современной генной терапии — это лечение моногенных наследственных заболеваний и приобретенных болезней. Несмотря на значительный прогресс в обоих направлениях генной терапии, количество нерешенных проблем не позволяет этим методам лечения перешагнуть границы экспери-

мента. Терапия моногенных наследственных заболеваний находится на этапе зарождения, так как технически не решена проблема коррекции генома. Развитие этого направления идет по пути внехромосомной экспрессии введенных генетических конструкций. Генная терапия злокачественных новообразований с помощью генов цитокинов, генов, контролирующих апоптоз, и ряда других генетических конструкций — это также пока объект научных экспериментов.

Лечебный эффект генной терапии может достигаться в результате:

- коррективы или замены дефектного гена (такой вид терапии называют генетической);
- внехромосомной экспрессии введенных терапевтических генных конструкций (этот вид терапии называют генной);
- подавления функции патологических или сверхактивных генов.

Объектом генной терапии могут быть соматические клетки, а также клетки плода. Генетические конструкции могут использоваться системно (вводится внутривенно или внутримышечно) или местно (непосредственно в пораженные органы, опухоли). В большинстве существующих в настоящее время протоколов генной терапии применяется местное локальное введение генетических конструкций. Переносчиками генетических конструкций служат вирусные и невирусные векторные системы. Создание эффективных и безопасных векторов в генной терапии — важная составляющая ее успеха. Невирусные векторы имеют преимущества, связанные с их безопасностью, а также дешевизной и легкостью производства. Полностью синтетические системы доставки генов более безопасны для реципиента, чем рекомбинантные вирусы, однако процесс создания эффективных микромолекулярных векторных систем не завершен. Наиболее вероятно, что при широком внедрении генной терапии в клиническую практику векторы для доставки генетической информации будут включать как вирусы, так и элементы синтетических комплексов. Один из

примеров клинических испытаний генной терапии — попытки лечения этим методом взрослых больных муковисцидозом. Как известно, основу заболевания составляет наличие мутаций гена муковисцидоза, расположенного на 7-й хромосоме. Используя в качестве вектора вирусы, ученые предпринимают попытки доставки неповрежденного гена непосредственно в эпителиальные клетки трахеобронхиального дерева больных муковисцидозом.

Нерешенность многих технических аспектов генной терапии, а также сама ее природа вызывают целый ряд биоэтических противоречий. Серьезные угрозы и противоречия, которые несет генная терапия, можно разделить на три группы. Первая группа представляет опасность вмешательства в генетический аппарат последующих поколений и, как результат, изменение природы человека. Соматическая генная терапия таит в себе вторую группу опасностей, связанных с вмешательством в генетический аппарат клеток отдельных органов и тканей с их последующим перерождением. Третья группа опасностей обусловлена возможными негативными последствиями воздействия на организм человека векторных систем, причем это воздействие при использовании вирусных векторов касается не только организма больного, но и окружающих людей [12].

Таким образом, одна из главных биоэтических проблем генной терапии — бесконтрольное вмешательство в геном будущих поколений с изменением их наследственности. При соматической генной терапии можно предположить возможность неконтролируемого встраивания вектор-ДНК-последовательностей в геном с последующим злокачественным перерождением клеток. Также теоретически возможно попадание генетических конструкций в половые клетки с изменением гена будущих поколений.

Основные биоэтические вопросы генной терапии следующие:

— когда, при каких условиях и как широко она может применяться;

— как должно быть организовано медико-генетическое консультирование;

— насколько реальна опасность «генетицизма» общества, то есть навязывания ему неких генетических норм;

— возможна ли в будущем практика «профилактической» или косметической генной терапии;

— существует ли угроза создания генетически высших и низших классов носителей определенных генетических признаков;

— перспективны ли и экономически оправданы научные исследования в области генной терапии.

Вполне очевиден тот факт, что в ближайшие десятилетия генная терапия выйдет за границы медико-биологических и клинических экспериментов. Следовательно, к ней необходимо применять соответствующий набор правовых и этических регуляций. Генная терапия — вторжение в наиболее интимные аспекты жизнедеятельности, поэтому экспертиза всех научных изысканий со стороны национальных этических комитетов оправдана.

Основная тенденция религиозной оценки генной терапии может быть проиллюстрирована на модели позиции православия: «Привлекая внимание людей к нравственным причинам недугов, Церковь вместе с тем приветствует усилия медиков, направленные на врачевание наследственных болезней. Однако целью генетического вмешательства не должно быть искусственное “усовершенствование” человеческого рода и вторжение в Божий план о человеке. Поэтому генная терапия может осуществляться только с согласия пациента или его законных представителей и исключительно по медицинским показаниям. Генная терапия половых клеток является крайне опасной, ибо связана с изменением генома (совокупности наследственных особенностей) в ряду поколений, что может повлечь непредсказуемые последствия в виде новых мутаций и дестабилизации равновесия между человеческим сообществом и окружающей средой» [14].

В международном правовом поле генная терапия, будучи одним из объектов

генноинженерной деятельности, составляет часть общей системы биобезопасности. Под биобезопасностью понимается система мер по обеспечению безопасного создания, использования и трансграничной передачи живых измененных организмов — результата биотехнологии.

«Конвенция о правах человека и биомедицине», принятая Советом Европы в 1997 г., констатирует наличие серьезной опасности того, что геном человека может подвергнуться преднамеренному изменению, с тем чтобы получить людей или целые группы, наделенные особыми характеристиками и необходимыми качествами. Чтобы отвлечь подобную угрозу в каждом случае, любое вмешательство, имеющее целью видоизменить геном человека, должно проводиться только в профилактических, диагностических или терапевтических целях. Вмешательство, направленное на модификацию генетических характеристик, не связанных с болезнью или недомоганием, запрещено. Поскольку в настоящее время генная терапия соматической клетки еще находится на стадии исследования, то применять ее можно только в том случае, если она отвечает стандартам защиты. Вмешательство, преследующее цель внести какое-либо изменение в геном потомков, запрещено. Поэтому, в частности, не разрешаются генетические модификации сперматозоида или яйцеклетки в целях оплодотворения. Проводить медицинские исследования с целью внесения генетических изменений в сперматозоид или яйцеклетку, не связанные с воспроизведением потомства, разрешается только в искусственных условиях с одобрения соответствующего органа, занимающегося вопросами этики или управления. В связи с непредсказуемостью последствий переноса генетического материала в половые клетки, в большинстве регламентирующих документов на международном уровне существует запрет на проведение такого рода испытаний. Запрещая генную терапию половых клеток, Конвенция не исключает вмешательства в соматических целях, которое, как указывалось выше, так-

же может иметь нежелательные побочные эффекты в зародышевой клетке.

Ф. Андерсон (1992) сформулировал три условия, ставшие общепризнанными для разрешения клинических испытаний в области генной терапии. Необходимо доказать в экспериментах на животных, что, во-первых, нужный ген может быть перенесен в соответствующие клетки-мишени, где он будет функционально активен довольно продолжительное время; во-вторых, будучи перенесен в новую для себя среду, этот ген не потеряет свою экспрессию, то есть сохранит эффективность; в-третьих, такой перенос не вызовет неблагоприятных последствий в организме.

Несмотря на кажущуюся простоту, эти условия не могут стать универсальным правилом. Для каждого конкретного эксперимента придется определять, какие сроки сохранения эффективности гена могут считаться достаточными, каким должен быть уровень экспрессивности, каков потенциальный риск для пациента и как он соотносится с предполагаемым лечебным эффектом. Подобный анализ может быть выполнен только в рамках этических комитетов. Участие в их работе независимых ученых позволит непредвзято оценить обоснованность и реалистичность предлагаемых клинических испытаний. Например, известна строгая система контроля генотерапевтических процедур «Система разрешительных мероприятий для процедур генной терапии в США» [15]. Каждый протокол возможного генотерапевтического лечения вначале рассматривается комитетом по биологической безопасности того учреждения, в котором он будет выполняться. Если протокол одобрен, он направляется для утверждения в консультативный Совет по рекомбинантным молекулам при Национальном институте здоровья. После окончательного рассмотрения и утверждения национальной службой, контролирующей безопасность пищевых продуктов и лекарственных веществ, протокол должен быть опубликован в журнале «Human Gene Therapy». В большинстве европейских государств также существует

отработанная и строгая система контроля исследований в области генной терапии.

В России научные изыскания в области генной терапии и генной инженерии регулируются Федеральным законом «О государственном регулировании в области генноинженерной деятельности», прошедшим международную экспертизу и вступившим в силу в 1996 г. Согласно этому закону, генноинженерная деятельность должна основываться на принципах:

- безопасности граждан (физических лиц) и окружающей среды;
- безопасности клинических испытаний методов генетической диагностики и генной терапии на уровне соматических клеток;

- сертификации продукции, содержащей результаты генноинженерной деятельности с указанием полной информации о методах получения и свойствах данного продукта.

Деятельность исследователей, занимающихся в России генной терапией, регламентируется также законом «О трансплантации органов и/или тканей». Созданная в России нормативно-правовая база совершенствуется, и в 2000 г. был принят Федеральный закон о внесении дополнений и изменений в законодательный документ (в редакции 1996 г.) «О государственном регулировании в области генноинженерной деятельности». Однако и вновь созданная нормативно-правовая база не лишена недостатков, главный из которых — отсутствие эффективного контроля за выполнением условий безопасности и непосредственным проведением генноинженерных и генотерапевтических процедур [16].

В Украине также проходит процесс становления нормативно-правовой базы, регламентирующей генноинженерную деятельность.

Биоэтическая оценка использования генетически модифицированных продуктов питания стала необходимой после значительных успехов генной инженерии. Генетическое модифицирование продуктов получило широкое развитие благодаря достижениям генной инженерии в области

сельского хозяйства. Основная проблема состоит в том, что модифицированные продукты часто несут в себе непредсказуемые побочные эффекты. Мы не можем быть уверены в том, что генетически модифицированное растение, употребляемое нами в пищу, не станет вдруг производить новые токсины и аллергены или не повысит уровень скрытых токсинов. Трудно с точностью утверждать что-либо о пищевой ценности таких растений и о их воздействии на окружающую среду и дикую природу. Все эти вопросы важны, но ответа на них пока нет. Трудно предсказать, как употребление генетически модифицированных продуктов повлияет на организм через некоторое время. Для этого нужно вести наблюдение за несколькими поколениями людей, потребляющих такие продукты питания [17].

В настоящее время выведены и уже выращиваются генетически модифицированные сорта кукурузы, картофеля, сои, томатов и других культур. Сторонники применения генной инженерии в сельском хозяйстве уверены: питаюсь трансгенными пищевыми продуктами, человек подвергается опасности не большей, чем употребляя обычные продукты. Более того, некоторые ученые, фермеры, государственные чиновники и, конечно же, производители трансгенных продуктов убеждены, что без генной инженерии человечеству не обойтись. Основные аргументы в пользу этой технологии производства продуктов питания таковы:

- существуют предположения, что в течение последующих 20 лет население планеты увеличится вдвое, что сделает актуальной проблему обеспечения продовольствием. Растения, полученные при помощи генной инженерии, могут давать более высокие урожаи, чем традиционные культуры, обладают более высокой устойчивостью к насекомым-вредителям. Таким образом, возможность повышения урожайности — один из основных аргументов в пользу создания трансгенных растений;

- существует возможность изменения свойств растений при помощи генетичес-

кой модификации с увеличением содержания питательных веществ и витаминов, что приведет к большей сбалансированности питания;

— генетически модифицированные растения будут обладать устойчивостью в экстремальных погодных условиях (засуха, холод, наводнения), что особенно важно для населения беднейших регионов планеты [17];

— у генетически модифицированных растений проявляется меньшая потребность при их выращивании в пестицидах и гербицидах. Так, встраивание в кукурузу гена земляной бактерии *Bacillus thuringiensis* — природного пестицида — снабжает растение собственной защитой, поэтому дополнительно не надо обрабатывать его;

— продукты питания, содержащие генетически модифицированные ингредиенты, могут стать полезными для здоровья, если в них встроить вакцины против различных болезней.

Однако все эти доводы основаны на утилитаристском подходе к использованию генетически модифицированных продуктов. При этом компании, производящие генетически модифицированную продукцию, прикрываются мифом о равноценности пищевых субстанций. Концепция «эквивалентности пищевых субстанций» используется в Европе, Северной Америке и повсюду в мире как основа для системы регулирования. Она была создана специально для облегчения коммерциализации генетически модифицированных продуктов питания. Например, такая концепция составляет основу Европейских правил о генетических модифицированных продуктах и ингредиентах. Равноценность подразумевает, что оба типа продуктов — обычные и генетически модифицированные — одинаковы по всем характеристикам, важным для потребителей, — безопасности, питательности, внешнему виду. На основе тезиса, что генетически модифицированные продукты не опаснее прочих, они при тестировании или маркировке классифицируются как равноценные обычным и проходят про-

стые, такие же, как и для обычных продуктов, а не усиленные тесты.

В настоящее время процедуры тестирования, принятые в Европе, США и всем остальном мире, состоят практически исключительно из специальных химических и биохимических исследований, призванных качественно определить то или иное специфическое питательное вещество, токсин или аллерген. Эти тесты фокусируются на компонентах, которые могут дать побочные действия в каком-либо генетически модифицированном продукте и основаны на известных свойствах этих же веществ, проявляющихся в их немодифицированных аналогах, а также на характеристиках самих по себе генов, привнесенных в генетически модифицированные растение и животное. Такие исследования не могут обнаружить опасность, таящуюся в генетически модифицированных продуктах, так как могут не выявить побочные эффекты, существование которых никто не предполагал [18].

Учитывая то, что геновая инженерия способна привнести в продукты ранее неизвестные опасные свойства, каждый генетически модифицированный продукт должен быть подвергнут обследованию, которому выявить самый широкий спектр возможных опасностей. Но в настоящее время использование концепции эквивалентности позволяет обойти необходимость такого тестирования. Только клинические испытания способны обнаружить все возможные опасности и непредвиденные побочные эффекты, которые могут таиться в продуктах генноинженерного процесса. Основными и очевидными опасностями генетически модифицированных продуктов для здоровья человека считаются аллергия, токсичность и возникновение устойчивости к антибиотикам. Необходимо также отметить негативное влияние внедрения генетически модифицированных сельскохозяйственных культур на окружающую среду, в частности на биоразнообразие.

Вопросы создания трансгенных растений и животных требуют большого фило-

софского и научного осмысления, так как это касается далеко не одного лишь узкого круга специалистов. Речь идет не только о современной популяции, но, в основном, о будущих поколениях. Определенный минимум новейших генетических знаний становится необходимой составной частью не только специальной, но и общей грамотности человека, показателем его подготовленности и ответственности за жизнь в современном мире.

### Список литературы

1. *Zaporozhan V.* Nooethics: as modern stage of development of bioethics // *Leadership Medica.* — 2005. — Vol. XXI, N 5. — P. 4–14.
2. *Bioethics: an introduction to the history, methods and practice* / Ed. By N. S. Jecker, A. R. Jonsen, R. A. Pearlman. — London UK: Jones and Barlett Publishers International, 1997. — P. 416.
3. *Тимченко Л. Н., Попов В. В.* Защита прав пациентов. Этика клинических испытаний. — Харьков: Харьков. благодтв. фонд «Качественная клиническая практика», 2003. — 32 с.
4. *Любан-Площа Б., Запорожан В., Аряев Н.* Терапевтический союз врача и пациента. — К.: АДЕФ Украина, 2001. — 292 с.
5. *Аряев Н. Л.* Медико-этические и правовые проблемы в неонатологической практике // Другий національний конгрес з біоетики. — К.: НАН України, АМН України, Комісія з питань біоетики при Кабінеті Міністрів України, 2004. — С. 103.
6. *Иванюшкин А. Я.* Профессиональная этика в медицине. — М., 1990. — 220 с.
7. *Bioethics: An Anthology* / Ed. by H. Kuhze, P. Singer. — Oxford: Blackwell Publ. Ltd, 1999. — 600 p.
8. *Veatch R. M.* The Basics of Bioethics — 2nd Newjersey: Prentice Hall. — 2003. — P. 205.
9. *Антологія біоетики* / За ред. Ю. І. Кундієва. — Львів: БАК, 2003. — 592 с.
10. *Thomas A. Mappes, David DeGrazia.* Biomedical ethics. — Me Graw Hill, 2001. — 707 p.
11. *Биомедицинская этика* / Под ред. В. И. Покровского. — М.: Медицина, 1997. — 224 с.
12. *Яровинский М. Я.* Лекции по курсу «Медицинская этика» (биоэтика): Учеб. пособие. — М.: Медицина, 2001. — Т. 1. — 208 с.
13. *Биоэтика: принципы, правила, проблемы* / Под ред. Б. Г. Юдина. — М., 1998. — 225 с.
14. *Франкл В.* Доктор и душа. — СПб.: Ювента, 1997. — 245 с.
15. *Стефанов А. В., Мальцев В. И.* Биоэтические проблемы клинических испытаний лекарственных средств // Антологія біоетики: За ред. Ю. І. Кундієва. — Львів: БАК, 2003. — С. 349-358.
16. *Запорожан В. Н.* Биоэтика в XX столетии: от глобальной биоэтики к нооэтике // *Інтегративна антропологія*, 2004. — № 2 (4). — С. 3-9.
17. *Вітенко І. С.* Психологічні основи лікувально-профілактичної допомоги та підготовки лікаря загальної практики — сімейного лікаря. — Харків: Золоті сторінки, 2002. — 288 с.
18. *Запорожан В. М.* Від біоетики до нооетики // *Вісник НАН України.* — 2004. — № 12. — С. 22-30.

# Содержание

---

---

Предисловие .....	3	<b>Глава 3. Фармакогенетика</b>	
Preface .....	7	(Кресюн В. И.) .....	95
<b>Глава 1. Введение в генетическую</b>		3.1. Предмет, задачи, методы	
<b>медицину (Кордюм В. А.) .....</b>	10	исследования, проблемы .....	95
<i>Список литературы .....</i>	40	3.2. Этапы становления	
		фармакогенетики .....	99
<b>Глава 2. Иммуногенетика</b>		3.3. Транспорт лекарств	
(Запорожан В. Н., Бажора Ю. И.) .....	42	через биологические	
2.1. Генетика		мембраны .....	103
иммуноглобулинов .....	42	3.4. Фармакогенетика	
2.2. Главный комплекс		рецепторного	
гистосовместимости .....	53	взаимодействия .....	113
2.3. Рецепторы клеток		3.5. Система цитохрома	
иммунной системы .....	62	P-450 в метаболизме	
2.3.1. Строение		лекарственных средств .....	117
и функция TCR .....	62	3.6. Генетическое разнообразие	
2.3.2. Строение		ферментов лекарственного	
и функция BCR .....	65	метаболизма .....	125
2.3.3. Взаимодействие клеток		3.7. Биотрансформация	
иммунной системы .....	67	лекарственных средств	
2.4. Молекулы клеточной		и ее нежелательные эффекты .....	153
адгезии человека .....	74	3.8. Клинические проблемы	
2.5. Эволюция суперсемейства		фармакогенетики .....	158
иммуноглобулинов и формирование		3.9. Методы, применяемые	
эффективной системы иммуно-		в фармакогенетике. ....	165
логического распознавания .....	78	3.10. Перспективы развития	
2.6. Молекулярно-генетические		фармакогенетики .....	168
основы эволюции иммунной		<i>Список литературы .....</i>	173
системы .....	79		
2.7. Система цитокинов .....	82	<b>Глава 4. Генетическая токсикология</b>	
2.8. Генетические		(Трахтенберг И. М., Левицкий Е. Л.) ....	183
механизмы аутоагрессии .....	86	4.1. Предмет генетической	
<i>Список литературы .....</i>	90	токсикологии и ее задачи .....	183

4.2. Краткие сведения о структуре и основных функциях хроматина — субстрата действия генотоксикантов .....	185	6.7. Пренатальная диагностика наследственных заболеваний и врожденных пороков развития .....	297
4.3. Классификация генотоксикантов, основные типы генотоксических повреждений и методы их идентификации .....	191	6.8. Методы диагностики наследственной патологии в системе современных репродуктивных технологий .....	307
4.4. Основные механизмы генотоксического действия ксенобиотиков: роль свободнорадикальных реакций в механизмах ДНК-повреждающего действия ксенобиотиков .....	197	6.9. Диагностика гетерозиготных носителей рецессивных генов наследственных заболеваний, генных болезней с поздней манифестацией, генов предрасположенности к мультифакториальным заболеваниям .....	308
4.5. Фармакологические принципы защиты ядерного генома от повреждающего действия генотоксикантов .....	213	6.10. Общие принципы ведения наследственных заболеваний и врожденных пороков развития .....	311
<i>Список литературы</i> .....	216	6.11. Общие принципы медико-генетического консультирования .....	325
<b>Глава 5. Клиническая онкогенетика</b> (Чехун В. Ф., Полицук Л. З., Бучинская Л. Г.) .....	222	<i>Список литературы</i> .....	332
<i>Список литературы</i> .....	256	<b>Глава 7. Выделение и характеристика стволовых клеток</b> (Дерябина Е. Г.) .....	335
<b>Глава 6. Генетическое консультирование. Принципы диагностики и ведения наследственных заболеваний и врожденных пороков развития</b> (Аряев Н. Л.) .....	263	<i>Список литературы</i> .....	344
6.1. Общие принципы клинической диагностики наследственных болезней .....	263	<b>Глава 8. Клиническое применение стволовых клеток</b> (Habibullah С. М.) .....	347
6.2. Клинико-генеалогический метод. Принципы построения родословной .....	274	8.1. Применение стволовых клеток в эксперименте и клинической практике .....	348
6.3. Цитогенетические методы диагностики хромосомных заболеваний .....	280	8.2. Лечение с использованием стволовых клеток — уровень клинического применения в настоящее время .....	352
6.4. Молекулярно-генетические методы (методы ДНК-диагностики) .....	285	8.3. Потенциальное клиническое применение: заболевания зрелого возраста .....	354
6.5. Метод дерматоглифики .....	294	8.4. От пересадки гепатоцитов до стволовых клеток печени: новая стратегия лечения заболевания печени .....	357
6.6. Биохимические методы .....	295	<i>Список литературы</i> .....	366

**Глава 9. Генная инженерия и генетическая терапия (Huss R.)** ..... 370

- Система невирусной доставки генов ..... 373
- Физические методы ..... 373
- Методы, основанные на биомолекулах ..... 374
- Список литературы** ..... 375

**Глава 10. Метаболические основы «доминантности» и «рецессивности» в наследовании генетических нарушений (Wheatley D.)** ..... 377

- 10.1. Мендель и его работа с растительными гибридами ..... 377
- 10.2. Доминантные и рецессивные признаки, а не доминантные и рецессивные аллели ..... 378
- 10.3. Ведущие ученые-биохимики ищут метаболический эффект генов ..... 379
- 10.4. Анализ контроля метаболического пути и проявление фенотипических признаков ..... 380
- 10.5. Объяснение доминантности и рецессивности ..... 382

- 10.6. Неполная пенетрантность и другие выводы ..... 384
- 10.7. Уровни клеточной организации: геном, транскриптом, протеом и метаболом ..... 385
- Список литературы** ..... 387

**Глава 11. Генетические аспекты старения и возрастной патологии (Бутенко Г. М.)** ..... 388

- 11.1. Роль наследственных факторов в продолжительности жизни человека ..... 389
- 11.2. Изменения в геноме в процессе старения ..... 396
- 11.3. Нарушения при старении митохондриального генома ..... 397
- 11.4. Возрастные нарушения в геноме ядра ..... 399
- Список литературы** ..... 401

**Глава 12. Нооэтика и генетическая медицина (Запорожан В. Н.)** ..... 407

- Список литературы** ..... 425

# Contents

---

---

Preface (Russian) .....	3	<i>Chapter 3. Pharmacogenetics</i>	
Preface .....	7	(Kresyun V. I.) .....	95
<i>Chapter 1. Introduction into genetic medicine</i> (Kordyum V. A.) .....	10	3.1. Object, objectives, methods of research, problems .....	95
<i>References</i> .....	40	3.2. Stages of pharmacogenetics formation .....	99
<i>Chapter 2. Immunogenetics</i> (Zaporozhan V. N., Bazhora Yu. I.) .....	42	3.3. Transport of drugs through biological membranes .....	103
2.1. Genetics of immunoglobulins .....	42	3.4. Pharmacogenetics of receptor interrelation .....	113
2.2. The main complex of histocompatibility .....	53	3.5. The cytochrome P-450 system in drug metabolism .....	117
2.3. Receptors of immune system cells .....	62	3.6. Genetic variety of drug metabolism enzymes .....	125
2.3.1. TCR structure and function .....	62	3.7. Drug biotransformation and its undesirable effects .....	153
2.3.2. BCR structure and function .....	65	3.8. Clinical problems of pharmacogenetics .....	158
2.3.3. Interrelation of immune system cells .....	67	3.9. Methods applied in pharmacogenetics. ....	165
2.4. Molecules of cellular adhesion of man .....	74	3.10. Perspectives of the pharmacogenetics development .....	168
2.5. Evolution of superfamily of immunoglobulins and forming of the effective system of immune recognition .....	78	<i>References</i> .....	173
2.6. Molecular-genetic bases of the immune system evolution .....	79	<i>Chapter 4. Genetic toxicology</i> (Trakhtenberg I. M., Levitsky Ye. L.) .....	183
2.7. System of cytokines .....	82	4.1. Subject of genetic toxicology and its objectives .....	183
2.8. Genetic mechanisms of autoagression .....	86	4.2. Brief information on structure and basic functions of chromatine – genotoxicants action substrate .....	185
<i>References</i> .....	90		

4.3. Classification of genotoxicants, basic types of genotoxic damages and methods of their identification .... 191

4.4. Basic mechanisms of genotoxic action of xenobiotics: role of free-radical reactions in the mechanisms of DNA-damaging action of xenobiotics ..... 197

4.5. Pharmacological principles of nuclear genome protection from damaging action of genotoxicants..... 213

*References* ..... 216

**Chapter 5. Clinical oncogenetics** (Tchekhun V. F., Polishchuk L. Z., Buchinskaya L. G.) ..... 222

*References* ..... 256

**Chapter 6. Genetic advising. Principles of diagnosis and management of hereditary diseases and congenital maldevelopments** (Aryayev N. L.) ..... 263

6.1. General principles of clinical diagnostics of a hereditary diseases .... 263

6.2. The clinical-genealogical method. Principles of pedigree construction ..... 274

6.3. Cytogenetic methods of chromosomal diseases diagnosis ..... 280

6.4. Molecular-genetic methods (methods of DNA-diagnosis) ..... 285

6.5. The method of dermatoglyphics ... 294

6.6. Biochemical methods ..... 295

6.7. Prenatal diagnosis of hereditary diseases and congenital maldevelopments ..... 297

6.8. Methods of hereditary pathology diagnosis in the system of modern reproductive technologies ..... 307

6.9. Diagnosis of heterozygous carriers of recessive genes of hereditary diseases, gene illnesses of late manifestation, genes of predisposition to multifactorial diseases ..... 308

6.10. General principles of management of hereditary diseases and congenital maldevelopments ..... 311

6.11. General principles of the medical-genetic advising ..... 325

*References* ..... 332

**Chapter 7. Selection and description of stem cells** (Deryabina Ye. G.) ..... 335

*References* ..... 344

**Chapter 8. Clinical application of stem cells** (Habibullah C. M.) ..... 347

8.1. Application of stem cells in experiment and clinical practice ..... 348

8.2. Treatment with the use of stem cells is the level of clinical application presently ..... 352

8.3. Potential clinical application: diseases of the mature age ..... 354

8.4. From hepaticytes transplantation to stem cells of the liver: new strategy of the liver diseases treatment ..... 357

*References* ..... 366

**Chapter 9. Gene engineering and genetic therapy** (Huss R.) ..... 370

The system of non-viral delivery of genes ..... 373

Physical methods ..... 373

Methods based on biomolecules ..... 374

*References* ..... 375

**Chapter 10. Metabolic basis of “dominant” and “recessive” in the inheritance of genetic violations** (Wheatley D.) ..... 377

10.1. Mendel and his work with vegetable hybrids ..... 377

10.2. Dominant and recessive signs, but not dominant and recessive allels .....	378	<b>Chapter 11. Genetic aspects of senescence and age pathology</b> (Butenko G. M.) .....	388
10.3. Leading scientists-biochemists search for metabolic effect of genes .....	379	11.1. The role of hereditary factors in human life-span .....	389
10.4. Analysis of the metabolic way control and display of phenotypical signs .....	380	11.2. Changes in genome in the process of senescence .....	396
10.5. Explanation of dominantness and recession .....	382	11.3. Violations during mitochondrial genome aging .....	397
10.6. Incomplete penetrance and other conclusions .....	384	11.4. Age violations in the nuclear genome .....	399
10.7. Levels of cell organization: genome, transcriptom, proteom and metabolom .....	385	<i>References</i> .....	401
<i>References</i> .....	387	<b>Chapter 12. Nooethics and genetic medicine</b> (Zaporozhan V. N.) .....	407
		<i>References</i> .....	425

Г 34 **Генетична** медицина / В. М. Запорожан, В. А. Кордюм, Ю. І. Бажора та ін.; За ред. В. М. Запорожана. — Одеса: Одес. держ. мед. ун-т, 2008. — 432 с. — Рос. мова.  
ISBN 978-966-443-001-9

У книзі наводяться досягнення різних напрямків генетичної медицини — науки, яка давно вийшла за межі клінічної генетики. В окремих главах розглядаються як питання генетичного контролю механізмів функціонування організму людини на різних рівнях його організації, так і застосування досягнень геноміки, протеоміки і метаболоміки у діагностиці, лікуванні та профілактиці захворювань.

Для наукових працівників, лікарів, студентів вищих медичних навчальних закладів.

**ББК 52.522**

НАУКОВЕ ВИДАННЯ

**ЗАПОРОЖАН Валерій Миколайович**  
**КОРДЮМ Віталій Арнольдович**  
**БАЖОРА Юрій Іванович та ін.**

**ГЕНЕТИЧНА МЕДИЦИНА**

*Російською мовою*

Провідний редактор *В. М. Попов*  
Редактори *Т. М. Ананьєва, А. А. Гречанова, О. М. Фащевська*  
Художній редактор *О. А. Шамиуріна*  
Художник *Р. О. Рудченко*  
Технічний редактор *А. В. Попов*  
Коректор *О. В. Титова*

Підп. до друку 27.12.2007. Формат 70×100/16. Папір офсет. № 1.  
Друк офсет. Ум.-друк. арк. 32,41.  
Обл.-вид. арк. 45,0. Тираж 1000 прим. Зам. 993.

Видавництво Одеського державного медичного університету  
65082, Одеса, Валіховський пров., 2.  
Свідоцтво ДК № 668 від 13.11.2001.

*В книге, написанной коллективом известных отечественных и зарубежных ученых, представлены достижения различных направлений генетической медицины — науки, давно вышедшей за рамки клинической генетики. В отдельных главах рассматриваются вопросы генетического контроля механизмов функционирования организма человека на различных уровнях его организации, применение достижений геномики, протеомики и метаболомики в диагностике, лечении и профилактике заболеваний.*

