

КАЗАХСТАНСКО-РОССИЙСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Н.Т. ДЖАЙНАКБАЕВ, С.А. ЕРМЕКОВА

# МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНЕТИКА

Республика Казахстан  
Алматы, 2021

УДК 575 (075.8)

ББК 52.5я73

E72

Учебник «Медицинская генетика» НУО Казахстанско-Российский медицинский университет, авторы С.А.Ермекова, Н.Т.Джайнакбаев утвержден и разрешен к изданию решением УМО по направлению подготовки кадров по специальности «Здравоохранение» МОН РК за № 4 от 6 мая 2019 года на основании положительного заключения научно-медицинской экспертизы и терминологической комиссии Центра Развития образования и науки РЦРЗ МЗ РК

**Рецензенты:**

Айташева Зауре Гайнетдиновна, зав. кафедрой молекулярной биологии и генетики КазНУ им. Аль-Фараби, д.б.н.

Калимагамбетов Айткали Мажитович, старший преподаватель кафедры молекулярной биологии и генетики КазНУ им. Аль-Фараби, к.б.н.

Имамбаева Татьяна Михайловна, профессор кафедры детских болезней, №2, АО Национального Медицинского Университета, д.м.н.

Пиржанов Базарбай Тореевич, зав курсом патофизиологии КРМУ, д.м.н., профессор

Есиргепова София Ричардовна, зав. кафедрой патологии органов и систем с курсами КРМУ, к.м.н.

**E72 Джайнакбаев Н.Т., Ермекова С.А.**

Медицинская генетика: Учебник – Алматы, 2019. - 623 с.: ил. (Учебник для студентов медицинских вузов и медико-биологических факультетов университетов).

**Авторы:** *Джайнакбаев Нурлан Темирбекович*, д.м.н., профессор, ректор Казахстанско-Российского Медицинского Университета, г. Алматы.

*Ермекова Сауле Алихановна*, д.м.н., профессор кафедры молекулярной биологии и медицинской генетики Казахстанско-Российского Медицинского Университета, г. Алматы.

В учебнике отражены основные разделы генетики, устоявшиеся представления о наследовании признаков, классические методы диагностики и профилактики наследственных болезней человека, генетики индивидуального развития, фармакогенетики и генетики популяций человека. Описаны новейшие достижения в медицинской генетике, базирующиеся на молекулярно-генетических и цитогенетических методах исследований генома человека, методах анализа генных мутаций, амплификации, клонировании отдельных фрагментов ДНК, картировании на хромосомах генов различных заболеваний и выявлении часто встречающихся в отдельных популяциях человека мутаций генов различных наследственных заболеваний. Приводится классификация наследственных заболеваний, дается их характеристика, клинические признаки и особенности проявления в зависимости от уровня генных и геномных повреждений. Описаны наследственные болезни, связанные с нарушением обмена веществ, менделирующие и неменделирующие моногенные и полигенные болезни, болезни импринтинга, лизосомные и митохондриальные болезни, системные болезни, связанные с нарушением генов структурных белков, белков ионных каналов и сигнальных систем.

Учебник предназначен для студентов, преподавателей, интернов и резидентов медицинских вузов, для научных сотрудников и врачей.

УДК 575(075.8)

ББК 52.5я73

ISBN

© Н.Т.Джайнакбаев, С.А.Ермекова 2019

**СОДЕРЖАНИЕ**

ВВЕДЕНИЕ	
<b>Глава1. ЗАКОНОМЕРНОСТИ НАСЛЕДОВАНИЯ ПРИЗНАКОВ. ХРОМОСОМНАЯ ТЕОРИЯ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ</b>	<b>11</b>
1.1 Предшественники Менделя	11
1.2 Законы наследования отдельных признаков	11
1.3 Основные положения теории наследственности Менделя. Условия выполнения законов Менделя	16
1.4. Хромосомная теория наследственности	17
1.5. Первые описания хромосом	17
1.6. Индивидуальность хромосом. Работы Бовери Исследования мейоза. Гипотеза Сеттона. Теория хиазмотипии	18
1.7. Открытие сцепленного наследования	20
1.8. Открытие половых хромосом. Работы Моргана и его школы	22
1.9 Сравнение генетических и цитологических карт хромосом	28
1,10. Баланс полов. Балансовая теория Бриджерса.	32
<b>Глава 2. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕНОВ</b>	<b>34</b>
2.1 Генные аллели и их взаимодействие	34
2.2 Взаимодействие неалельных генов	36
2.3 Плейотропия генов	40
2.4 Множественный аллелизм	40
2.5. Экспрессивность и пенетрантность. Генокопии	45
<b>Глава 3. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АППАРАТ КЛЕТКИ</b>	<b>47</b>
3.1 Клетка – элементарная структурно- функциональная единица живого	47
3.2 Морфология метафазных хромосом	48
3.3 Уровни компактизации хромосомной ДНК	50
3.4 Нормальный кариотип человека. Денверская классификация хромосом.	53
3.5. Дифференциальная окраска метафазных хромосом и Парижская классификация хромосом.	57
3.6. Методы детекции хромосомных перестроек: общие сведения	61
3.6.1. Гибридизация in situ, хромосомный пейнтинг	62
3.6.2. Сравнительная геномная гибридизация (CGH)	65
<b>Глава 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛА У ЧЕЛОВЕКА (БИОЛОГИЯ)</b>	<b>73</b>
4.1 Пол у человека. Детерминация пола у человека.	73
4.2.Гены, изменяющие пол. Механизмы детерминации пола у дрозофилы.	75
4.2.1. Генетический механизм половой дифференцировки у человека	76
4.3. Аутосомные гены в детерминации пола. Вторичная детерминация пола у человека.	80
4.4. Детерминирующие гонады факторы	82
4.5 Гаметогенез	87
<b>Глава 5. ОНТОГЕНЕЗ И ГЕНЕТИКА</b>	<b>90</b>
5.1. Ооплазматическая сегрегация и формирование градиентов в ооците	90

5.2 Детерминация, дифференцировка клеток и сегментация зародыша	94
5.3. Гомеозисные гены	96
5.4 Гомеобоксы у человека. Наследственные болезни.	98
5.5. Дифференциация	102
5.6 Эмбриональная индукция	103
5.7 Морфогенез	104
5.8 Клеточный уровень	107
5.9. Клеточные механизмы онтогенеза	113
<b>Глава 6. ВРОЖДЕННЫЕ ПОРОКИ РАЗВИТИЯ</b>	<b>116</b>
6.1. Врожденные пороки развития: общие сведения, нарушения развития Классификации пороков развития	116
6.2. Критические периоды в онтогенезе человека	119
6.3. Клеточные механизмы развития заболевания	120
6.4. Патогенетическая классификация ВПР	120
<b>Глава 7. ПОПУЛЯЦИОННАЯ ГЕНЕТИКА</b>	<b>123</b>
7.1. Генетический полиморфизм в популяции и естественный отбор	123
7.2. Элементарные эволюционные процессы Мутационный процесс в популяции. Миграции в популяции. Отбор в популяции.	125
7.3. Современной теории эволюции.	126
7.4. Закон Харди—Вайнберга. Условия выполнения закона Харди—Вайнберга.	127
7.5. Инбридинг	130
7.6. Генетический дрейф	133
7.7. Генетический груз популяции	134
<b>Глава 8. ИЗМЕНЧИВОСТЬ</b>	<b>137</b>
8.1. Изменчивость, определение, типы.	137
8.2 Мутационная изменчивость	140
8.3 Роль ионизирующего излучения в развитии мутаций.	147
8.4. Свойства ионизирующих излучений	150
<b>Глава 9. ГЕНОМНЫЕ И ХРОМОСОМНЫЕ МУТАЦИИ. ХРОМОСОМНЫЕ БОЛЕЗНИ</b>	<b>156</b>
9.1. Геномные мутации	156
9.2. Хромосомные мутации (абберации): общие сведения	157
9.3. Хромосомные Болезни	163
9.3.1. Синдром (Болезнь) Дауна	163
9.3.2. Синдром Эдвардса	166
9.3.3. Синдром Патау	169
9.4.1. Синдром Вольфа-Хиршхорна	171
9.4.2. Синдром кошачьего Крика, синдром Лежена	176
9.5. Болезни хромосомные: аномалии половых хромосом, введение	179
9.5.1. Синдром Клайнфельтера	180
9.5.2. Синдром Тернера	182
<b>Глава 10. МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ ХРОМОСОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК</b>	<b>186</b>
10.1. Ана-телофазный метод анализа хромосомных аббераций	186

10.2. Вариация числа копий генов	186
10.3. Ломкие сайты хромосом	187
10.4. Сестринский хроматидный обмен	189
<b>Глава 11. ГЕННЫЕ МУТАЦИИ</b>	<b>192</b>
11.1. Роль химических соединений в развитии мутаций. Химия и мутации генов	192
11.2. Генные мутации. Характеристика генных мутаций.	193
11.3. Генные мутации. Генные болезни	195
11.4. Механизмы генных мутаций. Молекулярный генез генных мутаций.	199
11.5. Учет спонтанных мутаций у человека. Техника учета спонтанных мутаций.	205
11.6. Мутации: методы обнаружения: общие сведения.	205
11.6.1. Однонуклеотидный полиморфизм	206
11.6.2. Методы Обнаружения Неизвестных Мутаций	211
<b>Глава 12. РЕПАРАЦИЯ ДНК</b>	<b>228</b>
12.1. Репарация ДНК: общие сведения	228
12.2. Репарация ДНК: основные механизмы	228
12.3. Виды репарации ДНК. Фотореактивация	230
12.4. Эксцизионная репарация оснований (BER)	232
12.5. Коррекция неспаренных оснований (КНО) в ДНК	237
12.6. Исправление ошибок спаривания ДНК. Мисмэтч-репарация.	240
12.7. Эксцизионная репарация нуклеотидов (NER)	241
12.8. Пострепликативная репарация	247
12.9. SOS-система (регулон) у <i>E. coli</i>	253
12.10. Репарация ДНК и наследственные болезни	255
<b>Глава 13. ФАРМАКОГЕНЕТИКА</b>	<b>261</b>
13.1. Успехи в предсказании лекарственных взаимодействий	261
13.2. Метаболизм лекарства, эффективность и токсичность	265
13.3. Фармакогенетические закономерности I фазы биотрансформации	267
13.4. Фармакогенетические закономерности II фазы биотрансформации	269
13.5. Фармакогенетические закономерности транспорта лекарственных средств (III Фаза Биотрансформации)	273
13.6. Фармакодинамика и генетический полиморфизм	276
<b>Глава 14. ГЕННЫЕ НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ</b>	<b>281</b>
14.1. Генные наследственные болезни: общие сведения.	281
14.2. Генные наследственные болезни: мозаичные формы	283
14.3. Болезни аутосомно-доминантные моногенные	284
14.4. Аутосомно-рецессивные болезни: общие сведения	285
14.5. Мутации динамические (экспансия повторов ДНК) и наследственные болезни	286
14.6. Дисомия однородительская. Импринтинг	287
14.7. Синдром Прадера-Вилли (PWS)	290
14.7.1. Эпигенетика и синдромы Прадера-Уилли (PWS) и Ангелмана (AS)	292

14.8. Эпигенетика и BWS (синдром Беквита-Видемана)	295
14.9. Эпигенетика и SRS (синдром Силвера-Рассела)	297
14.10. Эпигенетика и PHP (псевдогипопаратирозидизм)	297
<b>Глава 15. НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ ЧЕЛОВЕКА: ГРУППЫ РИСКА, МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГРУППЫ РИСКА И ПРОФИЛАКТИКА НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ</b>	<b>305</b>
15.1. Группы риска: обнаружение	305
15.2. Профилактика наследственных заболеваний	306
15.3. Методы определения наследственных болезней	310
15.4. Методы изучения генетики человека	311
15.5. Пренатальная диагностика наследственных заболеваний	324
15.6. Наследственные болезни: диагностика и профилактика	326
15.7. Наследственные болезни: диагностика: скрининг популяции	327
15.8. Наследственные болезни: диагностика: программы скрининга новорожденных	328
15.9. Медико-генетическое консультирование: общие положения	329
<b>Глава 16. НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ ОБМЕНА</b>	<b>335</b>
16.1. Наследственные болезни обмена: общие сведения	335
16.2. НАСЛЕДСТВЕННЫЕ НАРУШЕНИЯМИ ОБМЕНА УГЛЕВОДОВ	339
16.2.1. Галактоземия	340
16.2.2. Лактацидоз (Лактозный ацидоз)	341
16.2.3. Фруктозурия	342
16.2.4. Гликогенозы: общие сведения	342
16.2.4.1. Гликогеноз Iа типа; GSD1A	346
16.2.4.2. Гликогеноз II типа; GSD2; Болезнь Помпе	347
16.2.4.3. Гликогеноз III типа; GSD3; Болезнь Кори, Болезнь Форбса	348
16.2.4.4. Гликогеноз IV типа; GSD4; Болезнь Андерсена	349
16.2.4.5. Болезнь МакАрдля; Гликогеноз V типа; GSD5	350
16.2.4.6. Гликогеноз VI типа; GSD6; Болезнь Герса	351
16.2.4.7. Гликогеноз VII типа; GSD7; Болезнь Таруи	351
16.2.4.8. Гликогенозы типа 0 (недостаточность гликогенсинтазы)	352
16.2.4.9. Гликогеноз типа IXA (GSD9A1) и типа IXA2 (GSD9A2)	353
16.2.4.10. Заболевание накопления гликогена IXb типа; GSD9	354
<b>Глава 17. МУКОПОЛИСАХАРИДОЗЫ (лизосомные болезни)</b>	<b>356</b>
17. Мукополисахаридозы: общие сведения	356
17.1. Мукополисахаридоз I типа; Синдром Гурлера	359
17.2. Мукополисахаридоз II типа; Синдром Хантера	361
17.3. Мукополисахаридоз III типа; Синдром Санфилиппо	363
17.4. Мукополисахаридоз IV типа; Синдромом Моркио (Morquio)	366
17.5. Мукополисахаридоз VI типа; Синдром Марото-Лами	368
17.6. Мукополисахаридоз VII типа; Синдром Слая	370
17.7. Аспартилгликозаминурия	371
17.8. I-клеточная болезнь	373

<b>Глава 18. НАРУШЕНИЯ ОБМЕНА ОТДЕЛЬНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ И АМИНОКИСЛОТ</b>	<b>376</b>
18.1. Наследственные нарушения обмена аминокислот: общие сведения	376
18.2. Врожденные нарушения обмена аминокислот	377
18.3. Наследственные нарушения обмена некоторых аминокислот	379
18.4. Нарушение обмена фенилаланина.	380
18.4.1. Гиперфенилаланинемия, ВН4-дефицитная В; НРАВН4В	389
18.5. Нарушение обмена тирозина	398
18.6. Алкаптонурия	401
18.7. Альбинизм	402
18.8. Пропионовая Ацидемия: Общие Сведения	405
18.9. Метилмалоновая Ацидемия	406
18.10. Болезнь Кленового Сиропа (Валинолейцинурия, Кетонурия разветвленных кетокислот, MSUD)	408
18.11. Гомоцистинурии	409
<b>Глава 19. ЛИЗОСОМНЫЕ БОЛЕЗНИ. СФИНГОЛИПИДОЗЫ</b>	<b>417</b>
19.1. Сфинголипиды.	417
19.2. Гликолипиды	418
19.3. Липидозы (Липоидозы, Наследственные нарушения обмена фосфолипидов и сфинголипидов)	420
19.3.1 Сфинголипидозы: общие сведения	421
19.3.2. Метахроматическая лейкодиетрофия	423
19.4. Ганглиозидозы GM2	427
19.4.1. Болезнь ТЕЯ-САКСА; ТСД	427
19.4.2. Синдром Фабри	429
19.5. Нейрональные цероид-липофусцинозы	430
19.5.1. Болезнь Гоше	431
19.5.2. Болезнь Нимана-Пика: общие сведения	433
<b>Глава 20. НАСЛЕДСТВЕННЫЕ НАРУШЕНИЯ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА</b>	<b>437</b>
20.1. Липидный обмен: холестерин, фосфолипиды, липопротеиды	437
20.2. Гиперлипидемия	442
20.3 Причины и признаки болезни обмена липидов.	444
20.4. Роль рецептора липопротеинов очень низкой плотности ЛПОНП в патологии	448
20.4.1. Рилин: роль в работе мозга	449
20.5. Семейные гиперхолестеролемии. Роль рецептора ЛПНП в патологии	454
<b>Глава 21. НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ КРОВИ</b>	<b>458</b>
21.1. Анемия Фанкони	458
21.2. Несфероцитарные анемии	461
21.3. Гемоглобинопатии	468
21.4. Эритроцитарные мембранопатии.	477
21.5. Коагуляционные факторы	481
21.6. Гемофилия А: Генетика	482
21.7 Гемофилия В: Генетика	484

<b>Глава 22. НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ</b>	<b>489</b>
22.1. Наследственные болезни нервной системы: классификация	489
22.2. Синдром ломкой X-хромосомы	493
22.3. X-сцепленная бульбоспинальная амиотрофия (синдром Кеннеди)	496
22.4. Дентаторубропаллидосубталамическая дегенерация	500
22.5. Болезнь Гентингтона: общие сведения	500
22.6. Митохондриальные болезни	504
22.6.1. Митохондрии и митохондриальные болезни: краткие сведения	504
22.6.2 Синдром Кернса-Сейра	506
22.6.3. Синдром Meffl (миоклоническая эпилепсия с рваными мышечными волокнами)	507
22.6.4. Синдром Пирсона	508
22.6.5. Синдром MELAS	510
22.6.6. Болезнь ЛИ	511
22.6.7. Синдром Лебера	513
22.7. Прионные заболевания	515
22.8. Нервные болезни: генодиагностика, введение	522
22.8.1. Болезнь Альцгеймера	523
22.8.2 Паркинсонизм	530
<b>Глава 23. НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ ОБМЕНА МЕТАЛЛОВ</b>	<b>534</b>
23.1. Синдром Фанкони (псевдорахитическая ацидотическая остеопатия)	534
23.2. Гемохроматоз	534
23.3. Гипофосфатазия	535
23.4. Болезнь Вильсона — Коновалова: общие сведения	541
<b>Глава 24. НАСЛЕДСТВЕННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ</b>	<b>547</b>
24.1. Соединительная ткань: нарушения структуры и функции.	547
24.2. Ахондроплазии и хондродисплазии	552
24.3. Синдром Элерса-Данло	559
24.4. Синдром Альпорта	560
24.5. Буллезный Эпидермолиз	561
24.6. Синдром Марфана	561
24.7. Несовершенный остеогенез	563
<b>Глава 25. ВРОЖДЕННЫЕ МИОДИСТРОФИИ</b>	<b>566</b>
25.1. Прогрессирующие миопатии	566
25.2. Миодистрофия Дюшенна	569
25.3. Атрофическая Миотония	573
25.4. Мышечные Дистрофии – Дистрогликанопатии; MDDG	574
25.5. Спинальная Мышечная Атрофия (СМА или SMA)	579
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	<b>583</b>
Терминологический словарь.	589
Вопросы к итоговому контролю по медицинской генетике	594



## ВВЕДЕНИЕ

---

**Медицинская генетика** – важный раздел современной генетики, изучающий роль наследственных факторов в возникновении патологических симптомов и признаков в организме человека. Человек, как объект генетических исследований сложен и вместе с тем удобен. Сложность связана с существованием ряда ограничений, возникающих при проведении научного эксперимента. Например, к человеку абсолютно неприменим метод экспериментальной гибридизации, не всегда возможно одновременное обследование представителей трех и более поколений семьи и т.д. С другой стороны, бурное развитие молекулярной и клеточной биологии существенно расширило наши представления о биохимических, физиологических, молекулярных и других важных процессах, происходящих в организме здорового человека, что позволяет судить о тонких патогенетических механизмах отдельных клинических симптомов и заболеваний.

Известно, что **наследственные болезни** – это часть общей наследственной изменчивости человека как биологического вида, обеспечивающей его эволюцию и приспособление к меняющимся условиям внешней среды. Кроме того, существует довольно много человеческих популяций, характеризующихся высоким уровнем инбридинга и изоляции. Изучение таких популяций позволяет судить о механизмах распространения мутантных генов и поддержания их частоты на определенном уровне из поколения в поколение.

**Развитие медицинской генетики** происходило скачкообразно. Каждый новый прорыв был результатом появления нового эффективного метода исследования. Так, ошутимого прогресса в области медицинской генетики удалось достигнуть в 50-е годы XX столетия, когда были разработаны методы кариотипирования. Именно в это время, выявлены и охарактеризованы основные синдромы трисомий по аутосомам и половым хромосомам. Однако революционный прорыв в медицинской генетике стал возможен благодаря молекулярно-генетическим методам и, прежде всего, гибридизации нуклеиновых кислот. Метод амплификации ДНК (получение множества копий нужного фрагмента генома) в значительной степени компенсировал отсутствие гибридизационного метода в медицинской генетике. Использование молекулярных подходов позволило не только

картировать гены человека, но и идентифицировать в них основные типы мутаций, обуславливающих развитие наследственных заболеваний.

**К настоящему времени** картировано более 1000 генов человека, контролирующих возникновение той или иной патологии; больше половины этих генов клонированы. Данные о вновь идентифицированных генах и болезнях со всего мира стекаются в лабораторию генетики, руководимую профессором Мак-Кьюстиком в Университете Джона Хопкинса в Балтиморе, США. Каждое идентифицированное наследственное заболевание вносится в созданный в данной лаборатории «Каталог наследственных болезней человека», ему присваивается индивидуальный номер, первая цифра которого определяет тип наследования болезни. Так, для аутосомно-доминантного типа используется номер 1, для аутосомно-рецессивного - 2; 3 и 4 – для Х- и Y-сцепленного типов, соответственно, и 5 – для митохондриальных заболеваний. В последние годы в Каталоге появился еще один номер - 6. К этой группе относят вновь выделенные генетические варианты уже известных нозологических форм и идентифицированных генов. Большую роль в решении проблем медицинской генетики играет создание и исследование генетических линий животных, имеющих сходные нуклеотидные последовательности кодирующих, регуляторных и интронных областей многих генов с генами человека.

Проводимые параллельные **исследования генома человека** и мыши позволяют существенно повысить эффективность исследования молекулярных основ наследственных болезней человека. Использование лабораторных животных, имеющих мутации в генах, гомологичных генам человека, в ряде случаев дает единственную возможность выявления основ патогенеза наследственных болезней.

Изучение **реализации генетических механизмов** на клеточном, молекулярном, организменном и популяционном уровнях привело к выделению различных разделов медицинской генетики - популяционной, клинической, биохимической, цитогенетики, иммуногенетики, генетики развития, генетики соматических клеток, молекулярной генетики, фармакогенетики и других.

## ГЛАВА.1

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ НАСЛЕДОВАНИЯ ПРИЗНАКОВ.  
ХРОМОСОМНАЯ ТЕОРИЯ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ****1.1. Предшественники Менделя**

В начале XIX века Дж. Госс (*John Goss*), экспериментируя с горохом, показал, что при скрещивании растений с зеленовато-голубыми горошинами и с желтовато-белыми в первом поколении получались жёлто-белые. Однако, при втором поколении, не проявляющиеся у гибридов первого поколения, и названные позже Менделем рецессивными признаки вновь проявлялись, причём растения с ними не давали расщепление при самоопылении [Иванов, 2007, с. 9—10].

Огюстен Сажрэ (*Augustin Sageret*, 1763—1851), французский растениевод, проводил эксперименты по гибридизации тыквенных, главным образом дынь. О. Сажрэ впервые в истории гибридизации стал изучать отдельные признаки скрещиваемых растений (мякоть, кожура и т. д.). Он установил, что при гибридизации родительские признаки распределяются между потомками без всякого смешения между собой. Таким образом, Сажрэ пришёл к установлению решающего свойства наследственности: в своей статье «Соображения об образовании гибридов, вариант и разновидностей» (1825 г.) он указывал на наличие наследственности «константной» вместо «слитной» наследственности [Гайсинович А.Е. 1988].

Ш. Ноден (1815—1899), скрещивая различные виды дурмана, обнаружил преобладание признаков дурмана *Datura tatula* над *Datura stramonium*, причём это не зависело от того, какое растение материнское, а какое — отцовское. Таким образом, к середине XIX века было открыто явление доминантности, единообразие гибридов в первом поколении (все гибриды первого поколения похожи друг на друга), расщепление и комбинаторику признаков во втором поколении. Тем не менее, Мендель, высоко оценивая работы предшественников, указывал, что всеобщего закона образования и развития гибридов ими не было найдено, и их опыты не обладают достаточной достоверностью для определения численных соотношений. Нахождение такого достоверного метода и математический анализ результатов, которые помогли создать теорию наследственности, является главной заслугой Менделя.

**1.2. Законы наследования отдельных признаков**

Собственно научный этап развития генетики начинается с работы Г. Менделя «Опыты над растительными гибридами», опубликованной в 1865 г. Суть этой работы заключается не в установлении правил расщепления признаков в потомстве от скрещивания гибридов у гороха, часть которых была выявлена предшественниками Менделя,

а в том, что в результате количественного анализа расщепления по отдельным четким качественным признакам у потомства ученый предположил существование элементарных единиц наследственности, не смешивающихся с другими такими же единицами и свободно комбинирующимися при образовании половых клеток. Открытие Менделя оставалось забытым 35 лет, но после его «переоткрытия» в 1900 г. развитие генетики пошло более быстрыми темпами. Генетика стала превращаться в науку. В одном из скрещиваний, которые проводил Мендель, доминантный признак не полностью исключал проявление рецессивного признака. При неполном доминировании могут наблюдаться некоторые вариации признака у гибридов с отклонениями в сторону доминантного или рецессивного фенотипа. Если выражение признака у гетерозигот примерно промежуточное, то такие признаки называются **полудоминантными**. Так у львиного зева (*Antirrhinum majus*) и ночной красавицы (*Mirabilis jalapa*) гибриды от скрещивания красноцветковых растений с белоцветковыми имели розовую окраску. Другим примером полудоминантного признака может служить окраска оперения у кур андалузской породы. При скрещивании белых кур с черными петухами, потомство F<sub>1</sub> имеет серую окраску, в то время как во втором поколении у ¼ птиц окраска оперения черная, у ½ серая и у ¼ белая.

Мендель спланировал и провёл масштабный эксперимент. Им было получено от семеноводческих фирм 34 сорта гороха, из которых он отобрал 22 «чистых» (не дающих расщепления по изучаемым признакам при самоопылении) сорта. Затем он проводил искусственную гибридизацию сортов, а полученные гибриды скрещивал между собой. Он изучил наследование семи признаков, изучив в общей сложности около 20 000 гибридов второго поколения. Эксперимент облегчался удачным выбором объекта: горох в норме — самоопылитель, но легко проводить искусственную гибридизацию, см таблицу 1.1.

**Таблица 1.1. Результаты опытов Менделя по скрещиванию растений гороха, различающихся по одному из семи признаков**

	Признак *	F	F, (количество)			F, (%)	
			Доминантные	Рецессивные	Всего	Доминантные	Рецессивные
1	Семена: гладкие или морщинистые	Гладкие	5475	1850	7325	74.7	25.3
2	Семена: желтые или зеленые	Желтые	6022	2001	8023	75.1	24.9
3	Цветы: фиолетовые или белые	Фиолетовые	705	224	929	75.9	24 Л
4	Цветы: пазушные или верхушечные	Пазушные	651	207	858	75.9	24 Л
5	Бобы: («стручки») выпуклые или с перетяжками	Выпуклые	882	299	1181	74.7	25.3
6	Бобы: зеленые или желтые	Зеленые	428	152	580	73.8	26.2
7	Стебель: длинный или короткий	Длинный	787	277	1064	74.0	26.0
	Всего или в среднем		14949	5010	19959	74.9	25.1

Мендель одним из первых в биологии использовал точные количественные методы для анализа данных. На основе знания теории вероятностей он понял необходимость анализа большого числа скрещиваний для устранения роли случайных отклонений.

Проявление у гибридов признака только одного из родителей Мендель назвал доминированием. Проявление рецессивного признака у потомков гибридных растений гороха позволило Менделю сформулировать закон расщепления признаков и закон чистоты гамет.

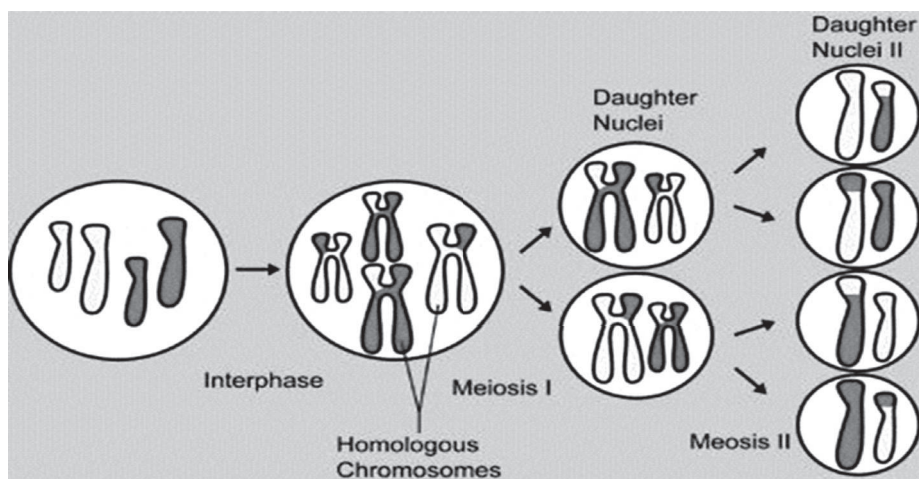
Явления кодоминирования и неполного доминирования признаков слегка видоизменяет первый закон Менделя: «Гибриды первого поколения от скрещивания чистых линий особей с противоположными признаками всегда одинаковы по этому признаку: проявляют доминирующий признак, если признаки находятся в отношении доминирования, или смешанный (промежуточный) признак, если они находятся в отношении кодоминирования (неполного доминирования)».

Явление, при котором скрещивание гетерозиготных особей приводит к образованию потомства, часть которого несёт доминантный признак, а часть — рецессивный, называется расщеплением. Следовательно, расщепление — это распределение доминантных и рецессивных признаков среди потомства в определённом числовом соотношении. Рецессивный признак у гибридов первого поколения не исчезает, а только подавляется и проявляется во втором гибридном поколении. **Закон расщепления** (второй закон Менделя) — при скрещивании двух гетерозиготных потомков первого поколения между собой во втором поколении наблюдается расщепление в определённом числовом отношении: по фенотипу 3:1, по генотипу 1:2:1.

**Закон чистоты гамет:** в каждую гамету попадает только одна аллель из пары аллелей данного гена родительской особи.

В норме гамета всегда чиста от второго гена аллельной пары. Этот факт, который во времена Менделя не мог быть твердо установлен, называют также гипотезой чистоты гамет. В дальнейшем эта гипотеза была подтверждена цитологическими наблюдениями. Из всех закономерностей наследования, установленных Менделем, данный «Закон» носит наиболее общий характер (выполняется при наиболее широком круге условий).

При оплодотворении гаметы, несущие одинаковые или разные аллели, случайно встречаются друг с другом. В силу статистической вероятности при достаточно большом количестве гамет в потомстве 25 % генотипов будут гомозиготными доминантными, 50 % — гетерозиготными, 25 % — гомозиготными рецессивными, то есть устанавливается отношение 1AA:2Aa:1aa (расщепление по генотипу 1:2:1). Соответственно по фенотипу потомство второго поколения при моногибридном скрещивании распределяется в отношении 3:1 (3/4 особей с доминантным признаком, 1/4 особей с рецессивным). Таким образом, при моногибридном скрещивании цитологическая основа расщепления признаков — расхождение гомологичных хромосом и образование гаплоидных половых клеток в мейозе. Две гомологичные хромосомы обычно содержат каждая по одному аллелю данного гена (рисунок 1.1)



**Рис.1.1.** Основные этапы мейоза <https://ru.wikipedia.org/wiki/Мейоз> На схеме показан мейоз клетки с диплоидным набором  $2n=4$  (две пары гомологичных хромосом). Отцовские и материнские хромосомы обозначены разным цветом.

### Закон независимого наследования признаков

Такой характер наследования признаков впервые описан Г.Менделем в опытах на горохе, когда одновременно анализировалось наследование в ряду поколений несколько признаков, например, цвета и формы горошин. Каждый из них в отдельности подчиняется закону расщепления в F<sub>2</sub>. В то же время разные варианты этих признаков свободно комбинировались у потомков, встречаясь как в сочетаниях, наблюдаемых у родителей, так и в новых сочетаниях. На основании анализа полученных результатов Г.Мендель сформулировал **закон независимого наследования признаков**, в соответствии с которым: «Разные пары признаков, определяемые неаллельными генами, передаются потомкам независимо друг от друга и комбинируются у них во всех возможных сочетаниях». Открытие независимого характера наследования разных признаков у гороха дало возможность Г.Менделю высказать предположение о дискретности наследственного материала, в котором за каждый признак отвечает своя пара наследственных задатков, сохраняющих в ряду поколений свою структуру и не смешивающихся друг с другом. В настоящее время с целью выяснения генотипа организмов с доминантным фенотипом широко применяют также *анализирующее скрещивание*. Оно заключается в скрещивании организма, генотип которого необходимо определить, с организмом, несущим рецессивный признак, а, следовательно, гомозиготным по рецессивному аллелю.

Менделю попались признаки, гены которых находились в разных парах гомологичных хромосом гороха. При мейозе гомологичные хромосомы разных пар комбинируются в гаметах случайным образом.

В опытах с горохом разными авторами получены одинаковые результаты по расщеплению признаков при скрещивании гибридов первого поколения в соотношении 3:1. (см. таблицу на рисунке 1.2) и независимое наследование признаков в соотношении

9:3:3:1 при дигибридном скрещивании во втором поколении (см. верхний справа рисунок), показано независимое сочетание неаллельных генов в гаметах и их случайное комбинирование в потомстве при скрещивании (нижний ряд) (рисунок 1.2).

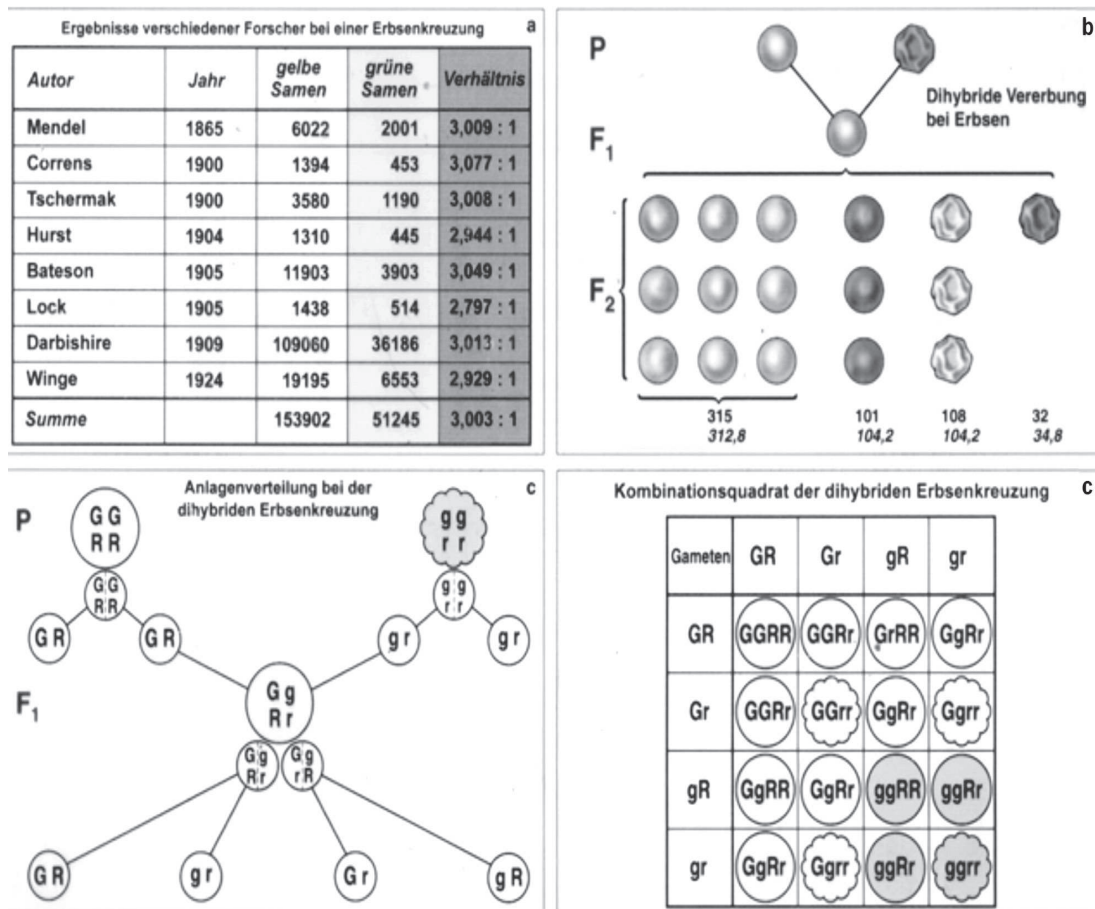


Рис. 1.2. Дискретность наследственного материала и независимое наследование признаков. <http://900igr.net/fotografii/biologija/Nasledstvennost/024-Reshetka-Penneta.html>

Если в гамету попала отцовская хромосома первой пары, то с равной вероятностью в эту гамету может попасть как отцовская, так и материнская хромосома второй пары. Поэтому признаки, гены которых находятся в разных парах гомологичных хромосом, комбинируются независимо друг от друга. Впоследствии выяснилось, что из исследованных Менделем семи пар признаков у гороха, у которого диплоидное число хромосом  $2n=14$ , гены, отвечающие за одну из пар признаков, находились в одной и той же хромосоме. Однако Мендель не обнаружил нарушения закона независимого наследования, так как сцепления между этими генами не наблюдалось из-за большого

расстояния между ними. Результаты дигибридного скрещивания подтверждают закон расщепления, поскольку ожидаемое отношение 3:1 хорошо соблюдается для каждого отдельно взятого признака. На основании вышеизложенного можно сформулировать некоторые общие правила относительно потомства гибридов, полученных от скрещивания особей, отличающихся определенным числом генов. В общем виде, каждый новый ген увеличивает число типов различных гамет вдвое, а число генетических классов (генотипов) втрое. Таким образом, особь, гетерозиготная по  $n$  парам генов, может произвести  $2^n$  типов гамет и  $3^n$  различных генотипов. Число внешне различающихся классов (фенотипов) равно числу различных типов гамет при наличии доминирования, и числу различных генотипов в отсутствие доминирования (табл.1.2.).

**Таблица 1.2. Число различных типов гамет в  $F_1$  и различных генотипов в  $F_2$  при скрещивании особей, гомозиготных по двум различным аллелям определенного типа**

Число генов	Число типов гамет	Число генотипов	Число фенотипов*
1	2	3	2
2	4	9	4
3	8	27	8
4	16	81	16
$n$	$2^n$	$3^n$	$2^n$

### 1.3 Основные положения теории наследственности Менделя

В современной интерпретации эти положения следующие:

За наследственные признаки отвечают дискретные (отдельные, не смешивающиеся) наследственные факторы — гены (термин «ген» предложен в 1909 г. В.Иогансенем).

Каждый диплоидный организм содержит пару аллелей данного гена, отвечающих за данный признак; один из них получен от отца, другой — от матери.

Наследственные факторы передаются потомкам через половые клетки. При формировании гамет в каждую из них попадает только по одному аллелю из каждой пары (гаметы «чисты» в том смысле, что не содержат второго аллеля).

#### Условия выполнения законов Менделя

В соответствии с законами Менделя наследуются только моногенные признаки. Если за фенотипический признак отвечает более одного гена (а таких признаков абсолютное большинство), он имеет более сложный характер наследования.

Расщепление 3:1, по фенотипу, и 1: 2 : 1, по генотипу, выполняется приблизительно и лишь при следующих условиях:

1. Изучается большое число скрещиваний (большое число потомков).
2. Гаметы, содержащие аллель  $A$  и  $a$ , образуются в равном числе (обладают равной жизнеспособностью).
3. Нет избирательного оплодотворения: гаметы, содержащие любой аллель, сливаются друг с другом с равной вероятностью.
4. Зиготы (зародыши) с разными генотипами одинаково жизнеспособны.



## 1.4. Хромосомная теория наследственности

**Хромосомная теория наследственности** — теория, согласно которой передача наследственной информации в ряду поколений связана с передачей хромосом, в которых в определённой и линейной последовательности расположены гены. Эта теория сформулирована в начале XX века, основной вклад в её создание внесли американский цитолог У. Сеттон (*Walter Sutton*), немецкий эмбриолог Т. Бовери и американский генетик Т. Морган со своими сотрудниками К. Бриджесом, А. Стёртевантом и Г. Мёллером [*Коряков Д.Е., Жимулев И.Ф., 2009*].

В 1902-1903 годах У. Сеттон и Т. Бовери независимо друг от друга выявили параллелизм в поведении менделевских факторов наследственности (генов) и хромосом. Эти наблюдения послужили основой для предположения, что гены расположены в хромосомах. Экспериментальное доказательство локализации генов в хромосомах было получено позднее Т. Морганом и его сотрудниками, работавшими с плодовой мушкой *Drosophila melanogaste*. Начиная с 1911 года, эта группа опытным путём доказала, что гены располагаются в хромосомах линейно; что находящиеся на одной хромосоме гены наследуются сцепленно; что сцепленное наследование может нарушаться за счёт кроссинговера. Основные выводы сформулированной ими хромосомной теории наследственности были опубликованы в 1915 году в книге «Механизм менделевской наследственности» [*Morgan T.H., Sturtevant A.H., Muller H.J., Bridges C.B.*]. В 1933 году Томасу Моргану за открытие роли хромосом в наследственности была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине [*Nobel Media AB 2013*].

По мнению Н. В. Тимофеева-Ресовского, высказанного им в 1964 году «...вся экспериментальная генетика XX века была ни чем иным, как развитием и анализом деталей хромосомной теории наследственности» [*Тимофеев-Ресовский Н. В., 2009*].

## 1.5. Первые описания хромосом

Начальным этапом создания хромосомной теории наследственности можно считать первые описания хромосом во время деления соматических клеток, сделанных во второй половине XIX века в работах И. Д. Чистякова (1873), А. Шнейдера (1873), а главным образом Э. Страсбургера (1875) и О. Бючли (1876). Термина «хромосома» тогда ещё не существовало, и вместо него говорили о «сегментах», на которые распадается хроматиновый клубок, или о «хроматиновых элементах». Термин «хромосома» был предложен позднее Г. Вальдейером в его сводной статье 1888 года [*Филипченко Ю.А 1929*].

Параллельно с изучением соматических митозов шло и изучение процесса оплодотворения, как в животном, так и в растительном царстве. Слияние семенного ядра с яйцевым впервые наблюдал у иглокожих О. Хертвиг (1876), а среди растений у лилейных Страсбургер (1884). Именно на основании этих наблюдений в 1884 году оба они пришли к выводу, что клеточное ядро является носителем наследственных свойств организма [*Филипченко Ю.А, 1929*].

Центр внимания с ядра, как целого, на его отдельные хромосомы был перенесён

лишь после того, как появилась чрезвычайно важная для того времени работа Э. ван Бенедена (1883) [Beneden, van E, 1883.]. Ему при изучении процесса оплодотворения у аскариды, имеющей очень малое число хромосом — всего 4 в соматических клетках, удалось подметить, что хромосомы в первом делении оплодотворённого яйца происходят наполовину из ядра сперматозоида и наполовину — из ядра яйцеклетки [Hamoir G., 1992]. Таким образом, во-первых, был открыт факт, что половые клетки имеют вдвое меньшее количество хромосом по сравнению с соматическими клетками, а во-вторых, был впервые поставлен вопрос о хромосомах, как особых постоянных сущностях в клетке [Филипченко Ю.А., 1929].

## **1.6. Индивидуальность хромосом. Работы Бовери. Исследования мейоза. Гипотеза Сеттона. Теория хиазмотипии**

Следующий этап связан с развитием концепции индивидуальности хромосом. Одним из первых шагов было установление того, что соматические клетки разных тканей одного и того же организма обладают одинаковым числом хромосом. Первым на это ясно и вполне определённо указал австрийский зоолог Карл Рабль в 1885 году в своей статье «О клеточном делении» [Carl Rabl, 1885; Boveri, T., 1888]. Экспериментальное обоснование закона индивидуальности хромосом было обеспечено работами немецкого зоолога Теодора Бовери, а именно — целым рядом классических исследований, посвящённых хромосомам: «Этюды о клетке» (1887—1890 и далее), «Данные о строении хроматинового вещества ядра» (1904) и др. [Boveri, T. , 1888; Boveri, T. , 1904]. Уже с самых первых работ, вышедших в 1887 и 1888 годах, Бовери решительно высказался в пользу того, что «хроматиновые элементы являются самостоятельными элементами, сохраняющими эту самостоятельность и в покоящемся ядре». Таким образом, согласно этому взгляду, хотя хромосомы ясно видны лишь во время митоза, но и на стадии интерфазы хромосомы не исчезают, а сохраняют свою обособленность и самостоятельность. Бовери также выдвинул гипотезу о качественном различии хромосом, согласно которой каждая хромосома отличается по своему внутреннему наследственному составу от других хромосом, входящих в состав того же ядра [Филипченко Ю.А., 1929].

В серии блестящих экспериментов (1902—1907) над яйцами морских ежей, оплодотворённых двумя спермиями, Бовери продемонстрировал, что нарушения нормального развития находятся в строгом соответствии с ненормальным распределением хромосом. На большом статистическом материале Бовери показал, что для нормального развития требуется наличие всех хромосом, присущих виду [Гайсинович, 1988].

Необходимым этапом в формировании хромосомной теории наследственности было создание ясной картины преобразований хромосом в мейозе. Такая картина сложилась усилиями многих исследователей в конце XIX и в первом десятилетии XX века. Тогда же была создана и вся терминология, описывающая процесс мейоза, которой пользуются до сих пор [В. В. Хвостова, Ю. Ф. Богданов., 1975].

Открывателем мейоза является упомянутый выше бельгийский исследователь Эдуард ван Бенеден, который, изучая процесс оплодотворения у аскариды лошади, в 1883 году детально описал два последовательных деления при созревании яйцеклетки и со-

путствующем формировании полярных телец [Hamoir G., 1992]. Благодаря малому числу хромосом у аскариды, диплоидный набор которой составляет 4 хромосомы, Э. ван Бенеден смог показать также, что у аскариды ядра гамет при оплодотворении вносят в зиготу по равному и гаплоидному набору хромосом. Феномен мейоза с его основным следствием — редукцией числа хромосом — был предсказан А. Вейсманом вскоре (1887) после этого открытия Э. ван Бенедена [В. В. Хвостова, Ю. Ф. Богданов., 1975].

В 1901 году Томас Монтгомери (*Thomas H. Montgomery*), изучавший мейоз у онихофор или первичнотрахейные, или бархатные черви (лат. *Onychophora*, от др.-греч. ὄνυξ — «коготь», φορός — «несущий») — тип влаголюбивых наземных беспозвоночных *Peripatus* и некоторых насекомых, пришёл к важному заключению, что конъюгирующие в профазе I мейоза хромосомы представляют собой пару гомологичных хромосом материнского и отцовского происхождения [Montgomery T.H., 1904; Sturtevant, 2001].

Спустя два года после переоткрытия законов Менделя, в 1902 году, исследования процесса сперматогенеза у кузнечика кобылки *Brachystola magna* привели молодого американского зоолога Уолтера Сеттона к смелой гипотезе, что распределение по дочерним клеткам хромосом при гаметогенезе может представлять основу менделевского закона независимого наследования признаков [Crow E.W., Crow J.F., 2002]. В своей работе он писал:

«Я хочу привлечь внимание к вероятности, что соединение пары отцовских и материнских хромосом и их последующее разделение во время редукционного деления может представлять физическую основу закона наследственности Менделя» [Гайсинович, 1988],

Оригинальный текст (англ.): «I may finally call attention to the probability that the association of paternal and maternal chromosomes in pairs and their subsequent separation during the reducing division as indicated above may constitute the physical basis of the Mendelian law of heredity» [Sutton W., 1902].

Однако предположение Сеттона не встретило немедленного признания, прежде всего в силу спекулятивности его характера. Также считалось загадкой, как выйти из противоречия, связанного с ограниченностью числа пар хромосом и чрезвычайно большого числа признаков [Гайсинович, 1988].

В 1909 году бельгийский цитолог Франс Янсенс (*Frans Alfons Janssens*) на основании своих наблюдений над первым делением мейоза у калифорнийской саламандры *Batrachoseps attenuatus* предложил теорию взаимобмена хромосом, названной им теорией хиазмотипии (рисунок 1.3).



**Рисунок 1.3.** Обмен участками между отцовской и материнской гомологичными хромосомами в мейозе согласно теории хиазматипии Ф.Янсенса (1909) [https://ru.wikipedia.org/wiki/Хромосомная\\_теория\\_наследственности#/media/File:Janssens\\_%27s\\_theory\\_of\\_chiasmatype.jpg](https://ru.wikipedia.org/wiki/Хромосомная_теория_наследственности#/media/File:Janssens_%27s_theory_of_chiasmatype.jpg)

Согласно этой теории, в профазе I мейоза бок о бок конъюгируют гомологичные хромосомы материнского и отцовского происхождения, каждая из которых состоит из двух хроматид. При этом хромосомы перекручиваются вокруг друг друга, рвутся и вновь соединяются в точке перекрёста (хиазмы) таким образом, что в двух хроматидах из четырёх реципрокно объединяются сегменты материнского и отцовского происхождения. Хиазматипия, по мнению Янсенса, могла служить цитологическим основанием менделевского закона независимого наследования признаков [Koszul R, Meselson M, Van Doninck K, Vandenhoute J, Zickler D, 2012; Janssens F. A., Koszul R., Zickler D, 2012].

## 1.7. Открытие сцепленного наследования

В своей статье 1903 года «Хромосомы в наследственности» У. Сеттон предположил, что одна хромосома должна содержать несколько генов, называемых им аллеломорфами, которые должны наследоваться совместно [Sutton W.S., 1903]. Такой вид наследования — сцепленное наследование — открыли в 1905 году Уильям Бэтсон с учениками, назвав его «гаметическое сцепление» (англ. *gametic coupling*). В экспериментах с душистым горошком *Lathyrus odoratus* они, изучая наследование цвета лепестков и формы пыльцы, обнаружили, что для этой пары признаков

не наблюдается независимого наследования, то есть пара признаков, характеризующее родительское растение, имеет тенденцию наследоваться совместно, однако эти признаки не являются полностью сцепленными [McPeck, M.S., 1996]. Для объяснения обнаруженного им явления Бэтсон создал крайне искусственную теорию редупликации, не приняв во внимание гипотезу, высказанную молодым У. Сеттоном [Гайсинович, 1988]. Связь между хромосомами и явлением гаметического сцепления предположил в 1906 году английский ботаник Роберт Локк (*Robert Heath Lock*) в своей книге «*Recent Progress in the Study of Variation, Heredity, and Evolution*», которая послужила учебником генетики для многих учёных того времени, включая таких известных генетиков, как Герман Мёллер и Роберт Фишер [Edwards A.W. 1906; Morgan T.H., Sturtevant A.H., Muller H.J., Bridges C.B., 1915].

Скрещивая две расы душистого горошка в 1906 г. В.Бетсоном и Р.Пеннетом в

опытах на душистом горошке, различающихся по двум парам признаков – по форме пыльцы и по окраске цветка они не обнаружили в F<sub>2</sub> ожидаемого расщепления 9:3:3:1. Изучаемые признаки не давали независимого наследования, они как бы стремились остаться в исходных, родительских комбинациях, а гены их – попасть в одну гамету. Они обозначили это явление как притяжение.

**Lathyrus odoratus (Горошек душистый).**  
 Окраска цветка: пурпурная – Р, красная – р.  
 Форма пыльцевых зерен: удлиненная – L, круглая – l.

P	PPLL X ppll			
F <sub>1</sub>	PpLl			
F <sub>2</sub>	P-L-	P-ll	ppL-	ppll
	4831	390	393	1338
	69,5%	5,6%	5,6%	19,3%

	PL	Pl	pL	pl
	0,44	0,06	0,06	0,44
PL	PPLL	PpLl	PpLL	PpLl
0,44	0,194	0,026	0,026	0,194
Pl	PpLl	Ppll	PpLl	Ppll
0,06	0,026	0,004	0,004	0,026
pL	PpLL	PpLl	ppLL	ppLl
0,06	0,026	0,004	0,004	0,026
pl	PpLl	Ppll	ppLl	ppll
0,44	0,194	0,026	0,026	0,194

В данном примере наблюдали кроссинговер по 5,6 % у потомков по каждому гену. *Сцепленное наследование* — феномен скоррелированного наследования определённых состояний генов, расположенных в одной хромосоме.

Полной корреляции не бывает из-за мейотического кроссинговера, так как сцепленные гены могут разойтись по разным гаметам. Кроссинговер наблюдается в виде расщепления у потомства тех аллелей генов и, соответственно, состояний признаков, которые были сцеплены у родителей.

Наблюдения, проведённые Томасом Морганом, показали, что вероятность кроссин-

говера между различными парами генов разная, и появилась идея создать генные карты на основании частот кроссинговера между разными генами. Первая генная карта была построена студентом Моргана, Альфредом Стёртевантом (англ.) в 1913 году на материале *Drosophila melanogaster*.

Расстояние между генами, расположенными в одной хромосоме, определяется по проценту кроссинговера между ними и прямо пропорционально ему. За единицу расстояния принят 1 % кроссинговера (1 морганида или 1 сантиморганида). Чем дальше гены находятся друг от друга в хромосоме, тем чаще между ними будет происходить кроссинговер.

## 1.8. Открытие половых хромосом. Работы Моргана и его школы

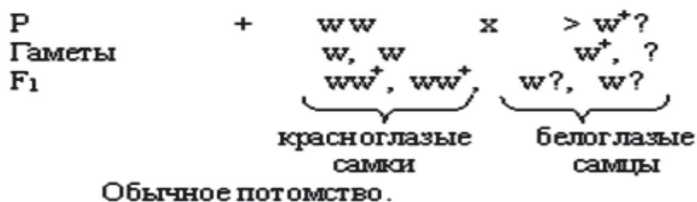
Важным источником доказательства роли хромосом в наследственности явилось обнаружение особых, «половых» хромосом, имеющих отношение к определению пола. К началу XX века несколькими исследователями были описаны «добавочные» хромосомы у насекомых. Американский исследователь Мак-Кланг (*C. E. McClung*) в 1904 году высказал догадку, что эти хромосомы, наблюдавшиеся только у половины спермиев у самцов разных видов насекомых, являются «определителями пола». В 1905 году подтверждение этой догадки почти одновременно получили Эдмунд Вильсон, обнаруживший у клопа *Protenor* различие в числе хромосом у самцов и самок (хромосомное определение пола, тип XO/XX), и Нетти Стивенс, выявившая различия по одной паре хромосом между самцами и самками у жука *Tenebrio* (хромосомное определение пола, тип XY/XX) [Гайсинович, 1988]. В своих работах Мак-Кланг, Вильсон и Стивенс установили наличие полной корреляции между поведением в мейозе половых хромосом и определением пола [В. В. Хвостова, Ю. Ф. Богданов, 1975].

Может быть, после Менделя самой важной вехой в развитии генетики были работы Томаса Моргана и его учеников А. Стертеванта, К. Бриджеса и Г. Меллера, выполненные на дрозофиле. В 1909 году в маленькой лаборатории американского зоолога Томаса Ханта Моргана в Колумбийском университете начали использовать для генетических экспериментов плодовую мушку *Drosophila melanogaster* [Thomas H. Morgan - Biographical Nobelprize.org. Nobel Media AB, 2013]. Многочисленные мутации, проявившиеся при лабораторном разведении дрозофилы, позволили в первую очередь обнаружить гены, наследовавшиеся «сцепленно с полом». Первой описанной мутацией стала мутация *w* (от англ. *white* — белый), обуславливающая белый цвет глаз у мушки. Публикация об этой мутации появилась в 1910 году, в ней Морган указывает, что характер наследования мутации *w* совпадает с наследованием хромосом, определяющих пол у дрозофилы [Miko I, 2008; Morgan T. H., 1910]. Т. Морган изучал наследование цвета глаз у мух и обнаружил несоответствие наследования признака законам Менделя. Предположение Моргана о связи гена окраски глаз с X половой хромосомой у дрозофилы для объяснения нарушения закона Менделя было подтверждено в блестящих исследованиях, проведенных Г. Морганом и К. Бриджесом.

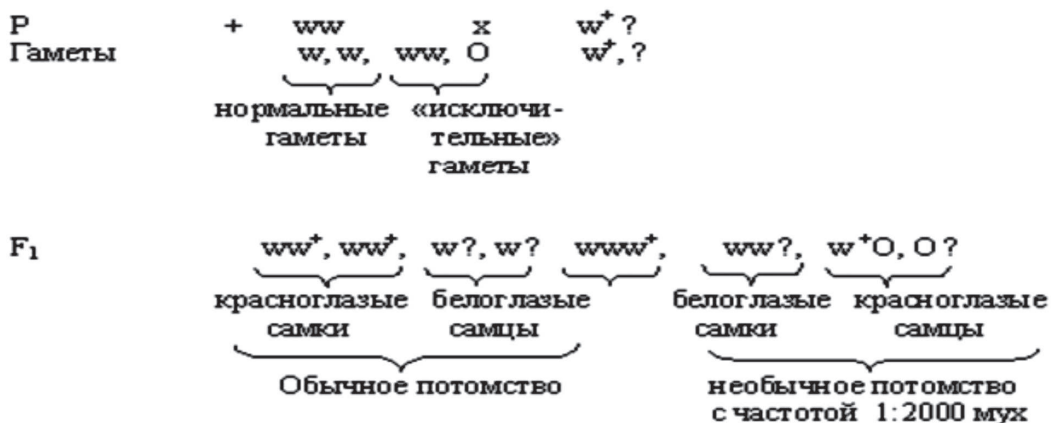
Одно из самых элегантных доказательств связи между генами и хромосомами получил ученик Моргана, Кэлвин Бриджес. Он соотнёс редкие случаи исключений при

наследовании мутаций, сцепленных с полом, с неправильным расхождением X-хромосом при мейозе у самок дрозофилы. Он описал самок дрозофилы с аномальным кариотипом XXУ вместо нормального XX, при этом по сцепленным с полом признакам они являлись полными копиями своих матерей, что говорило о том, что обе X-хромосомы были унаследованы от матери. Тем самым эксперименты по скрещиванию были подкреплены цитологическими наблюдениями [Bridges C, 1914].

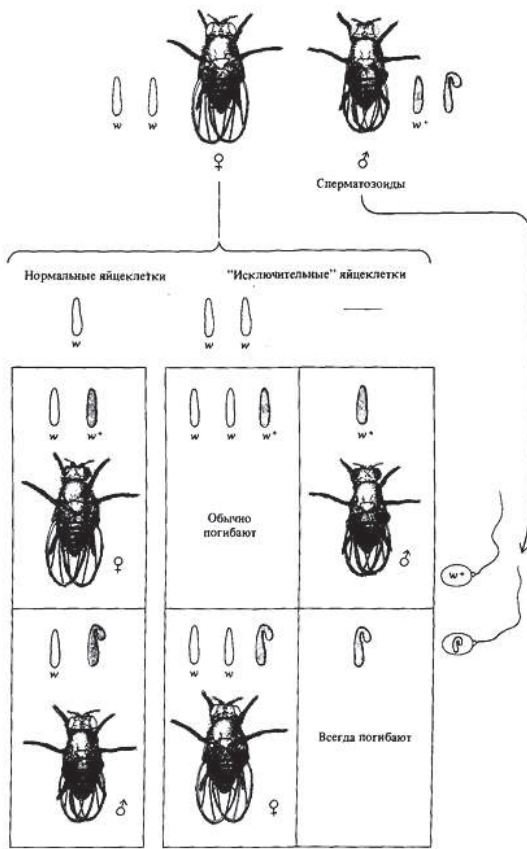
*Опыты Моргана:*



*Опыты Бриджеса:*

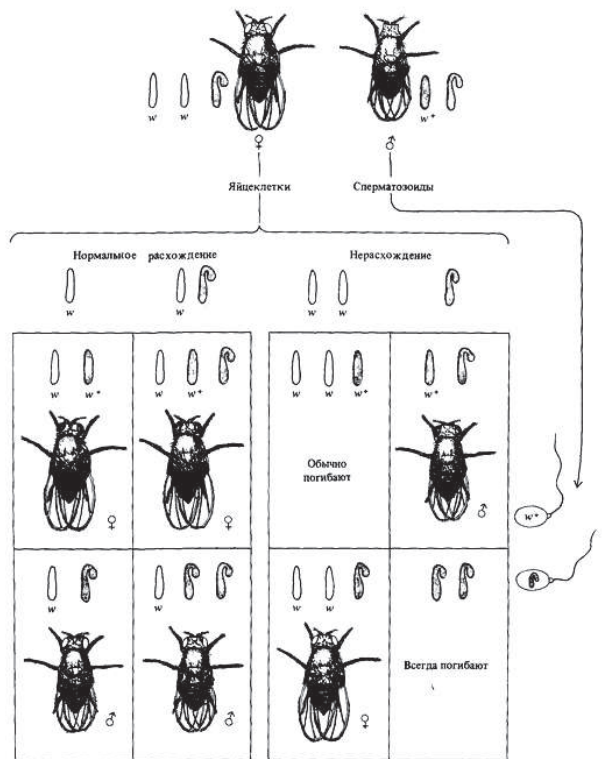


Вскоре было описано ещё две сцепленных с полом мутации, и при изучении их совместного наследования Морган приходит к заключению, что гены должны быть организованы на хромосоме линейно, и их сцепленное наследование может нарушаться из-за кроссинговера, происходящего так, как предположил ранее в своей теории хиазмотипии Янсенс [Morgan T. H, 1911]. В 1913 году Альфред Стёртевант, ученик Моргана, располагает шесть сцепленных с полом генов на первой генетической карте в порядке, соответствующем тому, насколько часто мутации этих генов наследуются совместно [Sturtevant A. H, 1913] (рисунки 1.4-1.7).



**Рисунок 1.4.** Первичное нерасхождение X-хромосом у *Drosophila melanogaster*, [https://ru.wikipedia.org/wiki/Хромосомная\\_теория\\_наследственности#/media/File:Sexlinked\\_inheritance](https://ru.wikipedia.org/wiki/Хромосомная_теория_наследственности#/media/File:Sexlinked_inheritance)

**Рисунок 1.5.** Вторичное нерасхождение X-хромосом у *Drosophila melanogaster*, [https://ru.wikipedia.org/wiki/Хромосомная\\_теория\\_наследственности#/media/File:Sexlinked\\_inheritance\\_white.jpg](https://ru.wikipedia.org/wiki/Хромосомная_теория_наследственности#/media/File:Sexlinked_inheritance_white.jpg)



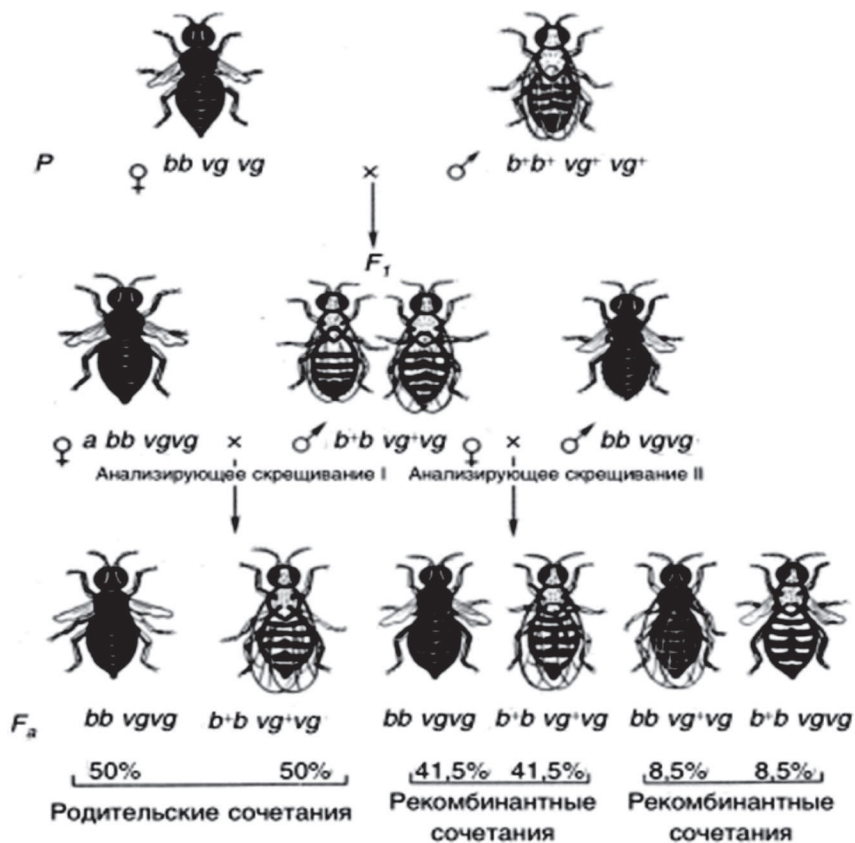
Т. Морган с сотрудниками провели скрещивание мух, различающихся по двум признакам окраске тела и форме крыльев.

При этом все мухи имели серую окраску тела и нормальные крылья. При скрещивании гибридов первого поколения получили не четыре, а лишь две разновидности мух серые с нормальными крыльями и черные с зачаточными крыльями, что можно объяснить совместным наследованием признаков. Однако, результаты аналитического скрещивания гибридных мух привели к разным результатам. При скрещивании дигетерозиготных самок с мутантными самцами рождались мухи четырех типов: нормальные по двум анализируе-



мым признакам, мутантные по обоим признакам по 41,5% и необычные мухи: с серым телом и зачаточными крыльями и с черным телом с нормальными крыльями по 8,5%.

P (F1)	♀ BV//bv	x	♂ bv//bv
Г - (Гаметы обычные)	BV, bv		bv
Г - (Гаметы необычные)	Bv, bV		
Fa	BV//bv, bv//bv, Bv//bv, bV//bv		
Потомство (%)	41,5%	41,5%	8,5% 8,5%



**Рисунок 1.6.** Аналитическое скрещивание дигетерозиготных самцов F1 с мутантной самкой в F2 дает родительские сочетания двух признаков в отношении 1:1, а при скрещивании дигетерозиготных самок из F1 с мутантными самцами дает четыре типа мушек: 2 типа по 41,5% родительские сочетания и 2 типа по 8,5% рекомбинантные сочетания. <https://www.google.kz/search?q=Рисунки+дигибридное+скрещивание+y+дрозофилы&rlz=1C>

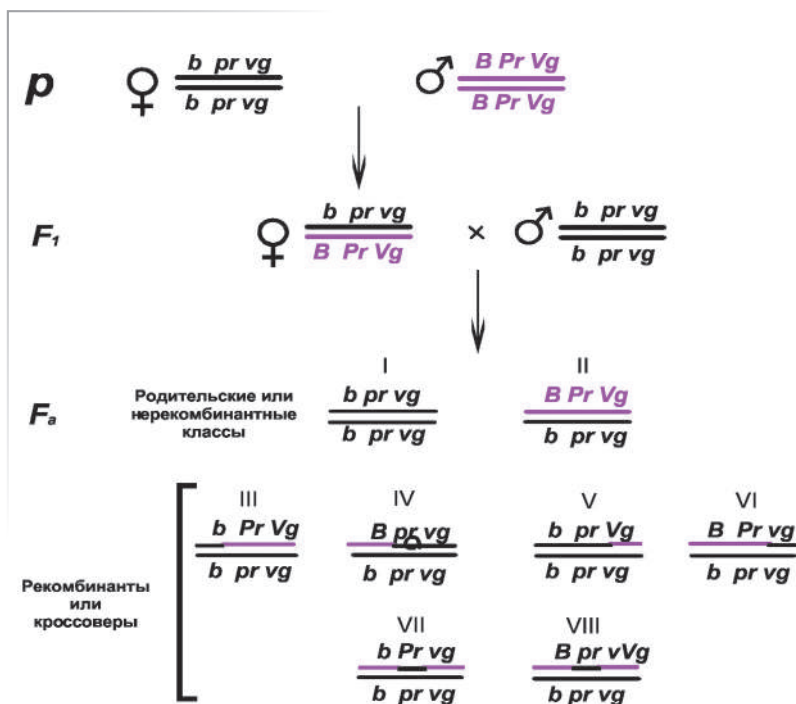
Результаты этих исследований привели к открытию явления рекомбинации при кроссинговере гомологичных хромосом, который наблюдается в гаметогенезе только у самок и отсутствует у самцов дрозофилы.

Вследствие неравного кроссинговера участок одной из гомологичных хромосом может удвоиться или утроиться, а в другой теряется фрагмент. Аналогичное удвоение участка хромосомы было обнаружено у кукурузы.

Поскольку кроссинговер вносит возмущения в картину сцепленного наследования, его удалось использовать для картирования «групп сцепления» (хромосом). Возможность картирования была основана на предположении о том, что, чем чаще наблюдается кроссинговер между двумя генами, тем дальше друг от друга расположены эти гены в группе сцепления и тем чаще будут наблюдаться отклонения от сцепленного наследования.

Первые карты хромосом были построены в 1913 г. для классического экспериментального объекта плодовой мушки *Drosophila melanogaster* Альфредом Стёртевантом, учеником и сотрудником Томаса Ханта Моргана.

В опытах по скрещиванию мух, различающихся по трем признакам (цвет тела (в -черное и серое) и цвет глаз (pr – пурпурные и белые), форма крыльев(vg-нормальные и зачаточные), в F2 были получены два исходных родительских нерекомбинантных классов дрозофилы и шесть классов рекомбинантных или кроссоверов с одним или двумя перекрестами.



**Рисунок 1.7.** Скрещивание мух, различающихся по трем признакам (цвет тела (в -черное и серое) и цвет глаз (pr – пурпурные и белые), форма крыльев(vg-нормальные и зачаточные), в F2 были получены два исходных родительских нерекомбинантных классов дрозофилы и шесть классов рекомбинантных или кроссоверов с одним или двумя перекрестами.

Перекрест, происходящий в одном участке хромосомы называют одинарным, в двух точках – двойным, в трех – тройным, т.е. кроссинговер может быть множественным.

Интерференция – это явление, сущность которого заключается в том, что кроссинговер, происшедший в одном участке хромосомы, препятствует кроссинговеру в ближайших участках. Особенно сильно это сказывается, если гены расположены близко друг к другу. Интерференция была открыта Г. Меллером в 1916 г. Количественно интерференция выражается как отношение наблюдаемого числа двойных обменов к числу теоретически ожидаемых. Это отношение называют коинцидентией, т.е. величиной совпадения. Установлено, что в опыте доля двойных кроссоверов оказывается ниже теоретически ожидаемой.

Соматический кроссинговер может быть обнаружен, если он осуществляется на стадии четырех хроматид. На частоту кроссинговера влияют внешние условия (температура и др.), стадии развития (возраст), пол, генотип (определенные гены или структурные изменения хромосом).

Частота кроссинговера высчитывается из отношения кроссоверных гамет (особей) к общему числу гамет (особей). Она не может быть более 50%, т.к. эта величина определяет вероятность нормального (без кроссинговера) расхождения хромосом.

Эти работы заложили основы хромосомной теории наследственности. Они показали, что ограничения в свободной комбинации некоторых генов обусловлены расположением этих генов в одной хромосоме и их физическим сцеплением. Было установлено, что сцепление генов, расположенных в одной хромосоме, не является абсолютным. Во время мейоза хромосомы одной пары могут обмениваться гомологичными участками между собой с помощью процесса, который называется *кроссинговером*. Чем дальше друг от друга расположены гены в хромосоме, тем чаще они разделяются кроссинговером. На основе этого феномена была предложена мера силы сцепления генов – процент кроссинговера – и построены первые генетические карты хромосом для разных видов дрозофилы. У дрозофилы гигантские хромосомы слюнных желез представляли собой не только идеальный объект для цитологического изучения, но и для картирования генов на хромосомах. В политеменных хромосомах ген *Var* находится в диске 16A1-2 в хромосомах дикого типа, у мутантов *Var* этот район хромосомы дуплицирован, а у мутантов *BB* – утроен. Исследователи трех лабораторий установили этот факт на дрозофиле независимо друг от друга: Г.Меллер, А.А. Прокофьева-Бельговская и К.В. Косиков, Е.Н. Волотов, а также К. Бриджес.

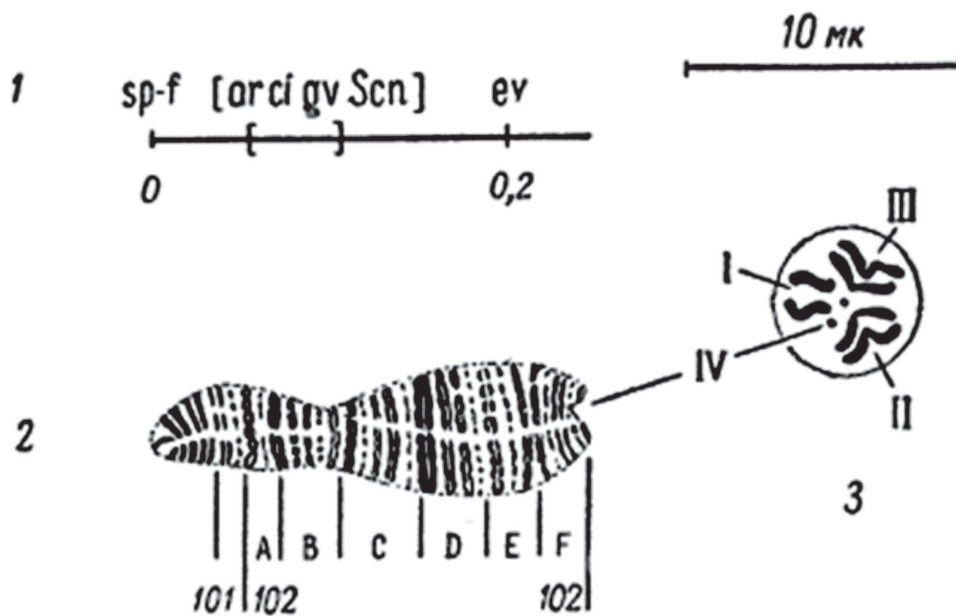
Морган и его сотрудники использовали хромосомные мутации как цитологические маркеры расположения генов. Собственно, такое совмещение цитологического и генетического изучения хромосом и создало особый раздел генетики, который называется *цитогенетикой*. Впервые предположение о том, что хромосомы являются носителями наследственной информации в клетке, было высказано еще в 1902 г. Т.Бовери, В.Сэттоном и К.Корренсом, но оно основывалось на цитологических доказательствах поведения хромосом во время деления клеток.

Доказательства справедливости хромосомной теории наследственности были получены в результате обнаружения взаимосвязи между конкретными хромосомами и конкретными генами Т.Х. Морганом и его студентом, а впоследствии сотрудником – К. Бриджесом в экспериментах на плодовой мушке – *Drosophila melanogaster*.

Данные о наследовании, сцепленном с полом, о нерасхождении хромосом, о сцепленном наследовании и кроссинговере, наряду с данными о хромосомном определении пола привели к формированию хромосомной теории наследственности. Согласно этой теории, материальной основой сцепления является хромосома. Она представляет собой отдельную физическую единицу, фигурирующую в мейозе. Все гены, находящиеся в одной хромосоме, связаны между собой и расположены в линейном порядке. Число групп сцепления равно гаплоидному числу хромосом.

### 1.9. Сравнение генетических и цитологических карт хромосом

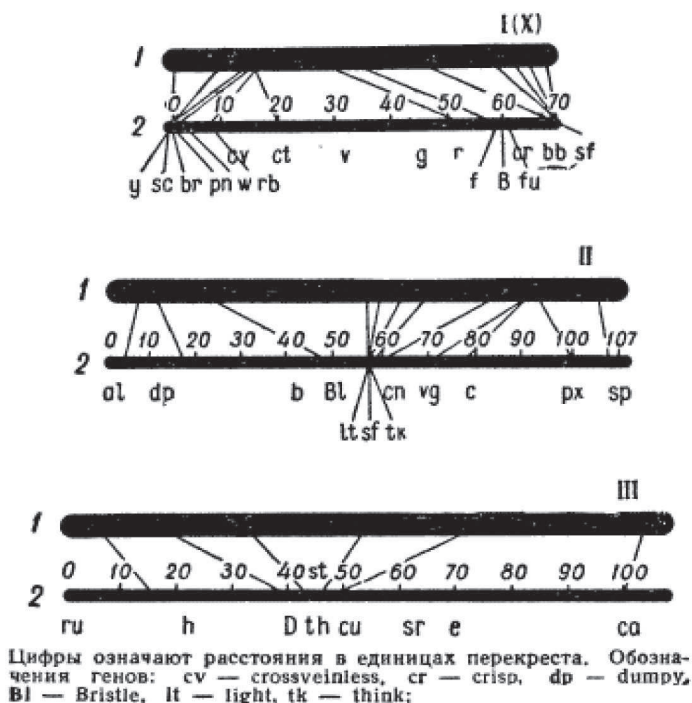
После установления групп сцепления генов и составления генетических карт на основе учета перекреста хромосом возникла необходимость составления цитологических карт с целью их сопоставления с генетическими. Это было осуществлено сначала на митотических, а затем на гигантских хромосомах (рисунки 1.8-1.9).



1 — генетическая карта с соответствующими локусами (sp-f — speck, ar — abdomen rotatum, ci — cubitus interruptus, Scn — scutenick, ey — eyeless); 2 — цитологическая карта (A — F — последовательные участки); 3 — метафазная пластинка соматической клетки (сравнить размеры IV хромосомы из слюнных желез и метафазной пластинки, масштаб одинаков).

**Рисунок 1.8.** Цитологическая и генетическая карты IV хромосомы клеток слюнных желез *Drosophila*  
 Источник: <http://www.activestudy.info/sravnienie-geneticheskix-i-citologicheskix-kart-xromosom/> © Зооинженерный факультет МСХА

Эти цитологические карты полностью подтвердили ту последовательность расположения генов, которая была установлена на основе чисто генетических методов. Несовпадение между генетическими и цитологическими картами обнаруживалось лишь в величине расстояний между генами, причем в одних участках хромосом эти расстояния оказались меньше, в других — больше. Это объясняется тем, что в разных районах хромосом вероятность осуществления перекреста неодинакова, а частота перекреста зависит не только от расстояния между генами, но и от местонахождения района хромосомы, в котором он находится.



Локализация генов в определенных участках хромосомы производится по методу Т. С. Пайнтера с помощью различных хромосомных перестроек: удвоения, нехватки отдельных дисков и другие.

**Рисунок 1.9.** Сравнение относительных размеров соответствующих участков на цитологических (1) и генетических (2) картах хромосом (I, II, III) *Drosophila*. © Зооинженерный факультет МСХА

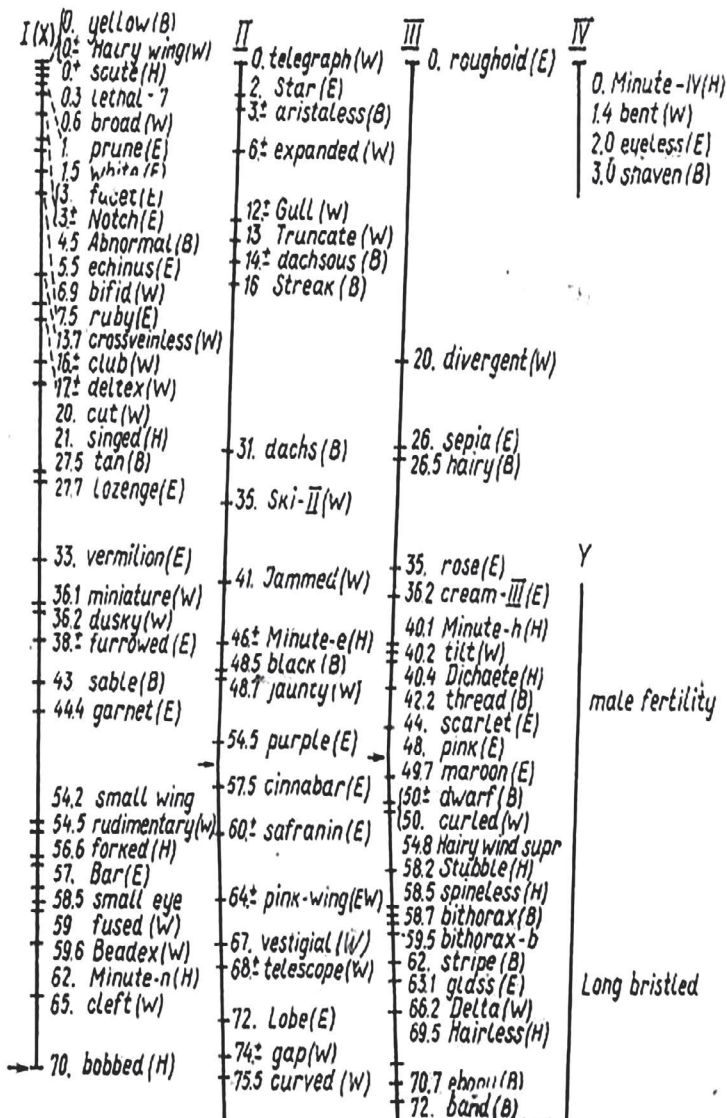
Сопоставление генетических и цитологических

карт позволило вскрыть еще одно явление, а именно неравномерность частоты перекреста по длине хромосом. Это было показано на хромосомах слюнных желез следующим образом. Генетические карты всех четырех хромосом дрозофилы, составленные на основе частоты перекреста, имеют определенную длину, выражаемую в единицах перекреста. Общая длина X-хромосомы и трех аутосом по генетическим картам составляет 279 морганид перекреста. К. Бриджес измерял длину каждой из четырех хромосом слюнных желез в микронах. Общая физическая длина хромосом слюнных желез, измеренных под микроскопом, составляет 1180 мк.

Чтобы сопоставить цитологические карты гигантских хромосом с генетическими картами для каждой хромосомы, К. Бриджес предложил воспользоваться коэффициентом кроссинговера. Для этого он разделил общую длину всех хромосом слюнных желез (1180 мк) на общую длину на генетических картах (279 единиц). В среднем это отношение оказалось равным 4,2. Следовательно, каждой единице перекреста на гене-

тической карте соответствует 4,2 мк на цитологической карте (для хромосом слюнных желез). Зная расстояние между двумя генами по генетической карте, например, геном *rx* (с локусом 100,5) и *sr* (с локусом 107,0) в правом плече второй хромосомы, можно сравнить частоту перекреста в разных районах хромосомы.

В силу неравномерного осуществления обменов по длине хромосом гены при локализации, ведущейся по частоте рекомбинантов, распределяются на генетической карте с разной плотностью. Следовательно, распределение генов на генетических картах можно рассматривать как функцию распределения возможности осуществления перекреста по длине хромосомы (рисунок 1.10).



**Рисунок 1.10.** Карта сцепления у плодовой мушки (*Drosophila melanogaster*). Показано расположение на хромосомах примерно 100 генов, известных у плодовой мушки по проценту перекреста между ними. Буквы в скобках указывают ту часть организма, которую затрагивает данная мутация (В-тело; Е- глаза; Н-волоски; W-крылья). Внизу слева – диплоидный набор хромосом из соматической клетки самца дrosophilы. (Мюнтцинг, Генетика, 1967, М., Мир, с.105)

Таким образом, определение местоположения генов на генетических и цитологических картах на примере дрозофилы и других объектов производилось:

1. цитологически — на хромосомах в мейозе с использованием хромосомных перестроек;
2. цитологически — на хромосомах слюнных желез (у дрозофилы);
3. генетически — при учете мейотического кроссинговера по проценту рекомбинантных особей (зигот) у диплоидных организмов и гамет (или спор) у гаплоидных организмов;
4. генетически — с учетом соматического (митотического) кроссинговера.

Сопоставление генетических и цитологических карт дало возможность подтвердить следующие положения хромосомной теории наследственности:

1. хромосомы по своей длине наследственно дискретны;
2. каждый ген занимает определенное место — локус в хромосоме;
3. гены распределены в хромосоме в определенной линейной последовательности;
4. частота кроссинговера между генами является функцией цитологического расстояния между генами.

Успехи Моргана, его учеников, а впоследствии сотрудников (К. Бриджес, А. Стертевант, Г. Меллер и др.) во многом объясняются удачным выбором объекта исследований — плодовой мушки.

небольшой период развития – 10-12 дней;

высокая плодовитость;

легкость культивирования в лабораторных условиях;

небольшое число хромосом (4 пары, одна из которых половая).

### **Основные положения хромосомной теории наследственности**

Анализ явлений сцепленного наследования, кроссинговера, сравнение генетической и цитологической карт позволяют сформулировать основные положения хромосомной теории наследственности:

- Гены находятся в хромосомах.
- Гены расположены в хромосоме в линейной последовательности.
- Различные хромосомы содержат неодинаковое число генов. Кроме того, набор генов каждой из негомологичных хромосом уникален.
- Аллельные гены занимают одинаковые локусы в гомологичных хромосомах.
- Гены одной хромосомы образуют группу сцепления, то есть наследуются преимущественно сцепленно (совместно), благодаря чему происходит сцепленное наследование некоторых признаков. Число групп сцепления равно гаплоидному числу хромосом данного вида (у гомогаметного пола) или больше на 1 (у гетерогаметного пола).
- Сцепление нарушается в результате кроссинговера, частота которого прямо пропорциональна расстоянию между генами в хромосоме (поэтому сила сцепления находится в обратной зависимости от расстояния между генами).
- Каждый биологический вид характеризуется определенным набором хромосом — кариотипом.

## 1.10. Баланс полов. Балансовая теория Бриджеса.

Исследуя в 1919-22 гг. характер половой дифференцировки у дрозофилы, К. Бриджес обнаружил триплоидных самок с набором хромосом  $3X+3A$ , где  $3A$  - число наборов аутосом. Некоторые из таких самок оказались плодовитыми и были скрещены с диплоидными самцами  $XY+2A$ . Потомство от этого скрещивания состояло из восьми типов особей с различным соотношением между числом  $X$ -хромосом и числом наборов аутосом (обозначено в дальнейшем как  $X/A$ ), обусловленным нарушением нормального расхождения хромосом в мейозе у триплоидных самок. Морфологический, цитологический и генетический анализ этого потомства сыграл важную роль в раскрытии механизмов детерминации пола у дрозофилы. К. Бриджес установил решающую роль соотношения между числом  $X$ -хромосом и числом наборов аутосом в детерминации пола. Оказалось, что при соотношении  $X/A$  равном 1 ( $2X/2A$  или  $3X/3A$ ), развиваются самки: соответственно нормальная (диплоидная) и триплоидная. Кроме того, фенотипически самками являются особи  $2X+Y/2A$ , возникающие в результате оплодотворения яйцеклетки с двумя  $X$ -хромосомами спермием, несущим  $Y$ -хромосому. При  $X/A$  равном 0,5 ( $X+Y/2A$  или  $X/2A$ ) независимо от присутствия или отсутствия  $Y$ -хромосомы развиваются самцы, но в отсутствие  $Y$  - стерильные. В случае, когда  $X/A$  имеет значение промежуточное между 0,5 и 1 (у дрозофил  $2X/3A$  или  $2X+Y/3A$ ), насекомые приобретают черты интерсексуальности, т.е. смешанного проявления мужских и женских половых признаков. Особи  $X+Y/3A$  развиваются в так называемых «сверхсамцов». Они имеют гипертрофированные мужские признаки, но стерильны и быстро погибают. И, наконец, особи  $3X/2A$  представляют собой «сверхсамок» с аномально развитыми яичниками и также сниженной жизнеспособностью. В 1925 г. эта концепция получила название балансовой теории. Согласно ее положениям, в отношении формирования пола организм является бипотенциальным, т.е. несет в себе задатки обоих полов. Интерсексуальность дрозофилы - следствие бисексуальной природы ее организма. Степень интерсексуальности может зависеть, как показал К. Бриджес, от внешних факторов, например, температуры, сдвигаясь при ее повышении в сторону женских признаков, а при понижении - в сторону мужских. Оказалось возможным вывести путем отбора по характеру потомства линии, дающие преимущественно интерсексов мужского или женского типа. Таким образом, у дрозофилы пол развивающейся зиготы генетически обусловлен соотношением числа аутосом и  $X$ -хромосом. Дополнительные доказательства детерминирующего характера этого соотношения были получены в остроумных экспериментах на интерсексах  $2X/3A$ . Методом хромосомных перестроек, заключающихся в дуплицировании (удвоении) участков хромосом, были получены особи, у которых кроме двух  $X$ -хромосом, имелись дополнительные участки  $X$ -хромосомы разной длины. По мере нарастания протяженности таких участков их носители-интерсексы становились все более похожими на самок.

### Литература

1. Гайсинович А.Е. Зарождение и развитие генетики. — М.: Наука, 1988. — 424 с. — ISBN 5-02-005265-5.
2. Дубинин Н. П. Общая генетика. — М.: «Наука», 1986. — 560 с.
3. В.И. Иванов, Н.В. Барышникова, Дж. С. Билева Генетика / Под ред. В.И. Иванова. — М.: Академкнига, 2007. — 638 с. — 2000 экз. — ISBN 978-5-94628-288-8.



4. Коряков Д.Е., Жимулев И.Ф. Хромосомы. Структура и функции. — Новосибирск: Из-во СО РАН, 2009. — С. 12. — 258 с. — ISBN 978-5-7692-1045-7.
5. Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции: учебник для студентов высших учебных заведений. — СПб.: Изд-во Н-Л, 2010. — 720 с. — ISBN 978-5-94869-105-3. — С. 153—181.
6. Morgan T.H., Sturtevant A.H., Muller H.J., Bridges C.B. The mechanism of mendelian heredity. — New York: Henry Holt and Company, 1915. — 262 с.
7. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1933 (англ.). Nobel Media AB 2013. Проверено 11 декабря 2013.
8. Тимофеев-Ресовский Н. В. Генетика, эволюция, значение методологии в естествознании. — Екатеринбург: Токмас-Пресс, 2009. — 144 с.
9. Филипченко Ю.А. Генетика. — Л.: Типография "Печатный Двор", 1929. — 379 с.
10. Beneden, van E. Recherches sur la maturation de l'oeuf, la fecondation et la division cellulaire.. — Leipzig, Paris, 1883.
11. Morgan T. H. Random segregation versus coupling in Mendelian inheritance. — 1911. — Т. 34, № 873. — С. 384-384.
12. Bridges C. B. Direct proof through non-disjunction that the sex-linked genes of Drosophila are borne by the X-chromosome // Science. — 1914. — Т. 40, № 1020. — С. 107—109.
13. Инге-Вечтомов С.Г. Генетика с основами селекции: учебник для студентов высших учебных заведений / С. Г. Инге-Вечтомов. — СПб.: Изд-во Н-Л, 2010. — С. 153-181. — 720 с. — ISBN 978-5-94869-105-3.
14. Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика: В 3 т. М.: Мир, 1987—1988. Т. 1. 295 с. Т. 2 368 с. Т. 3. 335 с.
15. Алиханян С. И., Акифьев А. П., Чернин Л. С. Общая генетика. — М.: Высш. шк., 1985. — 446 с.
16. Гершензон С. М. Основы современной генетики. — Киев: Наук. думка, 1983. — 558 с.
17. Гершкович И. Генетика. — М.: Наука, 1968. — 698 с.
18. Дубинин Н. П. Генетика. — Кишинёв: Штииница, 1985. — 533 с.
19. Жимулёв И. Ф. Общая и молекулярная генетика: учебное пособие для студентов университетов, обучающихся по направлению 510600 — Биология и биологическим специальностям. — 2-е, испр. и доп. — Новосибирск: Новосибирск : Сиб. унив. изд-во, 2003. — 478 с. — 2500 экз. — ISBN 5-94087-077-5.
20. Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции. — М.: Высш. шк., 1989. — 592 с.
21. Клаг Уильям С., Каммингс Майкл Р. Основы генетики. — М.: Техносфера, 2007. — 896 с.
22. Льюин Б. Гены: Пер. с англ. — М.: Мир, 1987. — 544 с.
23. Пухальский В. А. Введение в генетику. — М.: КолосС, 2007. — 224 с. (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений).
24. Сингер М., Берг П. Гены и геномы: В 2 т. М.: Мир, 1998. Т. 1. 373 с. Т. 2. 391 с.

### Контрольные вопросы

1. Какие закономерности наследования признаков были установлены Менделем?
2. Какие условия обязательны для выполнения законов Менделя?
3. Какие признаки изучал Мендель?
4. Какие признаки наследуются независимо?
5. Что определяет чистоту гамет?
6. Что такое сцепленное наследование?
7. Какие основные положения хромосомной теории наследственности нашли подтверждение?
8. Что такое баланс полов? Что описывает балансовая теория Бриджерса?
9. Как детерминируется пол у дрозофилы?

## ГЛАВА 2

---

### ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕНОВ

Генотип организма (совокупность всех генов особи) определяют, как исторически сложившуюся систему взаимодействующих генов. Генотип не меняется на протяжении жизни организма (онтогенеза). Однако в нем могут происходить изменения (мутации), которые могут проявляться в последующих поколениях.

Фенотип организма меняется на протяжении жизни. Между генотипом и фенотипом нет однозначного соответствия, т.е. активность генов не всегда приводит к появлению контролируемого им признака. Причиной этого несоответствия является то обстоятельство, что фенотип представляет собой результат сложного взаимодействия генов между собой и факторами окружающей среды. Впервые на это важное различие между генотипом и фенотипом обратил внимание датский генетик В. Иогансен (1909). Несмотря на расположение генов в различных хромосомах или различных локусах одной и той же хромосомы гены могут взаимодействовать. Биохимической основой взаимодействия генов является многоэтапность формирования признака и участие в нём различных ферментов, биосинтез каждого из которых контролируется отдельным геном. Совокупность всех внешних признаков организма носит название фенотип. Соответственно разделению генов на аллельные и неаллельные выделяют типы взаимодействия аллельных и неаллельных генов.

#### 2.1. Генные аллели и их взаимодействие

**Аллель** – одна из альтернативных форм гена. В классической генетике аллелями принято считать альтернативные фенотипические проявления признака у жизнеспособных особей. После открытия молекулярной структуры гена аллель стал трактоваться как один из вариантов нуклеотидной последовательности определенного фрагмента ДНК (как кодирующего, так и не кодирующего) в структуре генома. Например, аллелем называют и вариант длины рестрикционного фрагмента вне зависимости от его локализации, и последовательность варианта повтора сателлитной ДНК. Таким образом, в классической генетике к определению понятия аллель подходили с точки зрения его функционального проявления (различные варианты признака), а в молекулярной генетике учитывается прежде всего изменение структуры определенной последовательности ДНК. **При этом в случае** некодирующей ДНК аллель, как правило, не имеет никакого фенотипического проявления. В этом, видимо, заключается защитная функция некодирующей ДНК от мутаций в ее структуре с фенотипическим проявлением. Вместе с тем показано, что изменения в последовательности оснований в регуляторных 5'- и 3'-нетранслируемых областях генов, интронах и сайтах сплайсинга могут привести к тяжелым заболеваниям у человека.

**Между аллелями одного гена** существуют различные типы взаимодействия: доминирование, неполное доминирование, кодоминирование, сверхдоминирование. В конце

70-х годов XX века Р. Ригером было предложено включить в эту классификацию еще два типа взаимодействия: неустойчивую доминантность и условную доминантность.

Кодоминирование проявляется при наследовании групп крови у человека. Особи, имеющие вторую (AA) и третью (BB) группы крови, гомозиготны, однако у их гетерозиготных потомков из-за одинакового проявления (экспрессии) генов будет отмечаться четвертая (AB) группа крови.

Описаны **доминантно наследуемые заболевания**, обусловленные генными делециями. У человека в каждой из двух хромосом шестнадцатой пары имеется два гемоглобиновых гена  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$ ; ген  $\alpha 1$  кодирует  $\alpha$ -цепь в гемоглобине HbA, а  $\alpha 2$  – в HbA<sub>2</sub>. Таким образом, в диплоидном геноме человека присутствуют четыре гена  $\alpha$ . Нормальный гемоглобин взрослых людей состоит из двух альфа- и двух бета-цепей. Известны наследуемые по аутосомно-доминантному типу  $\alpha$ -талассемии, вызванные делециями различного числа генов. Делеции двух генов альфа ( $\alpha$ ) у гетерозигот приводят к слабо выраженной анемии. Тяжелая форма этого заболевания HbH (гепато- и спленомегалия, гипертрофия костей, кардиомегалия) вызвана отсутствием трех генов. К **летальному исходу** приводит выпадение всех четырех генов (водянка плода с Hb Bart-гемоглобином, состоящим из четырех  $\gamma$ -цепей).

Другой пример. **Делеция в миелиновом гене PMP22** на хромосоме 17 размером в 1,5 млн п. н. вызывает наследственную нейропатию с предрасположенностью к параличам от сдавления, наследуемую по доминантному типу.

В последние десятилетия благодаря использованию современных методов исследования появляется все больше сведений о молекулярных механизмах доминантности и рецессивности. Первичными продуктами гена, синтезированными в процессе считывания информации с РНК на белок (трансляция) являются структурные белки и ферменты. У гетерозигот синтезируются как нормальные, так и мутантные полипептидные цепи, кодируемые разными аллелями одного гена. При этом очень важно, какого количества белка, кодируемого нормальным геном, достаточно для обеспечения нормального фенотипа.

**Рецессивные мутации** не проявляются у гетерозигот при синтезе примерно половины нормального белка. И, напротив, гетерозиготы по доминантным мутациям обладают мутантным фенотипом, если синтезированный нормальный белок не может компенсировать присутствие мутантного белка. В случае мультимерных или субъединичных белков, состоящих из нескольких субъединиц, важно какие именно нарушения произошли в структуре белка. При доминантных заболеваниях чаще, встречается нарушение агрегации субъединиц белка, недостаточный синтез белка или полное его отсутствие, дефекты клеточных рецепторов и белков мембраны. Однако различные изменения, происходящие с одним и тем же белком, могут наследоваться по-разному.

Например, замена аминокислот в **гемоглобине** характерна для многих рецессивно наследуемых гемоглобинопатий, а недостаточный синтез гемоглобина HbA или полное его отсутствие наследуется по доминантному типу ( $\alpha$ -талассемии). Рецессивные заболевания, связанные с нарушениями обмена веществ, как правило, вызваны недостаточной активностью ферментов, например, алкалтонурия, галактоземия, фенилкетонурия. Рецессивные патологии могут обуславливаться и дефектами неферментных

белков (спинальная мышечная атрофия, наследственные моторно-сенсорные нейропатии), в том числе мембранных (муковисцидоз, мышечная дистрофия Дюшенна/Бекера). Данные, приведенные в монографии С. Н. Иллариошкина, посвященной наследственным заболеваниям нервной системы, свидетельствуют о том, что сходные нарушения структурных белков и ферментов имеют место при разных типах наследования. <http://medicalplanet.su/genetica/41.html>.

## 2.2. Взаимодействие неаллельных генов

Известно много случаев, когда признак или свойство детерминируются двумя или большим числом неаллельных генов, которые взаимодействуют между собой. Хотя и здесь взаимодействие условно, потому что взаимодействуют не гены, а контролируемые ими продукты. При этом имеет место отклонение от менделевских закономерностей расщепления.

Различают четыре основных типа взаимодействия неаллельных генов: комплементарность, эпистаз, полимерия и модифицирующее действие (плейотропия).

### Комплементарность

Взаимодополняющее действие двух неаллельных генов называется комплементарным взаимодействием или комплементарностью. Это такой тип взаимодействия неаллельных генов, когда один доминантный ген дополняет действие другого неаллельного доминантного гена, и они вместе определяют новый признак, который отсутствует у родителей. Причем соответственный признак развивается только в присутствии обоих неаллельных генов. Например, серая окраска шерсти у мышей контролируется двумя генами (*A* и *R*). Примером комплементарного взаимодействия является окраска мышей дикого типа, агути или серая. Диким типом называется тип, преобладающий в природе.

Появление «мышьиной» окраски шерсти обусловлено взаимодействием двух неаллельных генов:

Ген *A* – доминантный ген, контролирующий синтез пигмента черного цвета.

Ген *a* – рецессивный ген, неспособный синтезировать пигмент (альбинизм).

Ген *R* – доминантный ген, распределяющий пигмент у основания и верхушки шерсти мышей.

Ген *r* – рецессивный ген, неспособный распределять пигмент.

Генотип мышей дикого типа *AABV*, мышей-альбиносов – *aавв*.

Мыши с генотипом *A-R*- имеют серую окраску, вследствие взаимодополняющего действия генов *A* и *R*.

Мыши с генотипом *A-гг* имеют черную окраску, поскольку ген в рецессивном состоянии не распределяет пигмент вдоль шерсти.

Мыши с генотипом *aa R*- и *аагг* имеют белую окраску, поскольку в их организме не синтезируется пигмент.

Скрещивание дигетерозигот (*AaRr x AaRr*) приводит к расщеплению гибридов в соотношении 9:3:4. Числовые соотношения при комплементарном взаимодействии могут быть как 9:7; 9:6:1 (видно изменение менделевского расщепления).

Примером комплементарного взаимодействия генов у человека может быть синтез

защитного белка – интерферона. Его образование в организме связано с комплементарным взаимодействием двух неаллельных генов, расположенных в разных хромосомах.

### Эффект положения

Степень проявления гена зависит также от местоположения гена в генотипе, т.е. соседние гены оказывают влияние на активность данного гена. Различия в активности генов возникают в результате транслокаций, инверсий и др.

**Эпистаз** – это такое взаимодействие неаллельных генов, при котором один ген подавляет действие другого неаллельного гена. Угнетение могут вызывать как доминантные, так и рецессивные гены, и в зависимости от этого различают *эпистаз доминантный и рецессивный*. Подавляющий ген получил название **ингибитора** или супрессора. Гены-ингибиторы в основном не детерминируют развитие определенного признака, а лишь подавляют действие другого гена. Ген, эффект которого подавляется, получил название **гипостатического**. При эпистатическом взаимодействии генов расщепление по фенотипу в F2 составляет 13:3; 12:3:1 или 9:3:4 и др. Окрас плодов тыквы, масть лошадей определяются этим типом взаимодействия.

Если ген-супрессор рецессивный, то возникает **криптомерия** (греч. хриштад – тайный, скрытый). У человека таким примером может быть «Бомбейский феномен». В семье, в которой у отца была вторая А(II) группа крови, а у матери – первая 0 (I) группа крови, родились две девочки: одна с четвертой АВ (IV), другая с первой 0(I) группой крови. В этом случае редкий рецессивный аллель «h» в гомозиготном состоянии (hh) подавляет активность гена IB (определяющего В (III) группу крови системы АВО). Поэтому женщина с генотипом IB\_hh, фенотипически имеет I группу крови – 0 (I). Это объяснялось подавлением гена В (III) неаллельным рецессивным геном h в гомозиготном состоянии (hh) у матери, отец имел в гомозиготном состоянии доминантный ген H (HH), который он передал дочерям. Обе дочери стали гетерозиготными по гену H – Hh, без проявления эпистаза.

Примером **доминантного эпистаза** является окраска кур. Куры породы Леггорн имеют белое оперение, (ССII), также, как и куры породы Виандот (ссii). В потомстве от их скрещивания появляются куры как с белым, так и с цветным оперением. Цвет оперения кур определяется двумя генами:

Ген С – доминантный ген, синтезирует белок – пигмент, обуславливающий окраску оперения;

Ген с – рецессивный ген, неспособный синтезировать пигмент;

Ген I – доминантный ген, подавляющий действие гена С;

Ген i – рецессивный ген, не проявляет эпистатического действия.

Во втором гибридном поколении появляются куры с генотипом С – I – имеют белое оперение вследствие подавления синтеза пигмента – геном I, с генотипом ссI- и ссii имеют белое оперение вследствие отсутствия пигмента и куры с генотипом С- ii имеют цветное оперение вследствие отсутствия гена I, вызывающего эпистаз.

**Полимерией** называется взаимодействие неаллельных генов, одинаково влияющих на проявление определенного признака. Полимерия лежит в основе развития количественных признаков, например, роста, цвета кожи и волос, и других признаков. Полимерные или количественные признаки являются результатом аддитивного или суммарного действия неаллельных генов.

Цвет кожи контролируется 4 генами. У негров с максимальной пигментацией имеются четыре пары доминантных генов «Р» – Р1Р1 Р2Р2 Р3Р3 Р4Р4. У европейцев с минимальной пигментацией имеется четыре пары рецессивных генов «р» – р1р1р2р2р3р3р4р4. Различное количество доминантных генов в генотипе от 0 до 8 обуславливает разную интенсивность окраски кожи.

**Главные гены** в системе полигенов. Среди генов, влияющих на количественный признак, может оказаться «сильный» или главный ген, и более «слабые» гены. Действие главного гена иногда настолько существеннее действия других генов, что признак, кодируемый им, наследуется по менделевским законам. Изменчивость одного и того же признака может находиться под контролем как одного главного гена, так и полигенов. Например, карликовость у человека в случае ахондроплазии обусловлена специфическим главным геном, в то время как изменчивость по росту в нормальной популяции индивидов является примером полигенной изменчивости. Гены, действие которых заметно сильнее действия других генов на этот признак, можно изучать по отдельности от действия других генов. С другой стороны, один и тот же ген вследствие плейотропного действия, может оказывать сильное влияние на один признак и менее значительное на другой признак. К тому же к главным генам могут быть отнесены те, которые определяют признаки, наследуемые по законам Менделя, без их отношения к системе полигенов. Подразделение генов на главные и неглавные не всегда обосновано, хотя бесспорно, что их роль в определении признака может быть различна.

**Широко распространенные болезни** человека, например, артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца, бронхиальная астма, язвенная болезнь желудка, наследуются полигенно. При этом тяжесть заболевания зависит не только от совокупного действия множества генов, но и от провоцирующих средовых факторов.

Биологическое значение полимерии заключается еще и в том, что признаки, кодируемые этими генами, более стабильны, чем те, которые кодируются одним геном. Организм без полимерных генов был бы очень неустойчивым: любая мутация или рекомбинация приводила бы к резкой изменчивости, а это в большинстве случаев имеет неблагоприятный характер.

Многие морфологические, физиологические и патологические особенности человека определяются полимерными генами: рост, масса тела, величина артериального давления и др. Развитие таких признаков у человека подчиняется общим законам полигенного наследования и зависит от условий среды. В этих случаях наблюдается, например, склонность к гипертонической болезни, ожирению и др. Данные признаки при благоприятных условиях среды могут не проявиться или проявиться незначительно. Этим полигенные признаки отличаются от моногенных. Изменяя условия среды можно обеспечить профилактику ряда полигенных заболеваний.

#### **Гены модификаторы. Взаимодействие эмбриональных генов.**

Наряду с генами «основного» действия, на развитие любого признака оказывают влияние и другие гены, как правило, не имеющие собственного фенотипического проявления. Эпхансеры усиливают, а супрессоры (ингибиторы) ослабляют проявление основных, главных генов. Такие неаллельные гены, усиливающие или ослабляющие

действие главного гена, называются генами-модификаторами. Многие гены в организме в одно и то же время могут быть генами «главного действия» по одним признакам и генами-модификаторами по другим.

**Это частный случай плейотропного** (множественного) действия генов, когда один ген влияет одновременно на несколько признаков организма.

**На дрозофиле** было показано, что гены-модификаторы обладают следующими свойствами:

- могут быть локализованы либо в той же хромосоме, что и основной ген, либо в другой хромосоме;
- могут оказывать плейотропный эффект на такие количественные признаки, как жизнеспособность и плодовитость;
- один и тот же ген-модификатор может ослаблять действие одних и усиливать действие других генов.

**Дрозофила** – один из модельных объектов, который используется для изучения взаимодействия генов в раннем эмбриональном развитии. Личинки и взрослые мухи дрозофилы (имаго) имеют сегментарное строение.

**Эмбриогенез у дрозофилы** осуществляется под контролем нескольких групп взаимодействующих генов. Здесь мы рассмотрим те из них, которые ведают детерминацией полярных осей и обладают материнским эффектом. Материнский эффект заключается во влиянии генотипа матери на формирование признака у потомства, передаваемое через накопленные в цитоплазме яйцеклеток первичные продукты материнских генов. Так, в оогенезе у дрозофилы происходит накопление и градиентное распределение в созревающем яйце сначала мРНК, а затем белков, кодируемых этими генами.

**При трансляции мРНК** гена *bicoid* во время ранних делений дробления синтезируется белок, который формирует градиент с наибольшей концентрацией в переднем полюсе яйца. Два других белка, кодируемых генами *exuperantia* и *swallow*, обеспечивают распределение продукта гена *bicoid* в переднем конце яйца. При отсутствии продуктов этих генов градиент белка гена *bicoid* распространяется ближе к заднему полюсу. У мутантов *bicoid* отсутствуют голова и грудь, а на их месте образуются терминальные структуры личинки.

**Ген *bicoid*** взаимодействует также с геном *hunchback*, *hb*, – одним из ранних генов, активирующихся в зиготе. У мутантов по гену *hb* отсутствуют ротовые части и структуры груди.

В задней части **зародыша** функционирует ген *nanos* и другие гены, продукты которых необходимы для развития брюшка мухи. Ген *nanos* супрессирует действие гена *hunchback* в задней части зародыша. Доставка продукта гена *nanos* из заднего полюса в область брюшных сегментов осуществляется с помощью продуктов гена *rimilio*. Существуют еще гены, которые определяют границы между сегментированными и несегментированными частями тела. Одним из таких генов является ген *torso*, мутации которого приводят к отсутствию у зародыша несегментированных терминальных структур (акрона в передней части зародыша и тельсона – в задней).

**Продукт этого гена** синтезируется во всем зародыше, но активируется только на

его полюсах. Предполагают, что продукт гена torso взаимодействует с геном tailless и геном husckebein при формировании терминальных структур зародыша.

Таким образом, **пространственное распределение белков** в цитоплазме яйца и зародыша дрозофилы основано на взаимодействии (активации и репрессии) специфических генов.

### 2.3. Плейотропия генов

Явления взаимодействия генов указывают на целостность генотипа особи. Из взаимосвязи генов в пределах единого генотипа следует, что один ген может оказывать влияние на развитие нескольких признаков. Такое **множественное действие гена названо плейотропией**. *При плейотропии гены взаимодействуют на уровне продуктов контролируемых ими реакций*: каждый ген кодирует синтез определённого фермента для осуществления конкретного этапа метаболизма. Нарушения метаболизма на предшествующем этапе отразятся на последующих этапах нескольких, как правило, «переплетающихся» друг с другом биохимических превращений и, следовательно, повлияют на развитие сразу нескольких элементарных признаков.

Плейотропный эффект характерен для большинства генов и, особенно, генных мутаций. Так, доминантная мутация, вызывающая арахнодактилию (синдром «паучьи пальцы») обуславливает, наряду с изменениями пальцев рук и ног, также вывихи хрусталика глаза и врождённые пороки сердца. Рецессивная мутация гена вызывает не только такое заболевание как галактоземия, но и ведёт к слабоумию, циррозу печени и слепоте. Плейотропные свойства проявляет также рецессивный ген фенилкетонурии: гомозиготные по этому гену люди отличаются от нормальных уровнем содержания фенилаланина в крови, коэффициентом умственного развития (IQ), размером головы, интенсивностью цвета волос.

Плейотропное проявление летальной мутации, приводящей к различным патологическим изменениям у крысят, описано у крыс. Среди них: сужение просвета трахей, утолщение рёбер, хроническое кислородное голодание, затруднение кровообращения в лёгких, ненормальное положение зубов, невозможность сосания молока, смерть. На первый взгляд кажется, что большинство этих изменений не имеют ничего общего друг с другом. Однако, как выяснилось, все эти изменения являются следствием одной и той же причины. Произошедшая мутация вызвала нарушение развития хрящевой ткани, следствием чего и стали отмеченные отклонения в развитии всего организма.

### 2.4. Множественный аллелизм

Множественный аллелизм имеет важное биологическое и практическое значение, поскольку усиливает комбинативную изменчивость, особенно генотипическую.

Мутации, постоянно происходящие в живых организмах, приводят к изменениям нуклеотидной последовательности гена и появлению новых его форм, называемых аллелями – альтернативные формы гена. Аллельные гены контролируют развитие одного признака.



Количество аллелей варьирует от гена к гену. В генотипе имеются как мономорфные гены (с одним аллелем), так и полиморфные гены (с множеством аллелей). Различные комбинации аллелей приводят к вариабельности контролируемого данным геном признака и характеризуются следующими признаками:

1. Множественные аллели всегда располагаются в одном локусе хромосомы;
2. Между множественными аллелями не происходит кроссинговер (поскольку они являются формами одного и того же гена);
3. Множественные аллели контролируют развитие одинаковых признаков;
4. Аллель дикого типа (наиболее распространенный в популяции) почти всегда является доминантным, другие аллели могут обладать доминантным, рецессивным и промежуточным действием;
5. При скрещивании двух мутантных аллелей возникает мутантный фенотип.

В серии множественных аллелей один из них является доминирующим (главным) по отношению к другим аллелям. Другие аллели будут рецессивными по отношению к нему, но могут проявлять доминирующее влияние по отношению к другим аллелям серии.

Доминантный аллель обозначается прописной буквой или строчной со знаком «+».

Примером множественного аллелизма является окраска шерсти кролика. Наиболее распространенная в природе – серая или агути, аллель дикого типа  $c^+$ , доминантен по отношению ко всем остальным аллелям гена. В серии множественных аллелей один из них является доминирующим (главным) по отношению к другим аллелям. Шиншиловая или серебристая окраска шерсти кроликов обусловлена аллелями  $c^{ch}$ , рецессивными по отношению к аллелю дикого типа, но доминантными по отношению к другим аллелям.

Гималайская окраска  $c^h$  – белая окраска шерсти с черными ушами, носом и лапками; аллель рецессивна по отношению к дикой и шиншиловой окраске шерсти.

Альбинизм – отсутствие пигмента в шерсти (белая окраска), аллель (с) рецессивна по отношению ко всем вышеперечисленным аллелям, генотип  $cc$ .

Фенотипы и генотипы серии множественных аллелей гена окраски шерсти кроликов:

Фенотипы	Генотипы
Агути (дикий тип)	$c^+c^+, c^+c^{ch}, c^+c^h, c^+c$
Шиншилла	$c^{ch}c^{ch}, c^{ch}c^h, c^{ch}c$
Гималайская окраска	$c^hc^h, c^hc$
Альбиносы	$cc$

Эукариотические организмы обладают в норме только двумя аллельными генами, локализованными в двух гомологичных (отцовской и материнской) хромосомах. Однако различные мутации этого гена накапливаются в популяции организмов в виде множества состояний гена. **Присутствие в генофонде вида трёх и более различных аллелей гена получило название множественного аллелизма.** У дрозофилы, например, известно около 150 мутаций гена *vermillion* или около 350 мутаций

гена white. При этом все мутации vermilion имеют одинаковый фенотип. Фенотипы мутантов гена white варьируют в очень широких пределах от нормального цвета глаз до полного отсутствия пигмента:

Аллель	Цвет глаз
$w^+$	красные глаза (дикий тип)
$w^{Rr}$	цвет как у дикого типа – красный
$w^{co}$	коралловый
$w^{bl}$	цвет крови
$w^{ch}$	цвет вишни
$w^{bf}$	тёмно-жёлтый
$w^h$	цвет мёда
$w^a$	абрикосовый
$w^p$	пурпурный
$w^e$	эозиновый
$w^i$	цвет слоновой кости
$w^z$	лимонно-жёлтый
$w^{sp}$	мозаичный, цвет варьирует
$w^l$	белый

В 1900 году Ланштейнером была открыта система групп крови. В 1924 году Бернштейн установил, что *система групп крови АВ0 контролируется серией множественных аллелей (A, B, 0) одного гена человека*. Бернштейн предложил следующее объяснение генетического механизма формирования групп крови АВ0: существуют 3 аллеля одного и того же гена (A, B, 0) с шестью генотипами (00 – I группа; AA, A0 – II группа; BB, B0 – III группа; AB – IV группа). Важно помнить, что любой индивид может иметь максимум 2 аллеля из серии, так как у него две гомологичные хромосомы. В ряде случаев группы крови оказываются несовместимыми. Происходит это потому, что антитело  $\alpha$  агглютинирует эритроциты группы крови B и AB, а антитело  $\beta$  – эритроциты групп крови A и AB. Если в крови реципиента с группой крови A окажется антиген B, то наступает слипание его эритроцитов; то же произойдёт, если в кровь реципиента группы B попадают антигены донора A или AB. Следовательно, аллели A и B кодоминируют, и каждый из них доминирует над аллелем 0.

Дифференцировка крови человека по системе АВ0 на 4 группы основана на комбинации двух изоантигенов (А и В) в эритроцитах и двух антител ( $\alpha$  и  $\beta$ ) в плазме крови:

Группа крови реципиента		Антигены эритроцитов	Антитела сыворотки	Реакция агглютинации сыворотки реципиента с эритроцитами четырёх групп крови доноров			
				0	А	В	АВ
I	0	0	a	-	+	+	+
II	А	А	b	-	-	+	+
III	В	В	a	-	+	-	+
IV	АВ	АВ	-	-	-	-	-

Группы крови не изменяются в течение жизни человека, поэтому знания о характере их наследования находят практическое применение, например, в судебной медицине для исключения отцовства. Ниже приведены ожидаемые и невозможные группы крови у потомков при различном сочетании групп крови родителей:

Варианты	Группы крови родителей	Возможные группы крови потомков	Группы крови, невозможные у потомков в данном браке
1	0x0	0	А, В, АВ
2	0xA	0, А	В, АВ
3	AxA	0, А	В, АВ
4	BxB	0, В	А, АВ
5	AxB	0, А, В, АВ	-
6	0xAB	А, В	0, АВ
7	AxAB	А, В, АВ	0
8	BxAB	А, В, АВ	0
9	ABxAB	А, В, АВ	0
10	0xB	0, В	А, АВ

В системе групп крови АВ0 существуют гены-модификаторы. Описан случай, когда эритроциты не агглютинируются ни одной из антисывороток, хотя сыворотка содержит все три агглютинина. Этот фенотип был назван «Бомбей». Пара аллельных генов-модификаторов обозначается Н и h, фенотип «Бомбей» является рецессивной гомозиготой h/h.

## Резус система

На поверхности эритроцитов человека имеется еще один антиген, называемый резус-фактор. Он обнаружен у обезьяны – Макаки резус. У человека обнаружено восемь различных типов резус-антигена. Синтез резус-антигена зависит от активности трех тесно сцепленных аутосомных генов (псевдоаллелей). **Псевдоаллелями** называются мутации одного гена, проявляющие аллелизм в комплементационном тесте, но отделяющиеся друг от друга при рекомбинации. Доминантные гены продуцируют антиген, их обладатели относятся к резус-положительными лицам и составляют 85-90% от всей популяции.

Существует две гипотезы относительно генетики резус-системы:

1. Гипотеза Винера. Винер постулировал наличие по крайней мере 8 множественных аллелей гена R: r, R<sub>0</sub>, R<sup>I</sup>, R<sup>II</sup>, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>x</sub> или R<sub>z</sub>, R<sub>y</sub>.

2. Гипотеза Фишера. Фишер отвергает концепцию Винера о множественном аллелизме. По его мнению ген R состоит из трех псевдоаллелей или отдельных генов: C, D и E. Современные исследования подтвердили концепцию Фишера о псевдоаллелизме:

Символ гена		Антиген	Фенотип
Винер	Фишер		
r	cde	отсутствует	Rh <sup>-</sup>
R <sub>0</sub>	cDe	R <sub>0</sub>	Rh <sup>+</sup>
R <sup>I</sup>	Cde	R <sup>I</sup>	Rh <sup>+</sup>
R <sup>II</sup>	cdE	R <sup>II</sup>	Rh <sup>+</sup>
R <sub>1</sub>	CDe	R <sub>0</sub> или R <sup>II</sup>	Rh <sup>+</sup>
R <sub>2</sub>	cDE	R <sub>0</sub> или R <sup>II</sup>	Rh <sup>+</sup>
R <sub>x</sub> или R <sub>z</sub>	CDE	R <sup>I</sup> или R <sup>II</sup>	Rh <sup>+</sup>
R <sub>y</sub>	CdE	R <sup>I</sup> или R <sup>II</sup>	Rh <sup>+</sup>

Таким образом, развитие фенотипических признаков (фенотипа) во многих случаях зависит от взаимодействия генов между собой. Следует помнить, что на самом деле взаимодействуют не сами гены, а продукты их активности – белки.

Показателями зависимости функционирования наследственных задатков от характеристик генотипа является пенетрантность и экспрессивность.

Итак, пенетрантность – это частота проявления гена, вероятность появления или отсутствия признака у организмов, одинаковых по генотипу.

Если фенотипическое проявление гена полностью независит от окружающей среды, то пенетрантность равна 100 процентам. Однако некоторые доминантные гены проявляются менее регулярно. Так, полидактилия имеет четкое вертикальное наследование, но пропуски поколений встречаются. Доминантная аномалия - преждевременное половое созревание, присущее только мужчинам, иногда может передаваться от человека, который не страдал этой патологией.

## 2.5. Экспрессивность и пенетрантность. Генокопии

Межгенные взаимодействия, межаллельные взаимодействия, сложность и разветвлённость метаболических процессов, в которых участвуют кодируемые генами белки (ферменты), обуславливают сложную специфику фенотипического проявления признака. **Степень выраженности признака в фенотипе получила название экспрессивности** (термин введён Н.В. Тимофеевым-Ресовским в 1927 году). *Под ней понимают степень фенотипического проявления аллеля у разных особей. При отсутствии вариантов проявления признака говорят о постоянной экспрессивности.* Например, аллели систем группы крови АВ0 у человека имеют практически постоянную экспрессивность, а аллели, определяющие окраску глаз у человека - **изменчивую экспрессивность**. Классическим примером изменчивой экспрессивности рассматривают проявление рецессивной мутации, уменьшающей число фасеток глаза у дрозофилы: у разных особей может формироваться разное число фасеток вплоть до полного исчезновения.

*Экспрессивность выражают количественно. Частота встречаемости данного признака в поколении называется пенетрантностью* (термин предложен Н.В. Тимофеевым-Ресовским в 1927 году). Количественно её выражают в процентах. *Пенетрантность бывает полной (100% встречаемость признака) и неполной (встречаемость признака менее 100%).* Например, у человека пенетрантность врождённого вывиха бедра составляет 25%, а пенетрантность дефекта глаза «колобомы» – около 50%.

Знание механизмов и характера экспрессивности имеет значение в медико-генетическом консультировании и определении возможного генотипа фенотипически «здоровых» людей, родственники которых имели наследственные заболевания. *Явления экспрессивности указывают, что доминированием (проявлением доминантного аллельного гена) можно управлять, обоснованно осуществляя поиск средств, предотвращающих развитие наследственных аномалий и патологически отягощённой наследственности у человека.* Тот факт, что один и тот же генотип может явиться источником развития различных фенотипов, имеет существенное значение для медицины. Это означает, что *отягощённая наследственность не обязательно должна проявиться в развивающемся организме.* В ряде случаев развитие болезни можно предотвратить, в частности диетой или лекарственными препаратами.

Известны **одинаковые изменения фенотипа, обусловленные изменениями аллелей различных генов – генокопии.** Их возникновение – следствие контроля признака многими генами. Поскольку биосинтез молекул в клетке, как правило, осуществляется многоэтапно, мутации разных генов, контролирующих различные этапы одного биохимического пути, могут приводить к одинаковому результату – отсутствию конечного продукта цепи реакций и, следовательно, одинаковому изменению фенотипа. Так, у человека известно несколько форм глухоты, вызываемых мутантными аллелями трёх аутосомных генов и одного гена X-хромосомы. Однако в различных случаях глухота сопровождается либо пигментным ретинитом, либо зобом, или же аномалиями функции сердца. Проблема генокопий актуальна также в медицинской генетике для прогноза возможного проявления наследственных заболеваний у потомков, если родители имели сходные болезни или аномалии развития

**Пенетрантность** указывает на процент соответствующего фенотипа среди носителей гена. Итак, пенетрантность зависит от генов и от среды, от того и другого. Таким образом, это не константное свойство гена, а функция генов в конкретных условиях среды. **Пенетрантность** – вероятность проявления гена (все или ничего), т.е. ген либо проявляется, либо не проявляется в виде определенного признака. Пенетрантность оценивается количественно, в виде доли особей (%), у которых контролируемый признак проявился среди всех особей, обладающих данным геном: она может варьировать у разных генов от величин близких к 0 (низкая пенетрантность) до 100% (полная пенетрантность).

Взаимодействие генов, точнее продуктов их активности – белков, приводит к тому, что конечным результатом действия того или иного гена может быть появление не одного, а нескольких фенотипических признаков. Например, синдром Марфана, моногенное аутосомно-доминантное заболевание, характеризуется несколькими признаками: арахнодактилия, эктопия хрусталика, аневризма аорты, гиперрастяжимость, долихостеномелия.

Пенетрантность, экспрессивность, плейотропное действие гена обуславливают взаимодействие: а) генов между собой; б) генов с факторами внешней среды.

### Литература

1. Алиханян С.И., Акифьев А.П., Чернин Л.С. Общая генетика. М., 1985.
2. Биология. Под ред. Ярыгина В.Н. М., кн. 1, 2001.
3. Бочков Н.П. Клиническая генетика. М., 2004.
4. Вопросы и задачи по общей биологии и общей и медицинской генетике (с пояснениями). Под ред. проф. Иткеса А.В. М., 2004.
5. Генетика. Под ред. Иванова В.И. М., 2006.
6. Муминов Т.А., Куандыков Е.У. Основы молекулярной биологии (курс лекций). Алматы, 2007.
7. Генетика человека с основами общей генетики : учебное пособие / Н. А. Курчанов. — 2 е изд., перераб. и доп. — СПб. : СпецЛит, 2009. — 191 с. : ил.

### Контрольные вопросы

1. Дайте определение генотипа, фенотипа, гомозиготы, гетерозиготы, аллели
2. Какие виды взаимодействий характерны для аллельных генов?
3. Какие виды взаимодействий между неаллельными генами определяют признак?
4. Что такое комплементарность и эпистаз?
5. Что такое полимерия и множественный аллелизм?
6. Что такое пенетрантность, экспрессивность и плейотропия?

## ГЛАВА 3

## ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АППАРАТ КЛЕТКИ

**3.1. Клетка – элементарная структурно-функциональная единица живого**

В 1839 году создана клеточная теория. Основные положения клеточной теории Шлейдена-Шванна заключаются в следующем:

1. Все без исключения растительные и животные организмы состоят из клеток.
2. Клетки растений и животных гомологичны по происхождению и аналогичны по функции.

3 Клеточное строение, однородность по происхождению и сходство по функции клеток характеризуют рост и развитие организмов.

Немецкий патолог Рудольф Вирхов в 1855 году подытожил целый ряд исследований на растительных и животных объектах, которые убедительно показали, что новообразование клеток происходит путем их деления. «Каждая клетка – от клетки».

Позднее в 70-х годах XIX в, благодаря усовершенствованию гистологической техники и работы целой плеяды ученых были обнаружены хромосомы, открыты общие и специальные органоиды клетки: клеточный центр (1876), митохондрии (1894), аппарат Гольджи (1898). В начале XX в И.Д.Чистяков дал описание фаз митотического деления. В конце 1898 г И.Н.Горожанкин и С.Т. Навашин изучали цитологические основы оплодотворения у растений.

Широкое использование новейших методов физики и химии в XX веке, в частности, посредством электронной микроскопии были открыты такие важнейшие клеточные органоиды, как эндоплазматическая сеть, рибосомы и лизосомы. Применение методов молекулярной биологии привело к открытию роли ДНК как носителя наследственной информации в клетке и к расшифровке генетического кода.

Первые описания хромосом появились в статьях и книгах разных авторов в 70-х годах XIX века, и приоритет открытия хромосом отдадут разным людям. Среди них такие имена, как И. Д. Чистяков (1873), А. Шнейдер (1873), Э. Страсбургер (1875), О. Бючли (1876) и другие [Филиппченко Ю.А. Генетика. –Л.: Типография «Печатный Двор», 1929.-379 с.]. Чаще всего годом открытия хромосом называют 1882 год, а их первооткрывателем – немецкого анатома В. Флеминга, который в своей фундаментальной книге «*Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung*» (нем.) собрал и упорядочил сведения о них, дополнив результатами собственных исследований. Термин «хромосома» был предложен немецким гистологом Г. Вальдейером в 1888 году. «Хромосома» в буквальном переводе означает «окрашенное тело», поскольку основные красители хорошо связываются хромосомами.

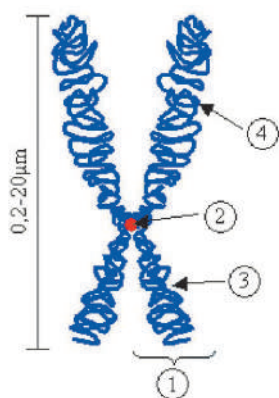
После переоткрытия в 1900 году законов Менделя потребовалось всего один-два года для того, чтобы стало ясно, что хромосомы при мейозе и оплодотворении ведут себя именно так, как это ожидалось от «частиц наследственности». В 1902 году Т. Бовери и в 1902—1903 годах У. Сеттон (*Walter Sutton*) независимо друг от друга выдвинули гипотезу о генетической роли хромосом.

У ДНК-содержащих вирусов, бактерий и сине-зеленых водорослей, а также в саморегулирующихся органеллах клеток эукариот (пластидах и митохондриях), хромосома представляет собой двуспиральную молекулу ДНК. У большинства форм она образует кольцо, которое закручено в шпильку и хромосома сверхспирализована. У бактерий геном организован в некое тело или тела, которые занимают около трети объема клетки и называются нуклеоидами.

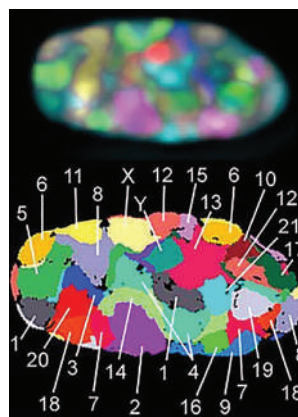
К началу XX века углубленное изучение поведения этих структур в ходе самовоспроизведения клеток, при созревании половых клеток, при оплодотворении и раннем развитии зародыша обнаружило строго закономерные динамические изменения их организации. Это привело немецкого цитолога эмбриолога Т. Бовери (1902-1907) и американского цитолога У. Сеттона (1902-1903) к утверждению тесной связи наследственного материала с хромосомами, что легло в основу хромосомной теории наследственности

### 3.2. Морфология метафазных хромосом

На стадии метафазы митоза хромосомы состоят из двух продольных копий, которые называются сестринскими хроматидами и которые образуются при репликации. У метафазных хромосом сестринские хроматиды соединены в районе *первичной перетяжки*, называемой центромерой. Центромера отвечает за расхождение сестринских хроматид в дочерние клетки при делении. На центромере происходит сборка кинетохора – сложной белковой структуры, определяющей прикрепление хромосомы к микротрубочкам веретена деления – движителям хромосомы в митозе [Вершинин А. В, 2007]. Центромера делит хромосомы на две части, называемые *плечами*. У большинства видов короткое плечо хромосомы обозначают буквой *p*, длинное плечо – буквой *q*. Длина хромосомы и положение центромеры являются основными морфологическими признаками метафазных хромосом (рисунки 3.1-3.4).



**Рисунок 3.1.** Схема строения хромосомы в метафазе митоза. 1 – хроматида; 2 – центромера; 3 – короткое плечо; 4 – длинное плечо.



**Рисунок 3.2.** Хромосомные территории в интерфазном ядре фибробласта человека



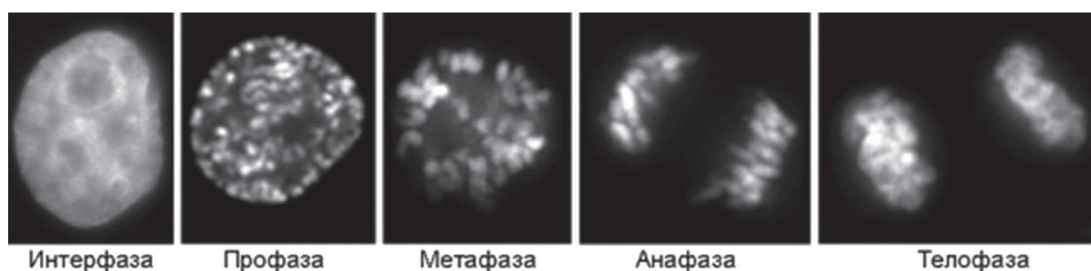


Рисунок 3.3. Клетки HeLa в интерфазе и на последовательных стадиях митоза

В зависимости от расположения центromеры различают три типа строения хромосом:

- *ахроцентрические* хромосомы, у которых центromера находится практически на конце, и второе плечо настолько мало, что его может быть не видно на цитологических препаратах;
- *субметацентрические* хромосомы с плечами неравной длины;
- *метацентрические* хромосомы, у которых центromера расположена посередине или почти посередине [Инге-Вечтомов, 2010].

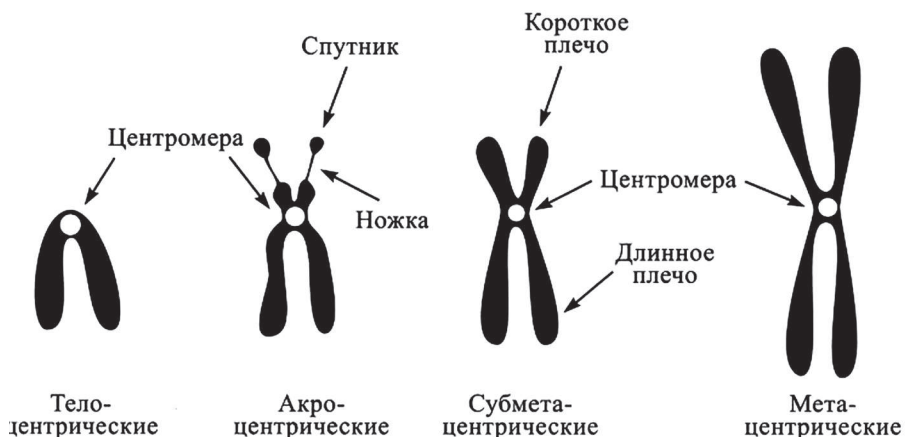


Рисунок 3.4. Типы метафазных хромосом [МакКьюсик, 1967. С. 25]

Эту классификацию хромосом на основе соотношения длин плеч предложил в 1912 году российский ботаник и цитолог С. Г. Навашин. Помимо вышеуказанных трёх типов С. Г. Навашин выделял ещё и *телоцентрические* хромосомы, то есть хромосомы только с одним плечом. Однако по современным представлениям истинно телоцентрических хромосом не бывает. Второе плечо, пусть даже очень короткое и невидимое в обычный микроскоп, всегда присутствует.

Дополнительным морфологическим признаком некоторых хромосом является так называемая *вторичная перетяжка*, которая внешне отличается от первичной отсутствием заметного угла между сегментами хромосомы. Вторичные перетяжки бывают различной длины и могут располагаться в различных точках по длине хромосомы. Во вторичных пе-

ретьяжках находятся, как правило, ядрышковые организаторы, содержащие многократные повторы генов, кодирующих рибосомные РНК. У человека вторичные перетьяжки, содержащие рибосомные гены, находятся в коротких плечах акроцентрических хромосом, они отделяют от основного тела хромосомы небольшие хромосомные сегменты, называемые *спутниками* [Pikaard C. S, 2000]. Хромосомы, обладающие спутником, принято называть SAT-хромосомами (лат. *SAT (Sine Acid Thymonucleinico)* - без ДНК).

### 3.3. Уровни компактизации хромосомной ДНК

Изучение химической организации хромосом эукариотических клеток показало, что они состоят в основном из ДНК и белков, которые образуют нуклеопротеиновый комплекс – хроматин, получивший свое название за способность окрашиваться основными красителями. Количество ДНК в ядрах клеток организма данного вида постоянно пропорционально их плоидности. В диплоидных соматических клетках организма ее вдвое больше, чем в гаметах. Увеличение числа хромосомных наборов в полиплоидных клетках сопровождается пропорциональным увеличением количества ДНК в них.

Белки составляют значительную часть вещества хромосом. На их долю приходится около 65% массы этих структур. Все хромосомные белки разделяются на две группы: гистоны и негистоновые белки.

Гистоны представлены пятью фракциями: Н1, Н2А, Н2В, Н3 и Н4. Являясь положительно заряженными основными белками, они достаточно прочно соединяются с ДНК, чем препятствуют считыванию заключенной в ней биологической информации. В этом состоит их регуляторная роль. Кроме того, эти белки выполняют структурную функцию, обеспечивая пространственную организацию ДНК в хромосомах.

Число фракций негистоновых белков превышает 100. Среди них ферменты синтеза и процессинга РНК, редупликации и репарации ДНК. Кислые белки хромосом выполняют также структурную и регуляторную роль. Помимо ДНК и белков в составе хромосом обнаруживаются также РНК, липиды, полисахариды, ионы металлов.

РНК хромосом представлена отчасти продуктами транскрипции, еще не покинувшими место синтеза. Некоторым фракциям свойственна регуляторная функция.

Регуляторная роль компонентов хромосом заключается в «запрещении» или «разрешении» списывания информации с молекулы ДНК.

Массовое соотношение ДНК : гистоны : негистоновые белки : РНК : липиды – равны 1:1:0,2-0,5:0,1-0,15:0,01-0,03. Другие компоненты встречаются в незначительном количестве.

Хроматин в зависимости от периода и фазы клеточного цикла меняет свою организацию. В интерфазе при световой микроскопии он выявляется в виде глыбок, рассеянных в нуклеоплазме ядра. При переходе клетки к митозу, особенно в метафазе, хроматин приобретает вид хорошо различимых отдельных интенсивно окрашенных телец – хромосом.

В процессе электронно-микроскопических и физико-химических исследований в составе интерфазного хроматина и метафазных хромосом были выявлены нити (фибриллы) диаметром 3,0-5,0, 10, 20-30 нм. Полезно вспомнить, что диаметр двойной спирали ДНК составляет примерно 2 нм, диаметр нитчатой структуры интерфазного

хроматина равен 100-200, а диаметр одной из сестринских хроматид метафазной хромосомы – 500-600 нм.

Диплоидный набор хромосом ( $2n$ ), свойственный соматическим клеткам организмов данного вида, являющийся видоспецифическим признаком и характеризующийся определенным числом, строением и генетическим составом, называется кариотипом. У отдельных особей разного пола имеется разное количество хромосом (XX или X0) или чаще (XX и XY).

В 1974 году сразу четверо исследователей показали наличие нуклеосом в составе хроматина ядер: Коренберг обнаружил, что хроматин состоит из субъединиц, содержащих по 200 п. н. ДНК и по две молекулы 4 типов гистонов, М. Нолль изолировал эти структуры, а А. Олинс и Д. Олинс опубликовали первые электронно-микроскопические фотографии нуклеосом (рисунок 3.5).

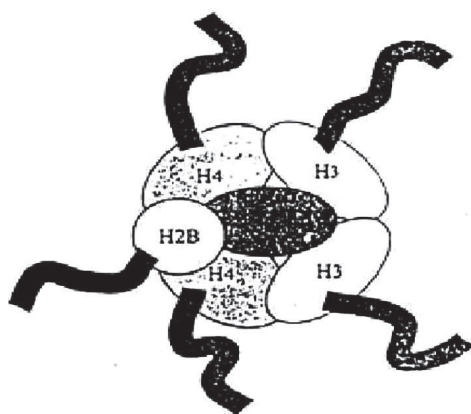


Рисунок 3.5. Расположение молекул гистонов в нуклеосоме [Lewin, 2000. P. 582]

Более 90% ДНК в клетке присутствует в составе нуклеосом. ДНК делает два оборота вокруг октамерной частицы, состоящей из гистонов H2A, H2B, H3 и H4, длина этого участка ДНК=146 п.н., еще около 50 п.н. приходится на участок между нуклеосомами – линкер. После упаковки ДНК в нуклеосомные структуры длина ее уменьшается в 6 раз и образует нить диаметром – 10 нм (рисунок 3.6).



Рисунок 3.6. Схема расположения ДНК (нить темного цвета) на белковой глобуле (коре) [Lewin, 2000. P. 570]

Дальнейшая компактизация нуклеосомной нити обеспечивается гистоном Н1, который соединяется с линкерной ДНК и двумя соседними белковыми телами, сближает их друг с другом (рисунок 3.7).

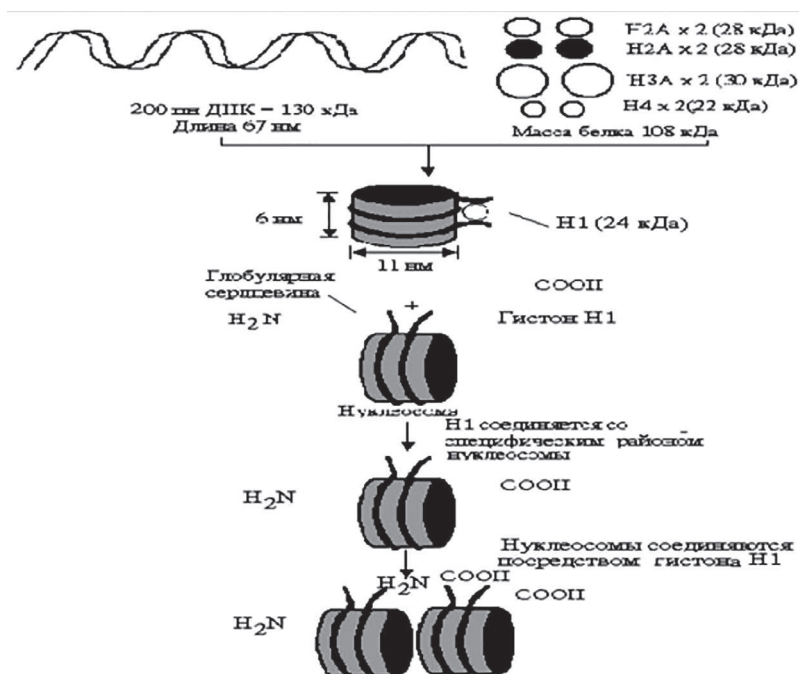


Рисунок 3.7. Структура нуклеосомы (а) [Lewin, 2000. Р. 569 ] и взаимодействие гистона Н1 и нуклеосом (б) [Alberts et al., 1994. Р. 346 ]

В результате образуется более компактная структура, построенная по типу солеоида. Такая хроматиновая фибрилла, называемая также элементарной, имеет диаметр 20-30 нм и соответствует нуклеомерному уровню упаковки ДНК (диаметр 30 нм) (рисунки 3.8-3.9).

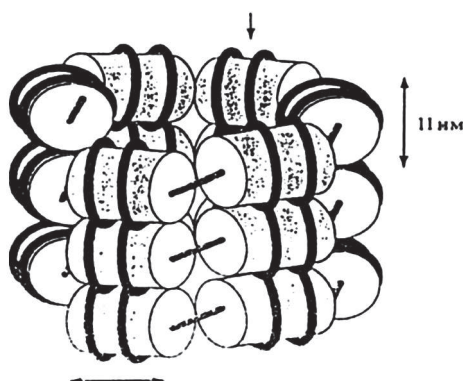
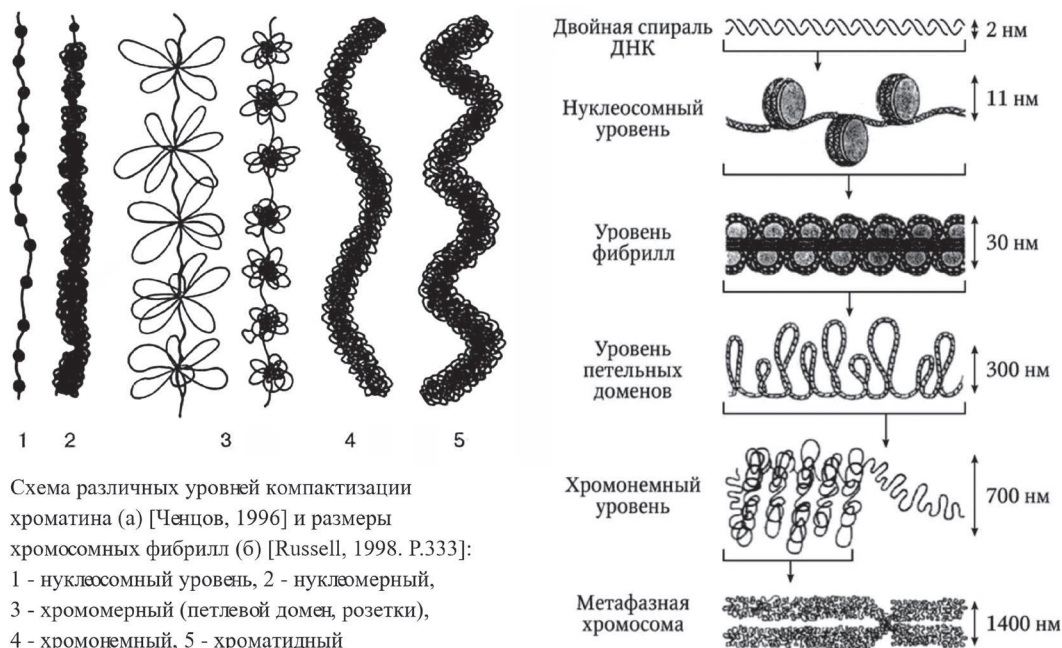


Рисунок 3.8. Структура нити хроматина диаметром 30 нм [Lewin, 1994. Р. 812]



**Рисунок 3.9.** Схема различных уровней компактизации хроматина (а) [Ченцов, 1996] и размеры хромосомных фибрилл (б) [Russell, 1998. P.333]:

Следующий третий - хромомерный (диаметр 300нм) обусловлен укладкой хроматиновой фибриллы в петли. В их образовании, по-видимому, принимают участие негистоновые белки, которые способны узнавать специфические нуклеотидные последовательности внуклеосомной ДНК, отдаленные друг от друга на расстояние в несколько тысяч пар нуклеотидов. Эти белки сближают указанные участки с образованием петель из расположенных между ними фрагментами хроматиновой фибриллы. Участок ДНК, соответствующий одной петле, содержит от 20 000 до 80 000 п.н. Возможно, каждая петля является функциональной единицей генома. В результате такой упаковки хроматиновая фибрилла преобразуется в структуру диаметром 300 нм, называемой интерфазной хромомерой и четвертый – хрономемный (диаметр 700нм) уровень упаковки ДНК в хроматиде и наконец метафазная хромосома (диаметр нити 1400 нм), которую можно наблюдать в световом микроскопе.

### 3.4. Нормальный кариотип человека. Денверская классификация хромосом

Центромера делит хромосому на короткое (p) и длинное (q) плечи. Хромосомы 13-15, 21, 22 и Y-хромосому называют акроцентрическими, потому что центромеры у них расположены практически на конце хромосомы (остальные хромосомы называют мета- и субметацентрическими).

Миниатюрное плечо p каждой акроцентрической аутосомы содержит ядрышковый

организатор, а в метафазе здесь обычно видна вторичная перетяжка (первичная - в центромере).

В метафазе они неконденсированы и не окрашиваются. Районы ядрышкового организатора примыкают к находящимся на конце короткого плеча хромосомы конденсированным участкам хроматина - спутникам. Спутники не содержат генов и являются полиморфными участками.

В небольшой части клеток удается выявить другие деконденсированные в метафазе участки, так называемые ломкие участки, где могут происходить «полные» разрывы хромосомы. Клиническое значение имеют нарушения в единственном подобном участке, расположенном на конце длинного плеча X-хромосомы. Такие нарушения вызывают синдром ломкой X-хромосомы.

Другие примеры специализированных районов хромосом - теломеры и центромеры.

Теломеры - это концевые районы хромосом, взаимодействующие с ядерной оболочкой; предполагается, что они участвуют в поддержании упорядоченной организации интерфазного ядра и в правильном спаривании гомологичных хромосом в мейозе.

Центромеры - это места присоединения микротрубочек веретена в метафазе.

Неоднородность хромосом проявляется и в асинхронной репликации их участков в периоде S. В целом, поздняя репликация характерна для неактивных участков.

У женщин одна из двух X-хромосом почти полностью инактивирована (за исключением псевдоаутосомного участка и нескольких дополнительных локусов). Инактивированная X-хромосома реплицируется поздно, в конце фазы S, а в интерфазе она конденсирована и различима под микроскопом как половой хроматин, или тельце Барра. Асинхронность репликации, которая лучше всего видна на примере X-хромосом, характерна и для отдельных участков аутосом. Предполагают, что в аутосомах такая асинхронность связана с геномным импринтингом.

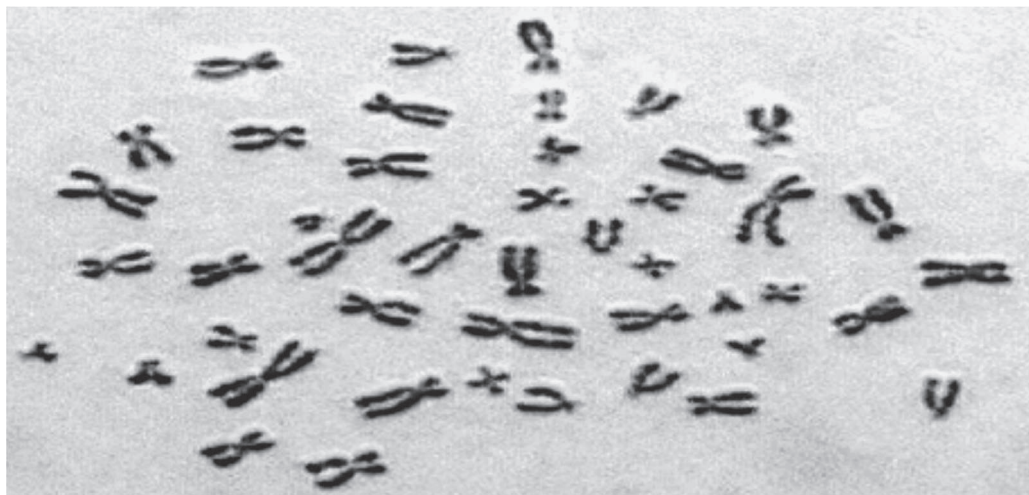
Пока точно не установлена роль гетерохроматина, на долю которого приходится значительная часть генома человека. Гетерохроматин конденсирован в течение практически всего клеточного цикла, он неактивен и реплицируется поздно. Большинство участков конденсированы и неактивны во всех клетках (конститутивный гетерохроматин), хотя другие, например, X-хромосома, могут быть как конденсированными и неактивными, так и деконденсированными и активными (факультативный гетерохроматин). Если из-за хромосомных aberrаций гены оказываются рядом с гетерохроматином, то активность таких генов может изменяться или даже блокироваться. Поэтому проявления хромосомных aberrаций, таких, как дупликации или делеции, зависят не только от затронутых локусов, но и от типа хроматина в них. Многие хромосомные аномалии, не являющиеся летальными, затрагивают неактивные или инактивируемые участки генома. Возможно, этим объясняется, что трисомии по некоторым хромосомам или моносомии по X-хромосоме совместимы с жизнью.

Проявления хромосомной аномалии зависят также от нового расположения структурных и регуляторных генов по отношению друг к другу и к гетерохроматину.

Аутосомы (все хромосомы кроме половых) образуют одинаковый набор у обоих полов. Мужской набор половых хромосом XY, женский - XX. Кариотип нормального

мужчины – 46, XY, нормальной женщины – 46, XX. Как и у всех млекопитающих, гетерогаметным полом у человека является мужской. Y-хромосома состоит преимущественно из гетерохроматина. Небольшая по длине эухроматиновая часть содержит 397 генов (при общем числе генов у человека более 25000 для одной из самых коротких хромосом это немало). Для компенсации дозы генов в клетках женского организма происходит инактивация одной из X-хромосом. X-хромосома содержит 1606 генов. Примечательно, что в ней остается небольшая неинактивированная часть, содержащая примерно четверть генов, что уравнивает дозу работающих генов у обоих полов (примерно 400 генов половых хромосом представлено двумя копиями).

Сложность в установлении количества хромосом человека (как, впрочем, и других видов) была связана с их беспорядочным расположением в анализируемых препаратах, утерей отдельных хромосом и другими техническими погрешностями. При окрашивании митотических хромосом ацидофильными (то есть связывающимися с кислотами) красителями, например эозином, или неспецифическими к нуклеотидам флуоресцентными красителями (флуорохромами – веществами, способными излучать световые волны большей длины при возбуждении светом с меньшей длиной волны) выявляется практически равномерный рисунок без исчерченности. Такая окраска называется рутинной (рисунок 3.10).



**Рисунок 3.10.** Митотические хромосомы человека, окрашенные рутинно, краситель Романовского-Гимзы – раствор эозина и метиленового синего (по материалам сайта <http://131.229.114.77/microscopy/gallm.html>).

Точное количество хромосом человека 46 было установлено в 1956 году французскими цитогенетиками Чийо и Леваном. По длине хромосомы могут быть вторичные перетяжки, которые могут образовывать ядрышки и спутники на концах хромосом. Концевые участки хромосом называются теломерами.

Окраска по Романовскому позволяет определить количественные изменения хромосом (трисомии, моносомии), и грубые нарушения структуры хромосом в группах. В этой связи в 1960 г была разработана Денверская классификация хромосом человека

(см.таблица 3.1). В основе ее лежит разделение хромосом по размеру и соотношению плеч на семь групп.

**Таблица 3.1. Денверская классификация хромосом человека**

Группа хромосом	№ хромосом	Характеристика хромосом
A	1-3	Самые крупные хромосомы, хромосомы 1 и 3 - метацентрические, 2 - субметацентрическая
B	4-5	Крупные субметацентрические хромосомы
C	6-12, X	Хромосомы 6, 7, 8, 11, 12 - средние субметацентрики, X-хромосома по размерам и морфологии сходна с хромосомами 6 и 7
D	13-15	Акроцентрические хромосомы средних размеров
E	16-18	Довольно короткие хромосомы. Хромосома 16 - метацентрик, 17 и 18 - субметацентрики
F	19-20	Самые маленькие метацентрики, между собой не различимы
G	21-22, Y	21 и 22 - самые мелкие акроцентрические хромосомы. Y-хромосома выделяется как самостоятельная, она больше чем хромосомы группы

Группа А включает хромосомы 1, 2 и 3 – это метацентрические и субметацентрические хромосомы. Хромосома 1 – самый большой метацентрик в кариотипе. Хромосома 2 является самой крупной субметацентрической хромосомой. Метацентрическая хромосома 3 отличается примерно на 1/5 по длине от хромосомы 1 и, поэтому, легко может быть идентифицирована. В проксимальном (находящемся ближе к центромере) районе длинного плеча хромосомы 3 при использовании Q-окраски выявляется очень яркий сегмент, который также позволяет безошибочно определить эту хромосому.

Группа В включает хромосомы 4 и 5 – крупные субметацентрики. Отличить их друг от друга при рутинном окрашивании невозможно.

Группа С представлена хромосомами 6-12. В эту же группу входит половая X-хромосома. Все хромосомы этой группы - метацентрики среднего размера. Индивидуально различить их можно только при помощи G-, R- или Q-окраски.

Группа D включает три пары акроцентрических хромосом средней длины – с 13 по 15. Все они содержат вторичную перетяжку – место локализации ЯОР (ядрышкообразующих районов), отделяющую небольшой по длине спутник от остальной части короткого плеча. Размеры спутников заметно варьируют у разных индивидуумов. Иногда наблюдаются два спутника.

К группе E относят короткие метацентрические и субметацентрические хромосомы с 16 по 18. Хромосома 16 – метацентрик, ее длина составляет около трети от длины хромосомы 1. Хромосомы 17 и 18 близки по центромерному индексу (около 0,30) и несколько (5-10%) различаются по длине.



Группа F объединяет две маленькие метацентрические хромосомы 19 и 20, практически неразличимые без дифференциальной окраски.

Группа G включает маленькие ацентрические хромосомы 21 и 22. К этой группе относят и половую Y-хромосому, которая отличается от других хромосом этой группы положением хроматид длинного плеча – у Y-хромосомы они расположены близко, а у хромосом 21 и 22 – широко расставлены. Размер Y-хромосомы варьирует в широких пределах за счет изменения размеров гетерохроматинового блока, не оказывающего существенного влияния на фенотип. Такая варибельность видна даже в интерфазных ядрах при окрашивании АТ-специфическими флуорохромами. В коротких плечах хромосом 21 и 22 обнаруживается вторичная перетяжка – подобно хромосомам группы D они содержат ЯОРы. Рисунки дифференциальной исчерченности хромосом 21 и 22 существенно различаются, что позволяет проводить их индивидуальную идентификацию.

### 3.5. Дифференциальная окраска метафазных хромосом. Парижская классификация хромосом

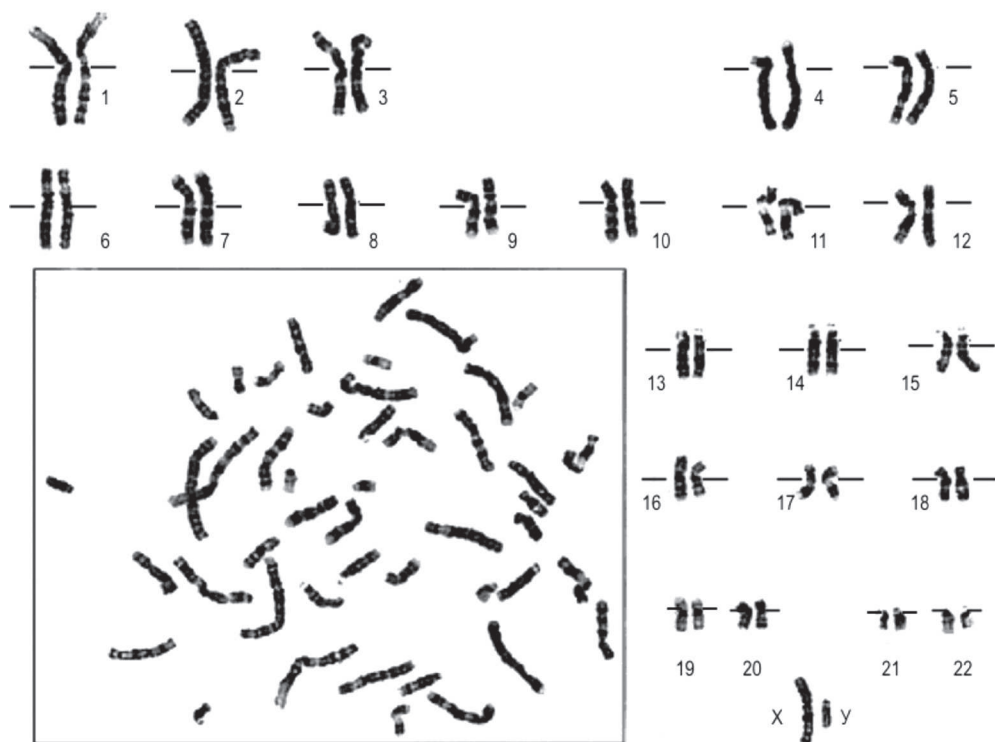
При монохромном окрашивании хромосом (ацето-кармином, ацето-орсеином, окрашиванием по Фельгену или Романовскому-Гимзе) можно идентифицировать число и размеры хромосом; их форму, определяемую прежде всего положением центромера, наличием вторичных перетяжек, спутников. В подавляющем числе случаев для идентификации индивидуальных хромосом в хромосомном наборе этих признаков недостаточно. Кроме того, монохромно окрашенные хромосомы часто очень похожи у представителей разных видов. Дифференциальное окрашивание хромосом, различные методики которого были разработаны в начале 70-х годов XX века, снабдило цитогенетиков мощнейшим инструментом для идентификации как индивидуальных хромосом в целом, так и их частей, облегчив тем самым процедуру анализа генома.

Методы дифференциального окрашивания делятся на две основные группы:

методы селективного окрашивания определённых хромосомных районов, таких как блоки конститутивного гетерохроматина, активные ядрышкообразующие районы, центромерные и теломерные районы;

методы дифференциального окрашивания эухроматиновых районов хромосом, обеспечивающие выявление в эухроматиновых районах чередующихся сегментов, так называемых бэндов (англ. *band* –полоса, лента, тесьма), которые окрашиваются с различной интенсивностью [Рубцов Н.Б,2006].

Основным методом дифференциальной окраски, широко использующийся в клинической цитогенетике является метод окрашивания хромосом краской Гимза (G- окрашивание) (рисунок 3.11).



**Рисунок 3.11.** (Рис. 66.1, Harrison). Метафазные хромосомы лимфоцитов человека <http://humbio.ru/humbio/har/00544273.htm>. Метафазные хромосомы лимфоцитов здорового человека, окрашенные красителем Гимзы (G-окрашивание). На врезке - расположение хромосом в интактной клетке, на основном рисунке - кариотип.

Для повышения точности цитогенетического анализа часто используют прометафазные и даже профазные хромосомы, что позволяет увеличить число распознаваемых сегментов дифференциального окрашивания до 850 и 1700, соответственно.

В данной клетке видны примерно 500 полос, с помощью других методов можно различить более мелкие полосы. Обычно гомологичные хромосомы окрашиваются одинаково. Исключение составляют некоторые полиморфные участки, например, темная околоцентромерная полоса на 9-й хромосоме обычно находится на длинном плече (слева), но иногда расположена на коротком плече (справа).

Для получения отчетливой G-окраски обычно используют мягкую обработку хромосом раствором трипсина с последующим окрашиванием красителем Романовского-Гимзы. По общепринятой трехбуквенной номенклатуре, которая часто используется в записи цитогенетического диагноза, такая окраска обозначается GTG (G-окраска – трипсин – Гимза).

Кариотип человека в норме состоит из 23-х пар хромосом, которые располагают под номерами в порядке убывания их линейных размеров (Рисунок 3.11).

Если перед окрашиванием митотические хромосомы обработать щелочными растворами, вымывающими ДНК в первую очередь из районов с низкой плотностью хро-

матина, можно наблюдать интенсивное окрашивание прицентромерных районов всех хромосом и практически полное интенсивное окрашивание Y-хромосомы.

Такой подход называется C-методом дифференциального окрашивания хромосом или C-бендингом. C-положительные (интенсивно окрашенные при использовании этого метода) районы хромосом соответствуют участкам генетически инертного хроматина – или гетерохроматина. Различная степень окрашивания районов хромосом при C-окраске говорит о неоднородности распределения гетерохроматина по длине хромосом.

К началу митоза каждая хромосома состоит из двух идентичных сестринских хроматид. Хромосомы идентифицируют по относительной длине, положению центромеры, а также характерному расположению и ширине полос, полученных при дифференциальном окрашивании. Число полос, различимых под микроскопом, варьирует от клетки к клетке и зависит от степени конденсированности хромосом. G<sup>+</sup>-блоки также могут быть выявлены при окрашивании хромосом AT-специфическими флуорохромами (DAPI, Хехст 33258) – это дифференциальная Q-окраска или Q-бендинг.

AT-богатые G-положительные районы связывают большее количество красителя, что приводит к их более интенсивной флуоресценции. Использование этого метода позволяет идентифицировать Y-хромосому даже в интерфазе, поскольку значительная ее часть состоит из необычайно AT-богатого гетерохроматина, который при связывании с флуорохромами дает бриллиантовое свечение.

Рисунок обратный G-бендингу получается при помощи R-метода дифференциального окрашивания путем тепловой денатурации. ГЦ-пары, которых больше в G-отрицательных районах хромосом, более устойчивы к этой процедуре. Подавляющее большинство G<sup>+</sup>-районов соответствует R- и наоборот.

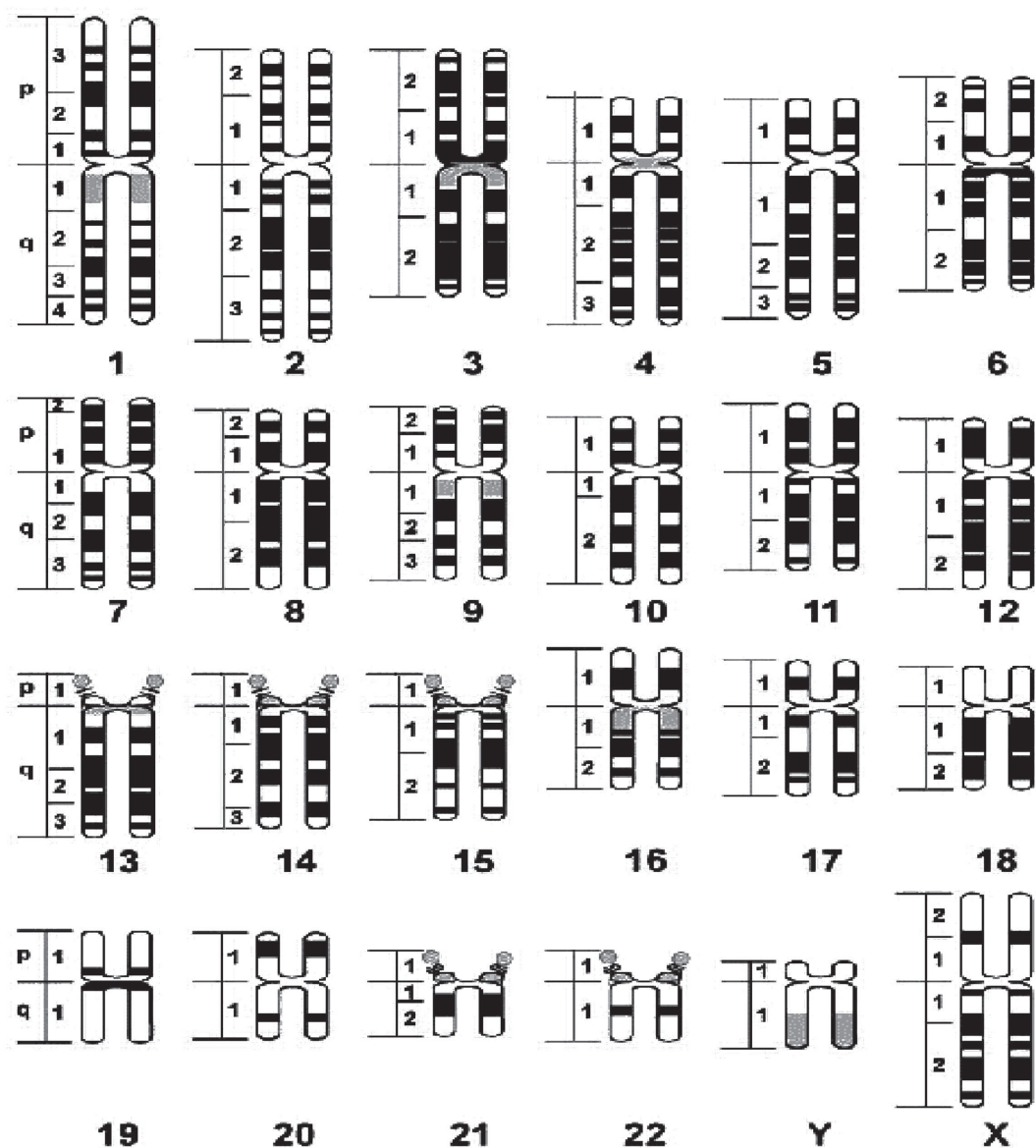
Само название этого метода происходит от английского слова reversed– обратный. R<sup>+</sup>-районы реплицируются в первой половине фазы S клеточного цикла, а G<sup>+</sup>-районы – во второй. Существуют методики выявления R-бендинга путем введения в клетки модифицированных предшественников синтеза ДНК в середине фазы S. Тогда R<sup>+</sup>-районы не будут содержать модифицированных нуклеотидов, а G<sup>+</sup>-районы – будут.

При более интенсивной тепловой обработке выявляются T-сегменты, расположенные преимущественно в прителомерных районах хромосом. Их локализация совпадает с наиболее близкими к теломере R-сегментами.

Содержание генов в T<sup>+</sup>-районах на порядок больше, чем в среднем по длине хромосомы, и больше чем в относительно обогащенных генами R<sup>+</sup>-районах. Некоторые функциональные особенности позволяют считать T-сегменты наиболее выраженными R-сегментами. В таких районах находится особенно много генов, связанных с наиболее важными функциями жизнеобеспечения клетки – генов домашнего хозяйства – и онкогенов, мутация которых может привести к злокачественной опухоли. Это определяет особое значение теломерных районов в онкогенезе.

Районы ядрышковых организаторов (ЯОР), содержащих гены рибосомной РНК и формирующих в интерфазе ядрышки, могут быть выявлены при помощи окраски нитратом серебра (AgNO<sub>3</sub>). Такой тип окраски называется N-бэндинг.

Согласно решениям Парижской конференции в 1971 году была предложена Парижская номенклатура обозначений G-сегментов хромосом человека (рисунок 3.12).



**Рисунок 3.12.** Систематические изображения G-сегментов хромосом человека и система их обозначения согласно решениям Парижской конференции в 1971 г. Цифрами обозначены номера хромосом; X и Y половые хромосомы; p – короткое, q – длинное плечи хромосом. <http://www.studfiles.ru/preview/2230013/>

Цифрами обозначены номера хромосом, короткое плечо (p) и длинное (q) плечо, с выделением в них районов и сегментов, и с обозначением нарушений (делеций, дупликаций, транслокаций, инверсий) кариотипа. Например, 46XXdel1p2.2 означает делецию второго сегмента второго района короткого плеча хромосомы 1.

### 3.6. Методы детекции хромосомных перестроек: общие сведения

Хромосомные перестройки впервые были обнаружены у дрозофил при помощи генетического анализа. В некоторых скрещиваниях соотношение числа потомков в разных классах сильно отличалось от ожидаемого, и это объяснили наличием перестроек в хромосомах родителей. Делеции, дубликации и транслокации обнаружил К. Бриджес в 1916, 1919 и 1923 годах, соответственно. Первую инверсию описал Алфред Стёртевант в 1921 году, сравнивая порядок генов в хромосоме 3 у *D. melanogaster* и *D. simulans*.

Первые цитологические наблюдения хромосомных перестроек были сделаны на политенных хромосомах слюнных желез дрозофилы. Лишь спустя некоторое время хромосомные перестройки были показаны на митотических хромосомах [Коряков Д. Е., Жимулев И. Ф. 2009].

Цитологически хромосомные перестройки могут быть выявлены также в профазе первого деления мейоза на стадии пахитены благодаря синапсису гомологичных участков хромосом. Подобный анализ был впервые проведен Барбарой Мак-Клинток в 1930 году при изучении транслокации у кукурузы [В. В. Хвостова, Ю. Ф. Богданов.1975; McClintock В. 1930].

В медицинской генетике хромосомные перестройки выявляют и анализируют при помощи цитогенетических методов, наиболее часто анализ хромосомных перестроек проводят цитологически на стадии метафазы. Самым распространенным и доступным цитогенетическим методом является метод дифференциальной G-окраски хромосом (G-бэндинг). С конца 1980-х годов для выявления хромосомных перестроек применяют метод флуоресцентной гибридизации *in situ* с использованием ДНК-проб к отдельным хромосомам или хромосомным локусам. ДНК имеет двунитевую структуру. Это дает возможность провести плавление (денатурацию), то есть перевести ДНК в однонитевую форму, затем восстановить двунитевую структуру по принципу комплиментарности с использованием однонитевой молекулы ДНК-зонда - иными словами провести гибридизацию двух молекул ДНК. Если молекула ДНК-зонда содержит меченые нуклеотиды, ее можно выявить при помощи одной из систем детекции гибридизационного сигнала. Гибридизация нуклеиновых кислот *in situ* (от лат. *in situ* – на месте) подразумевает проведение процедуры непосредственно на цитологическом препарате хромосом, интерфазных ядер или цитоплазмы.

Изначально метод гибридизации *in situ* применялся только для локализации повторяющихся последовательностей, сгруппированных в одном или нескольких районах митотических хромосом, благодаря чему они образуют относительно крупный участок связывания (мишень) для молекул зонда. В 80-е годы XX столетия стали появляться сообщения о применении метода гибридизации *in situ* для локализации уникальных последовательностей на митотических хромосомах с использованием статистического анализа.

Выявление уникальных последовательностей ДНК в митотических хромосомах требует соблюдения трех условий. Во-первых, зонды должны быть надежными: четко охарактеризованными и чистыми. Во-вторых, необходимы специальные приемы, облегчающие связывание молекул зонда и мишени в хромосомах. В-третьих, неспецифи-

ческое связывание ДНК-зонда с цитологическим материалом должно быть сведено к абсолютному минимуму. Выполнение первого условия в настоящее время практически не вызывает затруднений, поскольку для получения ДНК-зондов можно использовать технологию генной инженерии. Второе условие также выполнимо благодаря использованию декстран сульфата - агента, эффективно повышающего (примерно в 10 раз) скорость ренатурации одноцепочечных молекул ДНК в растворе. Это способствует образованию протяженных сотовидных конгломератов одноцепочечных молекул ДНК, связанных между собой за счет случайно расположенных двухцепочечных участков. Использование в качестве метки радиоактивных изотопов позволяет эффективно локализовать даже небольшие фрагменты ДНК – порядка 1-2 т.п.н. Основными недостатками изотопного варианта гибридизации являются относительно низкая разрешающая способность, необходимость длительной процедуры автордиографии и технические сложности, связанные с хранением и использованием радиоактивных веществ.

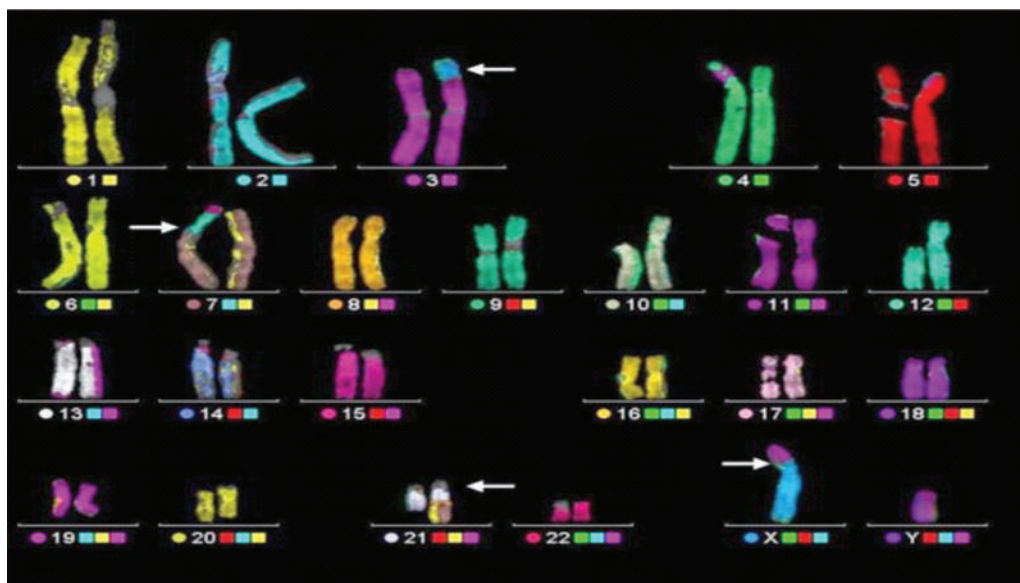
### **3.6.1. Гибридизация *in situ*, хромосомный пейнтинг**

Негативные аспекты использования радиоактивной метки служили стимулом для попыток разработать эквивалентные по эффективности, но более безопасные, быстрые и дешевые методы. В результате были разработаны методы гибридизации с использованием нерадиоактивно меченых зондов, выявляемых посредством различных иммунохимических методов. Было установлено, что новая технология гибридизации обладает рядом преимуществ, к которым относится ее полная безопасность для исследователя. Другим положительным свойством нерадиоактивно меченых зондов является их химическая устойчивость в течение нескольких месяцев. Применение нерадиоактивных меток обеспечивает более высокую разрешающую способность, чем работа с изотопами, а в ряде случаев повышает уровень информативности. Неизотопная гибридизация позволяет картировать (то есть определять местоположение на хромосоме) уникальные гены размером около 1 т.п.н. Наконец, результаты гибридизации можно анализировать сразу после проведения эксперимента. Таким образом, преимущества нерадиоактивного мечения зондов заключаются в высокой разрешающей способности, точности, воспроизводимости, дешевизне и безопасности. (рисунок 3.13)

Чувствительность данного метода зависит от размера гена, количества его копий, специфической активности зонда, а также от количества молекул флуорохрома, присутствующих в гибриде на заключительной стадии эксперимента.

Неизотопный вариант гибридизации *in situ* позволяет использовать несколько ДНК-зондов, меченных разными агентами, на одном цитологическом препарате многоцветная гибридизация. Такой подход используют для тонкого интерфейсного картирования с разрешающей способностью до 100 т.п.н. Для выявления тонких хромосомных перестроек и для быстрой идентификации хромосом применяют метод хромосомного пейнтинга - в этом случае в качестве зонда для гибридизации используют последовательности из хромосомоспецифических библиотек. Одновременно можно использовать несколько хромосомоспецифических зондов и получить изображение, где каждая хромосома представлена своим цветом.

Присутствие фрагментов другого цвета на хромосоме будет говорить о хромосомной перестройке (рисунок 3.13).



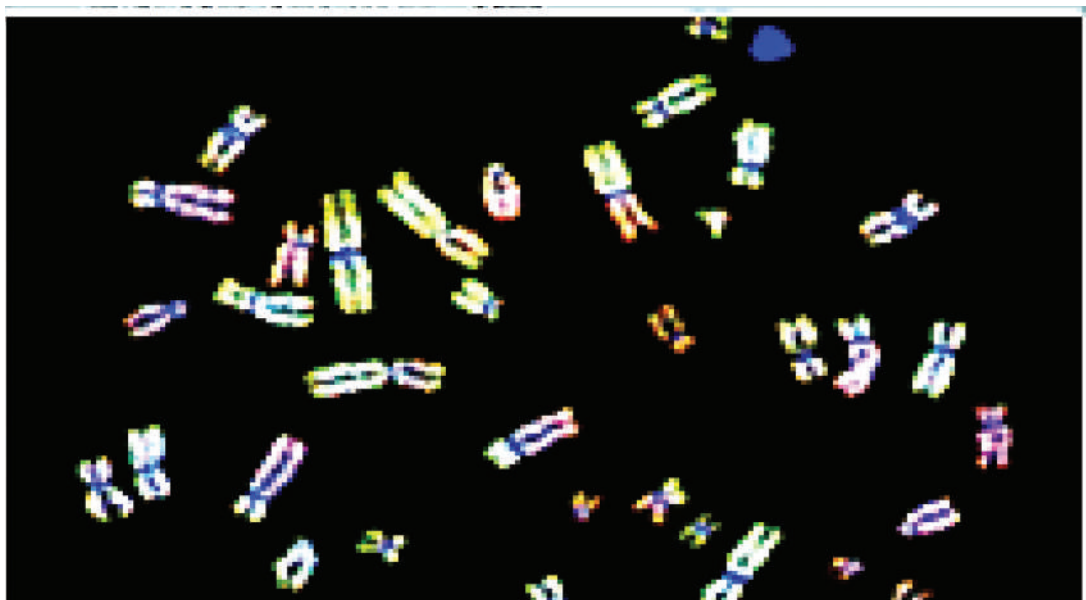
**Рисунок 3.13.** Транслокации фрагментов хромосом человека отмечены стрелками на многоцветной фотографии флуоресцентная гибридизация in situ. . <https://www.google.kz/search?q=рисунки+хромосом+человека&espv=>

В последние годы для картирования геномов высших эукариотов используют протяженные ДНК-зонды величиной 10-150 т.п.н., которые, как правило, клонируют в космидах или в искусственных хромосомах дрожжей или бактерий. Применение перекрывающихся протяженных ДНК-клонов (контигов) позволяет связать хромосомный и молекулярный уровни картирования геномов. Расположение и ширина полос идентичны в каждой паре гомологичных хромосом, за исключением полиморфных участков, поэтому окрашивание можно использовать в клинической цитогенетике для идентификации хромосом и выявления в них структурных нарушений (рисунок 3.13).

**Multi Media Catalog FISH (MMC FISH)** – это специализированное программное обеспечение для автоматизации методики FISH (Fluorescence in Situ Hybridization флуоресцентная гибридизация in situ).

FISH – широко распространенный цитогенетический метод, который применяют in situ для детекции и определения положения специфической последовательности ДНК на хромосомах. Для определения участков хромосом, с которыми связались флуоресцентные пробы, используют флуоресцентные микроскопы, высокочувствительные камеры и специальное ПО. Метод FISH часто применяют для поиска специфических участков ДНК для генетических консультаций, в медицине и идентификации видов. FISH также применяют для детекции и определения расположения специфических мРНК в образце ткани. В последнем случае метод FISH позволяет установить пространственно-временные особенности экспрессии генов в клетках и тканях.

**MC FISH** представляет собой программный модуль, встраиваемый в MultiMedia Catalog или MMC MultiMeter, и предназначенный для удобной работы по методу флуоресцентной гибридизации *in situ* (Рисунок 3.14).



**Рисунок 3.14.** **MC FISH** представляет собой программный модуль, встраиваемый в MultiMedia Catalog или MMC MultiMeter, и предназначенный для удобной работы по методу флуоресцентной гибридизации *in situ*

**MMC FISH** представляет собой программу для анализа изображений на основе базы данных MultiMedia Catalog, предназначенную для удобной работы по методу флуоресцентной гибридизации *in situ*.

- Съемка серии черно-белых изображений с использованием необходимого числа светофильтров с последующим цветокодированием по выбору пользователя, либо съемка серии цветных изображений. Удобные пользовательские настройки карты маркеров.

- Хранение исходных ч/б изображений и результирующего изображения во встроенной базе данных MultiMedia Catalog вместе с любой сопровождающей текстовой информацией, изображениями и документами. Программа позволяет производить гибкий поиск данных, делать выборки, а также распечатывать информативные и презентабельные отчеты для пациентов, содержащие графики, изображения и прочую информацию в том виде, который наиболее удобен для Вашей лаборатории или НИИ.

- **Коррекция** сдвига исходных изображений.
- Автоматическое построение **результирующего изображения** флуоресцентных маркеров.

- Набор **фильтров** для улучшения визуального отображения маркеров: яр-



кость, контраст, гамма. Результирующее изображение автоматически перестраивается в соответствии с проведенными изменениями.

- Возможность проведения ручных измерений для решения индивидуальных задач (необходим объект-микрометр для калибровки).

Для съемки флуоресцентных препаратов даже с самым слабым свечением предлагаются в комплекте с ПО MMC FISH камеры для флуоресцентного микроскопа на сенсорах Sony Exmor Pregius IMX249, IMX265 и IMX264 в монохромном варианте или в цветном. Рекомендуется использование ч/б камер, так как они имеют несколько большую чувствительность в связи с отсутствием цветных фильтров на сенсоре. Также возможно производство специализированных систем ввода под особые задачи пользователей.

Возможность проведения автоматических измерений (размеры, оптическая плотность и т.п.) при подключении к MMC MultiMeter.

### 3.6.2. Сравнительная геномная гибридизация

Одним из наиболее точных методов обнаружения небольших дупликаций и делеций в настоящее время является метод сравнительной геномной гибридизации на препаратах метафазных хромосом или ДНК-микрочипах. Дупликации и делеции могут быть выявлены и при полногеномном SNP-генотипировании (Single nucleotide polymorphism, SNP, произносится как снип - однонуклеотидный полиморфизм). Следует отметить, что два последних метода не позволяют выявлять сбалансированные хромосомные перестройки и, в отличие от других цитогенетических методов, не позволяют проводить анализ хромосомных aberrаций на уровне отдельной клетки, то есть являются нечувствительными для случаев мозаицизма.

В случае SNP гетерогенность первичной структуры ДНК проявляется в однонуклеотидных различиях аллелей.

Метод сравнительной геномной гибридизации на микрочипах (aCGH) позволяет одновременно оценить все 24 хромосомы. Данный метод обладает высокой чувствительностью и точностью и позволяет проводить анализ по единственной клетке. Валидация метода aCGH, по данным литературы, показала его высокую эффективность: только для 2,9% эмбрионов результат анализа не был получен, а уровень ошибки составил 1,9%. Методом aCGH проведена диагностика на 70 бластоцистах у 11 пациенток. Возраст пациенток составил от 25 до 43 лет. В настоящее время кариотипирование единичных бластомеров или клеток трофобласта проводят с помощью сравнительной геномной гибридизации генетического материала, получаемого из этих клеток эмбриона на ранних стадиях его развития, на микрочипе (по-английски Array-based Comparative Genomic Hybridization - aCGH). Микрочип представляет собой миниатюрное стекло (идентичное по размерам обычному предметному стеклу для микроскопа), на которое в строго определенном порядке нанесены фрагменты ДНК различных участков всех хромосом человека. Генетический материал, полученный из исследуемого эмбриона, фрагментируют и метят специальными флуоресцентными красителями, позволяющими впоследствии легко детектировать ДНК. После этого проводят гибридизацию исследуемой ДНК с микрочипом, т. е. с теми фрагментами нормальной ДНК, которые нанесены на него (рисунок 3.15).

После этого, зная соответствие каждого микрометра поверхности микрочипа определенному фрагменту определенной хромосомы, можно судить о копияности этого локуса в исследуемом образце. Таким образом, проводится анализ потери или наличия лишних хромосом (анэуплоидий), крупных хромосомных перестроек (делеций, дупликаций).

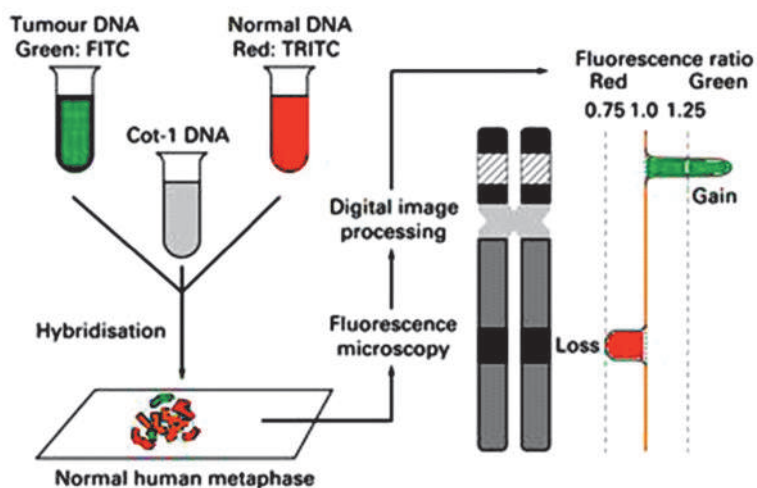
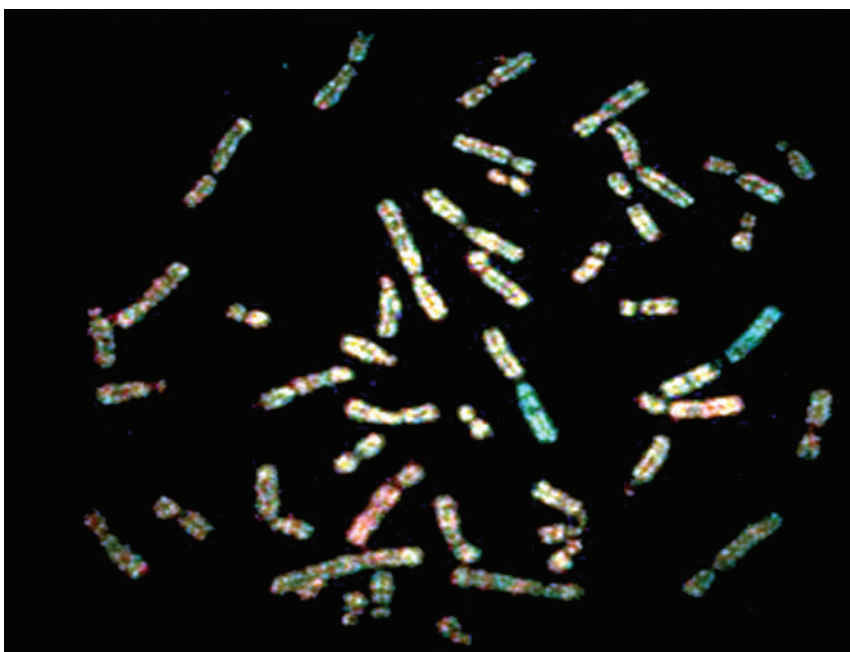


Рисунок 3.15. Сравнительная геномная гибридизация генетического материала на микрочипе (<https://www.babyblog.ru/community/post/sterility/3044357> © BabyBlog.ru)

Однако мало кто знает, что столь мощный и высокоразрешающий метод, как aCGH, был разработан и применяется в клинической практике не так давно. Первоначально сравнительная геномная гибридизация заключалась в сравнении паттерна гибридизации меченой ДНК, выделенной из исследуемого биологического образца, с меченой другой краской ДНК, выделенной из нормального контрольного образца, на препарате метафазных хромосом. В норме фрагменты ДНК из исследуемого и контрольного образцов равномерно покрывают окрашенный ими препарат метафазных хромосом, которые в таком случае окрашиваются смешанных цветом. Если в исследуемом образце имеется крупная делеция какого-либо участка (или всей) хромосомы, на метафазных хромосомах в этом месте будет гибридизоваться только контрольная ДНК, что приведет к окраске этого локуса только одной краской, соответствующей нормальной ДНК. Если же какой-то локус (или целая хромосома) окрашен только краской, соответствующей исследуемому образцу, это свидетельствует о том, что данный локус дублирован в исследуемом образце или же что имеет место лишняя хромосома (рисунок.3.16).



**Рисунок 3.16.** Сравнительная геномная гибридизация на метафазных хромосомах (Источник: <https://www.babyblog.ru/community/post/sterility/3044357> © BabyBlog.ru)

Понятно, что разрешающая способность, т. е. способность детектировать небольшие перестройки хромосом, метода сравнительной геномной гибридизации на метафазных хромосомах не высока, и с его помощью можно «разглядеть» лишь очень крупные перестройки или диагностировать существенные изменения в кариотипе, как-то: потеря или приобретение целой хромосомы или ее большей части (например, целого плеча).

Разрешающая способность a-CGH (array Comparative Genomic Hybridization), выполняемой на микрочипах, значительно выше. Однако следует различать СГГ, как метод молекулярного кариотипирования, и как метод детекции анеуплоидий (неправильного числа хромосом). Максимальная чувствительность метода требуется, например, для установления генетической причины заболеваний, сопряженных с делециями, у больных детей. Также сложные случаи пренатальной диагностики, когда нужно установить причину врожденных пороков развития плода, требует СГГ высокого разрешения (молекулярного кариотипирования). С другой стороны, в практике ПГД - преимплантационной генетической диагностики - используется вариант СГГ с меньшим разрешением. Дело в том, что в геноме человека возможно бесконечное количество перестроек, и клиническое значение большинства из них неизвестно. Поэтому такие «случайные находки» происходили бы постоянно, но отбраковывать на основании таких данных эмбрион - неправильно. Основная задача преимплантационного скрининга - отсеять эмбрионы с заведомо патологическими мутациями, такими, как лишняя или недостающая хромосома, и при этом провести анализ на минимально возможном количестве материала, чтобы не снижать жизнеспособность эмбриона.

В последние годы для выявления тонких хромосомных перестроек, размер которых может лежать за пределом разрешающей способности микроскопа, используют метод сравнительной геномной гибридизации (CGH – comparative genomic hybridization). Суть метода заключается в количественной оценке ДНК, связывающейся с молекулой короткого зонда на биочипе (Рисунок 3.17).

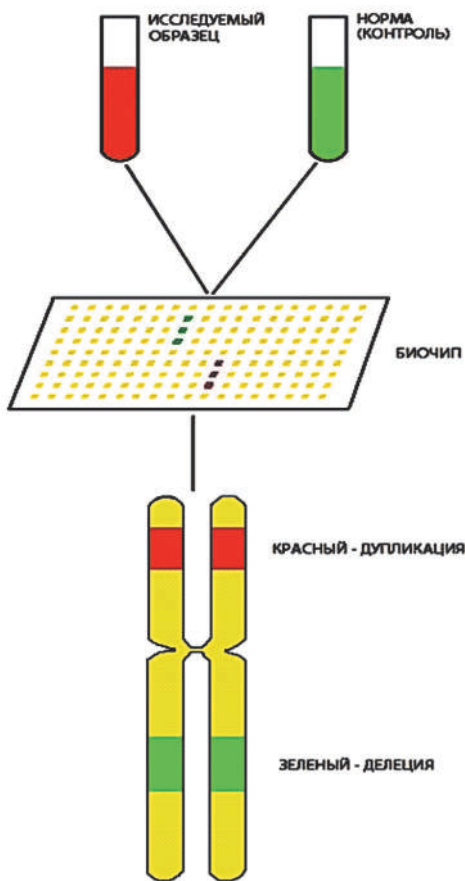


Рисунок 3.17. Схема метода сравнительной геномной гибридизации (CGH). [preview/2230013/page:4/](http://preview/2230013/page:4/)

Трудно переоценить значение таких маркеров, особенно широко распространенных в геноме высокополиморфных коротких tandemных повторов, для картирования генома человека. В частности, они позволяют установить точный порядок и характер взаимодействия локусов, играющих важную роль в обеспечении нормального онтогенеза и клеточной дифференцировки. Это касается и тех локусов, мутации в которых приводят к наследственным заболеваниям.

Различные под микроскопом участки на коротком плече акроцентрических аутосом обеспечивают синтез рРНК и образование ядрышек, поэтому их называют районами ядрышкового организатора.

Благодаря внедрению современных методов анализа хромосом (кариотипа) были картированы гены многих наследственных заболеваний человека (рисунок 3.18).

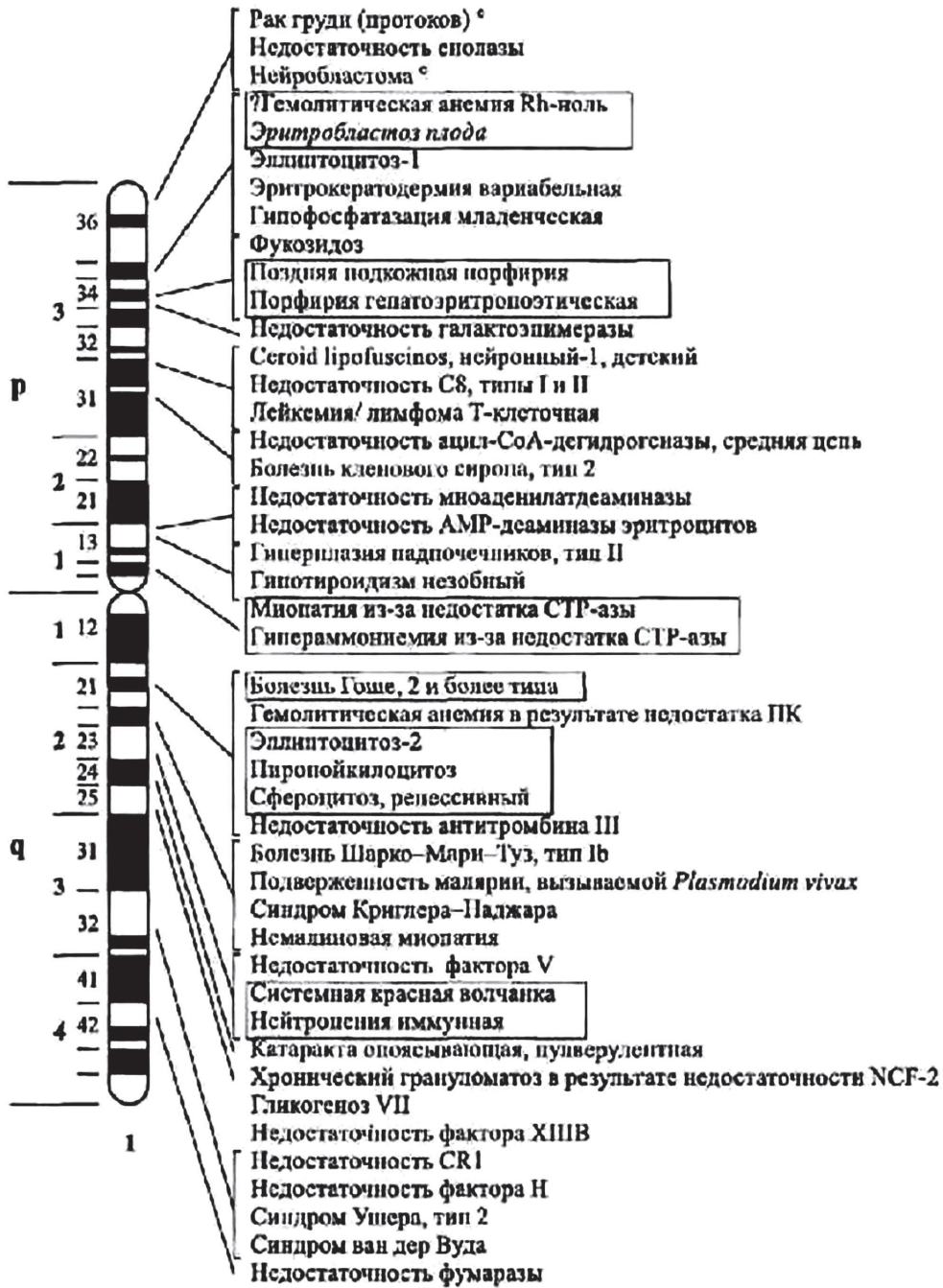


Рисунок 3.18. Гены болезней, картированные в первой хромосоме [McKusick, 1992-из Пузырева В. П., 1996. С.25] <http://www.studfiles.ru/preview/1903107/>

Наряду с нуклеотидными последовательностями составной частью сведений о геноме человека являются генетические карты хромосом – схемы, описывающие расположение генов и других элементов на хромосоме с указанием расстояния между ними в сантиморганах. Всего число картированных генов человека превышает 30000.

Нормальный кариотип человека представлен 46-ю хромосомами. Это 22 пары аутосом и одна пара половых хромосом (XY в мужском кариотипе и XX – в женском). В нижеприведённой таблице 3.2 показано число генов и оснований в хромосомах человека:

**Таблица 3.2. Число генов и оснований в хромосомах человека**

Хромосома	Всего оснований [32]	Количество генов [33]	Количество белок-кодирующих генов [34]
<u>1</u>	249250621	3511	2076
<u>2</u>	243199373	2368	1329
<u>3</u>	198022430	1926	1077
<u>4</u>	191154276	1444	767
<u>5</u>	180915260	1633	896
<u>6</u>	171115067	2057	1051
<u>7</u>	159138663	1882	979
<u>8</u>	146364022	1315	702
<u>9</u>	141213431	1534	823
<u>10</u>	135534747	1391	774
<u>11</u>	135006516	2168	1914
<u>12</u>	133851895	1714	1068
<u>13</u>	115169878	720	331
<u>14</u>	107349540	1532	862
<u>15</u>	102531392	1249	615
<u>16</u>	90354753	1326	883
<u>17</u>	81195210	1773	1209
<u>18</u>	78077248	557	289
<u>19</u>	59128983	2066	1492
<u>20</u>	63025520	891	561
<u>21</u>	48129895	450	246
<u>22</u>	51304566	855	507
<u>X-хромосома</u>	155270560	1672	837
<u>Y-хромосома</u>	59373566	429	76
<b>Всего</b>	<b>3 079 843 747</b>	<b>36463</b>	<b>21364</b>

### Литература

1. Bolzer, Andreas; Kreth, Gregor; Solovei, Irina; Koehler, Daniela; Saracoglu, Kaan; Fauth, Christine; Müller, Stefan; Eils, Roland; Cremer, Christoph; Speicher, Michael R.; Cremer, Thomas (2005). “Three-Dimensional Maps of All Chromosomes in Human Male

Fibroblast Nuclei and Prometaphase Rosettes". *PLoS Biology*. 3 (5): e157. DOI:10.1371/journal.pbio.0030157. PMC 1084335. PMID 15839726.

2. Dernburg A. F. Here, there, and everywhere: kinetochore function on holocentric chromosomes//The Journal of Cell Biology. – 2001. – Vol. 153, no. 6. – P. F33—F38. –PMID 11402076.

3. Ensembl. Location: whole genome (англ.). // The Ensembl project. Проверено 25 апреля 2013. Архивировано 28 апреля 2013 года.

4. Gall J. G. Are lampbrush chromosomes unique to meiotic cells? // *Chromosome Research*. – 2012. – Vol. 20, no. 8. – P. 905—909. – DOI:10.1007/s10577-012-9329-5. – PMID 23263880.

5. Hassold T., Hall H., Hunt P. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going // *Human Molecular Genetics*. – 2007. – Vol. 16, spec. no. 2. – P. R 203—R208. – DOI:10.1093/hmg/ddm243. –PMID 17911163.

6. Holland A. J., Cleveland D. W. Losing balance: the origin and impact of aneuploidy in cancer // *EMBO Reports*. –2012. –Vol. 13, no. 6. –P. 501—514. –DOI:10.1038/embor.2012.55. –PMID 22565320.

7. Homo sapiens Genome: Statistics – Build 37.3. // NCBI. Проверено 18 апреля 2013.

8. Human Genome Assembly Information (англ.). // Genome Reference Consortium. Проверено 18 апреля 2013.

9. Macgregor H. So what's so special about these things called lampbrush chromosomes? // *Chromosome Research*. – 2012. – Vol. 20, no. 8. – P. 903—904. –DOI:10.1007/s10577-012-9330-z. –PMID 23239398.

10. Mandrioli M., Manicardi G. C. Unlocking holocentric chromosomes: new perspectives from comparative and functional genomics? // *Current Genomics*. –2012. –Vol. 13, no. 5. –P. 343—349. –DOI:10.2174/138920212801619250. –PMID 23372420.

11. Morgan T. H., Sturtevant A. H., Muller H. J., Bridges C. B. The mechanism of mendelian heredity. –New York: Henry Holt and Company, 1915. –262 с.

12. Pikaard C. S. The epigenetics of nucleolar dominance // *Trends in Genetics*. – 2000. – Vol. 16, no. 11. –P. 495—500.

13. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1933 (англ.). // Nobel Media AB 2013. Проверено 11 декабря 2013.

14. Браун Т. А. Геномы/Пер. с англ. = Genomes. – М.-Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2011. – 944 с. – ISBN 978-5-4344-0002-2.

15. Вершинин А. В. Центромеры и теломеры хромосом // *Природа*. – 2007. – № 9. – С. 21—27.

16. Захаров А. Ф., Бенюш В. А., Кулешов Н. П., Барановская Л. И. Хромосомы человека. Атлас. – М.: Медицина, 1982. – 263 с.

17. Зошук Н. В., Бадаева Е. Д., Зеленин А. В. История современного хромосомного анализа. Дифференциальное окрашивание хромосом растений // *Онтогенез*. – 2003. – Т. 34, № 1. – С. 5—18. –PMID 12625068.

18. Инге-Вечтомов С.Г. Генетика с основами селекции: учебник для студентов высших учебных заведений / С. Г. Инге-Вечтомов. – СПб.: Изд-во Н-Л, 2010. с. 84—87. с. 401—414., с. 30.

19. Коряков Д.Е., Жимулев И.Ф. Хромосомы. Структура и функции. – Новосибирск: Из-во СО РАН, 2009. – 258 с. с.9, с 12,с.30 , с. 91.
20. Коряков, Жимулёв, 2009, – 258 с. с.9, с 12,с.29-31,с.45-46, с. 91.
21. Молекулярная биология клетки: в 3-х томах / Б. Альбертс, А. Джонсон, Д. Льюис и др. –М.-Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», Институт компьютерных исследований, 2013. –Т. I. –808 с. –ISBN 978-5-4344-0112-8. – С. 325—359.
22. Разин С. В. Хроматин: упакованный геном / С. В. Разин, А. А. Быстрицкий. – М.: БИНОМ: Лаборатория знаний, 2009. –176 с. –ISBN 978-5-9963-0087-7.
23. Рубцов Н. Б. Методы работы с хромосомами млекопитающих: Учеб. пособие. –Новосибирск: Новосиб. гос. ун-т, 2006. –152 с. –ISBN 5-94356-376-8.
24. Рубцов Н. Б. Организация хромосом: 70 лет спустя // Природа. –2012. – № 10. – С. 24—31.
25. Рубцов Н. Б. Хромосома человека в четырёх измерениях // Природа. –2007. – № 8. –С. 3—10.
26. Смирнов А. Ф. Структурно-функциональная организация хромосом. – СПб.: Нестор-История, 2009. – 204 с. – ISBN 978-5-98187-486-4.
27. Тарантул В. З. Толковый биотехнологический словарь. –М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – 400 экз. – ISBN 978-5-9551-0342-6.
28. Филипченко Ю. А. Генетика. –Л.: Типография «Печатный Двор», 1929. –379 с.
29. Ченцов Ю. С., Бураков В. В. Хромонема –забытый уровень укладки хроматина в митотических хромосомах // Биологические мембраны. –2005. –Т. 22, № 3. – С. 178—187. –ISSN 0233-4755.

**Контрольные вопросы:**

1. Назовите типы метафазных хромосом.
2. Чем представлен генетический материал прокариот и эукариот?
3. В чем различие Денверской и Парижской классификация хромосом человека?
4. Какие уровни компактизации хроматина установлены?
5. Какие виды окрашиваний хромосом применяются для определения количества и структуры хромосом?



ГЛАВА. 4

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛА У ЧЕЛОВЕКА (БИОЛОГИЯ)

4.1. Пол у человека. Детерминация пола у человека

Определение пола у человека в биологии – процесс развития половых различий у людей. Этот процесс определяется как развитие фенотипических структур в результате воздействия гормонов, которые вырабатываются в зависимости от развития гонад (рисунок 4.1) [Hughes, Ieuan A, 2001]. Развитие половых различий, или половая дифференциация, включает в себя развитие гениталий и внутренних половых путей, молочных желёз, волос на теле и играет роль при гендерной идентификации [Sizonenko, P.C., 2015].

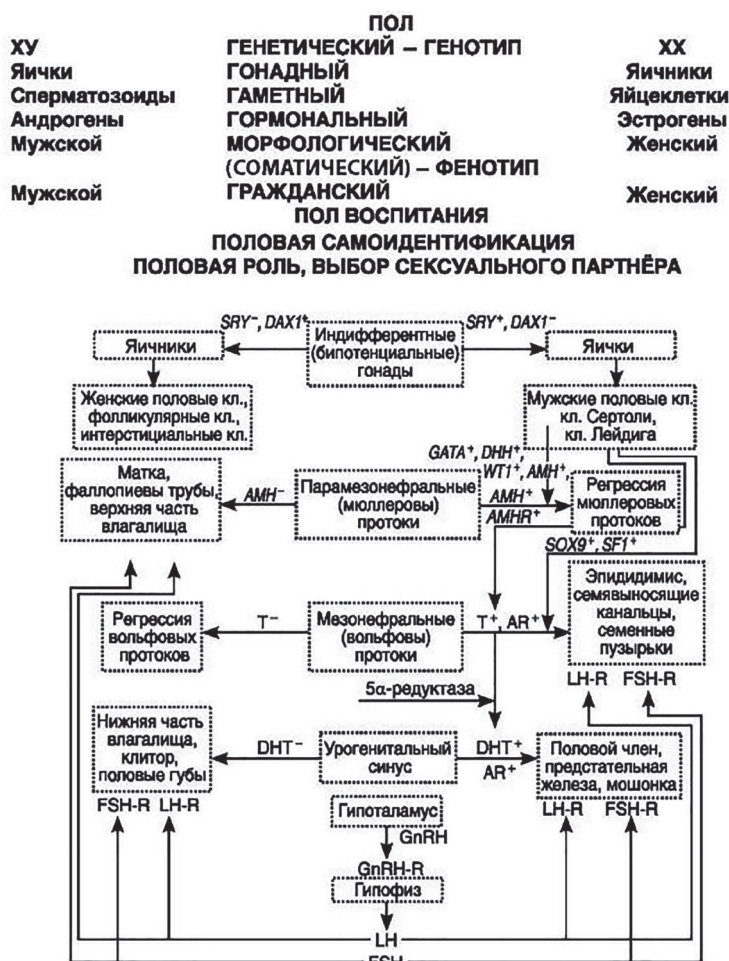


Рисунок 4.1. Схема уровней дифференцировки пола у человека, предложенная Г.С.Васильченко в 1990г (Из Черных, Курило, 2001)

Физиологической основой механизма определения пола является бисексуальность эмбриональных гонад млекопитающих. В таких прогонадах одновременно присутствуют Мюллеров проток и Вольфов канал – зачатки половых путей соответственно самок и самцов. Первичная детерминация пола начинается с появления в прогонадах специализированных клеточных линий – клеток Сертоли. В последних синтезируется предсказанный Жостом антимюллеровский гормон, ответственный за прямое или опосредованное ингибирование развития Мюллерова протока – зачатка будущих фаллопиевых труб и матки.

Критическая стадия развития индифферентных гонад – 8-я неделя внутриутробного развития. До 45-50 дня зачатки гонад не имеют половой дифференцировки. Под влиянием регуляторного фактора TDF, кодируемого Y-хромосомой, а также под влиянием дополнительных факторов (напр имер, гены Sox хромосомы 17) гонадные валики развиваются как яички; при отсутствии эффектов этого фактора развиваются яичники. Дифференцировку других структур определяют мужские половые гормоны и мюллеров ингибирующий фактор, продуцируемые в яичках плода. Клетки Лёйдига яичек плода под контролем гонадотропинов (хорионического и гипофизарного) секретируют тестостерон (рисунок 4.1).

Под влиянием тестостерона из мезонефрального протока развиваются: семявыносящий проток, придаток яичка, семенные пузырьки. 5 $\alpha$ -Редуктаза катализирует превращение тестостерона в дигидротестостерон (ДГТ), необходимый для завершающейся к 12-14 неделям внутриутробного развития дифференцировки наружных половых органов (мошонка, половой член). Клетки Сертоли яичек плода секретируют мюллеров ингибирующий фактор (МИФ), вызывающий регрессию мюллеровых протоков у плода мужского пола.

Дифференцировка по женскому типу при кариотипе 46XX происходит при отсутствии определяющего развитие яичек фактора Y-хромосомы, тестостерона, ДГТ и МИФ.

При отсутствии Y-хромосомы гонадные валики развиваются как яичники.

При отсутствии МИФ мюллеров проток развивается в маточные трубы, матку и верхнюю треть влагалища. При отсутствии тестостерона и ДГТ вольфов проток дегенерирует. Яичники начинают функционировать в пубертате; формирование по женскому фенотипу идёт автономно, под влиянием гормонов плаценты у беременной. По мнению ряда исследователей, процесс взаимодействия генетических регуляторов половой дифференцировки у человека, скорее всего, можно сравнить с сетью, где действие всех генов взаимосвязано и взаимообусловлено.

В женском организме в индифферентных гонадах развивается преимущественно корковое и атрофируется мозговое вещество.

В мужском организме преимущественное развитие получает мозговое вещество индифферентной гонады.

Развитие внегонадных половых структур (таблица 4.1) происходит из вольфова и мюллерова протоков, наружные половые органы дифференцируются из мочеполового синуса, полового бугорка, половых складок и половых валиков.

Женские половые гормоны способствуют дифференцировке внегонадных органов женской половой системы.

К мужским половым органам относятся яички, придатки яичек, семявыносящие протоки, семенные пузырьки, предстательная железа и половой член.

**Таблица 4.1 Дифференцировка структур мочеполовой системы**

Мужские половые структуры	Индифферентные структуры	Женские половые структуры
сперматозоиды	первичные половые клетки	яйцеклетки
яичко	индифферентная гонада	яичник
сеть яичка, придаток, семявыносящие протоки, семенные пузырьки	вольфов проток	
	мюллеров проток	матка, маточные трубы, верхняя часть влагалища
Предстательная железа.	мочеполовой синус	нижняя часть влагалища, мочево
бульбоуретральные железы, мочево		пузырь, уретра
пузырь, уретры		
полово	полово	клитор
член	бугорок	
дистальна	складки	малые половые губы
часть уретры		
мошонка	валики	большие половые губы

Клетки Сертоли яичек плода секретируют мюллеров ингибирующий фактор, вызывающий регрессию мюллеровых протоков у плода мужского пола.

Только под влиянием тестостерона, продуцируемого фетальными клетками Лёйдига, вольфовы протоки формируют сеть яичка, придаток, семявыносящие протоки и семенные пузырьки.

## 4.2. Гены, изменяющие пол. Механизмы детерминации пола у дрозофилы

Одно из первых прямых доказательств генетической детерминации пола было получено А. Стёртевантом: в 1945 г. им был открыт ген, изменяющий пол и влияющий на развитие первичных половых признаков. В одном из экспериментов по скрещиванию дрозофил наблюдалось не обычное расщепление по полу (50% самцов и 50% самок), а расщепление, в котором на 62,5% самцов приходилось 37,5% самок, А. Стёртевант показал, что этот феномен обусловлен аутосомным рецессивным геном *tra* (в схеме скрещивания он обозначен буквой *t* – трансформатор пола), локализованным в третьей хромосоме дрозофилы. В гомозиготном состоянии этот ген обуславливает развитие фенотипически нормальных, но стерильных самцов из зигот, имеющих две X-хромосомы. Самец XY, гомозиготный по гену *t*, является плодовитым. Если нормальных самок (XX *t+t*) скрещивают с самцами, гомозиготными по указанному гену (XY *tt*), то в первом поколении самки имеют генотип XX *t+t*, а самцы – XY *t+t*.

Показано, что пол у дрозофилы определяется генами: Sex-lethal (*Sxl*), transformer (*tra*), transformer-2 (*tra-2*), doublesex (*dsx*) M и F, intersex (*ix*), sisterless (*sis*) a и b, daughterless (*da*). Установлено, что многоступенчатый процесс половой детерминации

начинается с образования комплекса из белковых продуктов генов *sis-a* и *sis-b*, расположенных в X-хромосоме, и аутосомного гена *da*. Наличие большого числа комплексных молекул *sis/da* у эмбриона 2X/2A вызывает активацию раннего промотора (PE) на стадии бластодермы, что в конечном итоге приводит к формированию фенотипа самки. У эмбрионов X+Y/2A и X/2A, имеющих в генотипе единственную X-хромосому, число комплексных молекул уменьшено вдвое, поэтому активация раннего промотора не происходит и ген *Sxl* не включается. На следующих стадиях развития дрозофилы, при активации позднего промотора (PL) продукт гена *Sxl*, содержащего 8 экзонов, взаимодействует поэтапно с генами *tra* и *dsx*. Результаты этого взаимодействия зависят от соотношения X/A. Так у эмбрионов 2X/2A ген *Sxl* (в его составе экзоны 1, 2, 4—8) кодирует функционально полноценный белок. Он в свою очередь вступает во взаимодействие с геном *tra*, который в комплексе с продуктом гена *tra 2* обеспечивает образование специфической для самок РНК гена *dsxF*. Продукт этого типа вовлекает в цепь формирования пола дрозофилы еще один ген – *ix*. Именно за счет белковых продуктов генов *dsxF* и *ix* на заключительных этапах инактивируются многие гены, которые могли бы репрессировать формирование фенотипа самки. Напротив, у эмбрионов X + Y/2A в ходе образования первичного транскрипта гена *Sxl* вслед за экзонами 1 и 2 считывается экзон 3, на котором последующая трансляция заканчивается из-за большого числа входящих в его состав стоп-кодонов UGA. Усеченный продукт гена *Sxl* обуславливает специфическое считывание гена *tra*, в результате чего белок *tra* тоже оказывается нефункциональным. Это событие определяет сразу два момента в детерминации пола: при отсутствии функционального продукта *tra*-гена не синтезируется и полноценный продукт гена *tra 2*, а кроме того, в этих условиях с альтернативного набора экзонов гена *dsx* считывается белок *dsxM*, репрессирующий развитие самок. В результате формируются особи с фенотипом самца. Целый ряд белков у дрозофилы присущ особям одного пола и не синтезируется у другого. Так, например, для самок характерно наличие специфических белков желтка и яичевой оболочки (хориона). Таким образом, в каскад строго иерархических взаимодействий, определяющих детерминацию пола у дрозофилы, вовлечены гены, локализованные как на X-хромосоме, так и на аутосомах. Последовательная активация либо репрессия этих компонентов каскада в значительной степени обеспечивается альтернативным сплайсингом первичных РНК-транскриптов.

#### 4.2.1. Генетический механизм половой дифференцировки у человека

Детерминация пола у человека контролируется целым рядом генов, локализованных как на половых хромосомах, так и на аутосомах. Чрезвычайно важно, что зачатки гонад у эмбриона (называемые половыми валиками) до шестинедельного возраста развиваются как индифферентные, т.е. бипотенциальные образования. Первичные половые клетки (гоноциты), выявляемые у эмбриона с 14-го дня развития, мигрируют через энтодерму желточного мешка в область будущих зачатков гонад и в результате митотического деления формируют там пул половых клеток. Для начальных этапов развития гонады наличие в ней гоноцитов не является строго обязательным; от нали-

чия или отсутствия первичных половых клеток не зависит также окончательная дифференцировка гонад по мужскому типу. Но завершенная дифференцировка яичников при отсутствии первичных половых клеток либо нарушена, либо вовсе не происходит. Результатом первичной детерминации пола является формирование из недифференцированной ткани гонады либо яичек, либо яичников, причем и тот, и другой процесс активно контролируется группой генов, кодирующих транскрипционные факторы. Решающую роль в становлении пола у человека, как и вообще у всех млекопитающих, играет Y-хромосома: в случае ее отсутствия или отсутствия в ее составе детерминирующих пол генов дальнейшая дифференцировка происходит по женскому пути независимо от числа X-хромосом.

Факторы, участвующие в детерминации развития семенников, локализованы на конце короткого плеча Y-хромосомы, в зоне «обращения пола» (*sex reversal*, Sxr). Эта зона путем кроссинговера с гомологичной областью X-хромосомы при мейозе может приводить к появлению самцов с кариотипом XX. У человека мужчины с кариотипом XX встречаются с частотой 1:20 000. В зоне Sxr обнаружен ряд генов или их кластеров: локус Y-хромосомы детерминации семенников Tdy (*testis-determining Y*), антигенов с мужской половой специфичностью: антигенов гистосовместимости Y-хромосомы Hya (*histocompatibility Y antigens*) и серологически выявляемого антигена самцов Sdma (*serologically detected male antigen*), сперматогенный ген Y-хромосомы Sry (*spermatogenic gene from Y chromosome*), необходимый для нормального сперматогенеза, а также гены Y-хромосомы белков 1 и 2, содержащих цинковые пальцы Zfy-1, Zfy-2 (*zinc-finger-containing*), см. рисунок 4.2. Ген гистосовместимости HY, которому ранее приписывали ведущую роль в дифференцировке семенников, локализован в проксимальной части длинного плеча Y-хромосомы. В области Tdy обнаружен ген, названный детерминирующей пол областью Y-хромосомы – Sry (*sex determining region of the Y chromosome*), который, по-видимому, служит исходным пунктом канализации полового развития. Экспрессия генов локуса Sdma (*serologically detected male antigen*) Y-хромосомы начинается уже на 8-клеточной стадии развития зародыша. Эффект Y-хромосомы на дифференцировку семенников осуществляется в течение 1 – 2 дней после появления половой складки – полоски мезенхимы, прилегающей к мезонефросу. Первым типом клеток, дифференцирующихся из стромальных клеток по мужскому типу, являются клетки Сертоли, которые, агрегируя, формируют семенные канальцы. Y-хромосома человека содержит всего лишь 1,6% ДНК гаплоидного генома, тем не менее к настоящему времени на ней идентифицированы 92 гена, характеризующихся голандрическим типом наследования (рисунки 4.2-4.3). В 1987 году Дэвид Пэйдж и его коллеги, исследуя мужчину XX, унаследовавшего специфический фрагмент Y-хромосомы длиной 280 тысяч пар нуклеотидов, и женщину XY с делецией, захватывающей эту область в результате обмена участками между хромосомами пришли к заключению, что данный фрагмент представляет собой присутствующий в Y-хромосоме всех плацентарных животных участок, расположенный на расстоянии 100 тысяч пар нуклеотидов от границы псевдоаутосомной области ген ZFY длиной в 140 тысяч пар нуклеотидов [Page DC, de la Chapelle A, Jean Weissenbach (May 16-22 1985)].

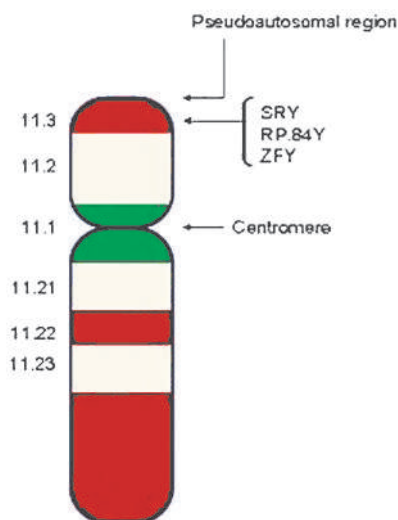


Рисунок 4.2. Y-хромосома человека с указанием локализации SRY-гена. Определение пола у человека (биология)#cite\_note-6

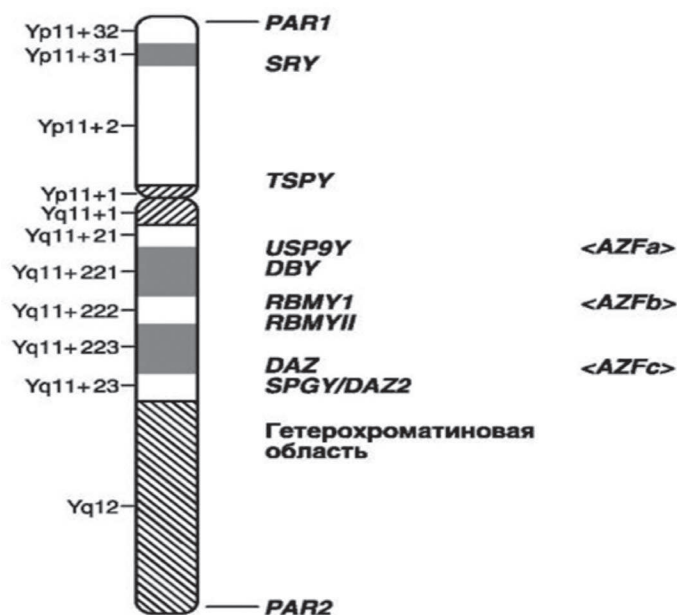


Рисунок 4.3. Схематическое изображение Y-хромосомы (по GenBank, 2003)

Гомолог ZFY – ген ZFX обнаружен в X-хромосоме [Palmer MS (1989)], причём ZFX не подвергается инактивации. Оба фактора ZFX и ZFY кодируют факторы транскрипции, содержащие мотивы цинковых пальцев, обладающие ДНК-связывающей активностью. Дальнейший детальный анализ специфических последовательностей Y-хромосом у особей с инверсией пола ограничил поиск районом размером 35 тыс. п. о. и привёл к обнару-

жению гена, рассматриваемого как истинный эквивалент классического Testis determining factor. Такой ген получил название SRY (англ. *Sex determining Region Y gene*).

Из всей совокупности Y-хромосомных генов пока лишь для отдельных представителей выявлены те звенья формирования и функционирования мужской репродуктивной системы, которые детерминируются ими. Один из наиболее изученных генов Y-хромосомы человека – локализованный в дистальной части ее короткого плеча (Yp11.31-32), однокопийный ген SRY (от англ. sex-determining region Y). Известно, что длина этого гена – 1 т.п.н., он не содержит интронных последовательностей, в его составе есть GC-богатая промоторная область длиной 310 п.н. и открытая рамка считывания из 612 п.н. Ген SRY млекопитающих кодирует белок (транскрипционный фактор из 204 аминокислот), который имеет ДНК-связывающий домен с консервативным участком из 79 аминокислотных остатков. Этот участок, так называемый HMG-бокс (от англ. high mobility group), может специфически связываться с регуляторными последовательностями ДНК (в частности, в области промоторов генов, детерминирующих половую дифференцировку), что вызывает изгиб молекулы. Такие изменения, происходящие в сайтах, являющихся мишенями для SRY, облегчают связывание транскрипционных регуляторов в непосредственно прилегающих областях. Пока точно не установлены гены, транскрипция которых регулируется SRY, достоверно известно лишь, что распознающий его сайт есть в промоторе гена AMH (от англ. anti-mullerian hormone). Экспериментально показано, что именно ген SRY играет роль тестис-определяющего фактора TDF (от англ. testis-determining factor). У человека его экспрессия обнаруживается уже на стадии зиготы, у мыши – на 10,5 день после оплодотворения. Специфические точечные мутации или делеции в HMG-боксе этого гена у женщин XY приводят к инверсии пола. Перенос фрагмента ДНК длиной 14 kbp, содержащего этот ген с фланкирующими участками, в оплодотворенную яйцеклетку гомогаметной особи с помощью микроинъекции привел к появлению самца с кариотипом XX [Коорман, Р (1995)]. Ген может быть deletирован (утрачен) или транслоцирован (перемещен) с Y- на X- или другую хромосому в профазе мейоза, в результате чего в потомстве появятся XY-женщины или XX-мужчины. Для последних характерен мужской фенотип при женском кариотипе (46,XX) и различные пороки развития: гипоплазия яичек, нарушения сперматогенеза, гинекомастия (развитие молочных желез по женскому типу). У XY-женщин наблюдается дисгенезия гонад, гипоплазия внутренних половых органов, а также феминизация пропорций тела вообще и наружных гениталий в частности. Локусу AZF (от англ. azoospermia factor), расположенному в длинном плече Y-хромосомы (Yq11), принадлежит значительная роль в генетической регуляции сперматогенеза у человека. Мутации генов этого локуса: AZFa, AZFb и AZFc приводят к нарушению сперматогенеза от снижения его активности (олигозооспермия) до полного отсутствия (азооспермия).

**Sry:** экспрессия гена ассоциирована с пролиферацией клеток целомического эпителия прегонады, превращающихся затем в клетки Сертоли и интерстициальные клетки, и необходима для миграции этих клеток из мезонефроса в формирующийся семенник. Вторая волна экспрессии Sry в будущих клетках Сертоли определяет индукцию экспрессии гена Sox9, опосредующего дальнейшую дифференцировку клеток Сертоли. Полагают, что действие Sry может включать два механизма: функционирование в ка-

честве транскрипционного фактора и в качестве фактора, изгибающего спираль ДНК, что обеспечивает взаимодействие между собой белков, локализованных на отдаленных участках ДНК.

Конкретные гены-мишени для Sry неизвестны. Неизвестно даже, действует ли данный белок в качестве активатора или репрессора транскрипции. Индукция экспрессии Sry в прегонаде осуществляется набором транскрипционных факторов, включающим, в частности, стероидогенный фактор 1 (SF1) и продукт гена 1 опухоли Уилма (Wilms tumor gene 1, WT1, см. ниже.). У человека 15-20% случаев 46.XY полной дисгенезии гонад связано с мутациями SRY. Приблизительно 2/3 мужчин с кариотипом 46.XX имеют транслокацию SRY с отцовской Y-хромосомы на отцовскую X-хромосому, что связано с обязательной рекомбинацией части X- и Y-хромосом при мейозе. При истинном гермафродитизме субъекты 46.XX, как правило, не содержат SRY.

Единственный представитель второй группы – ген DAX1 (DSS – АНС критический район хромосомы X: dosage-sensitive sex reversal – adrenal hypoplasia congenita). Этот ген, содержащий два экзона, картирован в DSS-локусе короткого плеча X-хромосомы. Предполагалось, что именно DAX1 детерминирует развитие яичников и в норме репрессируется у мужчин, (начало его экспрессии совпадает с активацией гена SRY, но в дифференцирующихся яичках уровень экспрессии DAX1 падает, тогда как в развивающихся яичниках, напротив, сохраняется). Однако в последнее время предположение относительно роли гена DAX1 в дифференцировке пола подвергается сомнению.

**DAX-1:** транскрипционный фактор класса ядерных рецепторов, действующий как репрессор за счет взаимодействия со шпильковыми структурами ДНК и белковыми активаторами транскрипции. Спектр органов, в которых экспрессируется DAX-1, в целом совпадает с таковым для SF-1, причем SF-1 служит важным стимулятором экспрессии DAX-1. В развивающихся семенниках DAX-1 сначала экспрессируется в клетках Сертоли, а с началом стероидогенеза – в клетках Лейдига. Роль DAX-1 в детерминации пола не вполне ясна: как избыток, так и недостаток DAX-1 ведет к нарушениям половой дифференцировки.

Так, дупликация гена DAX-1 у генетических самцов мыши ведет к обращению пола (М→Ж), а делеция гена приводит к нарушениям структуры семенников, гиперплазии клеток Лейдига с увеличением экспрессии в них ароматазы и дегенерации зародышевого эпителия. В норме DAX-1 ингибирует стимулирующее действие SF-1 на экспрессию ароматазы и ряда других ферментов стероидогенеза и подавляет эффекты некоторых других факторов, необходимых для развития семенников (WT1, Sox9 и GATA4). У самок делеция гена DAX-1 не сказывалась на развитии яичников, и поэтому DAX-1 рассматривают как антитестикулярный фактор.

### **4.3. Ауtosомные гены в детерминации пола. Вторичная детерминация пола у человека.**

Кроме генов Y-хромосомы, в первичной детерминации пола у человека прямо или косвенно участвуют X-хромосомные и ауtosомные гены. В настоящее время таких ге-



нов известно уже несколько десятков. Среди них можно выделить: 1) гены, детерминирующие развитие яичка; 2) гены, детерминирующие развитие яичника. Помимо описанного выше гена SRY к первой группе относится родственный ему ген SOX9 (от англ. SRY-related HMG-box-containing gene), который картирован в длинном плече хромосомы 17 в локусе (q24-q25). Экспрессию гена SOX9 обнаруживают в половом валике эмбриона еще до стадии дифференцировки гонад. Ген SRY гомологичен представителям семейства SOX (SRY-related HMG-box-containing genes) из 30-ти генов, кодирующих белки, которые имеют гомологию в ДНК-связывающем домене.

**Sox9** (сходный с блоком HMG SRY, SRY-like HMG Box): при нормальном развитии семенников служит посредником действия Sry. Экспрессия аутосомного гена транскрипционного фактора *Sox9* у эмбрионов повторяет паттерн экспрессии Sry. Одна из гипотез, объясняющих стимулирующее действие Sry на экспрессию Sox9, предполагает, что Sry снимает ингибирующий эффект некоего репрессора, которым мог бы быть атипичный ядерный рецептор DAX1. Дупликация SOX9 может служить причиной чувствительного к дозе обращения пола (Ж→М) у особей с кариотипом 46.XX. Приблизительно 70% случаев 46.XY дисгенезиса гонад связано с мутациями SOX9. Интересно, что у человека обращение пола (М→Ж) происходит при инактивирующей мутации уже одного аллеля SOX9, а у мыши – только при выключении обоих аллелей. По-видимому, Sox9 служит посредником действия Sry: формирование семенников может быть достигнуто и в отсутствие экспрессии Sry, но при условии индукции Sox9.

Отдельную группу составляют главные гены, регулирующие транскрипцию в ходе дифференцировки клеток, которые участвуют в морфогенезе гонад: WT1, LIM1, SF1 и GATA4 (действие первых двух генов может быть отнесено к процессу первичной детерминации пола). Ген WT1 (от англ. Wilm's tumor-associated gene 1), картированный в коротком плече хромосомы 11 в локусе p13, состоит из 10 экзонов и кодирует 16 основных изоформ белка. WT1 регулирует транскрипцию на разных уровнях, действуя либо как активатор, либо как коактиватор, либо как репрессор. Показано, что ген WT1 необходим на ранней, бипотенциальной стадии дифференцировки гонад: его экспрессия обнаружена до стадии активации гена SRY. Мыши с «выключенным» геном WT1 нежизнеспособны, при аутопсии у них установлено отсутствие и почек, и гонад. Для ранних этапов половой дифференцировки чрезвычайно важна и экспрессия гена LIM1. Это подтверждается экспериментальными данными на модельных животных. Последствия выпадения его функции у мышей те же, что и для гена WT1. Что касается генов SF1 и GATA4, то, согласно современным представлениям, их действие – важный этап вторичной половой детерминации. Описанные выше процессы приводят к тому, что гонады эмбриона, начиная с шестинедельного возраста, дифференцируются по полу, что подтверждено гистологически. Тем не менее, этого еще недостаточно для развития женского или мужского фенотипа. Вторичная детерминация пола обусловлена гормонами, которые вырабатывают яичники и яички. До начала половой дифференцировки, на стадии индифферентных гонад, выводящая система эмбриона представлена двумя типами протоков: вольфовыми и мюллеровыми, происходящими из первичной почки, закладка которой относится к 3-4 неделе эмбрионального развития.

#### 4.4. Детерминирующие гонады факторы

Молекулярные механизмы формирования дифференцированных по полу гонад остаются неясными, хотя изучена динамика экспрессии ряда ключевых генов, локализованных на Y-, X-хромосомах и аутосомах. Допускается, что развитие гонад может быть результатом перекрестных взаимодействий регуляторных элементов, а не линейного каскада. Ниже приведены сведения в отношении некоторых из потенциальных факторов дифференцировки гонад. Детерминирующим началом развития мужского фенотипа являются два гормона: антимюллеров и тестостерон, Антимюллеров гормон (АМН), или MIS-фактор (от англ. mullerian inhibiting substance) вызывает регрессию мюллеровых протоков. В отсутствие АМН мюллеровы протоки, как уже указывалось выше, развиваются в матку, маточные трубы и верхнюю треть влагалища. Установлено, что действие различных активаторов экспрессии гена АМН потенцируется действием гена GATA4, являющегося членом семейства транскрипционных регуляторных факторов. Секрция АМН начинается на седьмой неделе эмбрионального развития и продолжается до пубертатного периода, а затем резко падает, но низкий уровень экспрессии MIS-фактора может сохраняться и у взрослых. Предполагают, что он играет важную роль в развитии яичек, созревании сперматозоидов и ингибировании роста опухолевых клеток. Ген АМН картирован в коротком плече хромосомы 19 (локус p13.2-3). Он содержит 5 экзонов, кодирующих гликопротеин – белок, состоящий из 560 аминокислот. АМН связывается со специфическим рецепторным комплексом и активирует его. Промотор гена АМН содержит SRY-распознающий сайт, с которым связывается консенсусная SRY-последовательность AACAAAT/A. Область ДНК, в которой локализуется SRY, содержит два гена, кодирующие ключевые ферменты, участвующие в дифференцировке первичной гонады по мужскому типу: ген ароматазы P450, контролирующей конверсию тестостерона в эстрадиол и фактора, ингибирующего развитие протоков Мюллера, который вызывает обратное их развитие и способствует дифференцировке яичек. Также продукт гена SRY принимает участие в процессах половой дифференцировки в тесном взаимодействии с ещё одним геном, названным геном Z, функция которого в норме заключается в угнетении специфических мужских генов [MacLaughlin and Donahoe N (2004)]. В случае нормального мужского генотипа 46XY ген SRY кодирует белок, угнетающий ген Z, и специфические мужские гены активируются. В случае нормального женского генотипа 46XX, при котором отсутствует SRY, ген Z активируется и угнетает специфический мужской ген, что создает условия для развития по женскому типу [DiNapoli L, Capel B. (2008)].

АМГ (антимюллеров гормон): служит одним из поздних посредников действия Sox9. АМГ способен стимулировать миграцию клеток целомического эпителия в формируемый семенник, однако неизвестно, реализуется ли эта способность *in vivo*. Экспрессия АМГ в эмбриогенезе клетками Сертоли кооперативно стимулируется Sox9, SF-1, GATA4 и WT-1. DAX-1 блокирует синергизм SF-1 и GATA4 в действии на АМГ. В период полового созревания негативными регуляторами экспрессии АМГ становятся андрогены, которые таким образом снимают ингибирующее влияние АМГ на мейоз. В женском организме измеримый уровень АМГ появляется только при половом созревании.

Рецепторы АМГ локализованы в мезенхимальных клетках, окружающих мюллеровы каналы – монопотенциальные зачатки части женского репродуктивного тракта, т.е. индукция АМГ апоптоза эпителия мюллеровых каналов осуществляется с помощью паракринного посредника. Нокаут или мутации генов АМГ или его рецептора ведут к особой форме мужского ложного гермафродитизма – появлению внешне нормальных мужских особей с сохраненными производными мюллеровых каналов.

Помимо действия на мюллеровы каналы (внутриутробный период) в допубертатный период АМГ выполняет функцию ограничителя дифференцировки клеток Лейдига и продукции ими андрогенов, блокируя тем самым возможность преждевременного полового созревания. Во взрослом женском организме АМГ ограничивает вовлечение фолликулов в развитие, продлевая тем самым репродуктивный период.

**SF-1** (стероидогенный фактор 1): транскрипционный фактор класса ядерных рецепторов. Экспрессируется в гонадах, надпочечниках, гипоталамусе и гипофизе. Нокаут или мутации гена SF-1 сопровождаются агенезом гонад (женский фенотип 46.XY), гипоплазией надпочечников и нарушениями развития вентромедиального ядра гипоталамуса. Помимо участия в морфогенезе гонад SF-1 является необходимым фактором стимуляции тропными гормонами экспрессии ферментов стероидогенеза.

Экспрессия SF-1 появляется в недифференцированной прегонаде еще до начала экспрессии Sry, и SF-1 может быть одним из факторов, стимулирующих экспрессию Sry. После завершения детерминации пола гонад в семенниках экспрессия SF-1 сохраняется (снижаясь в клетках Сертоли и увеличиваясь в клетках Лейдига), тогда как в яичниках быстро снижается. Стимуляторами экспрессии SF-1 могут быть Sox9 и GATA4 (см. ниже), а ингибитором – DAX-1.

**Wt1** (ген 1 опухоли Уилма, Wilm's tumor 1 gene) – транскрипционный фактор, кодируемый аутосомой. Необходим для развития гонад и почек. Экспрессируется в недифференцированных прегонадах генетических самцов и самок и служит индуктором экспрессии Sry.

Альтернативный сплайсинг может влиять на наличие/отсутствие трех аминокислот, Lys, Thr, Ser (KTS), между цинковыми пальцами 3 и 4. Вариант с отсутствием этих аминокислот (WT1(-KTS)) действует как транскрипционный фактор, а вариант с их наличием (WT1(+KTS)), как полагают, участвует в процессинге РНК. Оба варианта необходимы для полного развития семенников, но для дифференцировки прегонады в семенник необходим лишь вариант (WT1(+KTS)), в отсутствие которого наблюдается полное обращение пола (М-Ж). Предполагается, что WT1(-KTS) стимулирует экспрессию Sry, а WT1(+KTS) обеспечивает процессинг или стабильность мРНК Sry.

**GATA4** (белок 4, связывающий мотив GATA в ДНК): транскрипционный фактор, содержащий 2 цинковых пальца. Экспрессия начинается в еще недифференцированных прегонадах самцов и самок. В семенниках экспрессируется в клетках Сертоли и клетках Лейдига, причем максимум экспрессии GATA4 в клетках Сертоли наблюдается в период их интенсивной пролиферации, а в клетках Лейдига – в периоды интенсивного стероидогенеза (т.е. сходно с SF-1). Одним из активаторов экспрессии GATA4 служат андрогены: при нечувствительности к андрогенам GATA4 практически не экспрессируется в семенниках. Объектами регуляции GATA4 служат АМГ и ферменты стерои-

догенеза. Мутация GATA4, нарушающая его взаимодействие со специфичным коактиватором FOG-2 (другом 2 GATA, friend 2 of GATA), или нокаут Fog-2 у мыши блокирует формирование семенников у генетических самцов. У таких животных не экспрессируются или слабо экспрессируются Sry, Sox9, SF-1, WT1, АМГ, ферменты стероидогенеза. В яичниках GATA4, по-видимому, выполняет функцию одного из посредников действия гонадотропинов и оказывает антиапоптотическое действие.

Для развития семенников требуется множество других генов. Например, ген X-хромосомы (XN2) кодирует геликазу, разворачивающую ДНК, что обеспечивает доступность ДНК для действия транскрипционных факторов. Дифференцировка прегонады в семенник или яичник определяется не только наличием/отсутствием Y-хромосомы и ее продукта Sry, но и действием ряда репрессоров. Помимо упомянутого выше DAX1 функцию репрессоров могут выполнять паракринные регуляторы WNT4 и R-спондин (см. ниже), нарушение функции которых может приводить к развитию из прегонады семенника и в отсутствие Sry.

Нокаут гена Wnt4 у мыши, с одной стороны, ведет к деградации ооцитов, а с другой – к экспрессии маркеров клеток Сертоли и Лейдига, что сопровождается маскулинизацией экстрагонадных органов за счет продукции в яичниках андрогенов и АМГ. В связи с этим Wnt4 рассматривают как антитестикулярный фактор (наряду с DAX-1).

Недавно выявлен еще один регулятор половой дифференцировки гонад – секретиремый паракринный фактор **R-спондин 1**.

В одной итальянской семье часть братьев (индивидуумов с мужским фенотипом внутренних и наружных гениталий, отсутствием производных мюллерова канала) имела кариотип XX при отсутствии гена SRY. Проведенный анализ выявил гомозиготную вставку одного нуклеотида в экзоне 5 гена R-спондина 1 (хромосома 1), приводящую к сдвигу рамки считывания с возникновением стоп-кодона, прерывающего синтез белка после 10-го аминокислотного остатка. Близкий фенотип наблюдается при другой мутации гена R-спондина 1 (делеции), сопровождающейся образованием укороченного с N-конца белка. (Эти мутации ассоциированы также с ладонно-подошвенным гиперкератозом и предрасположенностью к плоскоклеточной карциноме.) У мыши экспрессия R-спондина 1 выявляется в прегонаде (в соматических клетках) с 10,5 дня развития, и в период половой дифференцировки (12-14 дни) преобладает у самок. Можно полагать, что R-спондин 1, как и Wnt-4, является антитестикулярным фактором. Возможно, оба паракринных регулятора действуют посредством сходных механизмов, включающих рецепторы группы Fz (Frizzled – «кудрявый») класса рецепторов, сопряженных с G-белками, и вспомогательные рецепторы группы белков, родственных рецепторам липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), стабилизацию β-катенина и последующую активацию транскрипционного фактора TCF (T cell factor – фактор T-клеток). Количество генов, вовлекаемых в развитие и функционирование репродуктивной системы, велико. Для яичка более 1200, для яичника более 500, для матки более 1800. Анализ функциональных взаимоотношений даже небольшой части генов, вовлеченных в формирование пола человека, позволяет получить представление о многоплановом их взаимодействии. Среди млекопитающих имеются значительные различия в механизмах половой дифференцировки гонад. В эволюционном плане возникающие различия могут служить барьером для рождения плодовитого потомства при скрещивании близких видов и тем самым могут ускорять процессы дивергенции видов.

При развитии эмбриона женского пола мюллеровы протоки преобразуются в фаллопиевы трубы, матку и верхнюю треть влагалища, а вольфовы – атрофируются. При развитии эмбриона мужского пола имеют место обратные события: редуцируются мюллеровы протоки, а из вольфовых формируются семенные протоки и семенные пузырьки. Зачатки наружных половых органов начинают обособляться на пятой неделе эмбриогенеза, проходя сначала недифференцированную стадию, по строению достаточно близкую к женским половым органам.

**Андрогеновый рецептор, или андрогенный рецептор** (англ. *androgen receptor, AR*), или **NR3C4** – один из рецепторов стероидных гормонов, активируемый андрогенами – тестостероном или дигидротестостероном [Roy A. K., Lavrovsky Y., Song C. S. et al. 1999]. Относится к подсемейству 3, группе С (ген 4) семейства ядерных рецепторов, способных непосредственно взаимодействовать с ядерной ДНК [Lu N. Z., Wardell S. E., Burnstein K., 2006.; Brinkmann A. O., 2000]. Андрогеновый рецептор активируется при связывании с андрогенами в цитоплазме, а затем переносится в ядро.

Андрогеновый рецептор – фактор транскрипции, который регулирует экспрессию генов [Mooradian A. D., Morley J. E., Korenman S. G. , 1987] путём взаимодействия с ДНК, а также выполняет другие функции, не связанные с взаимодействием с ДНК [Heinlein C. A., Chang C., 2002]. Гены, регулируемые андрогенами посредством AR, имеют важное значение для развития и поддержания мужского фенотипа [Hiort O., Holterhus P. M., 2000].

У человека андрогеновый рецептор кодируется геном AR, расположенным на X-хромосоме в локусе Xq11.2-12 [Chang C. S., Kokontis J., Liao S. T. , 1988; Trapman J., Klaassen P., Kuiper G. G., et al., 1988].

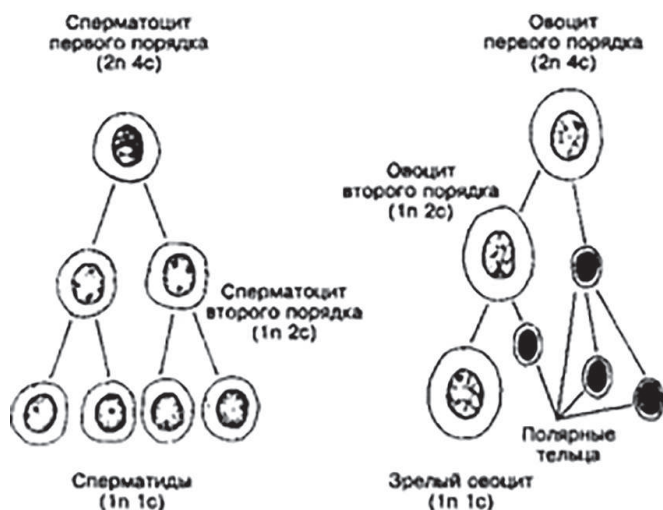
В 1953 году Джон Моррис (англ. John Morris), акушер из Йельского университета, сообщил о 82 индивидуумах, имевших женский фенотип, несмотря на наличие яичек. Проведённые после этого эндокринологические, патофизиологические, биохимические и молекулярно-биологические исследования позволили установить, что такой фенотип обусловлен синдромом нечувствительности к андрогенам. Эти исследования пролили свет на роль андрогенов в определении мужского пола, механизмы действия андрогенов, а также строение и функционирование андрогеновых рецепторов [Quigley C. A., De Bellis A., Marschke K. B., et al., 1995]. Ген андрогенового рецептора (AR) человека располагается на длинном плече X-хромосомы в локусе Xq11.2-12, причём 5'-конец гена обращён к центromере. Нуклеотидная последовательность гена содержит 90 тысяч пар оснований [Gelman E. P., 2002] и включает 8 экзонов. Их структурная организация аналогична генам других рецепторов стероидных гормонов. Экзон 1 кодирует N-концевой домен (NTD) белка, экзоны 2 и 3 – центральный ДНК-связывающий домен (DBD), а экзоны 4–8 – С-концевой домен. В различных клеточных линиях были выявлены 2 альтернативные формы мРНК AR длиной 8,5 и 11 тысяч оснований соответственно; они являются результатом альтернативного сплайсинга 3'-нетранслируемой области. Никаких структурных и функциональных различий между продуктами трансляции этих мРНК не было обнаружено, однако возможно, что наличие в определённой ткани той или иной формы мРНК определяется специфическими тканевыми регуляторами. В предстательной железе и фибробластах кожи, покрывающей половые органы, преимущественно экспрессируется более длинная мРНК [Brinkmann A. O., 2000]. Ген AR содержит 2 полиморфных участка, состоящих из тринуклеотидных повторов, кодирую-

щих полиглутаминовый и полиглициновый участки N-концевого трансактивационного домена рецептора.

Синдром Кеннеди, также известный как спинобульбарная (то есть связанная со спинным и продолговатым мозгом) мышечная атрофия, развивается в тех случаях, когда количество CAG-повторов в AR увеличивается до 40—62 повторов. У пациентов с синдромом Кеннеди развиваются прогрессирующие неврологические нарушения, обусловленные дегенерацией спинномозговых мотонейронов и последующим ослаблением мышц; обычно болезнь проявляется в возрасте 40—60 лет. Неврологические проявления синдрома Кеннеди объясняются тем, что белки, содержащие чрезмерно длинные полиглутаминовые участки, индуцируют апоптоз в нейронах, что характерно для многих нейродегенеративных заболеваний. Интересно, что синдром Кеннеди нередко сопровождается нечувствительностью к андрогенам, поскольку AR со слишком длинным полиглутаминовым участком не может нормально функционировать [Gelmann E. P., 2002]. Показано, что генетическое разнообразие в локусе AR связано с риском рака простаты. В частности, установлено, что количество повторов в области CAG-повторов обратно связано с активностью AR. Проявление этого на клеточном уровне тканеспецифично из-за того, что полиглутаминовый участок в N-концевом домене оказывает влияние на взаимодействие рецептора с p160 и другими коактиваторами. В различных исследованиях было показано, что чем короче участок CAG-повторов в N-концевом домене AR, тем агрессивнее опухоль, раньше начало развития рака и выше вероятность рецидива. Впрочем, в других исследованиях получены иные данные. С риском рака простаты связывают и другие изменения в AR, например, в 5'-нетранслируемой области, но объяснения этим связям пока ещё нет. В отличие от синдрома нечувствительности к андрогенам, для которого было определено множество вызывающих мутаций, мутаций, обуславливающих предрасположенность к раку простаты, немного. Впрочем, одна такая наследуемая мутация (миссенс-мутация) была обнаружена в Финляндии [Gelmann E. P., 2002]. До 1970-х годов рак молочной железы с некоторым успехом лечили андрогенами (тестостероном, дигидростероном, флуоксиместероном). Однако впоследствии оказалось, что у женщин, страдающих раком молочной железы, наблюдается повышенный уровень андрогенов в крови. Действительно, группу риска для рака груди составляют женщины в пре- и постменопаузный период с повышенным содержанием эстрогенов, тестостерона и надпочечниковых андрогенов в крови. Изучение животных моделей показало, что комбинированное воздействие эстрогенов и тестостерона индуцировало пролиферацию клеток молочной железы, сверхэкспрессию андрогенового рецептора и активацию генов-мишеней эстрогенов, причём все эти эффекты устранялись терапией с применением антиандрогенов. Однако разработка антиандрогенов, специфичных к раку молочной железы, находится на зачаточном уровне, хотя о наличии андрогеновых рецепторов в этой ткани известно уже почти 50 лет [Proverbs-Singh T., Feldman J. L., Morris M. J., et al., 2015]. Возможно, что андрогеновые рецепторы задействованы в развитии карциномы слюнных желёз [Williams L., Thompson L. D., Seethala R. R., et al., 2015]. Кроме того, выдвинуто предположение, что андрогены (в частности, дигидростерон) участвуют в развитии рака яичника [Kohan-Ivani K., Gabler F., Selman A., et al., 2015].

## 4.5. Гаметогенез

В плодном периоде первичные половые клетки дифференцируются в овогонии в развивающихся яичниках или в сперматогонии в яичках. От овогоний и сперматогоний до гамет различают несколько стадий, в течение которых осуществляется мейоз (рисунок 4.4).



**Рисунок 4.4.** Мейоз.  $n$  – число гаплоидных наборов хромосом,  $c$  – количество молекул ДНК в хромосоме. В результате двух делений мейоза образуются половые клетки, имеющие 22 аутосомы и одну X- или Y-хромосому [из Kaplan S, 1987]

Овогенез. В претерпевающих дифференцировку яичниках овогонии вступают в стадию размножения, образуя овоциты первого порядка. К семи месяцам внутриутробного развития стадия размножения обрывается, овоциты первого порядка в профазе первого мейотического деления приобретают оболочку из фолликулярных клеток (образуется примордиальный фолликул) и вступают в длительный период покоя, вплоть до наступления половой зрелости.

Количество овоцитов первого порядка достигает 10 миллионов на 7 месяце внутриутробного развития плода, и снижается к моменту рождения до 2 миллионов.

Мейоз. Последовательно осуществляется два деления (рис. 4.4). В ходе первого деления происходит ряд важных процессов.

- генетическая рекомбинация путём кроссинговера между гомологичными хромосомами (отцовскими и материнскими),
- уменьшение числа хромосом,
- снижение содержания ДНК,
- уменьшение ploидности клеточных потомков,
- значительный синтез РНК.

Овариально менструальный цикл. На пике лютеинизирующего гормона завершается первое мейотическое деление. Сигнал для завершения второго мейотического деления – оплодотворение, овоцит второго порядка делится с образованием зрелой яйцеклетки (гаплоидный набор хромосом) и второго полярного (направительного) тельца.

Сперматогенез. Мейоз приводит к образованию сперматозоидов с разными половыми хромосомами: сперматозоиды содержат либо X-, либо Y-хромосому. Если яйцеклетка оплодотворяется X-сперматозоидом, то XX-зигота развивается в женский организм. В случае оплодотворения яйцеклетки Y-сперматозоидом XY-зигота развивается по мужскому типу. Известны случаи происходящей при кроссинговере транслокации из хромосомы Y в хромосому X локуса SRY, кодирующего регуляторный фактор TDF.

Сперматогенез происходит в семенных канальцах. На пограничной мембране в семенных канальцах расположены поддерживающие клетки (клетки Сертоли), которые, соединяясь между собой отростками, образуют петли, заполненные эпителием, находящимся на разных стадиях сперматогенеза.

Поддерживающие клетки крупных размеров, вытянутой, грушевидной или веретенообразной формы, длиной от 20 до 40 мкм, со светлым, угловатым ядром. В цитоплазме этих клеток находятся многочисленные трофические включения (капельки жира и липидов, белковые кристаллы и др.). Сперматиды, созревающие в сперматозоиды, обычно плотно примыкают к поддерживающим клеткам, осуществляющим трофическую и, по-видимому, гормональную функции.

На пограничной мембране семенных канальцев между поддерживающими клетками располагаются сперматогонии – родоначальные клетки сперматогенеза. Часть сперматогоний, оттесненная в процессе деления от пограничной мембраны, прекращает деление и усиленно растет, превращаясь в сперматоциты I порядка (первичные). Сперматоциты редуционно делятся (мейоз), в результате чего происходит попарное соединение хромосом (конъюгация) и уменьшение их числа вдвое. Сперматоцит I порядка делится на два сперматоцита II порядка (вторичных), которые снова делятся, превращаясь в сперматиды.

Сперматиды, в свою очередь, превращаются в сперматозоиды. В эякулятах, содержащих большое количество клеток сперматогенеза, можно обнаружить гигантские многоядерные сперматиды (2—12 ядер).

Герминогенные опухоли возникают из клеточных предшественников половых клеток. Этот термин применяют и по отношению к соматическим клеткам эмбриона и оболочек.

### Литература

1. Hughes, Ieuan A. Minireview: Sex Differentiation // *Endocrinology*. – 2001. – Т. 142, № 8. – С. 3281-3287.
2. Sizonenko, P.C. Human Sexual Differentiation (англ.). Reproductive Health. Geneva Foundation for Medical Education and Research. Проверено 18 сентября 2015.
3. Page DC, de la Chapelle A, Jean Weissenbach (May 16-22 1985). «Chromosome Y-specific DNA in related human XX males.». *Nature* 315 (6016): 224–6.
4. Palmer MS (1989). «Sex determining genes.». *Science Progress* 73: 245–61.
5. Koopman, P (1995). «The molecular biology of SRY and its role in sex determination in mammals.». *Reproduction, Fertility, and Development* 7 (4): 713–22.
6. MacLaughlin and Donahoe N (2004). «Mechanisms of Disease: Sex Determination and Differentiation». *New England Journal of Medicine* 350: 367–378.
7. DiNapoli L, Capel B. (2008). «SRY and the standoff in sex determination.». *Molecular Endocrinology* 22 (1): 1–9.
8. Pereira de J. Tran K., Côté P. L., Cantin L., Blanchet J., Labrie F., Breton R. Comparison of crystal structures of human androgen receptor ligand-binding domain complexed with various agonists reveals molecular determinants responsible for binding affinity. (англ.) // *Protein science* : a



publication of the Protein Society. – 2006. – Vol. 15, no. 5. – P. 987—999.

9. Roy A. K., Lavrovsky Y., Song C. S., Chen S., Jung M. H., Velu N. K., Bi B. Y., Chatterjee B. Regulation of androgen action. (англ.) // *Vitamins and hormones*. – 1999. – Vol. 55. – P. 309—352.

10. Lu N. Z., Wardell S. E., Burnstein K. L., Defranco D., Fuller P. J., Giguere V., Hochberg R. B., McKay L., Renoir J. M., Weigel N. L., Wilson E. M., McDonnell D. P., Cidlowski J. A. International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors. (англ.) // *Pharmacological reviews*. – 2006. – Vol. 58, no. 4. – P. 782—797.

11. Brinkmann A. O. Androgen Physiology: Receptor and Metabolic Disorders (англ.). – 2000.

12. Mooradian A. D., Morley J. E., Korenman S. G. Biological actions of androgens. (англ.) // *Endocrine reviews*. – 1987. – Vol. 8, no. 1. – P. 1—28.

13. Heinlein C. A., Chang C. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. (англ.) // *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.). – 2002. – Vol. 16, no. 10. – P. 2181—2187.

14. Hiort O., Holterhus P. M. The molecular basis of male sexual differentiation. (англ.) // *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. – 2000. – Vol. 142, no. 2. – P. 101—110. – PMID 10664515. [исправить](#)

15. Chang C. S., Kokontis J., Liao S. T. Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. (англ.) // *Science* (New York, N.Y.). – 1988. – Vol. 240, no. 4850. – P. 324—326.

16. Trapman J., Klaassen P., Kuiper G. G., van der Korput J. A., Faber P. W., van Rooij H. C., Geurts van Kessel A., Voorhorst M. M., Mulder E., Brinkmann A. O. Cloning, structure and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. (англ.) // *Biochemical and biophysical research communications*. – 1988. – Vol. 153, no. 1. – P. 241—248.

17. Quigley C. A., De Bellis A., Marschke K. B., el-Awady MK, Wilson E. M., French F. S. Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. (англ.) // *Endocrine reviews*. – 1995. – Vol. 16, no. 3. – P. 271—321.

18. Gelmann E. P. Molecular biology of the androgen receptor. (англ.) // *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2002. – Vol. 20, no. 13. – P. 3001—3015.

19. NCBI: AR androgen receptor [ Homo sapiens (human) ].

20. Proverbs-Singh T., Feldman J. L., Morris M. J., Autio K. A., Traina T. A. Targeting the androgen receptor in prostate and breast cancer: several new agents in development. (англ.) // *Endocrine-related cancer*. – 2015. – Vol. 22, no. 3. – P. 87—106.

21. Brown T. R. Human androgen insensitivity syndrome. (англ.) // *Journal of andrology*. – 1995. – Vol. 16, no. 4. – P. 299—303.

22. Williams L., Thompson L. D., Seethala R. R., Weinreb I., Assaad A. M., Tuluc M., Ud Din N., Purgina B., Lai C., Griffith C. C., Chiose S. I. Salivary duct carcinoma: the predominance of apocrine morphology, prevalence of histologic variants, and androgen receptor expression. (англ.) // *The American journal of surgical pathology*. – 2015. – Vol. 39, no. 5. – P. 705—713.

23. Kohan-Ivani K., Gabler F., Selman A., Vega M., Romero C. Role of dihydrotestosterone (DHT) on TGF- $\beta$ 1 signaling pathway in epithelial ovarian cancer cells. (англ.) // *Journal of cancer research and clinical oncology*. – 2015.

### Контрольные вопросы:

1. Как происходит детерминация пола и половая дифференцировка у человека?
2. Какие генетические механизмы половой дифференцировки существуют?
3. Какими факторами детерминируются гонады?
4. Как осуществляется гаметогенез?

## Глава.5

---

### ОНТОГЕНЕЗ И ГЕНЕТИКА

**Онтогенез многоклеточных** (Metabiota) представляет собой удивительный по сложности и стройности комплекс ростовых и формообразовательных процессов, в результате которых развившийся из зиготы организм наследует соответствующие видоспецифические и индивидуальные черты организации, физиологии, а в случае человека – и психики.

При этом различают ростовые **процессы на клеточном уровне** (увеличение количества клеток в результате делений, увеличение клеточного объема) и морфогенез (формообразование), включающий как рост, так и локальную гибель клеток; изменение их формы; движения и изгибы клеточных пластов и многое другое. То, что индивидуальное развитие организма находится под генетическим контролем, доказывается фактом существования наследственной изменчивости по всем рассматриваемым процессам. Так, выявлены мутации генов, контролирующих скорость первых делений дробления, обнаружены онкогены, регулирующие ростовые процессы, известно множество мутаций генов, ответственных за становление морфологических признаков организма в ходе онтогенеза.

Современные исследования **онтогенеза** многоклеточных на молекулярном уровне весьма обширны, но на вопрос, как из двух клеток (яйцеклетки и спермия) развивается организм, представленный практически двумя сотнями гистотипов клеток, точного ответа пока нет. Как говорил Н.В. Тимофеев-Ресовский: «...почему в процессе развития Metabiota в должное время в должном месте происходит должное?». Это был и есть главный вопрос теории онтогенеза.

Первые попытки ответить на него восходят еще к средним векам, когда оформились **две основные теории**:

**1. Преформизм.** Сторонники этой теории утверждали, что развития как такового нет, и каждый индивид представляет собой, грубо говоря, матрешку, т.е. его развитие – это развертывание и рост уже содержащихся в яйцеклетке или спермин специфических микроструктур. Согласно А. Галлеру и Ш. Боннэ, в каждой яйцеклетке содержится полностью сформированный зародыш, и каждый такой зародыш имеет яичник с яйцеклетками, в которых в свою очередь содержатся еще меньшие зародыши. По подсчетам А. Галлера, в яичнике Евы должно было содержаться около 200 млрд. зародышей.

**2. Эпигенез.** Сторонники этой теории полагали, что внутренний механизм развития отсутствует, в исходной клетке ничего нет, все появляется в процессе взаимодействия со средой. Они настаивали на том, что организм в целом и отдельные органы в частности по мере развития не просто увеличиваются в размерах, но и усложняются, К.М. Бэру принадлежит детальное описание развития куриного эмбриона как строго упорядоченного процесса последовательных изменений от яйца к зародышу и далее к зрелой особи. Хотя ясно, что **теория эпигенеза** во многих отношениях более корректна, чем взгляды преформистов, но даже в 70-х годах XX века некоторые исследователи отрицали генетическую регуляцию индивидуального развития, полагая, что геном только сопутствует развитию, а не определяет его. Тем не менее, и эпигенез, и преформизм вкупе имеют рациональное

зерно: развитие многоклеточных может быть представлено как преформированный эпигенез, или эпигенетическая преформация.

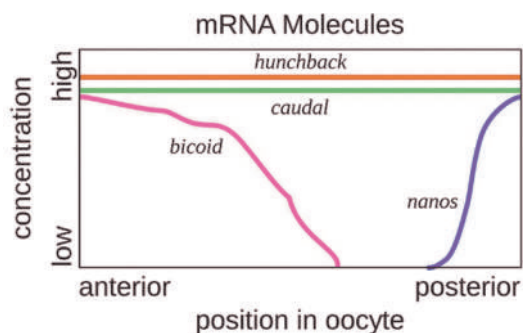
### 5.1. Ооплазматическая сегрегация и формирование градиентов в ооците

**Созревание ооцита** разворачивается как строго направленное, последовательное формирование гетерогенности его цитоплазмы, получившее наименование ооплазматической сегрегации – процесса, в ходе которого намечается план строения будущего организма. Этот план материализуется на основе градиентного распределения биологически активных веществ, доказательством чего, в частности, является постепенное падение концентрации РНК и белков в направлении от анимального полюса к вегетативному. Если экспериментально разрушить анимально-вегетативный градиент (например, центрифугированием) и добиться равномерного распределения РНК, белков и других веществ в цитоплазме, то развитие зародыша останавливается в самом начале. При другом типе разрушения – расчленении **существующего в ооците** дрозофилы анимально-вегетативного градиента на 2 самостоятельных, возникает зародыш с двумя системами осевых органов.

Т.Г. Морган точку начала **индивидуального развития дрозофилы** относил на период созревания яйцеклетки. Дальнейшие исследования доказали правильность такой постановки вопроса, так как на этой стадии была выявлена экспрессия практически всех генов, присущих данному виду, даже тех, активность которых станет необходимой на более поздних стадиях развития.

**Ооплазматическая сегрегация** обусловлена положением ооцита в материнском организме. Яйцо дрозофилы созревает в особой камере – фолликуле. Из одного оогония в результате четырех делений, характеризующихся высокой степенью упорядоченности, формируются 16 клеток, которые остаются связанными друг с другом кольцевыми каналами. Ооцитом становится та клетка, которая занимает задний конец яйцевой камеры. Остальные 15 превращаются в огромные питающие клетки. Именно в них активны так называемые **гены** с материнским эффектом, т.е. функционирующие в организме матери еще до оплодотворения яйца: *bicoid*, *exuperantia*, *swallow*, *nanos* и *pumilio* (рисунок 5.1). Все пять **вышеперечисленных генов** *bicoid*, *exuperantia*, *swallow*, *nanos* и *pumilio* составляют систему, обеспечивающую формирование передне-заднего градиента. Продукты этих генов принято называть **морфогенами**. Помимо них, важную роль в формировании плана строения будущего организма дрозофилы играет ген *hunchback*, активно функционирующий не только в материнском геноме, но и у зиготы. Мутанты, гомозиготные по *hunchback*, летальны и схожи с мутантами *bicoid* по утрате передних структур. Продукт гена *hunchback* блокирует развитие хвостового конца, чему в ходе нормального развития противопоставит продукт гена *nanos*, локализующийся у заднего полюса яйца.

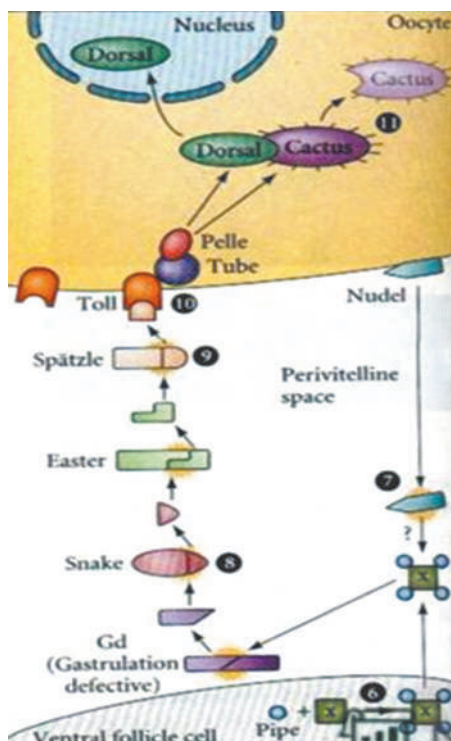
Продукт гена «материнского эффекта» – *bicoid* является регулятором транскрипции ряда генов, содержащих в регуляторных областях последовательность 5'-ТЦТА-АТЦЦЦ-3'. Гены *gap*, *hunchback*, *exuperantia*, *swallow* и *staufer* отвечают за локализацию гена *bicoid* на переднем конце зародыша и **формирование переднего полюса**. **Формирование заднего полюса** определяется продуктом гена «материнского эффекта – *nanos*, который подавляет трансляцию гена *hunchback* (рисунок 5.1).



**Рисунок 5.1.** Становление продольной полярности зародыша определяется активностью трех групп генов: генов переднего организующего центра, генов заднего организующего центра, генов терминальных структур.

В ооците за локализацию белка Nanos в задней части зародыша отвечает белок Bicoid D, за транспорт в брюшные сегменты – *rutilio*

Кроме того, в ооците **существует система**, контролирующая формирование *дорсо-вентрального градиента* (рисунок 5.2).



**Рисунок 5.2.** Сигнал из вентральных фолликулярных клеток в цитоплазму зародыша.

Она включает функционирующие в фолликулярных клетках гены *torpedo*, *pipe*, *nudel*, *windbeutel*, в результате чего происходит обмен не идентифицированными сиг-

налами между фолликулярными клетками и вентральной областью ооцита. После оплодотворения экспрессируются шесть генов, из которых *snake* и *easter*, кодирующие сериновые протеазы, активируют ген *spatzle*. Но ведущая роль в детерминации дорсо-вентральной полярности принадлежит гену *toll*, активность которого, опосредованная генами *relle* и *sactus*, обеспечивает формирование градиентного распределения белкового продукта гена *dorsal*, действующего как фактор транскрипции. Взаимодействие Nudel- и  $\chi$ -факторов (модифицировано участием Pipe) запускает каскад активации протеаз с сигналингом через Toll-рецептор. ТФ-Dorsal освобождается из комплекса с Sactus (последний разрушается после фосфорилирования протеинкиназой Pelle), Dorsal транслоцируется в ядро. Формируется ядерный градиент Dorsal, вентрализирующий зародыш (рисунок 5.2).

Наконец, **третья система**, состоящая из генов *torso*, *tailless* и *huckebein* осуществляет общий контроль над формированием градиентов при развитии несегментированных головного и хвостового конца. Причем в детерминации их анатомических границ особое значение имеет белок гена *torso*, расположенный на обоих полюсах яйца (рисунок 5.3).

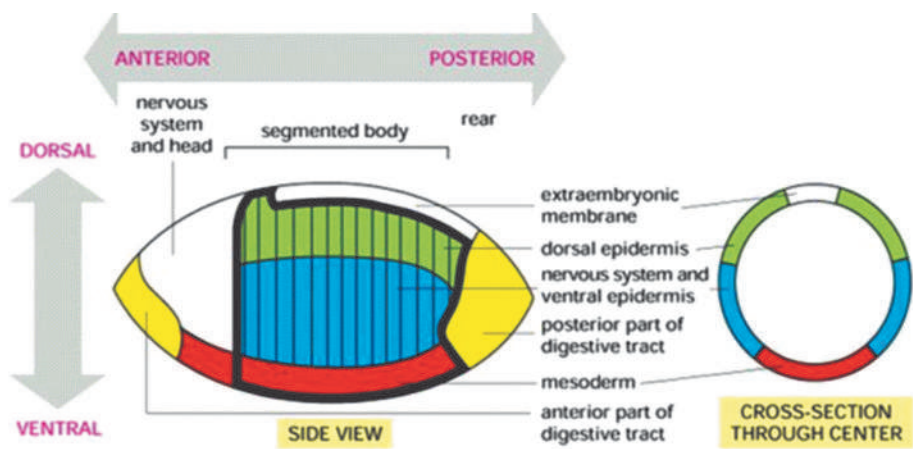


Рисунок 5.3. Карта детерминации в клеточной бластодермальной стадии эмбриона дрозофилы.

Формирование дорзо-вентральной оси дрозофилы происходит в ходе гаструляции. На рисунке 5.3 эмбрион изображен на продольном (сбоку) и на поперечном срезе, показано взаимоотношение между дорзо-вентральным разделением в будущих тканевых типах и передне-задних частях будущих сегментов. Толстой линией очерчен район формирования будущих сегментарных структур. Во время гаструляции клетки вдоль вентральной средней инвагинируют для формирования мезодермы, в то время как клетки предопределенные формировать кишку инвагинируют вблизи каждого конца эмбриона. Таким образом, что касается их роли в формировании кишки, противоположные концы эмбриона, хотя удаленные в пространстве сходны по функции и конечной детерминации ( из V. Hartenstein, G.M. Technau, J.A. Campos-Ortega, Wilhelm Roux' Arch. Dev. Biol.194.213-216,1985).

## 5.2. Детерминация, дифференцировка клеток и сегментация зародыша

Детерминация – ограничение возможностей различных дифференцировок, определяющее развитие клетки по специализированному пути.

Целый ряд данных указывает на то, что **детерминация клеток** зачатков личиночных и имагинальных органов различных сегментов тела дрозофилы происходит во время образования клеточной бластодермы или сразу после того.

Во-первых, клетки, изолированные из передней области **бластодермы**, дают начало только структурам передней части тела взрослой мухи, а из клеток задней области бластодермы формируются только структуры задней части тела имаго.

Во-вторых, **удаление клеток** из определенных участков поверхности бластодермы приводит к специфическим повреждениям взрослого насекомого, развившегося из поврежденного эмбриона, т.е. положение клеток в бластодерме определяет судьбу этих клеток в течение всего процесса развития.

Наконец, исследование **гинандроморфов дрозофилы** (особей, возникающих, например, в том случае, когда одно из эмбриональных ядер утрачивает X-хромосому, и клетки с потомками этого ядра становятся мужскими – ХО показало, что делящиеся ядра проходят детерминацию в соответствии со своим положением на поверхности яйцеклетки.

### Сегментация зародыша

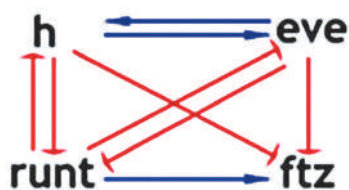
Первый этап становления пространственной **организации регулируется генами** с материнским эффектом, продукты активности которых в ходе оогенеза образуют градиенты с морфогенетически активными белками. Вслед за этим происходит оплодотворение и дробление зародыша. После образования бластодермы и включения зиготических генов начинается последовательное формирование сегментарного плана строения тела дрозофилы, личинки и взрослые особи (имаго) которой состоят из передних головных, трех грудных и восьми брюшных сегментов. В результате взаимодействия перекрывающихся **градиентов морфогенетически активных** белков, являющихся продуктами генов *bicoid* и *nanos*, активируются гены группы *gap* (от англ. *gap* – брешь, дыра), разделяющие зародыш на широкие домены.

К настоящему времени **описано 6 генов** из группы *gap*, к числу главных следует отнести гены *hunchback*, *Kruppel* и *knirps*. Каждый из них экспрессируется в определенных сегментах эмбриона. Экспрессия гена *hunchback* происходит в двух областях: в задней четверти яйца, а также в пространстве от переднего полюса почти до середины яйца. Ген *Kruppel* экспрессируется в широкой зоне, составляющей середину эмбриона, Продукт гена *knirps* выявляется как спереди, так и сзади от этой зоны. Тот факт, что экспрессия названных трех генов регулируется продуктами генов *bicoid* и *nanos*, был установлен в результате изучения мутантов, не способных к их синтезу.

### Развитие дрозофилы: гены *pair rule*

Гены *pair rule* (парного правила) – группа генов, каждый из которых экспрессируется или во всех четных, или во всех нечетных будущих сегментах. Их экспрессия – периодическая, в отличие от аperiodических *gap*-генов, которые служат для них факторами транскрипции.

Вот схема регуляции экспрессии четырех генов *pair rule*:



Это еще одна типичная генная сеть. Между генами *even-skipped* (*eve*) и *hairy* (*h*) – положительная обратная связь, между *eve* и *runt* – отрицательная. Включение *eve* ингибирует *ftz*. Реальная схема включает еще как минимум 3 гена.

На рисунке 5.4 показано, что **белок гена** *bicoid*, действуя как позитивный регулятор экспрессии гена *hunchback* (*hb*), способствует накоплению продукта последнего у головного конца эмбриона, а белок гена *nanos*, вероятно, ингибирует активность продукта гена *hunchback*.

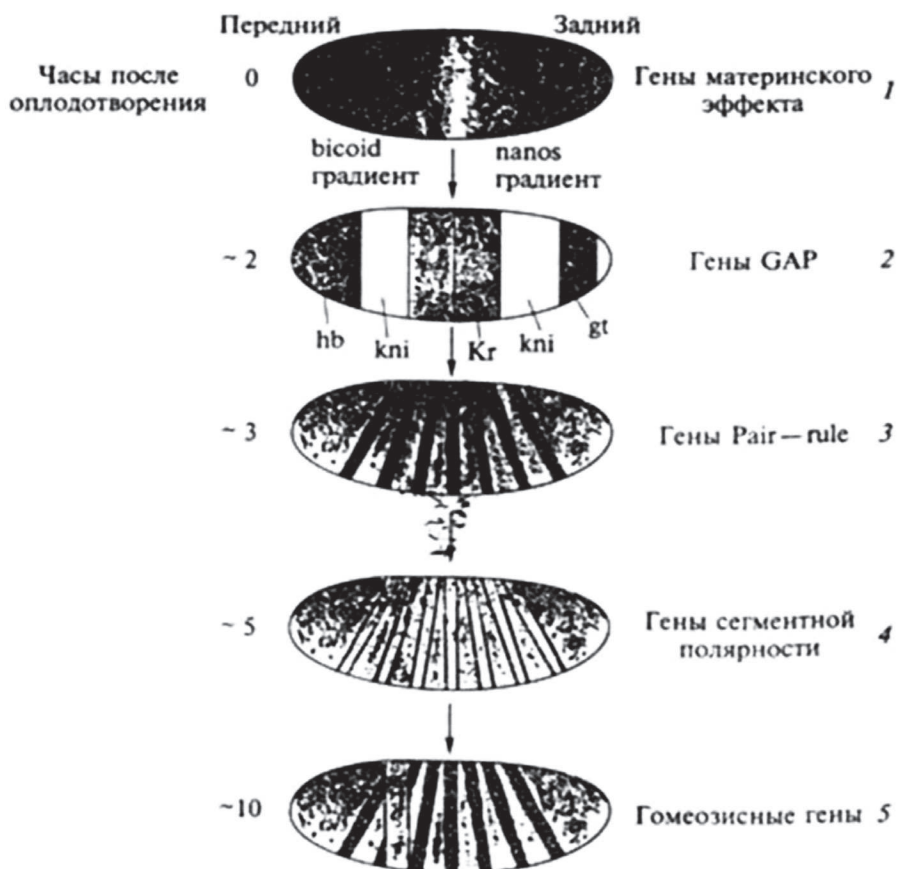


Рисунок 5.4. Схема формирования сегментарной структуры у дрозофилы <https://ppt-online.org/30103>.

Кроме того, блокируя экспрессию гена *Kruppel* (*Kr*) в передней и задней областях эмбриона, белковые продукты генов *bicoid* и *nanos* способствуют накоплению мРНК гена *Kruppel* в центральной части эмбриона. (рисунок 5.5).

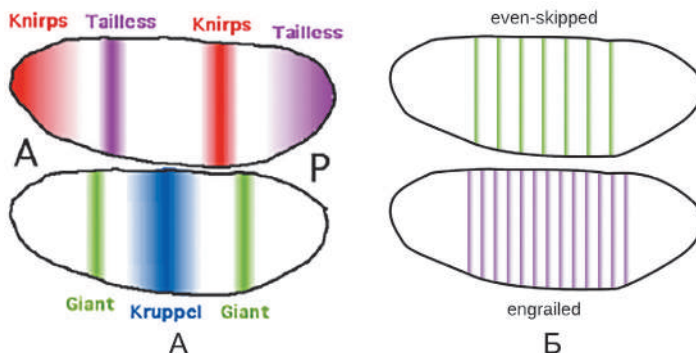


Рисунок 5.5. Профили экспрессии gap-генов (А) и pair-rule-генов (Б). <https://ppt-online.org/30103>

Поначалу размытые границы транскрипционных областей генов группы gap с течением времени сужаются, так как белок гена *Kruppel* ингибирует транскрипцию гена *hunchback*, а продукты генов *hunchback* и *knirps* – транскрипцию гена *Kruppel*.

В настоящее время установлено, что у **млекопитающих** есть, по крайней мере, три гомолога морфогена *hedgehog* из группы генов сегментарной полярности: *Sonic* (*SHH*), *Desert* (*OHI*) и *Indian hedgehog* (*IHH*). Они отвечают за контроль лево-правой асимметрии, детерминацию полярности в клетках центральной нервной системы, сомитов и конечностей, а также за формирование скелета.

*SHH* играет важнейшую роль в развитии **вентральной нервной трубки** человеческого зародыша. Его «выключение» вследствие мутации, нарушающей полное разделение развивающегося мозга на два отдельных полушария и желудочки, приводит к серьезным, часто летальным последствиям, именуемым в клинике как голопрозэнцефалия (конечный мозг не разделен и представлен полусферой, обонятельные луковицы и тракты отсутствуют, гиппокамп резко гипоплазирован, цитоархитектоника коры неразделенного мозга нарушена).

*OHI*, по-видимому, **контролирует вступление половых клеток** в клеточное деление, его экспрессия отмечается в сертолиевых клетках яичек после активации гена *SRY*. У мышей-носителей мутации этого гена, наблюдалось снижение количества половых клеток и блок сперматогенеза, в результате чего *развивалось бесплодие*.

### 5.3. Гомеозисные гены

После установления **границ каждого сегмента** начинают формироваться их специфические черты, этот качественный процесс детерминруется гомеозисными генами, которых у дрозофилы насчитывается около полусотни. Их отличительным свойством является способность трансформировать один сегмент в другой. Предлагая термин «гомеозис» в 1894 г., Уильям Бэтсон подразумевал под ним превращение одной части тела в другую, а точнее гетеротопическую дубликацию – появление добавочного



экземпляра какой-либо части тела в не характерном для нее месте. Гомеозисные гены дикого типа контролируют развитие определенных популяций клеток.

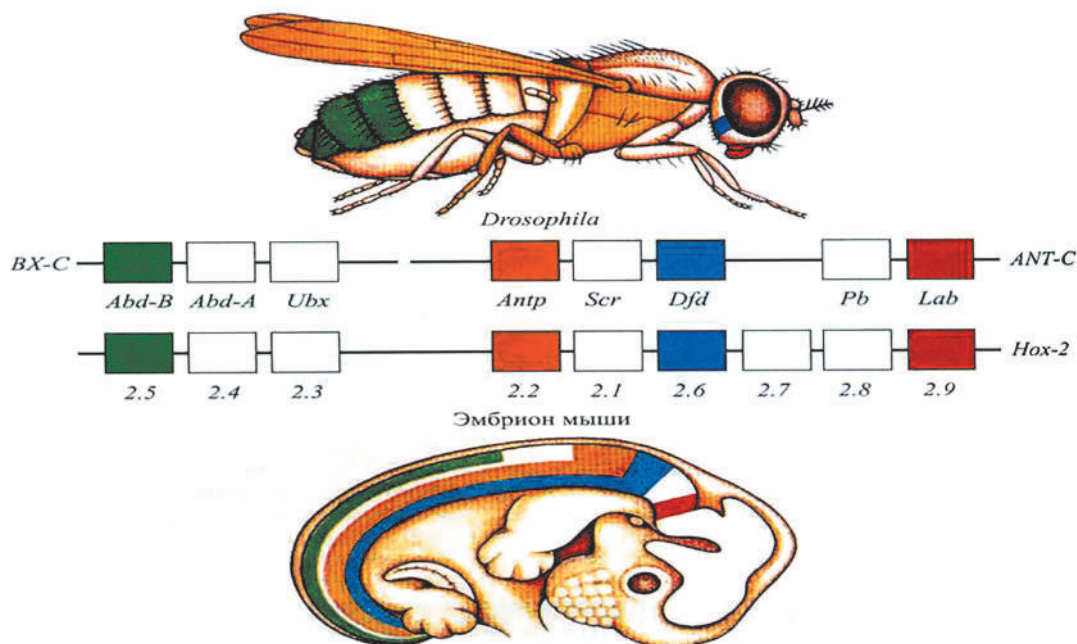
У дрозофилы гомеозисные гены направляют развитие особых личиночных структур – **имагинальных дисков (ИД)**. Из ИД образуется тело взрослой мухи. Популяции личиночных и имагинальных клеток разделяются очень рано. Личинка представляет собой капсулу для хранения и питания имагинальных клеток. У дрозофилы 19 ИД. После метаморфоза они преобразуются в различные органы мухи. Внешне клетки разных ИД очень похожи, но различаются биохимически. Проводили эксперименты по пересадке ИД другим личинкам в различные части тела и пересаженные ИД на новом месте дифференцируются в структуру, соответствующую его первоначальному положению, т.е. ИД имеет **жесткую детерминацию**.

Пересаженный в тело взрослой мухи ИД не изменялся, так как не было соответствующего гормонального воздействия. Такие ИД при последовательных пересадках живут долго, не претерпевая дифференцировки. Однако, иногда пересаженные ИД дифференцируются в структуры, отличные от первоначальных. Например, ИД антенн развивается в конечность. Это явление называется **трансдетерминацией**. Механизм трансдетерминации похож на гомеозисные мутации

**Мутации гомеозисных генов** нарушают детерминацию, устанавливаемую у дрозофилы еще на стадии бластодермы. К их числу относятся: *Antennapedia* – развитие дополнительных ног на месте антенн; *orthalmpoiera* – развитие крыла из имагинального диска глаза; у мутантов *tumorous head* ткани головы замещаются другими типами тканей, включая структуры, характерные для гениталий, и т.д. Установлено, что у гомеозисных мутантов нарушен процесс детерминации имагинальных дисков, что и приводит в дальнейшем к ошибкам дифференцировки.

Последовательно расположенные области, содержащие **кластеры гомеозисных генов** локализованы у дрозофилы на небольшом участке третьей хромосомы. (рисунок 5.6).

В одной из них находится комплекс ANT-C, включающий гены *Antennapedia* (*Antp*), *Deformed* (*Dfd*) и *Sex comb reduced* (*Scr*), которые контролируют развитие структур головы, первого и частично второго грудного сегмента. Во второй области локализован комплекс BX-C, включающий гены *bithorax* (*bx*), *Contrabithorax* (*Cbx*), *Ultrabithorax* (*Ubx*), *bithoraxoid* (*bxo*), *postbithorax* (*pbx*), *abdominal A* (*abd A*) и *Abdominal B* (*Abd B*), которые контролируют развитие остальных грудных и всех брюшных сегментов. Легко заметить в этом перечне гомеозисных генов коллинеарность их расположения в комплексах *Antp* и *BX-C* контролируемым ими органам в направлении от структур головы к структурам заднебрюшных сегментов. Конкретные механизмы **установления гомеозисными генами** границ их экспрессии пока не выяснены. Однако один из них найден: все шесть гомеозисных генов имеют общую последовательность длиной 180 п.н., которой соответствует участок полипептидной цепи из 60 аминокислот. Эта область ДНК была названа гомеобоксом (НОХ в англоязычной традиции), а ее белковый продукт – гомеодоменом. Термины были введены в 1984 г. В. Макгинисом, М. Скоттом и А. Вейнером. Гомеодомены разных гомеозисных генов гомологичны на 80-90%. Как было установлено впоследствии, гомеодомены принадлежат к числу факторов, активирующих транскрипцию.



Колинеарность расположения гомеозисных генов и картины их экспрессии у дрозофилы и мыши

[DeRobertis et al., 1990]

Гены, обладающие гомеобоксом, контролируют развитие столь различных организмов, как дрозофила и мышь.

Гомологичные гены и части тела у обоих видов закрашены одинаковым цветом

**Рисунок 5.6.** Колинеарность расположения гомеозисных генов и картины их экспрессии у дрозофилы и мыши [DeRobertis et al., 1990]

У дрозофилы 20-25 г.б. генов, они образуют **НОМ** семейство. У млекопитающих 38 г.б. генов, образующих **НОХ** сем. Гомеозисные гены образуют кластеры. У человека 4 кластера гомеозисных генов на 2, 7, 12, 17 хромосомах. В НОМ и НОХ семействах гены и располагаются, и считываются в одинаковом порядке. Белки, кодируемые этими генами, являются факторами транскрипции. Степень гомологии этих генов по аминокислотам составляет 97%.

#### 5.4. Гомеобоксы у человека. Наследственные болезни

**Гомологичные последовательности** найдены в ДНК амфибий, мыши и человека. Продуктом их является белок, связывающийся с ДНК и выполняющий регуляторные функции (репрессия-дерепрессия ДНК). Тестирование геномов различных *Metabiola* радиоактивной ДНК гена *Antp* с помощью Саузерн-блоттинга позволило выявить у них гены с гомеобоксом. Такие гены удалось обнаружить у кольчатых червей, моллюсков, иглокожих, лягушек, мыши и человека. При этом удивительное сходство можно обнаружить, сравнивая гомеодомены гена ММЗ лягушки и гена *Antp* дрозофилы: 59 из 60 аминокислотных остатков одинаковы, несмотря на то, что мухи и лягушки развивались независимо 600 млн. лет.

У человека идентифицированы четыре **НОХ-кластера**, каждый из которых состоит из серии тесно сцепленных генов:

Кластер	Количество генов	Номера генов	Локализация
НОХА	11	1-7, 9-11, 13	7p
НОХВ	10	1-9, 13	17q
НОХС	9	4-6, 8-13	12q
НОХD	9	1, 3, 4, 8-13	2q

**Эти 39 генов** удивительны тем, что большинство НОХ-мутаций разрушительны, и при наличии их эмбрион нежизнеспособен. С другой стороны, высокая степень гомологии между НОХ-генами разных кластеров может приводить к функциональной избыточности, за счет чего один НОХ-ген может компенсировать утрату функции вследствие мутации другого НОХ-гена. В этом контексте (внутривидовые гены, занимающие в разных кластерах одну и ту же позицию и характеризующиеся наибольшей гомологией) НОХ-гены называют паралогами. Так ген 13 из НОХD имеет большее сходство с геном 13 из НОХА и геном 13 из НОХС, чем с другими членами кластера НОХD.

**Мутация в гене 13 НОХА** служит причиной аутосомно-доминантного синдрома, характеризующегося укорочением первого и пятого пальцев кистей и стоп в сочетании с гипоспадией или двурогой маткой в зависимости от пола ребенка.

**Мутация в гене 13 НОХD** проявляется как синполидактилия – аномалия развития конечностей, наследующаяся по аутосомно-доминантному типу и характеризующаяся появлением дополнительного пальца между третьим и четвертым, фаланги которых частично срослись.

Что касается рассмотренных нами у **дрозофилы генов** группы pair-rule, то у млекопитающих обнаружен ее аналог, получивший название PAIR-BOX (PAX). Девять PAX-генов были идентифицированы у мыши и человека. У мыши они играют важную роль в развитии нервной системы. У человека мутации утраты функции четырьмя PAX-генами могут быть идентифицированы в связи с определенными аномалиями развития:

1. мутация в PAX3 (локализация гена – 2q35) обуславливает синдром Ваарденбурга 1-го типа, наследуемый аутосомно-доминантно и характеризующийся нейросенсорной глухотой, участками депигментации волос (часто в виде белой пряди) и аномальным паттерном пигментации радужек – гетерохромией;

2. мутация в PAX2 (локализация гена – 10q24) обуславливает синдром, при котором отсутствие почек и мочеполовых протоков (при наличии гонад и надпочечников) сочетаются со структурными дефектами в разных отделах глаза, включая сетчатку и зрительный нерв;

3. мутация в PAX6 (локализация гена – 11p13) приводит к развитию аниридии, которая в свою очередь является ключевым признаком для WAGR-синдрома. Этиологическая причина этого синдрома – делеция генных последовательностей, включающих локус PAX6 на коротком плече хромосомы 11;

4. наконец, значение экспрессии генов семейства PAX у человека демонстрирует также эффект мутации в PAX8 (локализация гена – 2q12), реализующийся в клинике как отсутствие или эктопия щитовидной железы.

Известны **несколько других генов** также образующих домен, подобный гомеобоксу. Это гены MSX2 и EMX2. Мутация в гене MSX2 приводит к краниосиностозу, т.е. преждевременному зарастанию швов черепа, что ограничивает его рост и приводит к деформации. Этот наиболее частый порок развития черепа поддается хирургическому лечению в возрасте до 3-х месяцев. Мутация в гене EMX2 является причиной шизэнцефалии – расщелины мозга в одном или обоих полушариях. К генам развития относится и семейство так называемых генов «цинковых пальцев», продуцирующих ДНК-связывающие белки.

Как уже указывалось, они играют роль **регуляторов транскрипции** и содержат характерный домен, который включает два цистеиновых и один гистидиновый остаток. Эти аминокислоты взаимодействуют с ионом цинка, а расположенная между ними полипептидная цепочка выпетливается в виде пальца. Гены «цинковых пальцев», также являются ответственными за некоторые болезни развития.

Например, **протяженные делеции** или транслокации, захватывающие ген GLI3, приводят к формированию синдрома цефалополисиндактилии Греига, для которого характерны множественные аномалии головы, кистей и стоп. По контрасту мутации со сдвигом рамки считывания в том же гене приводят к формированию синдрома Паллистера–Холла, клинически проявляющегося в совокупности гипоталамической гамартомы, неперфорированного ануса и присущей предыдущему синдрому полидактилии.

**Мутации генов ZIC2 и ZIC3** соответственно приводят к голопрозэнцефалии и латеральным дефектам, заключающимся в аномалиях развития и позиционирования непарных органов: сердца, печени и селезенки.

Мутации в области еще одного «**цинкового пальца**», содержащего ген WTI (Wilm's tumor-associated gene – состоит из 10 экзонов и кодирует 16 основных изоформ белка) хромосомы 11, могут быть причиной двух состояний:

1) у гетерозигот по делециям гена развивается WAGR-синдром (имеющий в своем составе опухоль Вилмса, аниридию, задержку умственного развития и дисгенезию гонад с предрасположенностью к возникновению гонадобластом);

2) у гетерозигот по миссенс-мутациям гена формируется синдром Дениса-Драша, характеризующийся наличием у пациента опухоли Вилмса, тяжелой прогрессирующей нефропатии с потерей белка, и неопределенных наружных гениталий.

Таким образом функционируют эти **несколько семейств генов** развития: семейство генов сегментации, кластеры гомеобоксных генов, Pair-box гены, семейство генов «цинковых пальцев». Кроме них известны еще три семейства:

1. Серия генов SOX. Они являются гомологами локализованного на Y-хромосоме гена SRY, роль которого в первичной детерминации пола уже описана. **Экспрессия гена SOX9** (SRY-related HMG box-containing gene) кроме полового валика, обнаружена также в хондроцитах развивающейся костной ткани человека, в связи с чем мутации гена SOX9 вызывают кампомелическую дисплазию, характеризующуюся множественными аномалиями скелета и внутренних органов. Гомолог человеческого гена – Sox-9 у мыши также необходим для нормального развития скелета. Всего же семейство Sox у мыши состоит более чем из двух десятков генов, характеризующихся тканеспецифической экспрессией в раннем эмбриогенезе: например, Sox 1-3 в нервной системе, Sox-4 – в

иммунной. Имеющиеся данные позволяют утверждать, что у позвоночных гены с гомеобоксом выполняют морфогенетические функции.

2. Серия генов T-box, экспрессия которых имеет важное значение для формирования мезодермы. В геноме человека они распределены дисперсно в виде небольших кластеров.

3. Гены сигнальной трансдукции (процесса, при котором внеклеточные факторы роста регулируют клеточное деление и дифференцировку, используя комплексные пути генетически детерминированных промежуточных шагов). Мутации большинства этих генов играют важную роль в канцерогенезе. В некоторых случаях они могут также быть причиной аномалий развития.

В результате изучения **гомеозисных генов** у позвоночных было установлено сохранение описанного выше для дрозофилы принципа коллинеарности, т.е. активность НОХ-генов млекопитающих вдоль передне-задней оси тела отражает последовательность этих генов в кластере. Для выяснения роли конкретных НОХ-генов в эмбриогенезе млекопитающих особенно информативным оказался метод нокаута (knockout), состоящий в замещении нормального аллеля мутантным. Этот же метод оказался чрезвычайно эффективным при изучении генетических основ эмбриональной индукции, которые будут рассмотрены ниже.

В проявлении признаков у **трансгетерозиготных дрозофил** наблюдается определенная полярность. Так, особи  $bxd^{+}/+ \text{rbx}$  подвергаются в развитии превращениям по типу  $\text{rbx}:$ , а не  $bxd$ ; особи  $bx^{+}/+ \text{rbx}$  проявляют себя как  $\text{rbx}$ , а не  $bx$ : нормальные аллели при расположении справа от мутантного локуса инактивируются таким образом, что экспрессируется их рецессивный мутантный аллель. Объясняя эти особенности гомеозисных генов, американский генетик, Нобелевский лауреат Эдвард Льюис предложил гипотезу, базирующуюся на двух предположениях: серия мутантов *bithorax* подобна оперону бактерий; нормальные аллели гомеозисных генов продуцируют вещества, дающие морфогенетический эффект, а мутантные не способны синтезировать их. Из этой гипотезы вытекает ряд важных следствий.

Во-первых, реализация плана сегментарного строения обеспечивается самой функциональной организацией локуса ВХ-С.

Во-вторых, **продукты каждого из генов**, контролирующих сегментарное строение, должны выявляться в тканях соответствующих сегментов.

В-третьих, **координированное функционирование генов** локуса ВХ-С возможно лишь при наличии специальных регуляторных участков.

Наконец, принципы **генетического контроля сегментации** должны быть универсальными для всего животного мира.

Эти положения получили блестящее подтверждение в **молекулярно-генетических работах**. Все шесть гомеозисных генов удалось клонировать и с помощью гибридизации *in situ* установить характер их экспрессии. Было показано, что нормальная транскрипция у гомеозисных мутантов нарушена. Так, ген *Antp* дикого типа нормально экспрессируется в торакальных сегментах, подавляя развитие в них головных структур. А у носителей доминантной мутации по гену *Antp* его транскрипты обнаружены не только в груди, но и в голове. В результате вместо антенных структур развиваются членики ноги. Кроме

того, было показано, что гомеозисные гены способны регулировать экспрессию других гомеозисных генов, причем экспрессия *Antrp* и *Ubx* имеет комплементарный характер.

**Изучение структуры** любого биологического объекта, несомненно, приближает нас к пониманию его функций. Перечисленные ниже особенности структуры гомеозисных генов, установленные в результате их клонирования, свидетельствуют о чрезвычайной сложности регуляции развития.

1. Некоторые из гомеозисных генов имеют несколько промоторов и сайтов инициации транскрипции. Так два промотора имеет ген *Antrp*, следствием чего является возможность транскрипции РНК двух типов.

2. РНК некоторых гомеозисных генов, в частности гена *Ubx*, подвергаются тканеспецифическому дифференциальному сплайсингу.

Таким образом, **гомеозисные гены**, контролирующие становление пространственной организации, по-видимому, работают не только по принципу «включен-выключен», но и с помощью сочетания набора их альтернативных состояний. Нормальная функция гомеозисных генов состоит в выборе или поддержании определенного пути развития, по которому следуют клетки. Каждый путь развития характеризуется экспрессией определенного набора генов, действие которых приводит к появлению конечного результата этого пути развития: глаза, крыла, ноги и т.д. В ходе мутационного анализа гомеозисных генов часто выявляется летальность для эмбриона тех мутаций (например, хромосомных делеций), которые полностью подавляют функцию гена.

Кроме гомеозисных генов есть другие регуляторные гены, которые контролируют гомеозисные гены. Дифференциальная экспрессия идет путем взаимодействия многих регуляторных генов. Активация одних генов запускает экспрессию других и весь каскад генов контролируется одним главным геном или мастер-геном – «гены господ». Структурные гены называют «гены рабы». Между ними находятся многочисленные регуляторные гены, к которым относятся и гомеозисные гены. Пример: развитие глаза. Мастер гены имеют максимальную гомологию (дрозофила, мышь, человек).

## 5.5. Дифференциация

Дифференциация – процесс специализации клеток, приводящий к морфофизиологическим различиям. В результате дифференциации реализуется программа, намеченная детерминацией. В зависимости от типа клеток, стадии их развития, типа синтезируемого белка гены делятся на:

1.«Гены домашнего хозяйства», которые экспрессируются во всех клетках и поддерживают универсальные клеточные функции;

2.«Гены роскоши» характерны для отдельных типов клеток и контролируют специализированные функции.

Дифференциальная экспрессия генов домашнего хозяйства обеспечивает начальную дифференциацию без тканевой специфичности, сразу после детерминации.

Дифференциальная экспрессия «генов роскоши» обеспечивает дифференциацию клеток в определенном направлении, формирует клеточные линии, ткани, органы. Дифференцировка нервной ткани обеспечивается экспрессией:

1. Собственных генов;
2. Генов смежных нейронов;
3. Генов удаленных нейронов;
4. Генов глиальных клеток;
5. Генетической системы эндокринных органов.

По мере развития зародыша усиливаются связи между клетками и увеличивается влияние их друг на друга. Влияние клеточных структур, определяющее развитие других клеточных структур, называется **эмбриональной индукцией**.

Дифференцированные клетки теряют митотическую активность, но в каждой ткани есть резерв клеток, сохраняющих способность к делению. Это стволовые клетки – недифференцированные клетки предшественники других клеток. Эмбриональные стволовые клетки зародыша обладают тотипотентностью. Тотипотентность или эквипотенциальность – способность клетки развиваться в любом направлении. У взрослого организма стволовые клетки мультипотентны, т.е. способны дифференцироваться в различные виды клеток.

Можно ли изменить детерминацию, переключить развитие в новом направлении? Ответом являются эксперименты по клонированию. **Клон** – клеточная популяция из одной исходной соматической клетки. Процесс получения клона называется клонированием. Примером клонирования являются опыты с пересадкой ядер, которые показали принципиальную возможность обратимости изменений при дифференцировке. Пересадку ядер проводили и на млекопитающих: до стадии 8 бластомеров клетки тотипотентны. Т.о., каждый тип ткани образуется не из одной клетки предшественницы, а из группы клеток. Эксперименты по пересадке ядер млекопитающих в энуклеированные яйцеклетки вначале были неудачными: только 5 -20 % зародышей развивались до стадии морулы. Это говорит о быстрой утере тотипотентности в эмбриогенезе. Поэтому сообщение о клонировании овечки Долли в 1997 г. стало сенсацией. Английский эмбриолог Я. Вильмут использовал ядра клеток молочной железы взрослой овцы, ввел их в энуклеированную яйцеклетку и затем перенес в овцу-реципиента. Из 250 экспериментов только 1 увенчался успехом.

### 5.6. Эмбриональная индукция

Эмбриональная индукция – взаимодействие между частями развивающегося организма у многоклеточных, беспозвоночных и всех хордовых.

Явление было открыто в 1901 году при изучении образования зачатка хрусталика глаз у зародышей земноводных. Гипотезу о механизме дифференцировки, получившем название эмбриональной индукции, на основании экспериментальных данных выдвинули Шпеман и Мангольд в 1924 году. Согласно этой гипотезе, существуют определенные клетки, которые действуют как организаторы на другие, подходящие для этого клетки. В условиях отсутствия клеток-организаторов такие клетки пойдут по другому пути развития, отличному от того, в котором они развивались бы в условиях присутствия организаторов. Проиллюстрировать это можно тем самым экспериментом 1924-го года, показавшим, что дифференцировка в значительной степени контролируется влиянием клеток одного типа на клетки другого типа.

### Эксперимент

Г. Шпеман и его сотрудница Х. Мангольд открыли у зародышей амфибий «организатор». Контрольный эксперимент был проведен Хильдой Мангольд в 1921 году. Она вырезала кусочек ткани из дорсальной губы бластопора гастролы гребенчатого тритона (*Triturus cristatus*) со слабопигментированными клетками и пересадила её в вентральную область другой гастролы близкого вида, тритона обыкновенного (*T. vulgaris*), зародыш которого сильнее пигментирован. Эта естественная разница в пигментации позволила различить в химерном зародыше ткани донора и реципиента. Клетки дорсальной губы при нормальном развитии образуют хорду и мезодермальные сомиты (миотомы). После пересадки у гастролы-реципиента из тканей трансплантата развивалась вторая хорда и миотомы. Над ними из эктодермы реципиента возникла новая дополнительная нервная трубка. В итоге это привело к образованию осевого комплекса органов второй личинки на том же зародыше.

Явление эмбриональной индукции тесно связано с такими понятиями, как морфоген и морфогенетическое поле (*morphogenetic field*). Еще Шпеманом было показано, что инактивированные нагреванием ткани организатора сохраняют индуцирующую активность, и среда из-под изолированного организатора также индуцирует эктодерму.

Позже было показано, что многие ткани взрослых животных индуцируют нейрализацию эктодермы. Также были открыты вещества-индукторы, такие как хордин и ноггин действуют косвенно, через подавление BMP (англ. *Bone Morphogenetic protein*) – эпидермального индуктора, его инактивация хордином и ноггином вызывает нейрализацию эктодермы, и многие другие.

### Интересные факты

Эмбриональная индукция – *лишь один из механизмов* онтогенеза. Многие процессы развития регулируются иными механизмами.

Участок дорсальной губы бластопора, который при пересадке вызывает на новом месте образование мезодермы и нейроэктодермы получил название «организатор Шпемана».

За своё открытие Ганс Шпеман получил в 1935 г Нобелевскую премию

## 5.7. Морфогенез

Морфогенез (англ. *morphogenesis*, от др.-греч. μορφή ‘форма’ и γένεσις ‘возникновение’, или буквально «формообразование») – возникновение и развитие органов, систем и частей тела организмов как в индивидуальном (онтогенез), так и в историческом, или эволюционном, развитии (филогенез). Изучение особенностей морфогенеза на разных этапах онтогенеза в целях управления развитием организмов составляет основную задачу биологии развития, а также генетики, молекулярной биологии, биохимии, эволюционной физиологии, и связано с изучением закономерностей наследственности (см. таблицу 5.1).



**Таблица 5.1 Морфогенетические процессы в различные клинические стадии внутриутробного развития зародыша человека. Модификация: Афанасьев Ю.И., Юрина Н.А., Котовский Е.Ф. и др. Гистология, цитология и эмбриология. М., «Медицина», 2003, 737 с., см.: Гистология человека: Литература. Иллюстрации.**

№	Сроки развития, недели	Морфогенетические процессы
I. Стадия предэмбриона (стадия предэмбриогенеза) в развитии зародыша (1-я неделя)		
1	1-я	Оплодотворение. Дробление зиготы. Образование морулы и бластулы. Первая стадия гастрюляции (деламинация), образование эпибласта и гипобласта. Начало имплантации
II. Стадия эмбриона (эмбриональная стадия) в развитии зародыша (2-я – 8-я недели)		
2	2-я	Завершение имплантации. Формирование зародышевого диска. Вторая стадия гастрюляции (иммиграция), образование первичной полоски, предхордальной пластинки. Образование амниотического и зародышевого пузырьков, внезародышевого мезодерма. Дифференцировка трофобласта на цитотрофобласт и симпластотрофобласт, первичных ворсин хориона. Развитие первичного и вторичного (дефинитивного) желточного мешка (пупочного пузырька).
3	3-я	Продолжение 2-й стадии гастрюляции, образование трех зародышевых листков, хорды, предхордальной пластинки, нервной трубки, нервного гребня. Начало сегментации дорзальной мезодермы (сомиты, сегментные ножки), образование париетального и висцерального листков спланхнотомов и эмбрионального целома, который далее разделяется на 3 полости тела – перикардальную, плевральную, перитонеальную. Закладка сердца, кровеносных сосудов, предпочки – пронефроса. Формирование внезародышевых органов – аллантоиса, вторичных и третичных ворсин хориона. Образование туловищной складки и отделение первичной кишки, зародыша от вторичного желточного мешка.
4	4-я	Углубление желточной складки, образование желточного стебля и приподнятие зародыша в полости амниона. Продолжение сегментации дорсальной мезодермы до 30 сомитов и дифференцировка на миотом, склеротом и дерматом. Замыкание нервной трубки и формирование переднего невропора (к 25 сут) и заднего невропора (к 27 сут), образование нервных ганглиев; закладка лёгкого, желудка, печени, поджелудочной железы, эндокринных желёз (аденогипофиза, щитовидной и околощитовидных желёз). Образование ушной и хрусталиковой плакод, первичной почки – мезонефроса. Начало формирования плаценты. Образование зачатков верхних и нижних конечностей, 4-х пар жаберных дуг.

5	5-я	Расширение головного конца нервной трубки. Окончание сегментации мезодермы (образование 42-44 пар сомитов), образование несегментированной мезодермы (нефрогенная ткань) в каудальном отделе. Развитие бронхов и долей лёгкого. Закладка окончательной почки (метанефрос), уrogenитального синуса, прямой кишки, мочевого пузыря. Образование половых валиков.
6	6-я	Формирование лица, пальцев рук. Начало образования наружного уха и глазного яблока. Образование зачатков отделов головного мозга – моста, мозжечка. Формирование печени, поджелудочной железы, легких. Закладки грудных желез. Отделение гонад от мезонефроса, формирование половых различий гонад.
7	7-я	Формирование верхних и нижних конечностей. Разрыв клоакальной мембраны.
8	8-я	Формирование пальцев верхней и нижней конечностей. Значительное увеличение размеров головы (до 1 / 2 длины туловища). Пуповина представляет собой шнур, соединяющий пупок зародыша/плода с плацентой. Пупочные кровеносные сосуды (две артерии и одна вена) обеспечивают гемациркуляцию зародыша и его питание и дыхание.
III. Стадия плода (фетальная стадия) в развития зародыша (9-я – 38-я неделя)		
9	9-38-я нед	Завершение формирования плаценты (12 – 13 нед). Образование гладкого и ворсинчатого хориона. Разрастание симпластотрофобласта и редукция цитотрофобласта в ворсинах плаценты. Значительное увеличение размеров и массы плода. Продолжение процессов формирования тканей и органов. Формирование системы беременная – плод. Кровообращение плода.

Процесс морфогенеза контролирует организованное пространственное распределение клеток во время эмбрионального развития организма. Морфогенез может проходить также и в зрелом организме, в клеточных культурах или опухолях. Морфогенез также описывает развитие неклеточных форм жизни, у которых нет эмбриональной стадии в их жизненном цикле. Морфогенез описывает эволюцию структур тела в пределах таксономической группы.

Морфогенетический ответ в организме может быть вызван гормонами, окружающими химическими сигналами широкого диапазона: от продуктов жизнедеятельности других клеток и организмов до токсических веществ и радионуклидов, или механическими воздействиями.

Некоторые из самых ранних идей того, как физические процессы и математические ограничения влияют на биологический рост, были высказаны Д'Арси Вентвортом Томпсоном и Аланом Тьюрингом. Так, в 1952 году Тьюринг опубликовал работу под названием «Химические основы морфогенеза» [A.M. Turing, F.R.S., 1952], где впервые математически описывается процесс самоорганизации материи. Работы этих авторов постулировали наличие в процессе роста клеток и организмов химических сигналов и физико-химических процессов, таких как диффузия, активация и деактивация. Более полное понимание механизмов морфогенеза пришло с изучением ДНК,

молекулярной биологии и биохимии, молекулярных механизмов регуляции работы генов.

Естественные морфологические системы, как правило, имеют модульную иерархическую структуру. Эта особенность является результатом эволюции биологических систем, в рамках которой происходила фиксация основных молекулярных процессов, с последующей комбинацией динамического регулирования внутри- и межклеточных взаимодействий. [Teague B. P., Guye P., Weiss R., 2016].

## 5.8. Клеточный уровень

Морфогенез возникает из-за изменений в клеточной структуре или из-за взаимодействий клеток в тканях. По современным представлениям связующим звеном контроля и регуляции между клеткой и целостным организмом является ниша стволовой клетки. Клетки некоторых типов *сортируются*. Это означает, что клетки собираются в кластеры так, чтобы максимизировать контакт с клетками того же типа (см. агрегация клеток). Два хорошо известных типа таких клеток – эпителиальные и мезенхимальные. В процессе эмбрионального развития происходят несколько событий клеточной дифференцировки, когда мезенхимальные клетки становятся эпителиальными и наоборот (см. Эпителиально-мезенхимальный переход). При этом клетки могут мигрировать из эпителия и ассоциироваться с другими подобными клетками в новом месте.

*Молекулярные механизмы эпителиально-мезенхимального перехода*

Для описания механизмов ЭМП можно выделить несколько ключевых моментов:

1. Подавление экспрессии гена E-кадгерина (E-cadherin (CDH1)) участвующего в образовании плотных контактов между эпителиоцитами.
2. Увеличение экспрессии генов ответственных за мезенхимальный фенотип эпителиоцитов, таких как виментин (Vimentin), гладко-мышечный актин, фибронектин (Fibronectin).
3. Усиление клеточной подвижности вследствие активации сигнальных путей приводящих к реорганизации цитоскелета.
4. Повышение экспрессии генов, кодирующих матриксные металлопротеиназы (ММП), которые участвуют в деградации внеклеточного матрикса и базальной мембраны.

Растворимые факторы роста (на схеме), цитокины, молекулы внеклеточного матрикса активируют сигнальные пути ведущие к реализации программы *эпителиально-мезенхимального перехода* (ЭМП). Эти пути активируют ряд транскрипционных факторов (Snail, Twist, Slug, ZEB1, ZEB2, Lef-1 и др.), которые связываются с промоторами генов ответственных за ЭМП (рисунок 5.7).

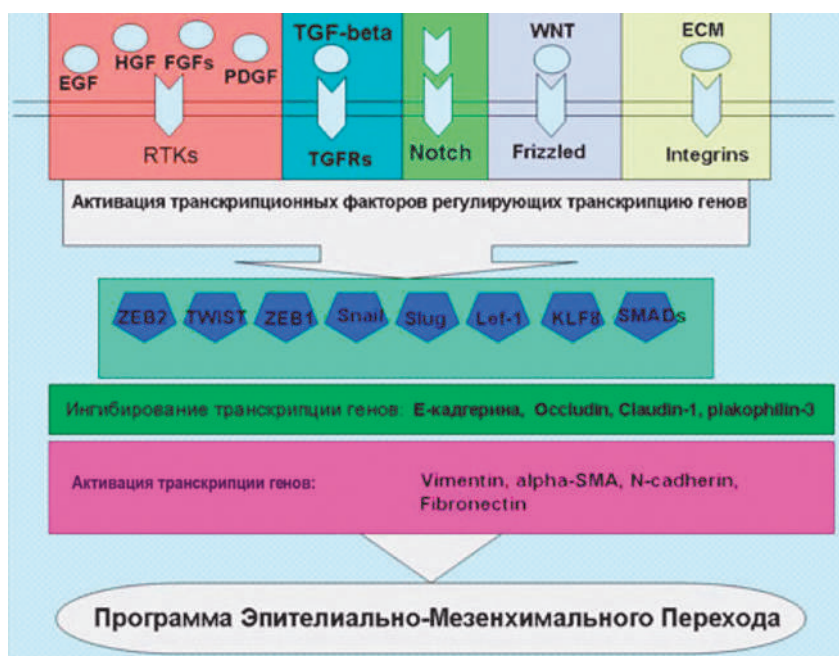


Рисунок 5.7. Схема. Программа Эпителиально-Мезенхимального Перехода.  
Автор: Kadmon . org/wikipedia/ru/1/16/EMT1.jpg

Промоторы генов, кодирующих белки плотных контактов (Tight Junction)(TJ) -E-cadherin, occludin, claudin-1, транскрипционно ингибируются этими транскрипционными факторами, а соответственно промоторы генов компонентов цитоскелета, например Vimentin, а также генов белков внеклеточного матрикса Fibronectin, в свою очередь, наоборот активируются.

**Гастрюляция** – сложный процесс морфогенетических изменений, сопровождающийся размножением, ростом, направленным перемещением и дифференцировкой клеток, в результате чего образуются зародышевые листки (эктодерма, мезодерма и энтодерма) – источники зачатков тканей и органов. Второй после дробления этап онтогенеза. При гастрюляции происходит перемещение клеточных масс с образованием из бластулы двухслойного зародыша – гастрюлы.

Тип бластулы определяет способ гастрюляции.

Зародыш на этой стадии состоит из явно разделенных пластов клеток – зародышевых листков: наружного (эктодерма) и внутреннего (энтодерма).

У многоклеточных животных, кроме кишечнополостных, параллельно с гастрюляцией или, как у ланцетника, вслед за ней возникает и третий зародышевый листок – мезодерма, который представляет собой совокупность клеточных элементов, расположенных между эктодермой и энтодермой. Вследствие появления мезодермы зародыш становится трехслойным.

У многих групп животных именно на стадии гастрюляции появляются первые признаки дифференцировки. Дифференцировка (дифференциация) – процесс возникнове-

ния и нарастания структурных и функциональных различий между отдельными клетками и частями зародыша.

Из эктодермы образуется нервная система, органы чувств, эпителий кожи, эмаль зубов; из энтодермы – эпителий средней кишки, пищеварительные железы, эпителий жабр и легких; из мезодермы – мышечная ткань, соединительная ткань, кровеносная система, почки, половые железы и др.

У разных групп животных одни и те же зародышевые листки дают начало одним и тем же системам органов и тканям.

Зародыш человека проходит стадию гастрюлы на 8-9 сутки развития. Гастрюла человека представляет собой уплощенное дискоидальное образование (т.н. «зародышевый диск»), которое формируется из «внутренней клеточной массы» бластоцисты. Верхний (то есть обращенный к анимальному полюсу) слой зародышевого диска относят к эктодерме, средний слой – к мезодерме, нижний (то есть обращенный к вегетативному полюсу, к будущему желточному мешку) слой диска относят к энтодерме. Гомологом первичной кишки у человека является т.н. «первичный желточный мешок» – пространство, ограниченное с анимального полюса эктодермой зародышевого диска, а с прочих сторон т.н. гипобластом – внезародышевой энтодермой (таблица 5.1).

**Нейруляция** – образование нервной пластинки и её замыкание в нервную трубку в процессе зародышевого развития хордовых.

Нейруляция – один из ключевых этапов онтогенеза. Зародыш на стадии нейруляции называется нейрулой.

Развитие нервной трубки в передне-заднем направлении контролируется специальными веществами – морфогенами (они определяют, какой из концов станет головным мозгом), а генетическая информация об этом заложена в так называемых гомеотических, или гомеозисных генах.

Например, морфоген ретиновая кислота при увеличении её концентрации способна превратить ромбомеры (сегменты нервной трубки заднего отдела головного мозга) одного вида в другой.

У птиц и млекопитающих – нервная пластинка инвагинирует внутрь, и замыкается в нервную трубку. У птиц и млекопитающих в процессе нейруляции выступающие части нервной пластинки, называемые **нервными валиками**, смыкаются по всей длине нервной трубки неравномерно.

Обычно смыкается сначала середина нервной трубки, а потом смыкание идет к обоим её концам, оставляя в итоге два несомкнутых участка – передний и задний нейропоры.

У человека смыкание нервной трубки более сложное. Первым смыкается спинной отдел, от грудного до поясничного, вторым – участок ото лба до темени, третьим – лицевой, идет в одном направлении, к нейрокраниуму, четвертым – участок от затылка до конца шейного отдела, последним, пятым – крестцовый отдел, также идет в одном направлении, от копчика.

При несмыкании второго участка обнаруживается смертельный врожденный порок – анэнцефалия. У зародыша не формируется головной мозг.

При несмыкании пятого участка обнаруживается поддающийся коррекции

врожденный порок – расщепление позвоночника, или Spina bifida. В зависимости от тяжести расщепление позвоночника делят на несколько подтипов.

### **Нервный гребень**

Нервный гребень – это совокупность клеток, выделяющихся из дорзальных отделов нервного желобка во время его замыкания в нервную трубку.

Клетки нервного гребня обладают развитой способностью мигрировать в организме. Клетки нервного гребня развиваются в весьма разнообразные структуры. Из-за этих двух особенностей и сравнительной лёгкости экспериментов с этим временным органом нервный гребень широко исследуется в эмбриологии.

### **Производные нервного гребня**

Клетки нервного гребня образуются почти на всём протяжении замыкающейся нервной трубки. В нём различают несколько уровней по длине, из клеток разных уровней развиваются разные структуры.

Из нервного гребня развиваются многие ганглии нервной системы (спинальные, вегетативные), глиальные клетки периферической нервной системы (шванновские), вспомогательные клетки нервных окончаний, а также пигментные клетки (меланоциты кожи), хрящи лицевого черепа, часть мозговых оболочек, хромоаффинные клетки надпочечников, одонтобласты (клетки, секретирующие дентин) и т. д. В сердце из мезенхимальных клеток, происходящих из нервного гребня, формируется перегородка между аортой и лёгочным стволом [Bibha Choudhary, et al. 2006].

### **Миграции клеток нервного гребня**

Сейчас точно неизвестна причина миграции клеток нервного гребня. Одна из перспективных гипотез предполагает, что в основе миграции клеток лежит чувствительность к фибронектину и ламинину – белкам внеклеточного матрикса. Показано, что введение антител к этим белкам блокирует миграцию.

Известны три основных пути миграции:

В вентральном направлении через передний отдел сомита, то есть по окружности, перпендикулярной оси нервной трубки, вниз. Мигрировавшие таким образом клетки образуют вегетативные (симпатические и парасимпатические) ганглии, вещество надпочечников, спинальные ганглии.

Клетки, примыкающие к заднему отделу, мигрируют через передний, то есть вначале движутся вдоль оси нервной трубки, а потом спускаются так же, как в первом случае. Образуют спинальные ганглии.

Миграция в дорсолатеральном направлении – под эктодерму, то есть в стороны от нервной трубки, не спускаясь. Образуют меланоциты.

Энтодерма и её производные у хордовых животных оказывают индукционное влияние на развитие хордомезодермы и некоторых производных эктодермы (рот, анус, жаберные щели, наружные жабры) и, в свою очередь для нормального развития нуждаются во влияниях, исходящих от различных экто- и мезодермальных закладок.

**Мезодерма** (др.-греч. μέσος – средний, промежуточный + δέρμα – кожа), или *мезобласт* – средний зародышевый листок у многоклеточных животных (кроме губок и кишечнополостных).

Располагается между эктодермой и энтодермой. У разных групп животных образуется различными способами.

У плоских червей и немуртин полосы мезодермы дают соединительную ткань, заполняющую пространство между внутренними органами, у кольчатых червей и большинства других беспозвоночных полосы мезодермы расчленяются на парные сомиты с вторичной полостью – целомом.

У позвоночных в период нейруляции с боков от зачатка хорды мезодерма расчленяется на спинные (первичные) сегменты – сомиты, нефротомы и несегментированную брюшную мезодерму – боковые пластинки. Между двумя листками каждой из них образуется целом.

**Дифференцировка мезодермы** начинается с 20-х суток эмбриогенеза. Дорсальные участки мезодермальных листков разделяются на плотные сегменты, лежащие по сторонам от хорды – *сомиты*. Процесс сегментации дорсальной мезодермы и образования сомитов начинается в головной части зародыша и быстро распространяется в каудальном направлении. На 22-е сутки развития у эмбриона имеется 7 пар сегментов, на 25-е – 14, на 30-е – 30 и на 35-е сутки – 43–44 пары. В отличие от сомитов вентральные отделы мезодермы (*спланхнотом*) не сегментируются, а расщепляются на два листка – *висцеральный* и *париетальный*. Небольшой участок мезодермы, связывающий сомиты со спланхнотомом, разделяется на сегменты – *сегментные ножки (нефрогонотом)*. На заднем конце зародыша сегментации этих отделов не происходит. Здесь взамен сегментных ножек располагается несегментированный нефрогенный зачаток (*нефрогенный тяж*). (рисунок 5.8).

Из мезодермы впоследствии формируются хорда, хрящевой и костный скелет, мышцы, почки, кровеносные сосуды. Мезодерма и её производные оказывают индуцирующее влияние на развитие производных эктодермы и энтодермы и в свою очередь испытывают индуцирующее влияние с их стороны.

Мезодерма дифференцируется на 3 части:

1. дорсальная часть получает название сомит и сегментируется на 44 сегмента;
2. вентральная часть – спланхнотом расщепляется на 2 листка – париетальный прилежит к эктодерме и висцеральный – прилежит к энтодерме, они замыкаются и включают вторичную полость тела – целом;
3. сегментная ножка, или нефрогонотом – участок, соединяющий сомиты и спланхнотом.

Нефрогонотом сегментируется вслед за сомитами, но не до конца, в каудальном отделе ножки не разделяются и формируют диффузную нефрогенную ткань.



**Рисунок 5.8.** Дифференцировка мезодермы <https://ppt-online.org/30103>; <https://www.google.com/search?q=рисунки+дифференцировка+мезодермы&rlz>

Каждый сомит в дальнейшем подразделяется на 3 части:

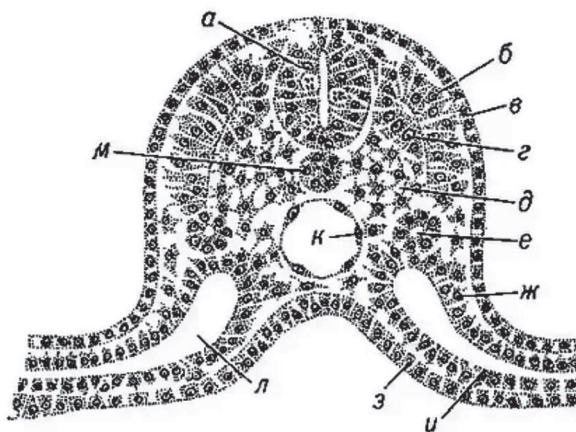
1. склеротом – костная и хрящевая ткань осевого скелета,
2. миотом – поперечно-полосатая скелетная мышечная ткань, и
3. дерматом – соединительнотканная основа кожи.

Нефрогонотом даст начало эпителию выделительной и половой систем.

Париетальный и висцеральный листки спланхнотом преобразуются соответственно в париетальный и висцеральный листки серозных оболочек (брюшины, плевры, перикарда), а целом – в соответствующие серозные полости тела.

Помимо этого, из спланхнотом выселится большая часть клеток мезенхимы, которая даст начала соединительной и гладкомышечной ткани большинства внутренних органов.

Из висцерального листка спланхнотом разовьются также корковое вещество надпочечников, миокард и эпикард сердца (рисунок 5.9).



**Рисунок.5.9.** Схема развития органов из мезодермы у высшего позвоночного (поперечный разрез зародыша): а – нервная трубка, б – дерматом, в – эктодерма, г – миотом, д – склеротом, е – нефротом, ж – наружный листок спланхнотом, з – энтодерма, и – внутренний листок спланхнотом, к – эндотелий аорты, л – целом, м – хорда. <http://bse.sci-lib.com/article075135.html>



## 5.9. Клеточные механизмы онтогенеза

**Пролиферация.** Управление пролиферацией клеток идет при помощи белка деления – **циклина**, который представлен несколькими разновидностями и действует на разных стадиях митотического цикла. Циклин способен разрушаться в процессе митоза и накапливаться после завершения митоза. По достижении критической концентрации того или иного циклина включается синтез ДНК и клетка вступает в митоз. Для реализации митоза должен образоваться сложный белок МРФ, состоящий из 2-х элементарных белков: циклина В и cdk1. В разных тканях ритм деления клеток управляется по-разному. В одних случаях присутствуют белки, приостанавливающие движение клеток по циклу.

### **Клеточная миграция (КМ)**

Часто встречающийся вариант КМ – амeboидное движение. Оно сводится к формированию уплощенного отростка цитоплазмы, который удлиняется в направлении движения клетки и подтягивает оставшуюся часть клетки за псевдоподией. Примером является миграция клеток нервного гребня. Особый тип миграции клеток в онтогенезе – движение сперматозоидов по хемотаксису (направление движения сперматозоидов по градиенту концентрации гиногамонов яйцеклетки).

**Клеточная адгезия** – способность клеток прилипать друг к другу. Например, эпителиальные клетки плотно прилегают друг к другу. Это обусловлено наличием в мембране специфических белков – **молекул клеточной адгезии** – гликопротеидов, которые взаимодействуют друг с другом по принципу ключ-замок. При отсутствии молекул межклеточной адгезии или их малом количестве клетки не прилипают друг к другу или прилипают не всей поверхностью. В этом случае клетки имеют шарообразную форму и касаются друг друга в одной точке. Например, на ранних стадиях дробления, когда зародыш состоит из нескольких шарообразных клеток. Клетки эмбриональной мезенхимы – пример слабой адгезии.

**Апоптоз** – запрограммированная смерть клеток, которая реализуется генетической программой «самоубийство». **Полагают, что эта генетическая программа универсальна для всех живых систем.** Апоптоз необходим для ограничения бурного клеточного роста, чтобы прервать рост в связи с завершением этапа морфогенеза, сформировать отверстие, полости, щели в сплошном эмбриональном органе (например, отверстие, связывающее матку и влагалище, полость среднего уха, межпальцевые перепонки). Масштабы апоптоза велики. Например, 2/3 нейронов, появившихся в ходе развития мозга эмбриона человека, погибает до рождения.

При мутации гена, кодирующего белок, запускающий апоптоз у мышей, развивается очень большой мозг, что вызывает несовместимость с жизнью. При отсутствии апоптоза желудочки мозга недоразвиваются и оказываются слишком маленькими. При апоптозе ядро и цитоплазма конденсируются, клетка делится на фрагментарные апоптозные тела, идет фагоцитоз и переваривание их макрофагами. Примером гена апоптоза является ген Rrg у дрозофилы, способный аккумулировать внешние и внутренние сигналы для своей экспрессии и вызывать смерть клетки. Экспрессия гена bcl-2 у человека, наоборот, блокирует программу апоптоза в опухолевых клетках.

В ходе онтогенеза у разных зачатков эмбриона может неоднократно происходить переход из состояния мезенхимы (слабая адгезия и высокая подвижность клеток) в состояние эпителия (высокая адгезия и низкая подвижность) и обратно.

В настоящее время торможению апоптоза в процессе малигнизации клеток придается большое значение. В норме клетки регистрируют нарушения экспрессии генов, контролирующих деление, и в таких клетках включается программа апоптоза. При малигнизации такая регуляция нарушается и апоптоз выступает как механизм защиты организма от клеток с генетическими нарушениями. При других заболеваниях человека (нейродегенеративных болезнях) происходит интенсификация физиологической гибели клеток.

Сложность генома млекопитающих, их эмбрионального развития, длительный период, предшествующий размножению, и трудности изучения большого числа индивидуальных животных делают генетический анализ этих систем затруднительным. Направленная инактивация генов является чрезвычайно важным методическим приемом, применяемым для получения трансгенных животных. Наибольшее развитие такие работы получили в экспериментах на мышах. Создание линий мышей, гомозиготных по направленно инактивированному гену, позволяет изучать детерминируемые данным геном свойства на уровне организма. Благодаря появлению методологии получения нокаутных мышей молекулярная генетика этой удобной лабораторной модели стала развиваться небывалыми темпами.

Используя трёхмерные клеточные культуры учёные научились выращивать «зачатки» органов названные органоидами (англ. organoid, не путать с органеллами). Такие органоиды используются учёными для изучения и моделирования органогенеза, моделирования опухолей и различных заболеваний, которым могут быть подвержены определенные органы, тестирования и скрининга на органоидах различных лекарственных препаратов и токсичных веществ, а также для экспериментов по замене органов или терапии повреждённых органов трансплантатами [Cantrell MA, Kuo CJ.(2015); Lancaster MA, Knoblich JA.(2014)].

### Литература

1. J. A. Davies, "Synthetic morphology: prospects for engineered, self-constructing anatomies.," *J. Anat.*, vol. 212, no. 6, pp. 707–19, Jun. 2008.
2. Teague B. P., Guye P., Weiss R. Synthetic morphogenesis // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. — 2016. — Vol. 8, № 9. — P. a023929. —
3. Teague, B. P., & Weiss, R. (2015). Synthetic communities, the sum of parts. *Science*, 349(6251), 924-925. doi:10.1126/science.aad0876
4. J. Frueh, N. Maimari, Y. Lui, Z. et al. "Systems and synthetic biology of the vessel wall," *FEBS Lett.*, vol. 586, no. 15, pp. 2164–2170, 2012.
5. J. K. Polka, S. G. Hays, and P. A. Silver, "Building Spatial Synthetic Biology with Compartments, Scaffolds, and Communities.," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, p. a024018, Jun. 2016.
6. E. Stolovicki and E. Braun, "Collective Dynamics of Gene Expression in Cell Populations.," *PLoS One*, vol. 6, no. 6, p. e20530, Jun. 2011.
7. E. Cachat, W. Liu, P. Hohenstein, and J. A. Davies, "A library of mammalian effector modules for synthetic morphology.," *J. Biol. Eng.*, vol. 8, no. 1, p. 26, 2014.

8. W. C. Ruder, et al., “Synthetic biology moving into the clinic.,” *Science*, vol. 333, no. 6047, pp. 1248–52, Sep. 2011.
9. T. Takebe, K. Sekine, M. Enomura, et al. “Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant.,” *Nature*, vol. 499, no. 7459, pp. 481–484, Jul. 2013.
10. T. Takebe, M. Enomura, E. Yoshizawa, et al. “Vascularized and Complex Organ Buds from Diverse Tissues via Mesenchymal Cell-Driven Condensation,” *Cell Stem Cell*, vol. 16, no. 5, pp. 556–565, 2015.
11. Gasanz, C., Raventós, C., & Morote, J. (2018). Current status of tissue engineering applied to bladder reconstruction in humans. *Actas Urológicas Españolas (English Edition)*. 42(7), 435-441
12. Cantrell MA, Kuo CJ.(2015). Organoid modeling for cancer precision medicine. *Genome Med.*;7(1):32. DOI: 10.1186/s13073-015-0158-y.PMID 25825593
13. Lancaster MA, Knoblich JA.(2014). Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc.*;9 (10):2329-40. DOI:10.1038/nprot.2014.158. PMID [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25188634 25188634]
14. Клабуков И.Д. Сборник задач по инженерной биологии. — SSRN, 2016. — 56 с.
15. Niemann, H., & Petersen, B. (2016). The production of multi-transgenic pigs: update and perspectives for xenotransplantation. *Transgenic research*, 25(3), 361-374. doi:10.1007/s11248-016-9934-8
16. Сосунов А. А «Нервный гребень и его нейральные производные», // СОЖ, 1999, No 5
17. Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. М., 1988.
18. Wakimoto BT, Kaufman TC (January 1981). “Analysis of larval segmentation in lethal genotypes associated with the antennapedia gene complex in *Drosophila melanogaster*”. *Dev. Biol.* **81** (1): 51–64.

**Контрольные вопросы (обратная связь):**

1. Как происходит детерминация, дифференцировка клеток и сегментация зародыша? Какова последовательность действия генов, регулирующих развитие?
2. Какие генетические механизмы определяют онтогенез?

## ГЛАВА 6

---

### ВРОЖДЕННЫЕ ПОРОКИ РАЗВИТИЯ

#### 6.1. Врожденный порок развития: общие сведения, нарушения развития. Классификации врожденных пороков развития

**Врожденный порок развития** – возникшее внутриутробно стойкое морфологическое изменение органа, системы органов, части тела или всего организма, выходящее за пределы вариаций строения и нарушающее его (ее) функцию. Пороки развития, не сопровождающиеся функциональными нарушениями чаще называют врожденными аномалиями (например, деформации ушных раковин – не обезображивающие лица больного и существенно не отражающиеся на восприятии звуков).

**К врожденным порокам относятся следующие нарушения развития:**

**АГЕНЕЗИЯ** – полное врожденное отсутствие органа.

**АПЛАЗИЯ** – врожденное отсутствие органа с наличием его сосудистой ножки.

**ВРОЖДЕННАЯ ГИПОПЛАЗИЯ** – недоразвитие органа, проявляющееся дефицитом относительной массы или размеров органа, превышающих отклонение в две сигмы от средних показателей для этого возраста.

**ВРОЖДЕННАЯ ГИПОТРОФИЯ** – уменьшение массы тела плода или новорожденного. У детей старшего возраста применяют термин «нанизм» (карликовость, микросомия, наносомия).

**ВРОЖДЕННАЯ ГИПЕРТРОФИЯ** – увеличенная относительная масса (или размеры) органа за счет увеличения количества (гиперплазия) или объема (гипертрофия) клеток.

**МАКРОСОМИЯ** (гигантизм) – увеличенная длина тела.

**ГЕТЕРОТОПИЯ** – наличие клеток, тканей или целых участков органа в другом органе или в тех же зонах того же органа, где их быть не должно.

**ГЕТЕРОПЛАЗИЯ** – нарушение дифференцировки отдельных типов ткани.

**ЭКТОПИЯ** – смещение органа, т.е. расположение его в необычном месте.

**УДВОЕНИЕ** – увеличение в числе того или другого органа или его части. Часто используется частица «поли-» (полидактилия).

**АТРЕЗИЯ** – полное отсутствие канала или естественного отверстия.

**СТЕНОЗ** – сужение канала или отверстия.

**НЕРАЗДЕЛЕНИЕ** (слияние) органов или двух симметричных или асимметрично развитых однояйцевых близнецов. Используется частица «син-» (синдактилия).

**ПЕРСИСТИРОВАНИЕ** – сохранение эмбриональных структур, в норме исчезающих к определенному периоду развития (открытое овальное окно или артериальный проток у ребенка старше трех месяцев). Одна из форм персистенции – дизрафия – незаращение эмбриональной щели (расщелины губы, неба, позвоночника, уретры).

**ДИСХРОНИЯ** – нарушение темпов (ускорение или замедление) развития.

Врожденные пороки развития являются причиной приблизительно 20% смертей в неонатальном периоде, а также занимают значительное место в практике акушерства и гинекологии, медицинской генетике детской хирургии и ортопедии, патологической анатомии. В связи с этим знания по вопросам профилактики, этиологии, патогенеза, лечения и прогнозирования врожденных пороков развития имеют большое значение.

По этиологическому признаку целесообразно различать три основные группы пороков:

1. Наследственные – пороки, возникшие в результате мутаций (стойких изменений наследственных структур) в гаметах или (реже) зиготе. В зависимости от уровня мутации пороки подразделяют на генные и хромосомные.

2. Экзогенные – пороки, обусловленные действием тератогенных факторов непосредственно на эмбрион или плод. Тератогенные ВПР могут фенотипически напоминать (копировать) генетически детерминированные ВПР, в таких случаях их называют фенкопиями.

3. Мультифакториальные – ВПР, произошедшие от совместного воздействия генетических и экзогенных факторов, причем, ни один из них отдельно не является причиной развития порока. Очевидно, что такое разделение несколько условно, поскольку генные и хромосомные мутации, лежащие в основе наследственных пороков, также индуцированы различными факторами.

Причины возникновения врожденных пороков вообще и нервной системы в частности весьма разнообразны. Их могут обуславливать мутации, а также их сочетанное воздействие. Г.И. Лазюк (1982 г.) выделяет следующие причины врожденных пороков:

1) **эндогенные (внутренние) факторы:**

- а) изменения наследственных структур (мутации);
- б) «перезревание» половых клеток;
- в) эндокринные заболевания;
- г) влияние возраста родителей;

2) **экзогенные (внешние) факторы:**

- а) физические – радиационные, механические воздействия;
- б) химические – лекарственные препараты, химические вещества, применяемые в промышленности и в быту, гипоксия, неполноценное питание, нарушения метаболизма;
- в) биологические – вирусные заболевания, протозойные инвазии, изоиммунизация.

В зависимости от времени воздействия факторов, индуцирующих развитие порока, все врожденные пороки могут быть разделены на:

1. Гаметопатии – поражение на уровне половых клеток – гамет.
2. Бластопатии – поражение бластоцисты, т.е. зародыша 15 дней после оплодотворения.
3. Эмбриопатии – ВПР, возникшие в результате повреждения эмбриона (воздействии повреждающего фактора в период от 16 дня после оплодотворения, до конца 8 недели.
4. Фетопатии – повреждения плода (9 неделя – окончание родов).

В зависимости от последовательности возникновения различают:

1. первичные – непосредственно обусловленные воздействием тератогенного фактора (генетического или экзогенного).
2. вторичные – являются осложнением первичных и всегда патогенетически с ними связаны, например, атрезия водопровода мозга (первичный порок), приведшая к развитию гидроцефалии (вторичный); или *spina bifida* (первичный), сопровождающаяся косолапостью (вторичный).

По распространенности в организме первичные ВПР целесообразно подразделять на:

1. изолированные (одиночные, локальные) – локализованные в одном органе (например, стеноз привратника или персистенция артериального протока);
2. системные – пороки в пределах одной системы (например, хондродисплазия, артрогрипоз – системное заболевание скелетно-мышечной системы с фиброзом, контрактурами суставов, деформацией конечностей);
3. множественные – пороки, локализованные в органах двух и более систем.

Наиболее распространенной классификацией изолированных и системных ВПР является классификация, в основу которой положен не этиологический, а анатомо-физиологический принцип деления тела человека на системы органов.

Именно по этому принципу построена классификация ВОЗ, рекомендованная для учета болезней и причин смерти, принятая XXIX Всемирной ассамблеей здравоохранения в 1975 г.

Множественные ВПР целесообразно подразделять по этиологическому принципу. Таким образом, предлагается следующая классификация ВПР:

**А. Врожденные пороки развития органов и систем.**

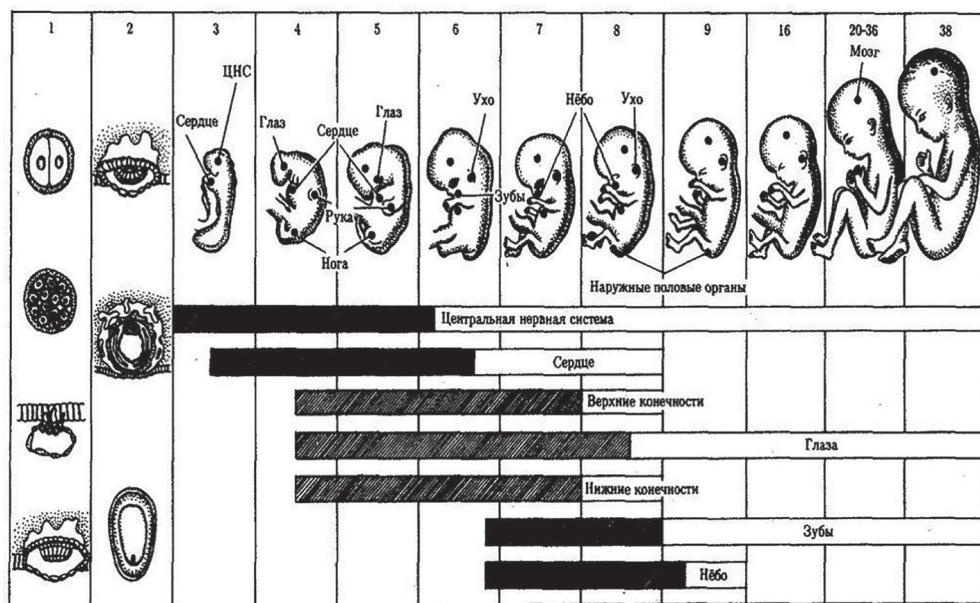
1. Пороки ЦНС и органов чувств.
2. Пороки лица и шеи.
3. Пороки сердечно-сосудистой системы.
4. Пороки дыхательной системы.
5. Пороки органов пищеварения.
6. Пороки костно-мышечной системы.
7. Пороки мочевой системы.
8. Пороки половых органов.
9. Пороки эндокринных желез.
10. Пороки кожи и ее придатков.
11. Пороки последа.
12. Прочие пороки.

**Б. Множественные врожденные пороки.**

1. Хромосомные синдромы.
2. Генные синдромы.
3. Синдромы, обусловленные экзогенными факторами.
4. Синдромы неустановленной этиологии.
5. Множественные неуточненные пороки.

## 6.2. Критические периоды в онтогенезе человека

С конца XIX в. существует представление о наличии в онтогенетическом развитии периодов наибольшей чувствительности к повреждающему действию разнообразных факторов. Эти периоды получили название *критических*, а повреждающие факторы — *тератогенных*. Критические периоды различных органов и областей тела не совпадают друг с другом по времени (рисунок 6.1).



**Рисунок 6.1.** Чувствительность развивающегося зародыша человека к повреждающим факторам. Заштрихованным отрезком обозначен период наиболее высокой чувствительности, незаштрихованным — период меньшей чувствительности; 1—38—недели внутриутробного развития

Единодушия в оценке различных периодов, как более или менее устойчивых, не существует. П. Г. Светлов установил *два критических периода* в развитии плацентарных млекопитающих. Первый из них совпадает с процессом имплантации зародыша, второй — с формированием плаценты. Имплантация приходится на первую фазу гастрюляции, у человека — на конец 1-й — начало 2-й недели. Вторым критическим периодом продолжается с 3-й по 6-ю неделю. По другим источникам, он включает в себя также 7-ю и 8-ю недели. В это время идут процессы нейруляции и начальные этапы органогенеза.

Причиной нарушения развития зачатка является большая чувствительность его в данный момент к действию патогенного фактора, чем у других органов. При этом действии разных факторов может вызвать одну и ту же аномалию. Это свидетельствует о неспецифическом ответе зачатка на повреждающие воздействия.

В то же время некоторая специфичность тератогенных факторов выражается в том, что, будучи различными, они оказывают максимальное повреждающее действие не на одних и тех же стадиях развития.

Факторы, оказывающие повреждающее воздействие, не всегда представляют собой чужеродные для организма вещества или воздействия. Это могут быть и закономерные действия среды, обеспечивающие обычное нормальное развитие, но в других концентрациях, с другой силой, в другое время. К ним относят кислород, питание, температуру, соседние клетки, гормоны, индукторы, давление, растяжение, электрический ток и проникающее излучение.

### 6.3. Клеточные механизмы развития заболевания

Формирование пороков происходит преимущественно в период эмбрионального морфогенеза (3-10-я неделя беременности) в результате нарушения процессов размножения, миграции, дифференциации и гибели клеток. Эти процессы происходят на внутриклеточном, экстраклеточном, тканевом, межтканевом, органном и межорганном уровнях. Нарушением размножения клеток объясняют гипоплазию и аплазию органов. Нарушение их миграции лежит в основе гетеротопий. Задержка дифференциации клеток обуславливает незрелость или персистенцию эмбриональных структур, а ее полная остановка – аплазию органа или его части. Нарушение физиологической гибели клеток, как и нарушение механизмов адгезии («склеивание» и срастание эмбриональных структур), лежат в основе многих дизрафий (например, спинномозговых грыж).

По филогенетической значимости можно все врожденные пороки развития разделить на филогенетически обусловленные и не связанные с предшествующим филогенезом, т.е. нефилогенетические.

*Филогенетически обусловленными* называют такие пороки, которые по виду напоминают органы животных из типа Хордовые и подтипа Позвоночные. Если они напоминают органы предковых групп или их зародышей, то такие пороки называют *анцестральными* (предковыми) или атавистическими. Примерами могут служить несращение дужек позвонков, шейные и поясничные ребра, несращение твердого неба, персистенция висцеральных дуг и др. Если пороки напоминают органы родственных современных или древних, но боковых ветвей животных, то их называют *аллогенными*.

Филогенетически обусловленные пороки показывают генетическую связь человека с другими позвоночными, а также помогают понять механизмы возникновения пороков в ходе эмбрионального развития.

*Нефилогенетическими* являются такие врожденные пороки, которые не имеют аналогов у нормальных предковых или современных позвоночных животных. К таким порокам можно отнести, например, двойниковые уродства и эмбриональные опухоли, которые появляются в результате нарушения эмбриогенеза, не отражая филогенетических закономерностей.

### 6.4. Патогенетическая классификация ВПР Синдром

Синдром – это устойчивое сочетание нескольких симптомов (пороков развития) в разных системах органов, в основе которого лежит одна причина (генная мутация, хромосомная aberrация, тератогенный фактор), т.е. имеет место этиологическая связь наблюдаемых симптомов. По определению Дж. Опитца такие синдромы называются ис-



тинными. Множественность поражений при них обусловлена явлением плейотропии, когда один фактор (причина) вызывает развитие нескольких симптомов. К настоящему времени описано и выделено множество синдромов с МВПР.

### Следствие

Следствие – тип множественных аномалий, являющихся следствием одной известной аномалии или действия механического фактора, так называемый каскад вторичных нарушений морфогенеза. В основе следствий лежат общие патогенетические связи, а этиология их может быть различной (рисунок 6.2).

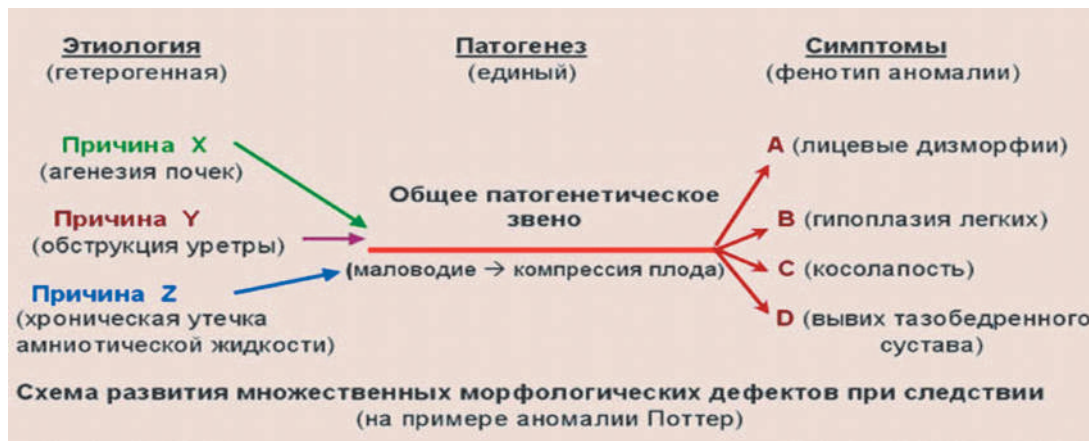


Рисунок 6.2. Схема развития множественных морфологических дефектов при следствии.

### Ассоциация

Ассоциация – сочетание или комбинация нескольких пороков развития, встречающиеся чаще, чем можно было бы ожидать по теории вероятности, но неизвестное как синдром или следствие. Понятие ассоциация относится к статистически, а не патогенетически или этиологически связанным порокам развития. Таким образом, причины происхождения множественности пороков неизвестны. Основное отличие от синдрома – отсутствие постоянства спектра специфических аномалий у разных больных.

Согласно патогенетической классификации выделяют четыре типа врожденных пороков развития:

1. **Порок развития** – структурный дефект органа, части органа или большого участка тела в результате нарушения процесса развития под действием внутренних, часто наследственных причин, при этом зачаток органа изначально аномален и его дальнейшее развитие не может идти по нормальному пути. Такие пороки называют первичными пороками. К этой группе относятся синдромы наследственной природы, а также большинство изолированных пороков развития, например, дефекты нервной трубки, врожденные пороки сердца, расщелины губы и неба и другие.

2. **Дизрупция** (disruption) – морфологический дефект органа, части органа или большого участка тела в результате внешнего препятствия или какого-либо другого

воздействия на изначально нормальный процесс развития, в связи с чем такой дефект называют иногда вторичным пороком. Нередко в постнатальном периоде трудно определить, является ли аномалия пороком или дизрупцией и в какое время произошло поражение. К факторам, способным вызвать нарушение процесса развития, относятся травмы, нарушения кровообращения, инфекции, амниотические тяжи. Дизрупции не относятся к порокам наследственного происхождения. Примером дизрупции являются внутриутробные ампутации отделов конечностей, обусловленные воздействием на плод амниотических тяжей.

3. **Деформация** (deformation) – нарушение формы, размера или положения части тела, обусловленное механическими воздействиями на нормально развитые органы или части тела плода. Примерами таких внешних воздействий являются малые размеры или деформация матки, маловодие. Деформации развиваются, как правило, уже после завершения процесса органогенеза, в поздние сроки беременности и имеют хороший прогноз при своевременном лечении. Деформации относительно распространенные нарушения и встречаются среди новорожденных с частотой примерно 2%. Примерами деформации являются позиционная косолапость, плагиоцефалия (асимметрия черепа).

4. **Дисплазия** (dysplasia) – нарушенная организация клеток в тканях и ее морфологический результат (процесс и следствие дисгистогенеза). Дисплазия может носить генерализованный характер, если измененная ткань входит в разные органы и системы, как, например, при синдроме Марфана, в основе которого лежит дисплазия соединительной ткани, наблюдается поражение опорно-двигательного аппарата, сердечно-сосудистой системы, патология зрения.

#### Литература

1. Langman's Medical Embryology, 11th edition. 2010.
2. <http://www.bioethics.gov/reports/stemcell/glossary.html>
3. Кофмен Т + Рэфф Р, Перевод: Фомина Н, Книга: *Эмбрионы, гены и эволюция*. Рудольф А. Рэфф, Томас К. Кофмен. Место издания: Москва : МИР, Год издания: 1986,
4. Spirov et al. // *Development*. — 2009. — № 136. — С. 605—614.
5. ScienceDirect.com – *Developmental Biology* – Bibha Choudhary, Yoshihiro Ito, Takako Makita, Tomoyo Sasaki, Yang Chai, Henry M. Sucov. Cardiovascular malformations with normal smooth muscle differentiation in neural crest-specific type II TGFβ receptor (Tgfb2) mutant mice. *Developmental Biology* Volume 289, Issue 2, 15 January 2006, Pages 420–429
6. Сосунов А. А «Нервный гребень и его нейральные производные», // *СОЖ*, 1999, No 5
7. Айала Ф., Кайгер Дж. *Современная генетика*. М., 1988.
8. Wakimoto BT, Kaufman TC (January 1981). "Analysis of larval segmentation in lethal genotypes associated with the antennapedia gene complex in *Drosophila melanogaster*". *Dev. Biol.* **81** (1): 51–64.

#### Контрольные вопросы (обратная связь)

1. Какие периоды наиболее опасны для внутриутробного развития плода?
2. Как определяются тератогенные терминационные периоды, и какое значение они имеют?
3. Что такое врожденные пороки развития и как их классифицируют?
4. Какие клеточные механизмы приводят к развитию заболеваний?
5. Чем отличаются синдромы от ассоциаций?

## ГЛАВА 7

## ПОПУЛЯЦИОННАЯ ГЕНЕТИКА

Особи не живут поодиночке, а образуют более или менее устойчивые группировки, сообща осваивая среду обитания. Такие группировки, если они самовоспроизводятся в поколениях, а не поддерживаются только за счет пришлых особей, называют популяциями.

Популяция характеризуется такими показателями как:

численность;

плотность – *численность популяции, приходящаяся на единицу площади;*

рождаемость;

смертность;

возрастная структура;

распределение в пространстве;

кривая роста и т.д.

Популяционная генетика изучает генетическое разнообразие в популяциях и закономерности изменения этого разнообразия в череде поколений (во времени) и в разных частях ареала (в пространстве). К этой области науки относят как исследования природных и экспериментальных популяций, так и теоретические.

Генетически популяция характеризуется генофондом (аллелофондом). Он представлен совокупностью аллелей, образующих генотипы всех организмов данной популяции.

### 7.1. Генетический полиморфизм в популяции и естественный отбор

Полиморфизм – это одновременное присутствие в популяции нескольких генотипов.

Различают наследственный и адаптационный полиморфизм. Наследственный полиморфизм создаётся мутациями и комбинативной изменчивостью. Адаптационный полиморфизм обусловлен тем, что естественный отбор благоприятствует разным генотипам из-за разнообразия условий среды в пределах ареала вида или сезонной смены условий. Например, в популяциях двухточечной божьей коровки (*Adalia bipunctata*) при уходе на зимовку преобладают чёрные жуки, а весной – красные особи. Это обусловлено тем, что чёрные жуки интенсивнее размножаются, а красные особи лучше переносят холод.

Разновидностью адаптационного полиморфизма является балансированный полиморфизм, возникающий в случаях, когда отбор благоприятствует гетерозиготным формам по сравнению с доминантными и рецессивными гомозиготами. В основе балансированного отбора может лежать сверхдоминирование – явление селективного преимущества гетерозигот (в том числе и над доминантными гомозиготами).

Полиморфным признаком называют менделевский (моногенный) признак, по которому в популяции присутствуют как минимум два фенотипа (и, следовательно, как минимум два аллеля), причём ни один из них не встречается с частотой менее 1% (т.е. не является редким). Эти два фенотипа (и, соответственно, генотипа) находятся в состоянии длительного равновесия.

Первый полиморфный признак (система групп крови АВО) был открыт в 1900 г. австрийским учёным К. Ландштейнером (1868-1943). В 1955 году с открытием методики электрофореза белков в крахмальном геле на примере гаптоглобина (сывороточного белка, связывающего гемоглобин) был выявлен самый простой вариант полиморфизма – полиморфизм белков.

К настоящему времени описано множество таких полиморфных признаков у человека:

1) сывороточные белки: церулоплазмин (2 аллеля – СР3, СРС', а также более редкий аллель австралонегроидов – СР4); гаптоглобин (3 аллеля – Hр1S, hр1P<sup>^</sup>, hр2<sup>^</sup>, иммуноглобины (4 аллеля и очень сложная система более редких аллелей);

2) поверхностные антигены эритроцитов (группы крови): АВО (4 аллеля: А1, А2, В, 0); секрция АВН (2 аллеля); антиген Келл (2 аллеля – К, к), антиген Льюис (2 аллеля – Lea, Leb); антиген резус (сложный комплекс аллелей);

3) ферменты эритроцитов: кислая фосфатаза-1 (3 аллеля); эстераза-D (2 аллеля); пептидаза-А (2 аллеля); аденозиндезаминаза (2+2 редких аллеля) и др.;

4) другие ферменты: сывороточная холинэстераза-1 (3 аллеля); алкогольдегидрогеназа (2 аллеля).

Полиморфизм человечества по отдельным локусам мог быть унаследован от далёких предков. Так, полиморфизм по таким системам групп крови, как АВО и резус, обнаружен у человекообразных обезьян. Вклад в наблюдаемое сейчас распределение аллелей внесли массовые миграции населения и сопутствующая им метисация: смешение больших контингентов людей разной расовой принадлежности имело место в Восточной Африке, Индии, Индокитае, Южной и Центральной Америке.

Генетический полиморфизм служит основой межпопуляционной и внутривидовой изменчивости людей. Эта изменчивость, в частности, проявляется: 1) в разной степени предрасположенности людей к определённым болезням; 2) неравномерном распределении по планете некоторых заболеваний; 3) неодинаковой тяжести их течения в разных человеческих популяциях; 4) индивидуальных особенностях течения патологических процессов; 5) различиях индивидуальной реакции на одно и то же лечебное воздействие. Генетический полиморфизм создаёт серьёзные трудности в решении проблемы пересадок тканей и органов.

Процесс видообразования с участием такого фактора, как естественный отбор, создаёт разнообразие живых форм, приспособленных к условиям обитания. Среди разных генотипов, возникающих в каждом поколении благодаря резерву наследственной изменчивости и рекомбинации аллелей, лишь ограниченное число обуславливает максимальную приспособленность к конкретной среде.

Все формы полиморфизма – генетический, хромосомный, переходный и сбалансированный – весьма обычны и очень широко распространены в природе среди популяций всех организмов.

В популяциях организмов, размножающихся половым путем, всегда есть полиморфизм.

## 7.2. Элементарные эволюционные процессы Мутационный процесс в популяции. Миграции в популяции. Отбор в популяции

Генофонд популяций человека является результатом наложения многочисленных и разнонаправленных векторов отбора, обеспечивающего сохранение в каждом поколении сравнительно приспособленных к данным условиям генотипов. При этом с течением времени влияние отбора на генетическую структуру популяций людей снижается в основном благодаря успехам лечебной и профилактической медицины, а также социально-экономическим преобразованиям цивилизации.

**Изоляция** – возникновение любых барьеров, препятствующих скрещиванию особей. Существуют различные виды изоляции: географическая, экологическая, репродуктивная (биологическая). **Географическая изоляция** наблюдается при разделении исходного ареала вида различными природными барьерами. **Экологическая изоляция** наблюдается при несовпадении мест обитания популяций одного вида или нескольких близких видов. **Репродуктивная (биологическая)** – существование биологических барьеров, препятствующих межпопуляционному скрещиванию. У человека помимо тех же видов изоляции, что и в природе, существуют различные социальные барьеры, например, сословные, религиозные или имущественные.

**Мутации и естественный отбор** – комплементарные процессы, которые по отдельности не способны создать направленные эволюционные изменения. Отбор в природных популяциях чаще всего действует не на отдельные гены, а на комплексы генов. Мутации не могут быть полезными или вредными, но их селективная ценность варьирует в разных средах. Механизм действия отбора зависит от внешней и генотипической среды, а вектор его действия от фенотипического проявления мутаций.

Эволюция возможна только в том случае, если существует наследственная изменчивость. Единственным поставщиком новых генетических вариантов служит мутационный процесс. Однако эти варианты могут по-новому комбинироваться в процессе полового размножения, т.е. при независимом расхождении хромосом и вследствие *кроссинговера*. Генетические варианты, возникшие в результате мутационного и рекомбинационного процесса, передаются из поколения в поколение отнюдь не с равным успехом: частота некоторых из них может увеличиваться за счет других. Помимо мутаций к процессам, изменяющим частоты *аллелей* в популяции, относятся естественный отбор, поток генов (т.е. миграция их) между популяциями и случайный дрейф генов. Частоты генотипов (но не аллелей!) могут изменяться также в результате *ассортативного*, т.е. неслучайного, формирования брачных

пар. Поскольку кроссинговер вносит возмущения в картину сцепленного наследования, его удалось использовать для картирования «групп сцепления» (хромосом).

### 7.3. Современной теории эволюции.

**Синтетическая теория эволюции (СТЭ), или неodarвинизм** – современная эволюционная теория, которая является синтезом различных дисциплин, прежде всего, генетики и дарвинизма. СТЭ также опирается на палеонтологию, систематику, молекулярную биологию и другие.

При изучении процесса эволюции важное значение имеет представление о генофонде. *Генофондом* называется совокупность генотипов всех особей популяции. Современная теория эволюции берет начало от Чарльза Дарвина (1809-1882) и его классического труда «Происхождение видов», впервые опубликованного в 1859 г. Существование наследственной изменчивости в природных популяциях послужило исходным пунктом в цепи аргументов, приведенных Дарвином для доказательства того, что эволюция происходит путем естественного отбора. Таким образом, синтетическую теорию эволюции (СТЭ) можно охарактеризовать как теорию органической эволюции путем естественного отбора признаков, детерминированных генетически. Синтетическая теория в её нынешнем виде образовалась в результате переосмысления ряда положений классического дарвинизма с позиций генетики начала XX века. После переоткрытия законов Менделя (в 1901 г.), доказательства дискретной природы наследственности и особенно после создания теоретической популяционной генетики трудами Р. Фишера (1918-1930), Дж. Б. С. Холдейна-младшего (1924), С. Райта (1931; 1932), учение Дарвина приобрело прочный генетический фундамент. Влияние генов на строение и функции организма *плейотропно*: каждый ген участвует в определении нескольких признаков. С другой стороны, каждый признак зависит от многих генов; генетики называют это явление *генетической полимерией признаков*. Фишер говорит о том, что плейотропия и полимерия отражают взаимодействие генов, благодаря которому внешнее проявление каждого гена зависит от его генетического окружения. Поэтому рекомбинация, порождая всё новые генные сочетания, в конце концов создает для данной мутации такое генное окружение, которое позволяет мутации проявиться в фенотипе особи-носителя. Таким образом, сущность синтетической теории составляет преимущественное размножение определённых генотипов и передача их потомкам. В вопросе об источнике генетического разнообразия синтетическая теория признает главную роль за рекомбинацией генов. Считают, что эволюционный акт состоялся, когда отбор сохранил генное сочетание, нетипичное для предшествующей истории вида. В итоге для осуществления эволюции необходимо наличие трёх процессов:

1. мутационного, генерирующего новые варианты генов с малым фенотипическим выражением;
2. рекомбинационного, создающего новые фенотипы особей;
3. селекционного, определяющего соответствие этих фенотипов данным условиям обитания или произрастания.

Все сторонники синтетической теории признают участие в эволюции трёх перечисленных факторов.

С развитием новейших наук СТЭ начала вновь расширяться и модифицироваться. Быть может, важнейшим вкладом молекулярной генетики в теорию эволюции было разделение генов на регуляторные и структурные (модель Р. Бриттена и Э. Дэвидсона, 1971). Именно регуляторные гены контролируют возникновение репродуктивных изолирующих механизмов, которые изменяются независимо от энзимных генов и вызывают быстрые изменения (в масштабах геологического времени) на морфологическом и физиологическом уровнях.

Идея *случайного изменения генных частот* нашла применение в *теории нейтральности* (Кимура, 1985), которая выходит далеко за рамки традиционной синтетической теории, будучи созданной на фундаменте не классической, а молекулярной генетики. Нейтрализм основан на совершенно естественном положении: далеко не все мутации (изменения нуклеотидного ряда ДНК) приводят к изменению последовательности аминокислот в соответствующей молекуле белка. В результате отбору, оценивающему фенотипы, «по существу безразлично, какие генетические механизмы определяют развитие данной формы и соответствующей функции, характер молекулярной эволюции совершенно отличен от характера фенотипической эволюции» (Кимура, 1985). Последнее высказывание, отражающее суть нейтрализма, никак не согласуется с идеологией синтетической теории эволюции, восходящей к концепции зародышевой плазмы А. Вейсмана, с которой началось развитие корпускулярной теории наследственности. Согласно взглядам Вейсмана, все факторы развития и роста находятся в половых клетках; соответственно, чтобы изменить организм, необходимо и достаточно изменить зародышевую плазму, то есть гены. В итоге теория нейтральности наследует концепцию генетического дрейфа, порожденную неodarвинизмом, но впоследствии им оставленную.

Появились новейшие теоретические разработки, позволившие еще больше приблизить СТЭ к реально существующим фактам и явлениям, которые ее первоначальная версия не могла объяснить. Достигнутые эволюционной биологией на настоящий момент рубежи отличаются от представленных ранее постулатов СТЭ.

#### **7.4. Закон Харди–Вайнберга. Условия закона Харди–Вайнберга**

В 1908 г. независимо друг от друга Г. Харди и В. Вайнберг показали, что менделевские закономерности наследования сами по себе не изменяют частот аллелей в популяции. Этот вывод называют законом Харди–Вайнберга: в бесконечно большой популяции диплоидных организмов, наследование в которой определяется одним аутосомным диаллельным локусом, осуществляется случайное скрещивание (панмиксия), при отсутствии мутаций, отбора и миграции частоты генов остаются неизменными из поколения в поколение, при этом частоты генотипов связаны с частотами генов простыми соотношениями: частота гомозигот AA –  $D = p^2$ , частота гетерозигот Aa –  $H = 2pq$ , частота гомозигот aa –  $R = q^2$ .

Случайным скрещиванием, или панмиксией, называют такую систему скрещиваний в популяции, при которой вероятность формирования брачной пары не зависит от генотипов особей. Следовательно, в случайно скрещивающейся популяции частота спариваний особей тех, или иных генотипов равна произведению частот, с которыми эти генотипы представлены в популяции. Например, если у самок и самцов частоты  $D$ ,  $H$  и  $R$  одинаковы, частота образования пары  $AA \times AA$  равна  $D^2$ , частота пары  $Aa \times aa$  равна  $H \times R$ .

Справедливость закона Харди-Вайнберга легко доказать. Пусть частоты аллелей у самок и самцов в исходном поколении одинаковы и равны  $p$  для аллеля  $A$  и  $q$  для аллеля  $a$ . При случайном скрещивании вероятности образования зигот равны произведению частот соответствующих гамет самок и самцов. Тогда, в следующем поколении потомков с генотипом  $AA$  будет  $p^2$ , потомков с генотипом  $aa$  –  $q^2$ , потомков с генотипом  $Aa$  –  $2pq$  (т.к. слияние женской гаметы  $A$  с мужской  $a$  дает  $pq$  гетерозигот и слияние женской гаметы  $a$  с мужской  $A$  дает также  $pq$  гетерозигот). Используя формулы, вычислим частоты аллелей  $A$  и  $a$  в этом поколении. Частота аллеля  $A$  равна  $p^2 + pq = p(p + q) = p$  (напомним, что  $p + q = 1$ ). Частота аллеля  $a$  равна  $q^2 + pq = q(p + q) = q$ .

Итак, частоты аллелей в следующем поколении оказались равными частотам в исходном поколении, и, значит, частоты генотипов во втором поколении окажутся такими же, как в предыдущем.

Из закона Харди-Вайнберга следует следующий вывод; если частоты аллелей у самцов и самок одинаковы, то при любом исходном соотношении частот генотипов равновесные частоты генотипов в каждом локусе достигаются за одно поколение. Если частоты аллелей у представителей разного пола исходно различны, то для аутосомных локусов они становятся одинаковыми в следующем поколении, поскольку и самцы, и самки получают половину своих генов от отца и половину – от матери. Следовательно, в этом случае равновесные частоты генотипов достигаются за два поколения. В случае сцепленных с полом локусов равновесные частоты достигаются лишь постепенно.

Известны примеры, когда соотношение Харди-Вайнберга обнаруживается на ограниченных выборках в каждом поколении в условиях сильного давления отбора и снижения частоты одного из аллелей. Однако отклонение от соотношения Харди-Вайнберга всегда свидетельствует о некоторых процессах, происходящих в популяции. Генетическое единство популяции обуславливается достаточным уровнем панмиксии, что является источником аллелей для генотипов организмов, последующих поколений, направленное на выживание.

Закон этот действует в идеальных популяциях, состоящих из бесконечного числа особей, полностью панмиктических и на которых не действуют факторы отбора. На реальные популяции в той или иной степени действуют факторы, небезразличные для поддержания равновесия Харди-Вайнберга по каким-либо генетическим маркерам. В популяциях многих видов растений или животных распространены такие явления как инбридинг и самооплодотворение – в таких случаях происходит уменьшение доли или



полное исчезновение класса гетерозигот. В случае сверхдоминирования наоборот, доли классов гомозигот будут меньше расчётных.

В медицинской генетике закон Харди-Вайнберга позволяет оценить популяционный риск генетически обусловленных заболеваний, поскольку каждая популяция обладает собственным аллелофондом и, соответственно, разными частотами неблагоприятных аллелей. Зная частоты рождения детей с наследственными заболеваниями, можно рассчитать структуру аллелофонда. В то же время, зная частоты неблагоприятных аллелей, можно предсказать риск рождения больного ребёнка.

Применение закона Харди-Вайнберга для расчета частот аллелей у человека наглядно демонстрирует пример аутосомно-рецессивных болезней. Зная частоту встречаемости генетического заболевания, по формуле Харди-Вайнберга мы можем рассчитать частоту аллелей (с поправкой на погрешность). Например, одно из тяжелейших аутосомно-рецессивных заболеваний человека – *муковисцидоз*, встречается с частотой 1: 2500. Поскольку все случаи проявления обусловлены гомозиготой рецессивного аллеля, то:

$$q^2 = 0,0004; q = 0,02;$$

$$p = 1 - q = 1 - 0,02 = 0,98.$$

Частота гетерозигот ( $2pq$ ) =  $2 \times 0,98 \times 0,02 = 0,039$  (около 4 %).

Мы видим, что почти 4 % людей (совсем не мало) являются носителями гена *муковисцидоза*. Это показывает, сколь большое число рецессивных патогенных генов находится в скрытом состоянии.

При множественном аллелизме частоты генотипов определяются возведением в квадрат многочлена из частот аллелей. Например, имеются три аллеля:  $a_1, a_2, a_3$ .

Их частоты соответственно:  $p, q, r$ . Тогда  $p + q + r = 1$ .

Для расчета частот генотипов:

$$(p + q + r)^2 = p^2 + q^2 + r^2 + 2pq + 2pr + 2rq,$$

где  $p^2$  – частота генотипа  $a_1 a_1$ ;  $q^2$  – частота генотипа  $a_2 a_2$ ;  $r^2$  – частота генотипа  $a_3 a_3$ ;  $2pq$  – частота генотипа  $a_1 a_2$ ;  $2pr$  – частота генотипа  $a_1 a_3$ ;  $2rq$  – частота генотипа  $a_2 a_3$ .

Необходимо отметить, что сумма частот генотипов, как сумма частот аллелей всегда будет равна 1, т. е.  $(p + q)^2 = (p + q + r)^2 = \dots = 1$ . Частоты генотипов остаются неизменными в последующих поколениях.

В строгом виде закон Харди-Вайнберга применим только для идеальной популяции, т. е. достаточно большой популяции, в которой осуществляется свободное скрещивание и не действуют внешние факторы. Только при этих условиях популяция находится в равновесии. Такие идеальные условия в природе никогда не реализуются. Рассмотрим подробнее два ограничения применения закона Харди-Вайнберга, касающиеся свободного скрещивания и действия внешних факторов.

В генетике популяций выделяют два вида скрещиваний:

1. Панмиксия – свободное скрещивание: вероятность образования брачной пары не зависит от генотипа партнеров. В отношении целых генотипов панмиксия в природе почти никогда не соблюдается, однако она вполне применима в отношении отдельных локусов.

2. Ассортативность – избирательное скрещивание: генотип влияет на выбор брачного партнера, т. е. особи с определенными генотипами спариваются чаще, чем при случайной вероятности. Избирательное скрещивание не изменяет частот генов, но изменяет частоты генотипов. Одной из крайних разновидностей ассортативности является целенаправленный **инбридинг** – скрещивание между родственными особями.

Отклонение от равенства Харди-Вайнберга свидетельствует о том, что на популяцию действует какой-либо внешний фактор. Для анализа изменений генных частот в настоящее время разработаны сложные и довольно громоздкие системы уравнений. Это объясняется наличием переменных факторов, влияющих на результат. Разновидности эволюционных факторов мы рассмотрим чуть ниже, а пока отметим, что в любой достаточно большой популяции отклонения будут весьма незначительны, поэтому закон Харди-Вайнберга позволяет проводить важнейшие расчеты и является основой популяционной генетики. Но эти отклонения становятся значимыми, когда мы начинаем рассматривать процесс в эволюционном масштабе времени. Динамика генофонда популяций и представляет эволюцию на генетическом уровне.

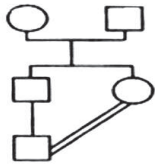
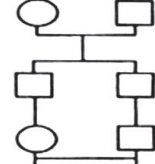
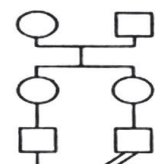
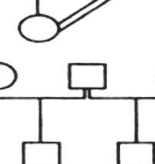
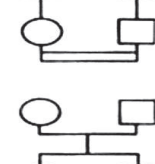
## 7.5. Инбридинг

В популяции могут существовать такие системы скрещиваний, при которых вероятности образования брачных пар зависят или от родственных отношений особей, или от степени их сходства. Скрещивания между родственниками называются инбридингом. Если в популяции скрещивания между родственниками происходят чаще, чем случайно, популяция называется инбридинговой. В популяции, в которой скрещивания между родственниками происходят реже, чем случайно, осуществляется аутбридинг. Если вероятность образования брачных пар зависит от сходства индивидуумов по какому-либо локусу, говорят об ассортативных скрещиваниях в популяции.

Ассортативное скрещивание, при котором вероятность образования пар между похожими особями выше, чем ожидается, называется положительным. Если эта вероятность ниже ожидаемой (т.е. чаще, чем случайно, скрещиваются непохожие друг на друга особи), скрещивание называют отрицательным ассортативным.

У человека, как правило, существуют запреты на родственные браки, что ограничивает инбридинг. Примером положительного ассортативного скрещивания у человека может быть образование пар по цвету кожи.

Изменения генетической структуры популяции и при положительном ассортативном скрещивании, и при инбридинге одинаковы. Они не влияют на частоту аллелей, но приводят к повышению частоты гомозигот по сравнению с ожидаемым на основании закона Харди-Вайнберга (Рисунок 7.1).

Родословная	Тип брака	Коэффициент инбридинга
	Тетка племянник	1/8
	Двоюродные сибсы	1/16
	Двоюродный дядя - племянница	1/32
	Троюродные сибсы	1/32
	Четвероюродные сибсы	1/64

**Рисунок 7.1.** Наиболее распространенные типы близкородственных браков и соответствующие им коэффициенты инбридинга.

Мерой степени инбридинга служит коэффициент инбридинга  $F$ , представляющий собой вероятность того, что у какой-либо особи в данном локусе окажутся идентичные по происхождению аллели.

Вычислим коэффициент инбридинга для потомка IV-1 (вероятность того, что он будет гомозиготен по какому-либо аллелю, полученному от прадедушки I-1 или прабабушки I-2 от брака между двоюродными братом и сестрой.

Предположим, что индивидуумы I-1 и I-2 не имеют общих родственников, и, следовательно, несут в локусе А разные по происхождению аллели.

Обозначим генотип I-1 как A1A2, и генотип I-2 -A3A4. Какова вероятность для

IV-1 быть гомозиготой, например, A1A1. Вероятность того, что I-1 передаст аллель A1, своему потомку II-2 или II-3 равна 1/2. Если II-2 получил аллель A1, то вероятность передать его потомку III-1 равна 1/2, следовательно, вероятность того, что III-I несет аллель A, равна 1/4. Вероятность того, что III-I передаст аллель A1 своему потомку IV-1, равна 1/2. Таким образом, вероятность того, что IV-1 получил аллель от прадедушки I-1 на пути I-I-II-2-III-I-IV-1 равна 1/8, или  $(1/2)^3$ . Рассуждая подобным образом, получим, что для потомка IV-I вероятность получить аллель A1 на пути I-I-III-2-IV-1 также равна 1/8. Значит, вероятность того, что IV-1 гомозиготен по аллелю A1 равна  $1/8 \times 1/8 = 1/64$ .

Вероятность того, что этот потомок IV-1 может быть гомозиготен по каждому из аллелей предков I-1 и I-2 A2, A3 и A4 также равна 1/64. И наконец, вероятность того, что IV-1 гомозиготен по любому аллелю предков I-1 и I-2 (коэффициент инбридинга), равна сумме вероятностей гомозиготности по каждому аллелю:  $1/64 + 1/64 + 1/64 + 1/64 = 1/16$ . Нет необходимости каждый раз вычислять коэффициент инбридинга таким способом, так как можно пользоваться формулами или таблицами, составленными для разных типов близкородственных браков. Величина ошибки выборки обратно пропорциональна величине выборки, следовательно, изменение частоты аллеля будет происходить тем быстрее, чем меньше численность популяции.

Частота спонтанных мутаций низка, поэтому изменение частоты аллеля только в результате мутационного процесса происходит чрезвычайно медленно. Обозначим частоту аллеля A в поколении t как  $p_t$  и частоту мутаций  $A \rightarrow a$  за поколение  $\mu$ . Тогда частота аллеля A в следующем t + 1 поколении будет равна

$$p_{t+1} = p_t - \mu p_t = p_t (1 - \mu).$$

Изменение частоты аллеля за одно поколение составит

$$\Delta p = p_{t+1} - p_t = p_t - \mu p_t - p_t = -\mu p_t$$

Эта формула показывает, что частота аллеля A уменьшается пропорционально частоте мутаций и частоте этого аллеля в популяции. Следовательно, изменение частоты за поколение будет падать по мере уменьшения частоты аллеля. Если темп мутирования аллеля A составляет  $10^{-5}$  на одну гамету за поколение, то для того чтобы частота аллеля A уменьшилась с 1 до 0,99 потребуется 1000 поколений, для уменьшения частоты аллеля A с 0,5 до 0,49 (на ту же величину 0,01) потребуется 2000 поколений. Даже увеличение темпа мутирования вдвое не ускорит значительно процесс изменения частоты аллеля.

Если миграция происходит в течение нескольких поколений, суммарное изменение частоты за эти поколения можно приблизительно оценить по формуле:

$$\Delta p = M(P - p_0)$$

где M – сумма долей мигрантов за все поколения, P – частота аллеля в популяции-доноре,  $p_0$  – исходная частота аллеля в популяции-реципиенте. Тогда,

$$M = \Delta p / (P - p_0)$$

Используя эту формулу можно оценить интенсивность миграции в популяции. Например, в Америке происходила «миграция» генов европейцев в популяцию африканцев, привезенных в качестве рабов. В штате Джорджия частота аллеля  $F_u$  (группа крови Даффи) среди белого населения равна 0,42, среди афроамериканцев - 0,046. В африканских популяциях она равна

$$M = \Delta p / (P - p) = (0,046 - 0) / (0,42 - 0) = 0,1095$$

Закон Харди-Вайнберга – простейшая математическая модель генетической структуры популяции. В реально существующих популяциях всегда действуют факторы, изменяющие в череде поколений частоты аллелей и генотипов. К ним относятся отсутствие панмиксии (случайного скрещивания), ограниченная численность популяции, мутации, миграция и отбор. Основы теоретических исследований влияния факторов динамики генетической структуры и их соотношений заложены С. Райтом.

Конечным результатом таких случайных флуктуаций частоты аллеля в каждом поколении является фиксация одного из аллелей, т.е. частота аллеля  $A$ , например, может в конце концов достигнуть значения  $p = 1$  или  $p = 0$ . Такие частоты аллелей означают, что все особи в популяции становятся гомозиготными или  $AA$  или  $aa$ , и, значит, дальнейшее изменение частоты становится возможным только за счет возникновения новых аллелей  $A$  или  $a$  (например, за счет новых мутаций)

Ещё в 1931 году С. Райтом была предложена концепция случайного дрейфа генов, которая говорит об абсолютно случайном формировании генофонда дема как малой выборки из генофонда всей популяции. Изначально дрейф генов оказался тем самым аргументом, которого очень долго не хватало для того, чтобы объяснить происхождение неадаптивных различий между таксонами. Поэтому идея дрейфа сразу стала близка широкому кругу биологов. Дж. Хаксли назвал дрейф «эффектом Райта» и считал его «наиболее важным из недавних таксономических открытий».

## 7.6. Генетический дрейф

*Эффект основателя – одна из форм дрейфа генов. Если небольшая группа индивидуумов покидает большую популяцию и основывает новую колонию, случайно в ней может оказаться совершенно иная частота аллеля, чем в исходной популяции.* Кроме того, в течение первых поколений на новом месте численность популяции остается небольшой, и эффекты дрейфа генов сильно сказываются в ней. Это может привести к тому, что частота аллеля в новой популяции будет значительно отличаться от частоты в исходной популяции. Сейчас предполагают, что почти полное отсутствие группы крови «В» среди американских индейцев объясняется именно эффектом основателя, когда их немногочисленные предки пересекли Берингов пролив примерно 10000 лет назад в конце последнего оледенения.

Одним из результатов дрейфа генов является то, что большинство вновь возникших мутаций, даже если они нейтральны, практически не имеют шансов сохраниться в популяции. В популяции численностью  $N$  вероятность того, что вновь возникшая мутация будет утрачена, равна  $(2N - 1)/2N$ . Но если она сохранится, вероятность того, что она распространится в популяции и частота ее достигнет  $1$ , равна  $1/2N$ .

Генетический дрейф происходит в результате вероятностных процессов, которые обуславливают случайные изменения в частоте признаков в популяции. Хотя изменения в результате дрейфа и селекции в течение одного поколения довольно малы, различие в частотах накапливаются в каждом последующем поколении и со временем приводят к значительным изменениям в живых организмах. Этот процесс может завершиться образованием нового вида. Один из механизмов дрейфа генов заключается в следующем. В процессе размножения в популяции образуется большое число половых клеток – гамет. Большая часть этих гамет не формирует зигот. Тогда новое поколение в популяции формируется из выборки гамет, которым удалось образовать зиготы. При этом возможно смещение частот аллелей относительно предыдущего поколения. Понятие «дрейф генов» (англ. genetic drift) было введено в оборот Райтом (1931), а синонимичное понятие «генетико-автоматические процессы в популяциях» – Дубининым и Ромашовым (1932). Впоследствии в мировой литературе (в том числе и в русскоязычной) закрепился термин С. Райта. Экспериментальное доказательство наличия дрейфа генов было получено С. Райтом в простом опыте: в пробирку с кормом он посадил по две самки и два самца мух дрозофил, *гетерозиготных* по гену А (их генотип можно записать Аа). В этих искусственно созданных популяциях концентрация нормального (А) и мутационного (а) *аллелей* составила 50 %. Через несколько поколений оказалось, что в некоторых популяциях все особи стали гомозиготными по мутантному аллелю (а), в других популяциях он был вовсе утрачен, и, наконец, часть популяций содержала как нормальный, так и мутантный аллель. Важно подчеркнуть, что, несмотря на снижение жизнеспособности мутантных особей и, следовательно, вопреки естественному отбору, в некоторых популяциях мутантный аллель полностью вытеснил нормальный. Это и есть результат случайного процесса – дрейфа генов. Таким образом, было также доказано, что в маленьких популяциях частота мутантного аллеля меняется быстро и случайным образом.

## 7.7. Генетический груз популяции

В пределах ареала какого-либо вида условия среды различны. Это становится причиной различного направления отбора в разных частях ареала. Поэтому естественный отбор действует на популяцию (вид) одновременно по многим направлениям, а его конечный результат зависит от соотношения интенсивности разных векторов отбора и контротбора. Результатом многовекторного действия отбора в пределах ареала является поддержание в разнообразном состоянии и одновременная относительная стабилизация генофонда популяции.

Не все генотипы в популяции имеют одинаково высокую приспособленность. Появление в популяции особей с низкой приспособленностью возможно за счет постоянно возникающих мутаций, при отборе в пользу гетерозигот, за счет инбридинга и др. Все это приводит к тому, что средняя приспособленность популяции оказывается ниже максимальной. *Величину, показывающую насколько средняя приспособленность ниже оптимальной для популяции, Кроу предложил называть генетическим грузом.*

*Относительная вероятность выживания и оставления потомков для определенных фенотипов и генотипов называется дарвиновской приспособленностью (обозначается буквой W).* Приспособленность служит оценкой средней выживаемости и интенсивности размножения, так как индивиды, имеющие совершенно одинаковые генотипы и живущие в

совершенно одинаковых условиях внешней среды, могут различаться по выживаемости и по числу потомков.

Приспособленность генотипа формируется как следствие всех фенотипических эффектов исследуемого гена. Если какой-либо аллель повышает вдвое плодовитость, но снижает на 10% продолжительность жизни, он все же обеспечивает большую приспособленность, несмотря на уменьшение продолжительности жизни.

Многие наследственные заболевания могут служить примером снижения приспособленности вследствие локального микронарушения хромосомы. Например, ген мышечной дистрофии Дюшенна, локализованный в X-хромосоме, приводит к смерти в раннем возрасте, следовательно, приспособленность гемизигот по этому гену равна нулю. Заболевание серповидноклеточная анемия вызвано гомозиготностью по рецессивной мутации гена, кодирующего  $\beta$ -цепь гемоглобина, приспособленность гомозигот HbS HbS, несмотря на лечение, чрезвычайно низка, так как они страдают тяжелой формой анемии. При нормальных условиях среды приспособленность гомозигот по нормальному аллелю HbA HbA и гетерозигот HbA HbS практически равны. Однако в районах распространения малярии приспособленность гетерозигот выше, чем у нормальных гомозигот, так как наличие измененного гемоглобина в крови защищает их от малярии.

С приспособленностью связан другой параметр, характеризующий отбор, – коэффициент отбора  $s = 1 - W$ . От величины коэффициента отбора зависит скорость уменьшения частоты того или иного генотипа.

Различают следующие виды генетического груза:

а) мутационный груз – обусловлен возникновением в популяции мутантных аллелей; поскольку отбор направлен против этих аллелей, их частота в популяции невелика и она поддерживается благодаря повторному возникновению (мутационному давлению);

б) сегрегационный груз – возникает в результате выщепления гетерозиготными родителями менее приспособленных гомозиготных потомков; в связи с тем, что значительная часть мутантных аллелей оказывает в гетерозиготном состоянии положительное действие (эффект сверхдоминирования), то гетерозиготы (а следовательно, и вредные мутации) могут поддерживаться в ряду поколений;

в) субституционный груз – возникает при изменении адаптивной ценности особей и сохраняется в популяции до тех пор, пока другой аллель не заместит потерявший адаптивную ценность первый аллель.

*Летальный эквивалент.* Генетический груз снижает в целом реальную приспособленность популяций людей к данным условиям. Для оценки бремени генетического груза человечества используют понятие летальных эквивалентов. Их число у отдельных людей составляет от 3-х до 8-ми. Это значит, что преобладающее количество неблагоприятных аллелей, которое имеется в генотипе каждого человека, оказывает суммарное вредное действие, эквивалентное действию 3-8 рецессивных аллелей, каждый из которых вызывает в гомозиготном состоянии смерть индивидуума до наступления репродуктивного возраста. Из-за наличия неблагоприятных аллелей и их сочетаний примерно половина зигот, образующихся в каждом поколении людей, в биологическом плане несостоятельна, т.к. не участвует в передаче генов следующему поколению: около 15% организмов гибнет до рождения, 3% – при рождении, 2% – сразу после рождения, 3% людей умирает, не достигнув половой зрелости, 20% лиц не вступает в брак и 10% образующихся браков бездетны.

**Генетический груз** – скрытый объем генетической информации, опасной для жизни и здоровья человека. **Генетический груз** – разность оптимальной и средней приспособленности генотипов популяции. Результаты проявления генетического груза:

- Спонтанные аборты
- Мертворождения
- Наследственные болезни
- Детская смертность
- Бездетные браки (бесплодие)

Знание генетического груза популяции необходимо для проведения профилактических мероприятий, которые снижают проявления генетического груза.

Проблема генетического груза у человека имеет большое значение для современной медицины, т.к. наследственные заболевания приобретают все больший удельный вес в отягощении человечества болезнями. Знания генетики наследственных болезней, степени насыщенности ими популяций, географии патологических генов необходимы для практической медицины. Эти проблемы исключительно важны для антропологии, для понимания будущей биологической эволюции человека. Вопрос о генетическом грузе у человека приобретает особое значение в связи с проблемами защиты окружающей среды от загрязнений.

#### **Литература:**

1. Воронцов Н. Н. Синтетическая теория эволюции: ее источники, основные постулаты и нерешенные проблемы // Журн. Всес. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. 1980. Т. 25. № 3. С. 293–312.
1. Вяткин Ю. С., Журавлев В. Б., Киселев В. Д. Эволюционная теория Дарвина и современность // На сайте Алтайского государственного университета ([www.asu.ru](http://www.asu.ru)), 2004.
2. Галл Я. М. Эволюционное учение. – «Энциклопедия Кирилла и Мефодия», 2003.
3. Грант В., «Эволюционный процесс: Критический обзор эволюционной теории»: Пер. с англ. – М.: Мир, 1991. ISBN 5-03-001432-2
4. Гродницкий Д. Л. Две теории биологической эволюции. – Саратов, 2002.
5. Иорданский Н. Н. Эволюция жизни. М., 2001.
6. Красилов В. А. Теория эволюции: необходимость нового синтеза // Эволюционные исследования. Макроэволюция. Владивосток: 1984.
7. Майр Э. Зоологический вид и эволюция. – М., 1968.
8. Медников Б. М., «Аксиомы биологии | *Biologia axiomatica*.» – М.: Знание, 1982. – (Наука и прогресс).
9. Шмальгаузен И. И. Пути и закономерности эволюционного процесса. – 2-е изд. – М., 1983. – (Сер. Избр. труды).
10. Simpson G. G. The major features of evolution. – 3-rd ed – New York, 1953.
11. Fisher R. A. The genetical theory of natural selection. – 2-nd ed. – New York, 1958.
12. Huxley J. Evolution. The modern synthesis. – 2-nd ed. – London, 1963.

#### **Контрольные вопросы (обратная связь):**

1. Как описываются популяции человека?
2. Что такое аутбридинг и инбридинг?
3. Какую роль играют элементарных эволюционных процессов в формировании генетической структуры популяций.
4. Что такое приспособленность?
5. Что такое генетический груз популяций и его медицинское значение?



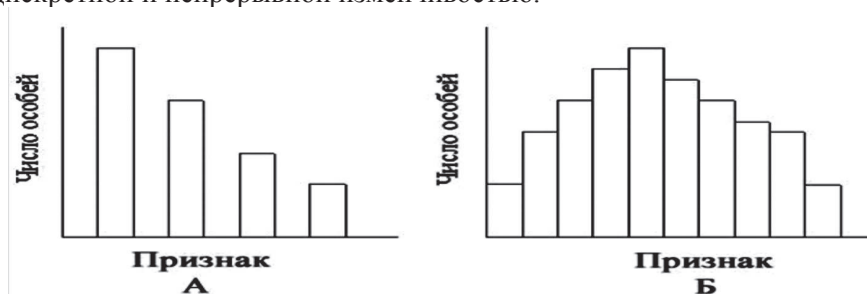
## ГЛАВА 8

## ИЗМЕНЧИВОСТЬ

## 8.1. Изменчивость, определение, типы

**Изменчивость – универсальное (всеобщее) свойство живых организмов существовать в различных формах или вариантах.** Если наследственность обеспечивает единообразие плана строения, механизмов развития и жизнедеятельности, то изменчивость обуславливает их разнообразие в силу чрезвычайного многообразия условий жизни, полиморфизма генов. *Различают две основные формы изменчивости: генотипическую и фенотипическую. Генотипическая (наследственная) изменчивость обусловлена возникновением мутаций и их рекомбинацией при половом размножении. Фенотипическая (ненаследственная) изменчивость представляет собой изменение только внешнего проявления признака. Фенотипическую изменчивость часто называют модификационной.*

Изучение фенотипических различий в любой большой популяции показывает, что существует две разновидности изменчивости - **дискретная и непрерывная**. На рисунке 8.1 представлены типичные результаты, наглядно демонстрирующие различие между дискретной и непрерывной изменчивостью.



**Рисунок 8.1.** Гистограммы, отражающие распределение частот в случае дискретной (А) и непрерывной (Б) изменчивости

При дискретной изменчивости признаки в популяции представлены ограниченным числом вариантов. В этих случаях различия между особями четко выражены, а промежуточные формы отсутствуют. К таким признакам относят, например, группы крови у человека, длину крыльев у дрозофилы, меланистическую и светлую формы пяденицы, длину столбика у первоцвета, пол у животных и растений. Признаки, для которых характерна дискретная изменчивость, обычно контролируются двумя или одним генами, у которых может быть два или несколько аллелей, а внешние условия относительно слабо влияют на их фенотип. В случае непрерывной изменчивости в популяции наблюдается постепенный переход от одной разновидности признака к другой без всяких разрывов. Наиболее яркими примерами служат такие признаки, как масса (вес), линейные

размеры, форма и окраска органов и тканей отдельных организмов. Частотное распределение по признаку непрерывной изменчивости соответствует кривой нормального распределения. Большинство членов популяции попадает в среднюю часть кривой, а на ее концах, соответствующих двум крайним значениям данного признака, находится примерно одинаковое (очень малое) число особей. *Признаки, для которых характерна непрерывная изменчивость, обусловлены совместным действием многих генов (полигенов) и факторов среды.* Каждый из этих генов в отдельности оказывает очень небольшое влияние на фенотип, однако совместно они создают значительный эффект.

***Модификационная изменчивость обусловлена влиянием только внешних условий и не связана с изменением генотипа.*** Конкретные варианты состояния фенотипа при модификационной изменчивости называют ***модификациями.*** Наибольший интерес представляют адаптивные модификации - полезные для организма ненаследуемые изменения, способствующие его выживанию в изменившихся условиях. В отличие от мутаций (редких, единичных и случайных событий), адаптивные модификации направлены и в то же время зачастую обратимы, предсказуемы и часто характерны для больших групп организмов.

***Диапазон, в пределах которого один и тот же генотип способен обусловить развитие различных фенотипов, называется нормой реакции.*** Другими словами, норма реакции - это амплитуда возможной изменчивости онтогенеза организма с конкретным неизменённым генотипом. Норму реакции лучше всего наблюдать у организмов с одинаковыми генотипами, например, у вегетативно размножающихся растений и однояйцевых близнецов. В этом случае можно выявить норму реакции генотипа в наиболее «чистом» виде.

***Основными факторами, способными обеспечивать варьирование признаков в пределах нормы реакции, являются:***

- 1) полигенная детерминация признака и реакции организма;
- 2) плейотропность действия гена;
- 3) зависимость проявления мутации от условий среды;
- 4) гетерозиготность организма;
- 5) взаимодействие генов на уровне генных продуктов (субъединиц белковых молекул);

б) альтернативные пути развития в системе организма и осуществления биосинтезов в клетке (блокирование одного пути компенсируется другим).

***Механизм возникновения модификаций заключается в том, что условия среды воздействуют на ферментативные реакции (метаболические процессы), протекающие в развивающемся организме, и в известной мере изменяют их течение, а, следовательно, и результат - состояние формировавшегося на их основе признака.***

Модификационная изменчивость обеспечивает сравнительно быстрое формирование в ходе онтогенеза приспособлений организма к изменяющимся условиям внешней среды, способствуя, тем самым, выживанию организма. Следовательно, *модификации являются важнейшим фактором нормального протекания и завершения онтогенеза живого организма.*

Несмотря на то, что модификации не наследуются потомством, *модификационная изменчивость в целом имеет важное значение для эволюции органического мира.*

*Генотипическая, или наследственная изменчивость, представляет собой изменения фенотипа, обусловленные изменениями генотипа.* Она вызывается мутациями и их комбинациями при половом размножении. *Комбинативная изменчивость обусловлена образованием у потомков новых сочетаний генов в генотипах, формирующихся в результате рекомбинирования генов и хромосом в процессе полового размножения.* Бесконечное разнообразие генотипов живых организмов, уникальность каждого генотипа обусловлены комбинативной изменчивостью. *При этом типе изменчивости изменяются сочетания генов и характер их взаимодействия в генотипе, а сами гены остаются неизменными.*

*Комбинативная изменчивость, являясь результатом рекомбинирования генов родительских особей в генотипах потомков, основывается на трёх основных механизмах.*

1. *Независимое расхождение в дочерние клетки (сперматоциты II, ооцит II и первое редукционное тельце) гомологичных хромосом из каждой пары (имеет место при I делении мейоза в ходе гаметогенеза).*

2. *Случайное сочетание гамет, а следовательно, гомологичных (отцовской и материнской) хромосом при оплодотворении.*

3. *Обмен отдельными аллелями между гомологичными хромосомами в процессе кроссинговера мейоза.*

Комбинативная изменчивость объясняет, почему у детей обнаруживаются новые сочетания признаков родственников по материнской и отцовской линиям, причём в таких конкретных вариантах, которые не были свойственны ни отцу, ни матери, ни бабушке, ни бабушке и т.д.

*Благодаря комбинативной изменчивости создаётся разнообразие генотипов в потомстве, что имеет большое значение для эволюционного процесса* в связи с тем, что: 1) *увеличивается разнообразие материала для эволюционного процесса без снижения жизнеспособности особей;* 2) *расширяются возможности приспособления организмов к изменяющимся условиям среды и тем самым обеспечивается выживание группы организмов (популяции, вида) в целом.*

*Для характеристики степени гомозиготизации организма используется коэффициент инбридинга, который отражает долю локусов в генотипе потомка конкретной пары родителей, по которым он гомозиготен:*

$$F = (1/2)^{n+n_1+1} \cdot (1 + F_z)$$

При этом  $n = n_1$  и равно числу поколений, считая от общего предка до родителей индивидуума;  $F_z$  - коэффициент инбридинга для общего предка (если предок неинбреден, то  $F_z = 0$ ).

*Неблагоприятные последствия инбридинга высокой степени (с большим значением коэффициента инбридинга) служат генетическим обоснованием нежелательности близкородственных браков у человека. Различают следующие системы*

браков: 1) случайный подбор брачной пары в определённой группе людей (**панмиксия**); 2) более частое, чем при панмиксии, вступление в брак индивидуумов, состоящих в родстве (**инбридинг**); 3) более редкое, чем при панмиксии, вступление в брак индивидуумов, состоящих в родстве (**аутбридинг**).

Наряду с системами браков выделяют два типа образования брачных пар:

1) *положительное ассортативное (избирательное) образование брачных пар*, или более частое вступление в брак индивидуумов, сходных по определённым фенотипическими признаками (браки между глухонемыми, или сходными по росту, по умственному развитию и т.п.);

2) *отрицательное ассортативное образование брачных пар*, или более редкое вступление в брак индивидуумов со сходными определёнными признаками (например, рыжеволосые особи избегают вступать в брак друг с другом).

Как инбридинг, так и положительное ассортативное образование брачных пар повышают (последнее, правда, в меньшей степени) уровень гомозиготности потомков, в том числе и по локусам вредных рецессивных аллелей. Аутбридинг, наоборот, повышает степень гетерозиготности и во многих случаях повышает уровень жизнеспособности. Возможные последствия инбридинга и положительного ассортативного образования брачных пар используются в медико-генетическом консультировании потенциальных брачных партнёров.

С учётом этого во многих странах существуют *запретные (инцестные) браки между ближайшими родственниками*, например, братом и сестрой, а в более чем в 1/3 штатов США запрещены браки между двоюродными сибсами. Хотя история свидетельствует о допущении в отдельных случаях таких браков (в племени эрnodан, живущем на полуострове Индостан, старшая дочь обычно становится второй женой отца). Более высокая степень близкородственных браков наблюдается в малых по размерам группах людей, изолированных географически, или из-за религиозных и других убеждений.

## 8.2. Мутационная изменчивость

**Мутация** (лат. *mutatio* – изменение) – стойкое (то есть такое, которое может быть унаследовано потомками данной клетки или организма) изменение генома. Термин предложен Гуго де Фризом. (*The Mutation Theory* (немецкое издание, 1900–1903), (английское издание, 1910–1911). *Species and Varieties: Their Origin by Mutation*. – 1905. *Plant Breeding* – 1907 (немецкий перевод, 1908).

Процесс возникновения мутаций получил название **мутагенеза**.

Мутационная изменчивость возникает в результате изменения структуры наследственного материала. Процесс возникновения мутаций называют **мутагенезом**, а факторы среды, вызывающие появление мутаций, – **мутагенами**. Установлено мутагенное влияние различных факторов на живые организмы и клетки (таблица 8.1).

Термин «**мутация**» предложил голландский ботаник Гуго де Фриз в своем классическом труде «Мутационная теория» (1901 –1903 гг.), основные положения которого до сих пор не утратили значения:

1. мутации возникают внезапно, дискретно, без переходов;
2. они константны в своем проявлении;
3. мутации наследуются;
4. они могут быть как полезными, так и вредными (добавим, а также - нейтральными);
5. выявление мутаций зависит от количества проанализированных особей;
6. одни и те же мутации могут возникать повторно, хотя и с низкой частотой.

**Таблица 8.1. Мутагенный эффект факторов внешней среды у разных биологических объектов.**

Факторы	Клетки человека		Микроорганизмы	Растения	Дрозофила	Млекопитающие		
	In vitro	In vivo				Культура клеток	Костный мозг	Доминантные летали
1. ионизирующее излучение	+	+	+	+	+	+	+	+
2. антибиотики	+	-	+	+	+	+	+	+
3. цитостатики	+	+	+	+	+	+	+	+
4. другие лекарственные соединения	+	+	+	+	+	+	+	+
5. пищевые добавки	+	-	+	+	+	+	+	+
6. хемотериянты	+	-	+	+	+	+	+	+
7. фунгициды	+	+	+	+	+	+	+	+
8. инсектициды	+	-	+	+	+	+	+	+
9. гербициды	-	-	+	+	+	+	+	-
10. промышленные химические вещества	+	+	+	+	+	+	+	+

Таким образом, под мутациями подразумеваются дискретные, стабильные изменения наследственного материала, приводящие к изменению фенотипа. Процесс возникновения мутаций называют мутационным, или мутагенезом (последний термин чаще употребляют в отношении индуцированных мутаций). Организм, приобретший какой-либо новый признак и тем самым изменивший свой фенотип в результате мутации, называют мутантом.

Впервые теорию непрерывно идущего в органическом **мире мутационного процесса**, в результате которого от константных видов «временами отщепляются новые формы», выдвинул СИ. Коржинский – российский академик, директор ботанического сада при Петербургском университете. Книга СИ. Коржинского «Гетерогенезис и эволюция», изданная в России в 1899 г. и переведенная на немецкий язык в 1901 г., стала известна Г. де Фризу в процессе его работы над «Мутационной теорией» и послужила объектом цитирования и обсуждения.

Определение характера и **частоты мутаций** – тончайший экспериментальный прием, широко используемый генетиками для решения многих фундаментальных проблем. Но особая важность детального изучения мутационного процесса обусловлена тем, что именно мутации служат первоосновой многих наследственных болезней человека. Следовательно, проблема профилактики наследственной патологии хотя бы частично может быть решена только при выяснении механизма становления мутаций.

Мутационные изменения чрезвычайно разнообразны. Они могут затрагивать практически все морфологические, физиологические и биохимические признаки организма, могут вызвать резкие или, наоборот, едва заметные фенотипические отклонения от нормы.

*В основе мутационной изменчивости лежат структурные изменения генов и хромосом. В зависимости от характера изменений в генетическом материале различают:*

**1) геномные (генотипические) мутации**, заключающиеся в изменении числа хромосом в клетке.

**2) хромосомные перестройки, или аберрации** – преобразования структуры хромосом, основанные на их разрыве;

**3) генные (точковые) мутации**, представляющие собой вставку, выпадение, замену или изменение пары нуклеотидов;

**4) инсерции** – вставки («врезания») молекул ДНК или их фрагментов в ген, приводящие чаще всего к его инактивации или к сильному полярному эффекту в оперонах;

**Мутации делятся на спонтанные и индуцированные.**

Спонтанные мутации возникают самопроизвольно на протяжении всей жизни организма в нормальных для него условиях окружающей среды с частотой около  $10^{-9}$ - $10^{-12}$  на нуклеотид за клеточную генерацию организма.

Индукцированными мутациями называют наследуемые изменения генома, возникающие в результате тех или иных мутагенных воздействий в искусственных (экспериментальных) условиях или при неблагоприятных воздействиях окружающей среды.

**Причины возникновения спонтанных мутаций** можно разделить на:

- экзогенные (естественная радиация, экстремальные температуры и др.);
- эндогенные (спонтанно возникающие в организме химические соединения-метаболиты, вызывающие мутагенный эффект; ошибки репликации, репарации, рекомбинации; действие генов-мутаторов и антимутаторов; транспозиция мобильных генетических элементов и др.).

**Организм человека** за год поглощает в среднем 0,095 рад энергии ионизирующих излучений, поступающих от естественной радиации ( $\gamma$ -излучение Земли, космические лучи, радиоактивные элементы земной коры и атмосферы такие, как радон, углерод С,

калий К40 и др.). Эта доза зависит от высоты над уровнем моря и географической широты. Кроме того, радиация выше в районах, где есть выходы на поверхность первичных пород. У человека доля мутаций, индуцированных естественной радиацией составляет до 25%, а у дрозофилы – лишь 0,1% всех спонтанных мутаций.

**УФ-излучение** практически не играет никакой роли в возникновении мутаций в половых клетках эукариот, не обладая достаточной проникающей способностью. В то же время, у одноклеточных организмов и вирусов под действием ультрафиолета образуется значительная часть спонтанных мутаций.

Замечено, что в **высокогорных**, а также арктических условиях растительность представлена преимущественно полиплоидными формами, так как резкие перепады температур в период вегетации растений ведут к увеличению частоты спонтанных геномных мутаций. Увеличение температуры окружающей среды на каждые 10 °С увеличивает частоту мутаций в 5 раз.

Мутации появляются постоянно в ходе процессов, происходящих в живой клетке. Основные процессы, приводящие к возникновению мутаций – репликация ДНК, нарушения репарации ДНК, транскрипции [Banerjee S. K., Borden A., Christensen R. B., et al. 1990; Jonczyk P., Fijalkowska I., Ciesla, 1988] и генетическая рекомбинация.

#### **Связь мутаций с репликацией ДНК**

Многие спонтанные химические изменения нуклеотидов приводят к мутациям, которые возникают при репликации. Например, из-за дезаминирования цитозина напротив гуанина в цепь ДНК может включаться урацил (образуется пара У-Г вместо канонической пары Ц-Г). При репликации ДНК напротив урацила в новую цепь включается аденин, образуется пара У-А, а при следующей репликации она заменяется на пару Т-А, то есть происходит транзиция (точечная замена пиримидина на другой пиримидин или пурина на другой пурин).

#### **Ошибки репликации:**

- таутомерные переходы азотистых оснований приводят при репликации к спонтанным транзициям и трансверсиям;
- ошибки в работе ДНК-полимераз обуславливают некомплементарное встраивание 1 на 100000 вновь синтезирующихся нуклеотидов. Корректорская 3'-5'-экзонуклеазная активность ДНК-полимераз снижает эту частоту до 1 на 10000000000;
- химические модификации оснований (например, при встраивании 5-метилцитозина происходит замена GC - AT, т.к. 5-метилцитозин при последующей репликации может образовывать водородные связи с аденином).

#### **Связь мутаций с рекомбинацией ДНК**

Из процессов, связанных с рекомбинацией, наиболее часто приводит к мутациям неравный кроссинговер. Он происходит обычно в тех случаях, когда в хромосоме имеется несколько дублированных копий исходного гена, сохранивших похожую последовательность нуклеотидов. В результате неравного кроссинговера в одной из рекомбинантных хромосом происходит дупликация, а в другой – делеция.

#### **Связь мутаций с репарацией ДНК**

Спонтанные повреждения ДНК встречаются довольно часто, такие события имеют место в каждой клетке. Для устранения последствий подобных повреждений имеется

специальные репарационные механизмы (например, ошибочный участок ДНК вырезается и на этом месте восстанавливается исходный). Мутации возникают лишь тогда, когда репарационный механизм по каким-то причинам не работает или не справляется с устранением повреждений. Мутации, возникающие в генах, кодирующих белки, ответственные за репарацию, могут приводить к многократному повышению (мутаторный эффект) или понижению (антимутаторный эффект) частоты мутирования других генов. Так, мутации генов многих ферментов системы эксцизионной репарации приводят к резкому повышению частоты соматических мутаций у человека, а это, в свою очередь, приводит к развитию пигментной ксеродермы и злокачественных опухолей покровов. Мутации могут появляться не только при репликации, но и при репарации – эксцизионной репарации или при пострепликативной.

**Ошибки репарации:** например, мутации в гене *uvrD*, отвечающем за репарацию одноцепочечных разрывов при УФ-облучении *E.coli* в сотни раз повышает частоту спонтанных транзиций АТ – ГС.

#### **Модели мутагенеза**

В настоящее время существует несколько подходов для объяснения природы и механизмов образования мутаций. Общепринятой, в настоящее время, является полимеразная модель мутагенеза. Она основана на идее о том, что единственной причиной образования мутаций являются случайные ошибки ДНК-полимеразы. В предложенной Уотсоном и Криком таутомерной модели мутагенеза впервые была высказана идея о том, что в основе мутагенеза лежит способность оснований ДНК находиться в различных таутомерных формах. Процесс образования мутаций рассматривается как чисто физико-химическое явление.

Полимеразно-таутомерная модель ультрафиолетового мутагенеза опирается на идею о том, что при образовании цис-син циклобутановых пиримидиновых димеров может изменяться таутомерное состояние входящих в них оснований. Изучается склонный к ошибкам и SOS-синтез ДНК, содержащей цис-син циклобутановые пиримидиновые димеры [Grebneva N. A., 2006]. Существуют и другие модели.

Впервые полимеразная модель ультрафиолетового мутагенеза была предложена Бреслером [Bresler S. E., 1975]. Он предположил, что мутации появляются в результате того, что ДНК-полимеразы напротив фотодимеров иногда встраивают некомплементарные нуклеотиды. В настоящее время такая точка зрения является общепринятой [Pham P., Vertram J. G, O'Donnell M., et al., 2001]. Известно правило (A rule), согласно которому напротив поврежденных участков ДНК-полимераза чаще всего встраивает аденины. Полимеразная модель мутагенеза объясняет природу мишеных мутаций замены оснований [Taylor J.-S., 2002].

Уотсон и Крик предположили, что в основе спонтанного мутагенеза лежит способность оснований ДНК переходить при некоторых условиях в неканонические таутомерные формы, влияющие на характер спаривания оснований. С помощью квантовомеханических расчетов и метода Монте-Карло было показано, что таутомерное равновесие в цитозин – содержащих димерах и в гидрате цитозина сдвинуто по направлению к их имино формам как в газовой фазе, так и в водном растворе. На этой основе объясняется ультрафиолетовый мутагенез [Danilov V. I., Les A., Alderfer J. L., 2001]. В паре



гуанин – цитозин устойчивым будет только одно редкое таутомерное состояние, в котором атомы водородов первых двух водородных связей, отвечающих за спаривание оснований, одновременно изменяют свои положения [Gorb L., Podolyan Y., Dziekonski P., 2004] А поскольку при этом изменяются положения атомов водорода, участвующих в Уотсон-Криковском спаривании оснований, то следствием может быть образование мутаций замены оснований, транзаций от цитозина к тимину или образование гомологичных трансверсий от цитозина к гуанину. Участие редких таутомерных форм в мутагенезе обсуждалось неоднократно.

В работах Полтева с соавторами предложен и обоснован молекулярный механизм узнавания полимеразми комплементарных пар оснований нуклеиновых кислот. На основании этой модели были изучены некоторые закономерности спонтанного и индуцированного аналогами оснований мутагенеза. Объяснено образование мутаций замены оснований в предположении, что главной причиной мутагенеза является образование неканонических пар оснований, типа Хугстиновских пар [Полтев В. И., Шулюпина Н. В., Брусков В. И., 1996].

Предполагается, что одной из причин образования мутаций замены основания является дезаминирование 5-метилцитозина [Cannistraro V. J., Taylor J. S., 2009], что может вызывать транзаций от цитозина к тимину. Из-за дезаминирования цитозина напротив него в цепь ДНК может включаться урацил (образуется пара У-Г вместо канонической пары Ц-Г). При репликации ДНК напротив урацила в новую цепь включается аденин, образуется пара У-А, а при следующей репликации она заменяется на пару Т-А, то есть происходит транзация (точечная замена пиримидина на другой пиримидин или пурина на другой пурин).

К эндогенным **факторам спонтанного мутагенеза** относится также, и мутагенная активность специальных элементов генома: генов-мутаторов и эндогенных метаболитов. Так генетическая стабильность большинства генов определяется не только особенностями их строения, но и уровнем общей мутабельности клетки, контролируемой генами-мутаторами и антимутаторами, которые по-видимому, задействованы в процессах репликации, репарации и рекомбинации ДНК. К классу эндогенных метаболитов относятся спонтанно возникающие химические соединения, вызывающие мутагенный эффект. Мутагенным эффектом обладают и свободные радикалы, возникающие при перекисном окислении липидов клеточных мембран.

**Среди структурных факторов**, определяющих эндогенные механизмы мутагенеза, можно выделить такие

- наличие прямых и обратных повторов вблизи места перестройки;
- высокая концентрация CpG-динуклеотидов;
- наличие внегенных последовательностей ДНК, гомологичных фрагментам структурного гена;
- мобильные элементы генома.

Два первых фактора реализуются в процессе **репликации ДНК хромосом**, третий – в процессе рекомбинации. Вследствие **скользящего нарушения спаривания** (slipping mispairing) родительской и дочерней цепей ДНК при репликации нередко образуются петли. Их формирование обусловлено наличием в первичной структуре ДНК пря-

мых и инвертированных повторов, идентичных повторяющихся последовательностей, структур шпилечного типа, квазипалиндромных последовательностей и симметричных элементов генома (например, CTGAAGTC). Эти петли либо исчезают в результате репарационного процесса (и тогда возникают делеции), либо сохраняются и приводят к дупликациям и инсерциям; при этом сформировавшиеся изменения закрепляются в последующих циклах репликации. Именно в последнем случае возможно появление мутации экспансии.

**Возникновение мутаций** зависит от особенностей первичной структуры ДНК в месте перестройки, и ряд исследователей полагают, что повышенной эндогенной мутагенностью обладают вообще все последовательности ДНК, находящиеся в состоянии изгиба (bens DNA). Именно такая конформационная структура ДНК свойственна: промоторным частям генов, местам начала репликации (origins of replication), местам контакта хромосом с ядерным матриксом, т.е. тем участкам ДНК, на которые воздействуют топоизомеразы, участвующие в процессах репликации, транскрипции, рекомбинации, в том числе, и негомологичной (незаконной). Результатом последней могут быть не только внутригенные мутации, но и крупные структурные перестройки хромосом (транслокации, инверсии и др.).

Наиболее распространенные **спонтанные нарушения ДНК** в ходе репликации и репарации - потеря оснований и дезаминирование, к которому особенно чувствительны цитозиновые остатки. В настоящее время показано, что у позвоночных почти половина всех цитозиновых остатков в ДНК метилирована в 5-м положении, в областях повторов 5'-CpG-3'. При дезаминировании 5-метилцитозин превращается в тимин. При последующей репликации возникший в результате дезаминирования ошибочный вариант (T-G) либо корректируется (C-G), либо приводит к мутациям типа транзиций; (T-G) или (C-A). Гены, имеющие в своей структуре большой процент CpG-оснований, спонтанно мутируют по типу транзиций особенно часто. Таковы, например, ген фенилаланингидроксилазы у больных фенилкетонурией, гены факторов VIII и IX свертывания крови и др.

Еще одна существенная **причина эндогенного мутагенеза** – наличие псевдогенов - тесно сцепленных с генами гомологичных последовательностей ДНК. В мейозе результатом такой структурной особенности может быть неравная гомологичная рекомбинация и, как следствие - генная конверсия, сопровождающаяся делециями, дупликациями и другими перестройками. Так, очевидная ключевая роль ошибок рекомбинации в этиологии нарушений структуры была установлена при анализе гигантского по размерам (2,2 млн, п.н.) гена дистрофина, мутации которого (в 60% случаев являющиеся делециями) ведут к миопатии Дюшенна. Подавляющее большинство этих делеций, захватывающих один или несколько соседних экзонов, сосредоточено в двух «горячих» районах. Наблюдаемая частота внутригенных рекомбинаций почти в 4 раза выше, чем можно предполагать, исходя из размеров гена дистрофина. В одной из этих «горячих» точек (интрон 7) недавно обнаружен кластер транспозоноподобных повторяющихся последовательностей. Единичные пока наблюдения свидетельствуют о реальном перемещении этих элементов по типу конверсии и об их интеграции в структурные гены аденозиндезаминазы, аполипопротеина С, факторов VIII и IX свертывания крови, кальмодулина. <http://medicalplanet.su/genetica/104.html>

В зависимости от уровня наследственного материала, на котором произошла мутация, выделяют: **генные, хромосомные и геномные мутации.**

### 8.3. Роль ионизирующего излучения в развитии мутаций

Открытие мутационного процесса в начале XX в. положило начало всестороннему изучению причин и механизмов наследственной изменчивости. Успеху в этом направлении способствовали:

- 1) выявление мутагенного действия рентгеновских лучей;
- 2) обнаружение систем, позволяющих отличить мутации в хромосомах от повреждений митотического аппарата или компонентов цитоплазмы;
- 3) разработка методов количественного учета вновь возникающих мутаций.

Мутагенные воздействия, вызывающие двунитевые разрывы ДНК, приводят к появлению **хромосомных перестроек** в клетках. Самым хорошо охарактеризованным мутагеном, индуцирующим хромосомные aberrации, является ионизирующее излучение.

Родоначальником радиационной цитогенетики считается Карл Сакс, чья фундаментальная работа «Chromosome Aberrations Induced by X-Rays» была опубликована в 1938 году [Sax K, 1938]. Для классификации радиоиндуцированных хромосомных нарушений создана собственная классификация aberrаций, которая лишь частично совпадает с классификацией, используемой в медицинской генетике. В этой классификации выделяют aberrации хромосомного и хроматидного типа, которые, в свою очередь, могут быть обменными и простыми, стабильными и нестабильными. Тип хромосомных aberrаций в значительной степени обусловлен фазой клеточного цикла, на котором находилась клетка в момент облучения.

Дицентрики и кольца, а также некоторые обменные aberrации хроматидного типа часто приводят к формированию «мостов» в анафазе митоза, которые можно детектировать при помощи ана-телофазного метода анализа хромосомных aberrаций.

Для частоты радиоиндуцированных хромосомных aberrаций характерна строгая зависимость от дозы, мощности и характера ионизирующего излучения, что позволило создать цитогенетические методы биологической дозиметрии [ IAEA, 2001 ]

Альфа-излучение представляет собой поток альфа-частиц – ядер гелия-4. Альфа-частицы, рождающиеся при радиоактивном распаде, могут быть легко остановлены листом бумаги. Бета-излучение – это поток электронов, возникающих при бета-распаде; для защиты от бета-частиц энергией до 1 МэВ достаточно алюминиевой пластины толщиной в несколько миллиметров. Гамма-излучение обладает гораздо большей проникающей способностью, поскольку состоит из высокоэнергичных фотонов, не обладающих зарядом; для защиты эффективны тяжёлые элементы (свинец и т. д.), поглощающие МэВ-ные фотоны в слое толщиной несколько см. Проникающая способность всех видов ионизирующего излучения зависит от энергии.

В 1925 г. советские ученые Г.А. Надсон и Г.С. Филиппов обнаружили повреждающее **действие лучей радия** на клетки дрожжей. В 1928 г. Г. Мёллер разработал методы количественного учета мутаций у дрозофилы, что позволило ему перейти от констата-

ции мутагенного эффекта рентгеновских лучей к подробному изучению этого феномена.

В связи с тем, что основные **закономерности мутационного процесса** были открыты при изучении генетических эффектов ионизирующей радиации, в данной главе сначала будет рассмотрен радиационный и химический мутагенез и только потом - спонтанный мутационный процесс.

Коротко суммировать **положения классической теории** мишени можно в следующих пунктах:

1) частота возникающих в результате одиночных ударов генных мутаций, микроделеций и хромосомных разрывов линейно зависит от дозы и не зависит от мощности дозы и ее распределения во времени;

2) частота крупных перестроек, возникающих при воссоединении фрагментов в случае двух хромосомных разрывов, возрастает пропорционально квадрату дозы после рентгеновского или  $\gamma$ -облучения и в соответствии с кинетикой первого порядка – после воздействия нейтронами;

3) снижение мощности дозы или ее фракционирование уменьшает частоту хромосомных перестроек в случае рентгеновских лучей и не оказывает влияния на частоту перестроек в случае действия нейтронов.

Системы генетической репарации не срабатывают при летальных дозах, являющихся видоспецифичными (для человека летальная доза составляет примерно 600 р, для мыши – 900 р, для дрозофилы – 80 000 р).

В присутствии **воды рентгеновские лучи** не только прямо воздействуют на чувствительные к ним генетические структуры, но и действуют на них косвенно за счет разложения воды – радиолиза. Этот процесс приводит к образованию реакционноспособных, короткоживущих свободных радикалов водорода  $H^+$  и гидроксила  $OH^-$ , объединяющихся с образованием воды, атомарного кислорода либо химически активной перекиси водорода. Поэтому облучение молекул-мишеней в присутствии соединений, способных взаимодействовать со свободными радикалами (антиоксидантов), защищает молекулы-мишени от непрямого действия радиации.

Кроме того, **эффективность радиационного мутагенеза**, как оказалось, определяется не только дозой облучения и ее мощностью, не только условиями, в которых клетки или целые организмы подвергались облучению, но и биологической чувствительностью объектов к летальному и мутагенному действию ионизирующих излучений. Так, одна и та же доза рентгеновских лучей индуцирует у мыши примерно в 10 раз больше мутаций, чем у дрозофилы, и почти в 1000 раз больше, чем у бактерий. Следовательно, частоту мутаций необходимо определять с учетом видовых различий организмов.

Кроме того, еще в 50-е годы XX-го века была установлена четкая зависимость частоты **возникновения индуцированных мутаций** от изменений чувствительности клеток на разных стадиях клеточного цикла. Наибольшей радиочувствительностьюобладают клетки на стадии ранней профазы и во время фазы синтеза ДНК.

Установлена миграция электронного возбуждения по молекуле ДНК на большие расстояния (1 000 – 10 000 п.н.). Если первоначально поражается наиболее радиостойкая компонента в сахарофосфате, то, в конечном счете, свободная валентность

локализуется на сахарной компоненте. Далее миграция энергии или заряда идет в направлении наиболее возбуждаемых азотистых оснований. Миграция заряда возможна не только внутри ДНК, но и с ДНК на протектор. Профлавин служит лучшим акцептором электронов, и конечное повреждение локализуется именно на нем. Самым плохим акцептором является гистамин, и после гамма-облучения сигнал передается от него на азотистые основания. Вещества-радиопротекторы, захватывающие электроны, образуют с ДНК комплекс, в котором возможна миграция заряда на это вещество, а рекомбинация мигрировавшего заряда с зарядом противоположного знака происходит на фрагменте протектора. В итоге произошедших преобразований повреждения могут быть репарированы, могут сформировать точковые мутации или послужить началом цепи событий, приводящих к хромосомным абберациям,

В заключение отметим наиболее важные характеристики **радиационного мутагена**:

- генетический эффект облучения наблюдается при любой дозе;
- специфика этого эффекта зависит от вида и дозы облучения, состояния репаративной системы ДНК, видоспецифической радиочувствительности, стадии и локализации воздействия. <http://medicalplanet.su/genetica/100.html>

В отличие от рентгеновских, **ультрафиолетовые (УФ)** лучи не действуют на половые клетки большинства многоклеточных организмов, поскольку проникают в ткани очень слабо, не обладают достаточной энергией для индукции ионизации атомов и только возбуждают электронные оболочки. Их мутагенный эффект (возникновение генных мутаций и хромосомных перестроек) обнаруживается лишь в клетках, образующих монослой: микроорганизмах, пыльце и др.

**Ультрафиолетовые лучи** оказались первым мутагеном, чье действие на бактериальные клетки было подробно изучено. О том, что ультрафиолетовое излучение убивает бактерии, известно с 1877 г., а в 1914 г. была выявлена способность УФ-лучей индуцировать у бактерий наследуемые варианты, отличающиеся от исходного типа по патогенности и морфологии колоний. Но лишь тридцать лет спустя М. Демерец показал, что среди клеток чувствительного к фагу T1 штамма *E. coli*, выживших после облучения определенной дозой ультрафиолета, доля мутантов превышает их спонтанный уровень среди необлученных бактерий более, чем в тысячу раз.

Ключевые исследования, позволившие установить механизм действия **ультрафиолета**, были начаты в 1946 г. на *E. coli* Эвелин Виткин. Она показала, что мутагенный эффект УФ-лучей в большинстве случаев носит всего лишь потенциальный характер и вероятность появления индуцированных мутаций в значительной степени зависит от того, в каких физиологических условиях находится клетка после облучения. Э. Виткин предположила, что клетка имеет механизм, способствующий восстановлению от повреждающего действия ультрафиолета. Дальнейшие исследования показали правильность ее предположения.

В отличие от рентгеновских лучей, мутагенность которых не зависит от длины волны, степень **мутагенности ультрафиолетовых лучей** является функцией последней. Максимум поглощения УФ-облучения входящими в состав ДНК пуринами и пирими-

динами лежит в области 260 нм. Эта же величина соответствует максимуму мутагенности УФ-лучей, что указывает на прямую связь процесса индукции предмутационных повреждений ДНК с поглощением УФ-лучей ее азотистыми основаниями. Основные фотопродукты, возникающие при облучении двухцепочечной ДНК, пиримидин-пиримидиновые (преимущественно тимин-тиминовые) димеры, формирующие между соседними основаниями в цепи ДНК циклобутановые кольца.

Присутствие димеров в ДНК приводит к ошибкам при ее репликации. Механизм вырезания **ультрафиолет** индуцированных повреждений ДНК, работающих на свету (фотореактивация), рассмотрен в главе репарация. Добавим, что исследования актиноцетов позволили установить временные характеристики формирования мутаций после воздействия УФ-света. Оказалось, что мутагенный эффект тем выше, чем больше промежуток времени между облучением клеток ультрафиолетом и последующей их обработкой видимым светом. Так, интервал между 98%-ным восстановлением от повреждений и временем получения максимального числа мутаций составлял 7 ч, а непосредственно в момент своего действия УФ-свет вызывал появление не истинных мутаций, а первичных пиримидин-пиримидиновых димеров, которые эффективно репарировались при включении видимого света сразу после обработки ультрафиолетом.

Максимальный выход мутаций наблюдается, когда облучение производится в момент максимально близкий к S-фазе. Ингибирование синтеза ДНК после УФ-облучения снижает выход мутаций на 90%.

Кроме прямого действия на ДНК, **ультрафиолетовые лучи** индуцируют мутации и косвенно, вызывая образование в клетках свободных радикалов и перекисей, обладающих мутагенными свойствами. Такие же мутагенные вещества возникают под действием УФ-света в жидких питательных средах для культивирования бактерий, что заметно увеличивает у них частоту мутаций. <http://medicalplanet.su/genetica/101.html>

## 8.4. Свойства ионизирующих излучений

По механизму взаимодействия с веществом выделяют непосредственно потоки заряженных частиц и косвенно ионизирующее излучение (потоки нейтральных элементарных частиц – фотонов и нейтронов). По механизму образования – первичное (рождённое в источнике) и вторичное (образованное в результате взаимодействия излучения другого типа с веществом) ионизирующее излучение.

Энергия частиц ионизирующего излучения лежит в диапазоне от нескольких сотен электронвольт (рентгеновское излучение, бета-излучение некоторых радионуклидов) до  $10^{15}$  –  $10^{20}$  и выше электронвольт (протоны космического излучения, для которых не обнаружено верхнего предела по энергии).

Длина пробега и проникающая способность сильно различаются – от микрометров в конденсированной среде (альфа-излучение радионуклидов, осколки деления) до многих километров (высокоэнергетические мюоны космических лучей).

**Грей** (грэй) (русское обозначение: **Гр**, международное: **Gy**) – единица поглощённой дозы ионизирующего излучения в Международной системе единиц (СИ). Поглощённая доза равна одному грею, если в результате поглощения ионизирующего излуче-

ния вещество получило один джоуль энергии в расчёте на один килограмм массы. Через другие единицы СИ грей выражается следующим образом:

$$1 \text{ Гр} = \text{Дж} / \text{кг} = \text{м}^2 / \text{с}^2 \text{ (метр}^2 \text{ / секунда}^2\text{)}$$

Единица названа в честь британского учёного Льюиса Грея в 1975 году. В соответствии с правилами СИ, касающимися производных единиц, названных по имени учёных, наименование единицы грей пишется со строчной буквы, а её обозначение «Гр» – с заглавной.

Ранее широко использовалась (а иногда используется и до сих пор) внесистемная единица поглощённой дозы «рад».

$$1 \text{ Гр} = 100 \text{ рад}$$

**Зиверт** (русское обозначение: **Зв**; международное: **Sv**) – единица измерения эффективной и эквивалентной доз ионизирующего излучения в Международной системе единиц (СИ), используется с 1979 года. Зиверт – это количество энергии, поглощённое килограммом биологической ткани, равное по воздействию поглощённой дозе гамма-излучения в 1 Гр [Голубев Б. П., 1986].

Через другие единицы измерения СИ зиверт выражается следующим образом:

$$1 \text{ Зв} = 1 \text{ Дж/кг} = 1 \text{ м}^2/\text{с}^2 \text{ (для излучений с коэффициентом качества, равным 1,0).}$$

Единица названа в честь шведского учёного Рольфа Зиверта. В соответствии с правилами СИ, касающимися производных единиц, названных по имени учёных, наименование единицы *зиверт* пишется со строчной буквы, а её обозначение «Зв» – с заглавной.

Равенство зиверта и грея показывает, что эквивалентная доза и поглощённая доза имеют одинаковую *размерность*, но не означает, что эффективная доза *численно* равна поглощённой дозе. При определении эквивалентной дозы учитываются физические свойства излучения, при этом эквивалентная доза равна поглощённой дозе, умноженной на коэффициент качества излучения, зависящий от вида излучения и характеризующий биологическую *активность* того или иного вида излучения. Так, для альфа-частиц коэффициент качества равен 20 и это означает, что при *равном* количестве энергии излучения, поглощённой в единице массы органа или ткани, биологический эффект альфа-частиц окажется в *двадцать раз более сильным*, чем эффект гамма-излучения. При определении эффективной дозы учитывается вклад различных органов и тканей в общий ущерб, наносимый здоровью человека ионизирующим излучением. Эффективная доза равна эквивалентной дозе, умноженной на взвешивающий тканевый коэффициент, зависящий от вклада того или иного органа в ущерб, наносимый при облучении отдельных органов или тканей организму в целом. Эквивалентная доза имеет большое значение для радиобиологии, в то время как эффективная доза является одной из основных величин, применяемых для гигиенического нормирования уровня радиационного воздействия.

### **Кратные и дольные единицы**

Десятичные кратные и дольные единицы образуют с помощью стандартных приставок СИ.

Раньше (а иногда и сейчас) использовалась единица **бэр** (биологический эквивалент рентгена), англ. *rem (roentgen equivalent man)* – устаревшая внесистемная единица измерения эквивалентной дозы. 100 бэр равны 1 зиверту. Также верно, что 100 рентген

= 1 зиверт с оговоркой, что рассматривается биологическое действие рентгеновского излучения (или другого фотонного излучения, например, гамма-излучения).

#### **Допустимые и смертельные дозы для человека**

Миллизиверт (мЗв) часто используется как мера дозы при медицинских диагностических процедурах (рентгеноскопия, рентгеновская компьютерная томография и т. п.).

Согласно постановлению главного государственного санитарного врача России за № 11 от 21 апреля 2006 г. «Об ограничении облучения населения при проведении рентгенорадиологических медицинских исследований», п. 3.2, необходимо «обеспечить соблюдение годовой эффективной дозы 1 мЗв при проведении профилактических медицинских рентгенологических исследований, в том числе при проведении диспансеризации». Среднемировая доза облучения от рентгенологических исследований, накопленная на душу населения за год, равна 0,4 мЗв, однако в странах с высоким уровнем доступа к медобслуживанию (более одного врача на 1000 человек населения) этот показатель растёт до 1,2 мЗв ([https://ru.wikipedia.org/wiki/Зиверт#cite\\_note-report-2](https://ru.wikipedia.org/wiki/Зиверт#cite_note-report-2)). Облучение от других техногенных источников значительно меньше: 0,005 мЗв от радионуклидов, оставшихся от атмосферных ядерных испытаний, 0,002 мЗв от Чернобыльской катастрофы, 0,0002 мЗв от ядерной энергетики.

Среднемировая доза облучения от естественных источников, накопленная на душу населения за год, равна 2,4 мЗв, с разбросом от 1 до 10 мЗв.

Основные компоненты:

- 0,4 мЗв от космических лучей (от 0,3 до 1,0 мЗв, в зависимости от высоты над уровнем моря);

- 0,5 мЗв от внешнего гамма-излучения (от 0,3 до 0,6 мЗв, в зависимости от радионуклидного состава окружения – почвы, стройматериалов и т. п.);

1,2 мЗв внутреннего облучения от ингалируемых атмосферных радионуклидов, главным образом радона (от 0,2 до 10 мЗв, в зависимости от местной концентрации радона в воздухе);

0,3 мЗв внутреннего облучения от инкорпорированных радионуклидов (от 0,2 до 0,8 мЗв, в зависимости от радионуклидного состава пищевых продуктов и воды).

При однократном равномерном облучении всего тела и не оказании специализированной медицинской помощи смерть в результате острой лучевой болезни наступает в 50 % случаев:

при дозе порядка 3–5 Зв из-за повреждения костного мозга в течение 30–60 суток;

10 ± 5 Зв из-за повреждения желудочно-кишечного тракта и лёгких в течение 10–20 суток;

> 15 Зв из-за повреждения нервной системы в течение 1–5 суток.



## Десятичные кратные и дольные единицы образуют с помощью стандартных приставок СИ.

Кратные		Дольные	
величина	название и обозначение	величина	название и обозначение
$10^3$ Зв	килозиверт, кЗв, kSv	$10^{-3}$ Зв	миллизиверт, мЗв, mSv
$10^6$ Зв	мегазиверт, МЗв, MSv	$10^{-6}$ Зв	микрозиверт, мкЗв, $\mu$ Sv
$10^9$ Зв	гигазиверт, ГЗв, GSv	$10^{-9}$ Зв	нанозиверт, нЗв, nSv
$10^{12}$ Зв	теразиверт, ТЗв, TSv	$10^{-12}$ Зв	пикозиверт, пЗв, pSv
$10^{15}$ Зв	петазиверт, ПЗв, PSv	$10^{-15}$ Зв	фемтозиверт, фЗв, fSv
$10^{18}$ Зв	эксазиверт, ЭЗв, ESv	$10^{-18}$ Зв	аттозиверт, аЗв, aSv
$10^{21}$ Зв	зеттазиверт, ЗЗв, ZSv	$10^{-21}$ Зв	zeptозиверт, зЗв, zSv
$10^{24}$ Зв	иоттазиверт, ИЗв, YSv	$10^{-24}$ Зв	иоктозиверт, иЗв, ySv

## Литература

1. Ian M. Ehrenreich, David W. Pfennig Genetic assimilation: a review of its potential proximate causes and evolutionary consequences // *Annals of Botany*. – 2016-4. – Т. 117, вып. 5. – С. 769–779. – ISSN 0305-7364. – DOI:10.1093/aob/mcv130.
2. Qi Chen, Wei Yan, Enkui Duan Epigenetic inheritance of acquired traits through sperm RNAs and sperm RNA modifications // *Nature Reviews. Genetics*. – 12 2016. – Т. 17, вып. 12. – С. 733–743.
3. Фриз Г. де, Избр. произв., пер. [с франц.], М., 1932
4. Коржинский С., Гетерогенезис и эволюция. К теории происхождения видов, СПб, 1899 (Записки АН. Серия 8. Отдел физико-математич., т. 9, № 2)
5. С. Г. Инге-Вечтомов. Генетика с основами селекции. М.: Высшая школа. 1989. 591 с.
6. Chromosome aberrations induced by X-rays // *Genetics*. – 1938. – Vol. 23. – No. 5. – P. 494–516. – PMID 17246897
7. IAEA, Cytogenetic analysis for radiation dose assessment, a manual, Technical Report Series No. 405. International Atomic Energy Agency 2001, Vienna, Austria; <http://www-pub.iaea.org/books/iaea-books/6303/Cytogenetic-Analysis-for-Radiation-Dose-Assessment-A-Manual>
8. Биология. Книга 1 / Под ред. акад. РАН В. Н. Ярыгина. – М.: Высшая школа, 2003.
9. Грин Н. и др. Биология. – М.: Мир, 1990. Т. 1-3.
10. Жимулев И. Ф. Общая и молекулярная генетика. – Новосибирск: Изд-во НГУ, 2003.
11. Клаг У., Каммингс М. Основы генетики. – М.: Мир, 2007.
12. Тарантул В. З. Толковый биотехнологический словарь. Русско-английский. – М: Языки славянских культур, 2009. – 936 с. – ISBN 978-5-9551-0342-6.
13. Knudson AG Jr. (1971). «Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma». *Proc Natl Acad Sci U S A*. **68**: 820–823. PMID 5279523.
14. Райс Р. Х., Гуляева Л. Ф. Биологические эффекты токсических соединений. – Новосибирск: изд-во НГУ, 2003.
15. Little J. B., Gorgojo L., Vetrovs H. Delayed appearance of lethal and specific gene mutations in irradiated mammalian cells // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 1990. – 19. – P. 1425–1429.
16. Niwa O. Radiation induced dynamic mutations and transgenerational effects // *J. Radiation Research*. – 2006. – 47. – P. B25-B30.
17. Grebneva H. A. Nature and possible mechanisms formation of potential mutations arising at

emerging of thymine dimers after irradiation of double-stranded DNA by ultraviolet light // *J. Mol. Struct.* – 2003. – 645. – P. 133–143.

18. De Bont R, van Larebeke N. (2004) Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* 19(3):169-185. Review. PMID 15123782

1. Kemmink, Johan; Boelens, Rolf; Koning, Thea M.G.; Kaptein, Robert; Van der Morel, Gijs A.; Van Boom, Jacques H. (1987) «Conformational Changes in the oligonucleotide duplex d(GCGTTGCG)\*d(GCGAAGCG) induced by formation of a cis-syn thymine dimer». *European Journal of Biochemistry* 162, 31-43

2. Banerjee S. K., Borden A., Christensen R. B., LeClerc J. E., Lawrence C. W. SOS-dependent replication past a single trans-syn T-T cyclobutane dimer gives a different mutation spectrum and increased error rate compared with replication past this lesion in uninduced cell // *J. Bacteriol.* – 1990. – 172. – P. 2105–2112.

19. Mullaney J. M. et al Small insertions and deletions (INDELs) in human genomes (англ.) // *Human molecular genetics.* – 2010. – Vol. 19, no. R2. – P. R131-R136.

20. Garcia-Diaz M., Kunkel T. A. Mechanism of a genetic glissando\*: structural biology of indel mutations (англ.) // *Trends in biochemical sciences.* – 2006. – Vol. 31, no. 4. – P. 206-214. – DOI:10.1016/j.tibs.2006.02.004.

21. Definition. Frameshift mutation / frame-shift mutation; frameshift (англ.). Scitable by Nature Education. Проверено 17 января 2016.

22. Grebneva H. A. One of mechanisms of targeted substitution mutations formation at SOS-replication of double-stranded DNA containing cis-syn cyclobutane thymine dimers // *Environ. Mol. Mutagen.* – 2006. – 47. – P. 733–745.

3. Lynch M., Conery J. S. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes // *Science.* 2000. – Vol. 290. – P. 1151–1154.

4. Bargaonker D. S. *Chromosome Variation in Man: A Catalogue of Chromosomal Variants and Anomalies.* – 5th edn. – New York: Alan R. Liss, 1989.

5. Ohno S. *Evolution by gene duplication.* – New York: Springer-Verlag, 1970.

6. Page S. L., Shaffer L. G. Nonhomologous Robertsonian translocations form predominantly during female meiosis // *Nature Genetics.* – 1997. – Vol. 15. – P. 231–232.

23. Pfeiffer P., Goedecke W., Obe G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations (англ.) // *Mutagenesis.* – 2000. – Vol. 15, no. 4. – P. 289–302. .

24. Rieseberg L. H. Chromosomal rearrangements and speciation (англ.) // *Trends Ecol Evol : журнал.* – 2001. – Vol. 16, no. 7. – P. 351–358.

25. Cannistraro V. J., Taylor J. S. Acceleration of 5-methylcytosine deamination in cyclobutane dimers by G and its implications for UV-induced C-to-T mutation hotspots // *J. Mol. Biol.* – 2009. – 392. – P. 1145–1157.

26. Albertson D. G., Collins C., McCormick F., Gray J. W. Chromosome aberrations in solid tumors // *Nat Genet : журнал.* – 2003. – Т. 34, № 4. – С. 369–376.

27. Коряков Д. Е., Жимулёв И. Ф. *Хромосомы. Структура и функции.* – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2009.

28. Kaiser-Rogers K, Rao K. Structural chromosome rearrangements in *The principles of clinical cytogenetics.* Eds Martha B. Keagle, Steven L. Gersen. Humana Press. 2005; p.165-206

29. Danilov V. I., Les A., Alderfer J. L. A theoretical study of the cis-syn pyrimidine dimers in the gas phase and water cluster and a tautomer – bypass mechanism for the origin of UV-induced mutations // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2001. – 19. – P. 179–191.

### Контрольные вопросы

1. Какие типы изменчивости существуют и какое влияние на организм оказывает изменчивость генотипа и фенотипа?
2. Что называется нормой реакции?
3. Какие факторы способны обеспечивать варьирование признаков в пределах нормы реакции?
4. Что такое генотипическая изменчивость?
5. Что такое модификационная изменчивость?
6. Какая изменчивость обеспечивает сравнительно быстрое формирование в ходе онтогенеза приспособлений организма к изменяющимся условиям внешней среды, способствуя, тем самым, выживанию организма?.
7. Какие типы мутационной изменчивости встречаются у человека?
8. Какие виды ионизирующего излучения влияют на клетки организма человека?
9. Какими свойствами обладают ионизирующие излучения по воздействию на живые организмы?
10. Что такое зиверт, грей?
11. Какие дозы являются допустимыми и смертельными для человека?

ГЛАВА 9

ГЕНОМНЫЕ И ХРОМОСОМНЫЕ МУТАЦИИ.  
ХРОМОСОМНЫЕ БОЛЕЗНИ

9.1. Геномные мутации

К геномным мутациям относят мутации с увеличением числа хромосом. Выделяют кратные гаплоидному набору (эуплоидия) и не кратные гаплоидному набору (анэуплоидия) изменения числа хромосом (рисунок 9.1). Эуплоидия включает гаплоидию и полиплоидию. При гаплоидии клетки содержат один хромосомный набор (каждая хромосома не имеет пары). У гаплоидных организмов рецессивные аллели всегда проявляются в фенотипе, чем объясняется их сниженная жизнеспособность. Гаплоидия известна у растений (дурман, пшеница, кукуруза). В эксперименте, подвергая икру резким колебаниям температуры, получали гаплоидных тритонов, которые отличались пониженной жизнеспособностью. Кроме рассмотренной эуплоидии существует вторая разновидность геномных мутаций - анэуплоидия (гетероплоидия), или изменение числа хромосом, не кратное гаплоидному набору (рисунок 9.1). Например, при слиянии нормальной гаметы с гаметой, содержащей две гомологичные хромосомы, оставшиеся в клетке в результате неправильного расхождения хромосом в мейозе, возникает трисомия (рисунок 9.1). Тетрасомия может возникнуть при слиянии двух таких «необычных» гамет.



Тетрасомия может возникнуть при слиянии двух таких «необычных» гамет.

Рисунок 9.1. Геномные мутации  
При полиплоидии отмечается увеличенное число хромосом, кратное гаплоидному набору: 3n - триплоид, 4n - тетраплоид, 5n - пентаплоид и т.д.

Для аутоплоидов характерны нарушения онтогенеза. У мышей, например, большинство триплоидных эмбрионов погибает в первой половине беременности. У человека описаны единичные случаи рождения три- и тетраплоидных людей. Продолжительность жизни новорождённых с триплоидией варьировала от 15 минут до 7 суток. Полиплоиды человека обнаружены также при изучении выкидышей. Мозаичная диплоидно-триплоидная форма выявлялась у жизнеспособных детей в возрасте 9-10 лет.

Если одна из хромосом отсутствует или имеется лишняя хромосома, то говорят соответственно о моносомии или трисомии по этой хромосоме (например, трисомия по 13-й или моносомия по X-хромосоме). Гены такой хромосомы присутствуют в одинарной (при моносомии) либо в тройной (при трисомии) дозе, а не в нормальной двойной (дисомной) дозе. Аномальное число участков хромосомы, возникшее в результате хромосомной аберрации, часто называют частичной трисомией или частичной моносомией (например, частичная трисомия по плечу 13q или частичная моносомия по плечу 4p).

Хромосомные аномалии вызывают нарушение общего генетического баланса, той скоординированности в работе генов и системности регуляции, которые сложились в процессе эволюции. Поэтому неудивительно, что патологические эффекты хромосомных и геномных мутаций проявляются на всех стадиях онтогенеза и, возможно, даже на уровне гамет, влияя на последующие стадии развития (особенно у мужчин).

В отдельных органах (например, в печени) у человека и животных встречаются полиплоидные клетки, количество которых с возрастом увеличивается. Это явление получило название *избирательной соматической полиплоидии*. Оно способствует расширению функциональных возможностей органа, в случаях, когда достичь этого за счёт пролиферации клеток невозможно.

#### **Полиплоидизация происходит в результате:**

- *незавершения митоза разделением клетки* (митотическая полиплоидизация), в результате которого возникают тетраплоиды и т.д.;

- *нерасхождения хромосом в первом делении мейоза* с образованием гамет с диплоидным набором хромосом, а затем и триплоидной зиготы (мейотическая полиплоидизация);

- *нарушения дробления зиготы* (зиготическая полиплоидизация).

Митотическая и мейотическая полиплоидизации являются типами аутополиплоидии - умножения хромосомного набора одного вида. Наряду с последней выделяют аллополиплоидию, возникающую при межвидовой гибридизации (примером аллоплоида является гибрид редьки и капусты Г.Д. Карпеченко).

## **9.2. Хромосомные мутации (абerrации): общие сведения**

Хромосомные абerrации (chromosome aberrations, греч. *chroma* — цвет, окраска и *soma* — тело; лат. *aberratio* — уклонение) - различные изменения структуры хромосом (нехватки, транслокации, инверсии, дубликации), затрагивающие обе хроматиды, поскольку эти изменения происходят до начала репликации, т. е. на стадии G1 клеточного цикла. Иногда под хромосомными абerrациями подразумевают весь комплекс нарушений генома на уровне отдельных хромосом.

Нормальный хромосомный набор человека включает 46 хромосом, в том числе 22

пары аутосом и 1 пару половых хромосом - XX или XY. Частота хромосомных аномалий у детей, родившихся живыми, составляет 0,7%; у мертворожденных плодов - 5%; при ранних самопроизвольных абортах - 50%. Известно множество хромосомных аномалий, в том числе - связанных с эндокринными болезнями (таблица 9.1).

Основные типы аномалий:

- Численные изменения хромосомного набора.
- Структурные изменения (абerrации) отдельных хромосом.

**Таблица. 9.1. (табл 4.1 Lvn). Хромосомные болезни с эндокринными нарушениями**

Болезнь	Хромосомная аномалия	Эндокринные нарушения
Синдром Дауна	Трисомия по 21 хромосоме	Первичный гипогонадизм, гипотериоз или тиреотоксикоз
Синдром Тернера	45,X и другие варианты	Первичный гипогонадизм, гипотериоз, сахарный диабет
Синдром Клайнфельтера	47,XXY и другие варианты	Первичный гипогонадизм, сахарный диабет
Трисомия по 13 хромосоме	Трисомия по 13 хромосоме	Гипопитуитаризм, вторичный гипогонадизм
Трисомия по 18 хромосоме	Трисомия по 18 хромосоме	Гипоплазия щитовидной железы или надпочечников (в редких случаях)
Триплодия	Модальное число хромосом 69	Гипоплазия надпочечников
Синдром Вольфа-Хиршхорна	del(4p)	Первичный гипогонадизм,
Делеция короткого плеча 18 хромосомы	del(18p)	Гипопитуитаризм с голопрозэнцефалией, изолированная голопрозэнцефалия
Синдром WAGR	del(11p13)	Нарушения половой дифференцировки (наружные половые органы промежуточного типа), гонадобластома
Синдром Беквита-Видемана	Перестройки 11 хромосомы в районе 11pter-p15.4	Гипогликемия, опухоли надпочечников и других эндокринных желез
Синдром Прадера-Вилли	del(15q1.1-1.3) у 50% больных	Вторичный гипогонадизм, сахарный диабет, ожирение
Редко встречающиеся трисомии или моносомии у больных с мозаицизмом	.	Задержка роста, первичный гипогонадизм, другие нарушения

Аномалии могут затрагивать как аутосомы, так и половые хромосомы. Если хромосомная аномалия присутствует в половой клетке, то все клетки будущего организма наследуют эту аномалию (что приводит к развитию полной формы наследственной болезни). Хромосомные аномалии могут возникать и в соматических клетках, особенно на ранних стадиях эмбриогенеза. В таких случаях только часть клеток организма имеет хромосомную аномалию (хромосомный мозаицизм). Часто встречается мозаицизм по половым хромосомам. Для унификации цитогенетических исследований разработана Международная цитогенетическая номенклатура хромосом человека (ISCN, 1978), основанная на дифференциальном окрашивании хромосом по длине. Эта номенклатура позволяет подробно описать каждую хромосому: ее порядковый номер, плечо (p - короткое плечо, q - длинное плечо), район, полосу и даже субполосу. Например, 2p12 обозначает 2-ю хромосому, короткое плечо, район 1, полосу 2.

Хромосомные мутации (абберации), или хромосомные перестройки, возникают в результате преобразования структуры отдельных хромосом. В их основе лежит разрыв хромосомы и образования фрагментов, которые в последующем воссоединяются, но при этом нормальное строение хромосомы не восстанавливается (рисунок 9.2).

Рисунок 9.2. Хромосомные мутации (абберации)

Различают следующие типы хромосомных мутаций:

**1) Внутрихромосомные перестройки:**

- а) *делеция* (утрата части хромосомы, рисунок 9.2);
  - б) *дупликация* (удвоение или даже умножение некоторых участков, рисунки 9.2-9.3);
  - в) *инверсия* (образование, поворот на 180° и воссоединение фрагмента хромосомы, которые изменяют последовательность расположения генов); при перичентрической инверсии образуемый фрагмент содержит центромеру, при парацентрической инверсии - лишён её (рисунок 9.2);
  - г) *транспозиция* (не реципрокная транслокация) заключается в перемещении участка, соизмеримого с геном или группой генов, в пределах хромосомы.
- 2) межхромосомные перестройки,** при которых негомологичные хромосомы обмениваются участками; их разновидностью является *реципрокная транслокация*, заключающаяся в отрыве участка одной хромосомы и его перемещении в негомологичную хромосому (рисунок 9.2).

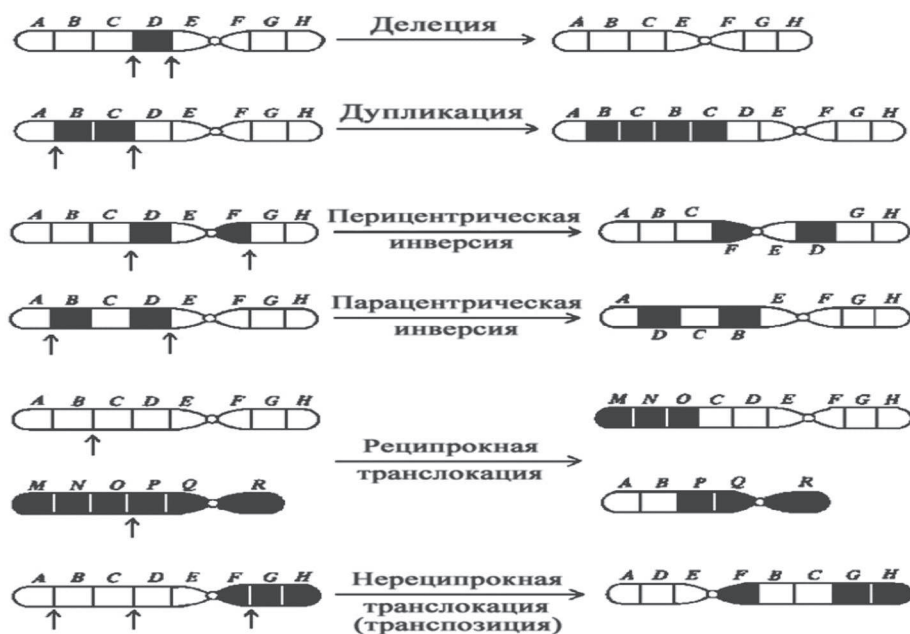


Рисунок 9.2. Хромосомные мутации (абберации)

Различают следующие типы хромосомных мутаций:

**1) Внутривнутрихромосомные перестройки:**

- а) *делеция* (утрата части хромосомы, рисунок 9.2);
- б) *дупликация* (удвоение или даже умножение некоторых участков, рисунки 9.2-9.3);
- в) *инверсия* (образование, поворот на  $180^\circ$  и воссоединение фрагмента хромосомы, которые изменяют последовательность расположения генов); при перичентрической инверсии образуемый фрагмент содержит центромеру, при парацентрической инверсии - лишён её (рисунок 9.2);
- г) *транспозиция* (нереципрочная транслокация) заключается в перемещении участка, соизмеримого с геном или группой генов, в пределах хромосомы.

**2) межхромосомные перестройки**, при которых негомологичные хромосомы обмениваются участками; их разновидностью является *реципрочная транслокация*, заключающаяся в отрыве участка одной хромосомы и его перемещении в негомологичную хромосому (рисунок 9.2).



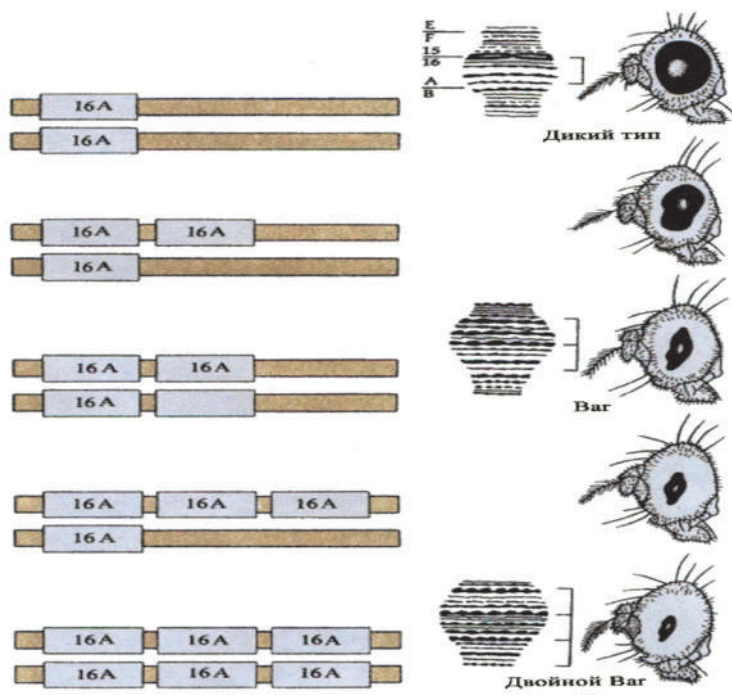


Рисунок 9.3. Дупликация участка 16А в X-хромосоме *D.melanogaster*, вызывающая уменьшение размера глаза (Bar)

Делеция в одной из гомологичных хромосом слюнных желез *D.melanogaster* приводит к образованию петли при конъюгации хромосом (рисунок 9.4).

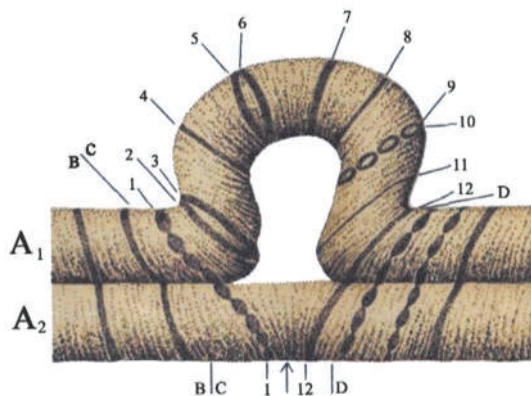


Рисунок 9.4. Конъюгация хромосом слюнных желез *D.melanogaster*, в одной из которых (A2) произошла делеция: отсутствует участок между 3C2 и 3C11; в хромосоме A1 образуется петля

Транслокация одной из хромосом (21-й) известна у человека, являясь причиной болезни Дауна (одна из копий 21-й хромосомы транслоцирована на 14-ю хромосому

и образует длинное плечо последней). Для этого синдрома характерна умственная отсталость, нарушения дерматоглифики ладони, аномалии лица (монголоизм). Продолжительность жизни составляет в среднем 16 лет. Большинство транслокаций ведёт к нежизнеспособности организма.

Изучение первичных эффектов хромосомных аномалий началось в начале 60-х годов вскоре после открытия хромосомных болезней и продолжается до сих пор. Главные эффекты хромосомных аномалий проявляются в двух связанных между собой вариантах: летальности и врожденных пороках развития. Имеются убедительные свидетельства тому, что патологическая роль хромосомных аномалий начинает проявляться уже со стадии зиготы. Летальный эффект их является одним из главных факторов внутриутробной гибели, достаточно высокой у человека.

Структурные хромосомные перестройки, называемые хромосомными абберациями, наследуются или возникают вновь. Причина хромосомных аббераций неизвестна, хотя предполагают, что часть их возникает спонтанно, а часть - под влиянием факторов окружающей среды, например, химических мутагенов или ионизирующего излучения, на половые клетки, зиготу или эмбрион на ранней стадии развития. Большинство хромосомных аббераций возникает в хромосомах, получаемых от отца.

Точечные мутации, как и делеции или дупликации участков хромосомы длиной в сотни нуклеотидов, под микроскопом не видны. Для выявления хромосомной абберации с помощью дифференциального окрашивания хромосом нужно, чтобы делеция, дупликация или транслокация затронули участок ДНК длиной более 3 млн нуклеотидов. Факторы окружающей среды, вызывающие точечные мутации ( мутагены в широком смысле), действуют и как факторы, приводящие к разрывам хромосом ( кластогены ), и наоборот. Таким образом, диапазон нарушений простирается от различимых под микроскопом аббераций до мутаций, для выявления которых необходимо определить нуклеотидную последовательность. В отличие от точечных мутаций, нарушения, различимые под микроскопом, обычно оказывают более выраженное воздействие на организм. Хромосомные абберации затрагивают как гены (часто много генов), так и участки хроматина с неизвестной функцией.

Многие хромосомные абберации были выявлены всего один или несколько раз. Другие периодически обнаруживают и в семьях, и у людей, не связанных родственными отношениями. Например, самая распространенная транслокация, которая может быть наследственной или новой, захватывает центромерные или прицентромерные районы одной 13-й и одной 14-й хромосом. При этой транслокации утрачивается только неактивный хроматин коротких плеч или неуникальные участки активного хроматина районы ядрышкового организатора и спутники. В еще одной сходной транслокации участвуют 14-я и 21-я хромосомы.

В результате таких хромосомных аббераций (их называют робертсоновскими транслокациями) в кариотипе оказывается 45 хромосом, а не 46, хотя общее количество активных генов практически не изменяется.

Таким образом, хромосомные аномалии могут быть генетически компенсированы, и тогда они не оказывают неблагоприятного влияния на их носителей; компенсирован-

ными являются примерно две трети нарушений, выявленных при обследовании новорожденных. Если нарушения не компенсированы, то это приводит к порокам развития; обычно такие нарушения выявляют у плода после самопроизвольного аборта или у больных с многочисленными пороками развития и умственной отсталостью.

Некоторые компенсированные хромосомные аберрации передаются из поколения в поколение, не вызывая заболеваний. Иногда они обуславливают возникновение декомпенсированных нарушений. Например, наследование транслокаций с участием 21-й хромосомы повышает вероятность трисомии по ней. Такие транслокации выявляют у 5% новорожденных с трисомией по 21-й хромосоме и в 20% этих случаев - у одного из родителей. Так как большинство детей с трисомией по 21-й хромосоме, обусловленной транслокацией, рождается у женщин моложе 30 лет, то при рождении больного ребенка у молодых родителей нужно обследовать их на наличие транслокации. При разных транслокациях риск появления декомпенсированных нарушений (частичных трисомии или моносомий) у детей неодинаков, и, как правило, рассчитать его теоретически невозможно. Однако можно использовать статистические данные, накопленные по распространенным транслокациям. Например, при Робертсоновской транслокации (14;21) вероятность рождения ребенка с трисомией по 21-й хромосоме составляет 2%, если носитель компенсированной транслокации является отец, и более 10%, если транслокация наследуется от матери.

### 9.3. Хромосомные болезни

Патологические состояния организма, обусловленные геномными и хромосомными мутациями, называются хромосомными болезнями

#### 9.3.1. Синдром (болезнь) Дауна

Синдром Дауна (СД), трисомия-21, - наиболее изученная хромосомная болезнь. Описана врачом в 1866 г. и названа им монголизмом [The Metabolic Basis of Inherited Disease, 1983].

Соотношение мальчиков и девочек среди новорожденных с СД составляет 1:1. Клиническая симптоматика СД разнообразна: это и врожденные пороки развития, и нарушения постнатального развития нервной системы, и вторичный иммунодефицит и т.п. Дети с СД рождаются в срок, но с умеренно выраженной пренатальной гипоплазией (на 8 - 10% ниже средних величин). Многие симптомы СД заметны при рождении, в последующем они проявляются более четко. Квалифицированный педиатр ставит правильный диагноз СД в родильном доме не менее чем в 90% случаев. Из черепно-лицевых дизморфий отмечаются монголоидный разрез глаз (по этой причине СД долго называли монголоидизмом), круглое уплощенное лицо, плоская спинка носа, эпикант, крупный (обычно высунутый) язык, брахицефалия, деформированные ушные раковины. (рисунок 9.5).



Рисунок 9.5. (фоторафии) Синдром Дауна.

Характерна мышечная гипотония в сочетании с разболтанностью суставов. Часто встречается врожденный порок сердца, клинодактилия, характерные изменения дерматоглифики (четырепальцевая или обезьянья складка на ладони, две кожные складки вместо трех на мизинце, высокое положение трирадиуса и др.). Пороки желудочно-кишечного тракта встречаются, но редко. Встречаемости какого-либо симптома в 100 % случаев не наблюдается. Частоты встречаемости внешних признаков СД и основных врожденных пороков внутренних органов представлены ниже в таблице 9.2.

Таблица 9.2. Фенотипические признаки синдрома Дауна

Симптомы	Частота встречаемости, %
Умственная осталость	99
Плоское лицо	90
Монголоидный разрез глаз	80
Эпикант	40
Пятна Брушфильда на радужке	50
Косоглазие	60
Аномалии ушных раковин	50
Высокое или готическое небо	70
Брахицефалия	75
Плоский затылок	78
Мелкие зубы	65
Короткая широкая шея	45
Большой язык	50
Врожденный порок сердца	8
Дуоденальная обструкция	70
Короткие конечности	70
Широкие короткие кисти, короткие пальцы	70
Единственная ладонная складка	20
Сандалевидная щель	45
Гипотония	60
Низкий рост	80

Большое значение для диагностики имеет оценка динамики физического и умственного развития ребенка. При СД и то, и другое задерживается. Рост взрослых больных на 20 сантиметров ниже среднего. Особенно проявляется задержка в умственном развитии до уровня имбецильности, если не применяются специальные методы обучения. Дети с СД ласковые, внимательные, послушные, терпеливые при обучении. Реакция детей с СД на окружающую среду очень низкая в связи со слабым клеточным и гуморальным иммунитетом, снижением репарации ДНК, недостаточной выработкой пищеварительных ферментов, ограниченными компенсаторными возможностями всех систем. По этой причине дети с СД часто болеют пневмониями, тяжело переносят детские инфекции. У них отмечается нарушение питания, выражен авитаминоз.

Врожденные пороки внутренних органов, сниженная приспособленность детей с СД часто приводят к летальному исходу в первые 5 лет. Следствием измененного иммунитета и недостаточности репарационных систем (для поврежденной ДНК) являются лейкозы, часто встречающиеся у больных СД.

Дифференциальная диагностика проводится с врожденным гипотиреозом, другими формами хромосомных аномалий.

Цитогенетическое исследование у детей показано и при подозрении на СД, и при клинически установленном диагнозе, поскольку цитогенетическая характеристика пациента необходима для прогноза здоровья будущих детей у родителей и их родственников.

Частота СД среди новорожденных равна 1:700 - 1:800, не имеет какой-либо временной, этнической или географической разницы при сравнении одинакового возраста родителей. Частота рождения детей с СД зависит от возраста матери и в меньшей мере от возраста отца [Мюнтцинг А., 1967].

Примерно в 94% случаев синдром обусловлен трисомией по 21-й хромосоме. У 3% больных наблюдается мозаицизм. В остальных случаях синдром вызван спорадической или наследуемой транслокацией 21-й хромосомы. Как правило, такие транслокации возникают в результате слияния центромеры 21-й хромосомы и другой акроцентрической хромосомы. Фенотип больных определяется трисомией участка 21q22.

Для взрослых с трисомией по 21-й хромосоме характерно раннее развитие болезни Альцгеймера. Если у больных женщин рождаются дети, то у каждого второго ребенка диагностируют трисомию по 21-й хромосоме. Некоторые хромосомные аномалии, в частности синдром Дауна (трисомия по 21-й хромосоме), предрасполагают к развитию острых миелоидных лейкозов.

Повторный риск рождения ребенка с синдромом Дауна у родителей с нормальным кариотипом составляет около 1%. Повторный риск у лиц с мозаицизмом и носителей сбалансированной транслокации существенно выше. Пожилой возраст матери - единственный фактор риска, для которого четко установлена связь с синдромом Дауна. После 35 лет существенно возрастает вероятность рождения детей с СД надо принимать во внимание распределение рожаящих женщин по возрасту (доля женщин, рожаящих после 35 лет, из общего числа рожаящих).

Лечебная помощь детям с СД многопланова и неспецифична. Врожденные пороки сердца устраняются оперативно. Постоянно проводится общеукрепляющее лечение.

Питание должно быть полноценным. Необходимы внимательный уход за больным ребенком, защита его от действия вредных факторов окружающей среды (простуда, инфекции). Большие успехи в сохранении детей с СД и их развитии достигнуты с помощью специальных методов обучения, укрепления физического здоровья с раннего детства, некоторых форм лекарственной терапии, направленных на улучшение функций ЦНС. Многие люди с трисомией-21 способны теперь вести самостоятельную жизнь, овладевают несложными профессиями, создают семьи.

### **Роль гена Xist в экспериментальном предотвращении синдрома Дауна**

В июле 2013 года появились сообщения [ Mole Beth,2013, Steve Connor,2013] со ссылкой на оригинальную публикацию в журнале Nature [Jiang J. et al., 2013] об *in vitro* эксперименте американских исследователей с медицинского факультета Университета штата Массачусетс под руководством д-ра Джин Лоренс. В ходе эксперимента ген Xist, ответственный за инактивацию X-хромосомы, был перенесён на 21-ю хромосому плюрипотентных стволовых клеток с трисомией по 21-й хромосоме. Таким образом удалось заблокировать лишнюю, третью копию 21-й хромосомы. Утверждается, что её блокировка сможет в будущем предотвращать развитие синдрома Дауна.

### **9.3.2. Синдром Эдвардса**

Трисомия по 18-й хромосоме (синдром Эдвардса) встречается у новорожденных с частотой от 1:3300 до 1:10000; у девочек бывает в 3 раза чаще, чем у мальчиков. Причиной заболевания является наличие дополнительной 18-й хромосомы (трёх вместо двух в норме для диплоидного набора) в кариотипе зиготы.

Дети с трисомией 18 рождаются с низким весом, в среднем около 2200 грамм, при этом длительность беременности — нормальная или даже превышает норму. Больные дети часто рождаются недоношенными или переношенными. Фенотипические проявления синдрома Эдвардса многообразны. Чаще всего возникают аномалии мозгового и лицевого черепа, мозговой череп имеет долихоцефалическую форму. Нижняя челюсть и ротовое отверстие маленькие. Глазные щели узкие и короткие. Ушные раковины деформированы и в подавляющем большинстве случаев расположены низко, несколько вытянуты в горизонтальной плоскости. Мочка, а часто и козелок отсутствуют. Наружный слуховой проход сужен, иногда отсутствует. Грудина короткая, из-за чего межреберные промежутки уменьшены и грудная клетка шире и короче нормальной. В 80 % случаев наблюдается аномальное развитие стопы: пятка резко выступает, свод провисает (стопа-качалка), большой палец утолщён и укорочен. Из дефектов внутренних органов наиболее часто отмечаются пороки сердца и крупных сосудов: дефект межжелудочковой перегородки, аплазии одной створки клапанов аорты и лёгочной артерии. У всех больных наблюдаются гипоплазия мозжечка и мозолистого тела, изменения структур олив, выраженная умственная отсталость, снижение мышечного тонуса, переходящее в повышение со спастикой. (рисунки 9.6).



Рисунок 9.6. (фотографии) Синдром Эдвардса (синдром трисомии хромосомы 18)

Процентное соотношение развития того или иного порока представлено в таблице 9.3.

Таблица 9.3. Основные клинические проявления синдрома Эдвардса

Симптомы	Частота встречаемости, %
Тяжелая задержка психомоторного и физического развития	100
Затруднения при глотании, проблемы с кормлением	100
Низкая масса тела при рождении	100
Гипертонус	65
Пороки развития головного и спинного мозга	30
Менингомиелоцеле	15
Выступающий затылок	90
Низко посаженные, уродливые уши	90
Птоз, эпикант, микрофтальмия	30
Расщелина губы и неба	15
Микрогнатия	90
Короткая шея с избыточностью кожи	60
Короткая грудина	90
Врожденный порок сердца (обычно дефект межжелудочковой перегородки)	95
Эвентерация диафрагмы	30
Паховая и пупочная грыжа	60
Пилоростеноз	30

Продолжительность жизни детей с синдромом Эдвардса невелика: 60 % детей умирают в возрасте до 3 месяцев, до года доживает лишь 5-10 %. Основной причиной смерти служат остановка дыхания и нарушения работы сердца. Оставшиеся в живых — глубокие олигофрены. Средняя продолжительность жизни мальчиков - 60, девочек - 280 дней.

Главные нарушения обмена веществ и эндокринные расстройства: гипоплазия подочной клетчатки, сильная задержка роста. Дисгенезия щитовидной железы или надпочечников встречается менее чем у 10% больных.

В одном случае из десяти наблюдается мозаицизм, лишнюю хромосому несут не все клетки организма. Это говорит о том, что нерасхождение произошло на ранней стадии развития зародыша, а все клетки с трисомией — потомки неправильно поделившейся клетки зародыша.

При более легкой мозаичной форме, когда лишь часть клеток в организме содержит аномальный набор хромосом, выживаемость несколько больше. Однако даже в этих случаях до взрослого возраста доживают единичные пациенты.

Их внешний вид определяется врожденными аномалиями, которые присутствовали при рождении (*заячья губа, деформированная ушная раковина, и др.*). Основным же симптомом, присутствующим у всех без исключения детей, является серьезнейшее отставание в умственном развитии (рисунок 9.7). Дожив до взрослого возраста, ребенок с синдромом Эдвардса является глубоким олигофреном (*IQ менее 20, что соответствует самой тяжелой степени умственной отсталости*).



Рисунок 9.7. (фотография) Синдром Эдвардса

В целом же в медицинской литературе описываются единичные случаи, когда дети с синдромом Эдвардса доживали до совершеннолетнего возраста. Из-за этого накопи-



но слишком мало объективных данных, чтобы говорить о внешних признаках этого заболевания у взрослых. Лечение на сегодняшний день сводится к паллиативной помощи (поддержанию морального духа столкнувшихся со смертельным заболеванием).

В связи с большим количеством пороков развития и очень низким процентом выживаемости детей с синдромом Эдвардса, в настоящее время разработаны методы антенатальной диагностики. Одной из первых и доступных методик, которые осуществляют во всех женских консультациях, является УЗИ плода. На УЗИ в ранних сроках беременности можно заподозрить пороки развития головного мозга и конечностей, также наличие обильного количества околоплодной жидкости, что должно насторожить врача. При получении данных результатов необходимо отправить беременную на более детальное и прицельное наблюдение в стационар.

В стационаре должны выполнить все необходимые общеклинические анализы и провести более специфические тесты, такие как эхография, доплерометрия (кровоток у беременных), исследование сывороточных маркеров крови:  $\beta$ -субъединицы хорионического гонадотропина ( $\beta$ ХГ),  $\alpha$ -фетопротеина (АФП), эстриола (ЕЗ), 17-оксипрогестерона. Для оценки степени риска рождения детей с хромосомной патологией во всех наблюдениях используют специально разработанную компьютерную программу PRISCA, учитывающую возраст женщины, показатели сывороточных маркеров и срок беременности. Также необходимо выполнить трансабдоминальный амниоцентез с последующим кордоцентезом. В амниотических водах при наличии синдрома Эдвардса определяются АФП, 17-ОП, ЕЗ, а в клетках крови плода - трисомия 18 хромосомы.

### 9.3.3. Синдром Патау

Трисомия 13 впервые описана Эразмусом Бартолином в 1657 году. Хромосомную природу заболевания выявил доктор Клаус Патау в 1960 году. Заболевание названо в его честь. Синдром Патау также был описан для племен с островов Тихого океана. Считается, что эти случаи были вызваны радиационным заражением, появившимся в результате испытаний ядерного оружия в регионе.

Трисомия по 13-й хромосоме ( синдром Патау) обнаруживается у новорожденных с частотой около 1:5000 - 1:7000 и связана с широким спектром пороков развития. Округлость черепа обычно уменьшена, встречается и тригоноцефалия. Лоб скошенный, низкий; глазные щели узкие, переносье запавшее, ушные раковины низко расположенные и деформированные. Типичный признак СП - это расщелины верхней губы и неба (обычно двухсторонние). (См фото 9.8). Всегда обнаруживаются пороки нескольких внутренних органов в разной комбинации: дефекты перегородок сердца, незавершенный поворот кишечника, кисты почек, аномалии внутренних половых органов, дефекты поджелудочной железы. Как правило, наблюдается полидактилия (чаще двухсторонняя и на руках) и флексорное положение кистей. Клиническая диагностика СП основывается на сочетании характерных пороков развития. При подозрении на СП показано ультразвуковое исследование всех внутренних органов. Наиболее распространенные дефекты: микрофтальмия или анофтальмия, расщелины верхней губы и твердого неба, наличие непарной резцовой кости, голопроэнцефалия.



Рисунок 9.8. (фотография). Синдром Патау

Эндокринные нарушения: гипопитуитаризм, гетеротопия поджелудочной железы, гипоплазия наружных половых органов. Гипопитуитаризм (гипоталамо-гипофизарная недостаточность) - болезненное состояние, обусловленное пониженным образованием гормонов гипофиза. Частота встречаемости разных симптомов у детей с СП представлена в таблице 9.4.

Таблица 9.4. Основные фенотипические проявления синдрома Патау

Симптомы	Частота встречаемости, %
Глубокая задержка умственного и физического развития	100
Микроцефалия	70
Предположительно глухота	70
Гипотония	45
Судороги	45
Дефекты скальпа	30
Гипертелоризм	90
Микрофтальмия	65
Эпикант	65
Отсутствие бровей	30
Колобома радужки	30
Низко посаженные, уродливые уши	90
Расщелина губы и/или неба	65
Короткая шея	65
Врожденный порок сердца (ДМЖП, ДМПП, коарктация аорты)	65

Клиническая и патологоанатомическая картины простых трисомных форм и транслокационных не различается. Соотношение полов при СП близко к 1:1. Дети с СП рождаются с истинной пренатальной гипоплазией (на 25 - 30% ниже средних величин), которую нельзя объяснить небольшой недоношенностью (средний срок беременности 38,3 нед). Характерным осложнением беременности при вынашивании плода с СП является многоводие: оно встречается почти в 50% случаев СП. Цитогенетические варианты этого синдрома следующие. Простая полная трисомия-13 как следствие нерасхождение хромосом в мейозе у одного из родителей (главным образом у матери) встречается у 80 - 85% больных. Остальные случаи обусловлены в основном передачей дополнительной хромосомы (точнее ее длинного плеча) в робертсоновских транслокациях типа D/13 и G/13. Другие цитогенетические варианты (мозаицизм, изохромосома, неробертсоновские транслокации) обнаружены, но они встречаются крайне редко.

В связи с тяжелыми врожденными пороками развития большинство детей с СП умирают в первые недели или месяцы (95% - до 1 года). Однако некоторые больные живут в течение нескольких лет. Более того, в развитых странах отмечается тенденция увеличения продолжительности жизни больных СП до 5 лет (около 15% детей) и даже до 10 лет (2 - 3% детей). Другие синдромы врожденных пороков развития (синдромы Меккеля и Мора, тригоноцефалия Опитца) по отдельным признакам совпадают с СП. Решающим фактором в диагностике является исследование хромосом. Цитогенетическое исследование показано во всех случаях, в том числе у умерших детей. Точный цитогенетический диагноз необходим для прогноза здоровья будущих детей. Некоторые хромосомные аномалии, в частности синдром Патау (трисомия по 13-й хромосоме), предрасполагают к развитию острых миелоидных лейкозов.

#### **9.4. Синдром ВОЛЬФА-ХИРШХОРНА. (Синонимы: 4p-синдром, моносомия 4p)**

**Синдром Вольфа — Хиршхорна** впервые описан в 1965 году. У 80 % страдающих им новорождённых цитологическую основу данного синдрома составляет делеция короткого плеча 4-й хромосомы. Размеры делеции колеблются от небольших терминальных до занимающих около половины дистальной части короткого плеча. Отмечается, что большинство делеций возникает «de novo» — 90 %, около 10 % происходит в результате транслокаций у родителей (1:2 — мужчина: женщина). Реже в геноме больных, помимо транслокации, имеются и кольцевые хромосомы. Наряду с делецией хромосом, патология у новорождённых может быть обусловлена инверсиями, дупликациями, изохромосомами.

У новорождённых небольшой вес при нормальной продолжительности беременности (до 2 кг). Среди внешних признаков могут отмечаться: умеренно выраженная микроцефалия, гипертелоризм, клювовидный нос, выступающее надпереносье, аномальной формы ушные раковины, нередко с преаурикулярными складками, гипоспадия, гипотония мышц, значительное снижение реакции на внешнее раздражение, эпилепсия встречается у 90% пациентов и зачастую проходит сама ближе к 10-ти годам и ранее. Практически у всех наблюдается митохондриальная дисфункция при которой

противопоказаны вальпроен содержащие препараты для лечения эпилепсии. У больных очень слабый иммунитет, даже бронхит может привести к летальному исходу. Часты расщелины верхней губы и нёба, деформации стоп и кистей, аномалии глазных яблок, эпикант и маленький рот с опущенными углами. Ушные раковины обычно оттопырены и крупные (главным образом за счёт увеличения ладьевидной и треугольной ямок), противозелок гипоплазирован, мочка не выражена. Впереди ушной раковины часто имеются вертикальные складки кожи (рисунок.9.9).



**Рисунок 9.9.** (фотографии) Ребенок с синдромом Вольфа-Хиршхорна. Характерные черты лица, гипертелоризм, нос в форме клюва. Плод с синдромом Вольфа-Хиршхорна. Девушка с синдромом Вольфа-Хиршхорн проявляет характерные черты этого состояния.

Болезнь характеризуется задержкой физиологического, умственного и психомоторного развития. Также могут проявляться в большинстве случаев тяжелейшие пороки сердца, почек. Частота встречаемости разных симптомов у детей с синдромом делеции 4p представлена в таблице 9.5.

**Таблица 9.5. Основные клинические проявления синдрома делеции 4p**

Симптомы	Частота встречаемости, %
Глубокая умственная отсталость	100
Микроцефалия	91
Затруднения при глотании	76
Дефект скальпа по средней линии	14
Низкая масса тела при рождении	89
Судороги	47
Гипертелоризм	74
Колобома радужки	31

Антимонголоидный разрез глаз	74
Преаурикулярные синусы, или выросты	33
Расщелина губы и/или неба	57
Гипоспадия или крипторхизм у мальчиков, Гипоплазия матки у девочек	64
Крючковатый нос	64
Низко посаженные, уродливые уши	69
Пороки сердца	55
Косолапость	70
Микрогнатия	55
«Обезьянья складка»	70

Стопы в ряде случаев резко деформированы. Описаны косолапость, плосковальгусная стопа, приведённая стопа и другие деформации. Часто наблюдаются гемангиомы кожи, обычно плоские, небольших размеров, локализованные в области лица. Частота этого синдрома низкая — 1 : 50000 рождений. Средняя продолжительность жизни примерно до 30 лет (в России зафиксирована максимальная продолжительность жизни 25 лет), при тяжёлых пороках сердца, почек, продолжительность жизни может составлять не более одного года.

WHS может быть вызван делецией WHSCR хромосомы 4p16.3 одним из нескольких генетических механизмов. Около 50% -60% людей с WHS имеют *de novo* полную делецию 4p16 и около 40% -45% имеют несбалансированную транслокацию как с делецией обоих 4p, так и с частичной трисомией различных хромосомных плеч. Эти несбалансированные транслокации могут возникнуть *de novo* или унаследованы от родителя со сбалансированной транслокацией. Остальные имеют другие сложные перестановки, приводящие к делеции 4p16.3 (например, кольцо 4). Риски для членов семьи зависят от механизма происхождения делеции.

**Методы геномного тестирования**, которые определяют количество копий последовательностей, могут включать хромосомный микрочип анализ (СМА), обычные цитогенетические исследования с дифференциальным G-окрашиванием или целевой анализ делеции с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* ( FISH ).

**Хромосомный микрочип анализ (СМА)** с использованием различных олигонуклеотидных микрочипов или различных SNP- генотипирующих последовательностей может обнаруживать делецию WHSCR более чем у 95% пробандов. Способность определения размера делеции зависит от типа используемого микрочипа и плотности зондов в области 4p16.3.

Пренатальное тестирование возможно для семей, в которых один родитель, как известно, является носителем хромосомной перестройки с участием 4p16.3.

**Целенаправленный (таргетный) анализ делеций.** Анализ FISH может использоваться у индивидов с клиническими особенностями, которые предполагают диагноз WHS. Невозможно определить размер делеции с помощью рутинного FISH анализа.

**Обычные цитогенетические исследования G-бендов** обнаруживают делецию в дистальной части короткого плеча одной хромосомы 4 с вовлечением полосы 4p16.3 примерно у 50-60% индивидов с WHS.

Многие индивиды (~ 55%) имеют делецию без каких-либо других цитогенетических аномалий (так называемая «чистая делеция»).

Около 40% -45% пораженных индивидов имеют несбалансированную транслокацию с делецией 4p и частичной трисомией другого хромосомного плеча.

Оставшиеся индивидуумы имеют другие сложные перегруппировки, приводящие к делеции 4p16.3 (например, кольцо 4) [ South et al 2008a ].

### **Номенклатура**

Ранее считавшиеся отдельными нарушениями, WHS и синдром Питта-Роджерса-Данкса (PRDS) теперь признаны одним синдромом из-за гетерозиготной делеции WHSCR на 4p16.3 [ Battaglia et al., 2001 ].

Распространенность WHS оценивается приблизительно в 1: 50 000 родов с соотношением женщин и мужчин 2: 1. Однако это, вероятно, недооценивается из-за неправильного диагноза и недооценки пораженных лиц [ Battaglia et al 2001 ].

### **Генетически связанные (аллельные) расстройства**

Делеции 4p-конца длиной более 22-25 МБ связаны с тяжелым фенотипом, который отличается от WHS [ Zollino et al 2008 ].

Удаления в пределах только дистальной части WHSCR могут быть либо доброкачественными, либо связанными с легкой задержкой развития, задержкой роста и судорогами, но без диагностических признаков WHS [ South et al 2008c ]. Было описано несколько лиц с интерстициальной делецией 4p, которая обычно включает полосы 4p12-p16, расположенные проксимальнее критической области WHS. Это расстройство является дискретным синдромом, отличным от WHS [ Bailey et al., 2010 ].

**Характерный клинический фенотип и особенно лицевой гештальт WHS, перекрываются с целым рядом синдромов:**

**Синдромом Секкеля**, характеризующимся дефицитом до и послеродового роста, микроцефалией и выпуклым носовым хребтом / заметным носом. Синдром Seckel наследуется аутосомно-рецессивным образом и вызван биаллельными патогенными вариантами в одном из следующих генов: *ATR*, *NIN*, *ATRIP*, *RBBP8*, *CEP152*, *CENPJ* или *CEP63*.

**CHARGE синдромом** с колобомой, сердечными пороками, хоанальной атрезией, задержкой роста и развития, генитальными аномалиями, а также аномалиями слуха / глухотой. Около 65% людей с клиническим диагнозом синдрома CHARGE имеют идентифицируемый гетерозиготный патогенный вариант *CHD7*. Синдром CHARGE наследуется аутосомно-доминантным образом; однако большинство людей с диагнозом синдром CHARGE представляют собой спорадические случаи.

**Синдромом Смита-Лемли-Опица (SLOS)**, характеризующимся преждевременной и постнатальной задержкой роста, микроцефалией, умственной отсталостью от умеренной до тяжелой степени и множественными крупными и малыми пороками развития. Уродства включают отличительные черты лица, расщелину неба, сердечные дефекты, недоразвитые внешние гениталии у мужчин, постаксиальную полидактилию и синдактилию 2-3 пальцев ног. SLOS связан с аномалией метаболизма холестерина в результате дефицита фермента 7-дегидрохолестеринредуктазы. SLOS наследуется

аутосомно-рецессивным образом и вызван биаллельными патогенными вариантами в *DHCR7*.

**Синдромом Опица G / ВВБ**, характеризующимся лицевыми аномалиями (широко расставленными глазами, выдвинутым вперед лбом, вдовим мысом, широкой переносицей и антевертированными ноздрями), ларинготрахеэзофагальными аномалиями и аномалиями мочеполовой системы (гипоспадия, крипторхизм и гипопластическая мошонка). Задержка развития / умственная отсталость и расщелина губы и / или неба присутствуют примерно в 50%. Была продемонстрирована генетическая гетерогенность: X-связанная форма вызвана либо гемизиготным патогенным вариантом в *MID1* у мужчин, либо гетерозиготным патогенным вариантом в *MID1* у женщин; аутосомно - доминантная форма обусловлена гетерозиготным патогенным вариантом в *SPECC1L*.

**Синдромом Malpuech** (OMIM 248340), характеризующимся замедлением роста, широко расставленными глазами, широким лбом, сильно изогнутыми бровями, урогенитальными аномалиями и проблемами слуха. Синдром Malpuech наследуется аутосомно-рецессивным способом.

**Синдромом Лоури-Маклина** (OMIM 600252) характеризующимся задержкой роста, умственной неполноценностью, расщепленным небом, врожденным пороком сердца и глаукомой.

**Синдромом Уильямса (WS)** характеризующимся сердечно-сосудистыми заболеваниями, отличительными чертами лица, аномалиями соединительной ткани, умственной неполноценностью (обычно мягкой), специфическим когнитивным профилем, уникальными характеристиками личности, аномалиями роста и эндокринными аномалиями. Проблемы с кормлением часто приводят к неспособности развиваться в младенчестве, гипотонии и задержке роста. WS вызван делецией генов с участием критической области WS (при 7q11,23), включающей ген эластина (*ELN*). Он наследуется аутосомно-доминантным образом; однако у большинства людей WS представляют спорадические случаи.

**Классическим синдромом Ретта**, прогрессирующим неврологическим расстройством, в первую очередь затрагивающем девочек, характеризующимся нормальным рождением и, по-видимому, нормальным психомоторным развитием в течение первых 6-18-ти месяцев жизни, за которым следует короткий период задержки развития, а затем быстрый регресс языковых и моторных навыков. Отличительной чертой болезни является потеря целенаправленного использования рук и замена его повторяющимися стереотипными движениями рук. Возникают приступы громкого и безутешного плача, аутичные черты, панические атаки, бруксизм, эпизодическое апноэ и / или гиперпноэ, атаксия и апраксия, тремор и приобретенная микроцефалия. Сообщается, что судороги отмечены у 90% женщин с синдромом Ретта. Синдром Ретта, вызываемый гетерозиготным патогенным вариантом в *MECP2*, наследуется X-сцепленно; однако более 99% девочек с диагнозом синдрома Ретта представляют собой спорадические случаи.

**Синдромом Ангельмана (AS)**, характеризующимся серьезной задержкой развития или умственной недееспособностью, серьезным нарушением речи, атаксией походки и / или дрожанием конечностей, а также уникальным поведением с неуместным счастливым поведением, которое включает в себя частый смех, улыбку и возбудимость. Ми-

кроцефалия и судороги являются характерными признаками синдрома. Задержки развития впервые отмечаются в возрасте около шести месяцев; однако специфические клинические симптомы AS не проявляются до достижения одного года, и даже проходит несколько лет, прежде чем правильный клинический диагноз станет очевидным. AS вызван нарушением импринтинга материнского гена *UBE3A*, расположенного в локусе 15q11.2-q13, области нарушений при синдроме Ангельмана/ синдроме Prader-Willi (AS / PWS).

**Синдромом Смита-Магениса (СМС)**, характеризующимся отличительными чертами лица, которые прогрессируют с возрастом, задержкой развития, когнитивными нарушениями и поведенческими отклонениями. У младенцев возникают трудности с кормлением, наблюдается отставание в развитии, гипотония, гипорефлексия, длительная дремота или необходимость пробуждения для кормления, а также генерализованная летаргия. Отмечается слабое или умеренное нарушение интеллектуальных, когнитивных и адаптивных способностей, фенотип включает значительное нарушение сна, стереотипы и неадаптивное деструктивное саморазрушающее поведение, которое не признается до возраста 18 месяцев и старше до совершеннолетия. Синдром Смита-Магениса (СМС) может быть вызван делецией или гетерозиготными мутациями патогенного варианта в *RAI1* на хромосоме 17p11.2. Практически все люди с диагнозом SMS представляют собой спорадические случаи.

#### 9.4.2. Синдром кошачьего крика, синдром Лежёна

**Синдром кошачьего крика** (англ. *cri du chat syndrome*, фр. *maladie du cri du chat*; также **болезнь кошачьего крика, синдром Лежёна** — по имени описавшего его в 1963 году французского учёного) — редкое генетическое расстройство, вызываемое отсутствием фрагмента 5-й хромосомы.

Кариотип 46 XX или XY, 5p-. Диагноз подтверждается кариологическим исследованием с применением одного из методов идентификации хромосом.

Хромосомный синдром кошачьего крика объясняется частичной моносомией; он развивается при делеции (с утратой от трети до половины, реже полная утрата) короткого плеча пятой хромосомы. Для развития клинической картины синдрома имеет значение не величина утраченного участка, а утрата конкретного короткого фрагмента хромосомы. Изредка отмечается мозаицизм по делеции или образованию кольцевой хромосомы-5.

##### **Клинические особенности**

Синдром Cri-du-chat характеризуется у маленьких детей микроцефалией, круглым лицом, гипертелоризмом, микрогнатией, эпикантальными складками, низко посаженными ушами, гипотонией и тяжелой психомоторной и умственной отсталостью (рисунк 9.10). Частота встречаемости симптомов синдрома делеции 5p представлена в таблице 9.6. Одной из наиболее характерных особенностей новорожденных является высокий кошачий крик, который обычно считается диагностическим признаком для синдрома [см. Overhauser et al., 1994]; однако характерный кошачий крик без типичных дисморфических и тяжелых признаков развития синдрома был обнаружен у лиц с делецией, ограниченной области 5p15,3 [см. Overhauser et al., 1994 and Gersh et al., 1995].



Таблица 9.6. Основные клинические проявления синдрома делеции 5p (синдром «кошачьего крика»)

Симптомы	Частота встречаемости, %
Низкая масса тела при рождении	100
Умственная отсталость	100
Затруднения при глотании	30
Плач, похожий на крик кошки	100
Дыхательный стрidor	60
Ларингомалация	20
Микроцефалия	90
Гипертелоризм	70
Косоглазие	50
Антимонголоидный разрез глаз	50
Низко посаженные, уродливые уши	60
Микрогнатия	60
«Обезьянья» складка	70

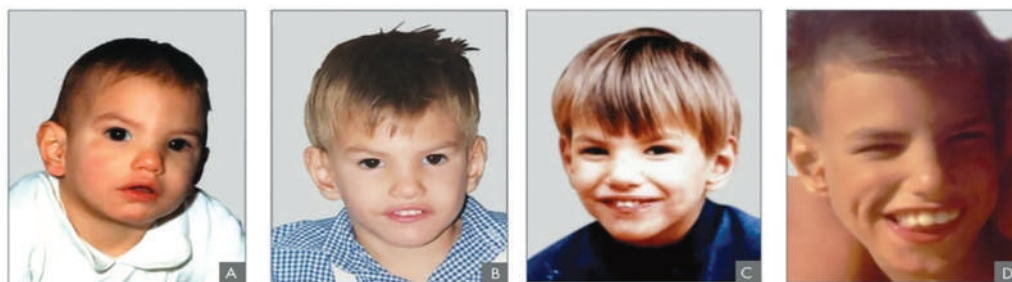


Рисунок 9.10. (фотографии). Синдром Лежена

Синдром cri-du-chat, по-видимому, является одним из наиболее распространенных синдромов делеции хромосом у человека, причем заболеваемость варьируется от 1 на 20 000 до 1 на 50 000 родов [Niebuhr, 1978]. Частота в популяции пациентов с глубокой задержкой (IQ менее 20) составляет приблизительно 1% [Niebuhr, 1978].

\*Гольденхара синдром – это наследственное заболевание окулоаурикуловертебральной области, то есть поражение структур, исходящих из первой и второй жаберных дуг. Оно было описано в 1952 году американским врачом Гольденхаром. Это наследственное заболевание человека, при котором чаще всего ярко выражена односторонняя гипоплазия лица, аномальные ушные раковины, веки, зубы, позвоночник и т. д. Связь синдрома Голденхара и синдрома кошачьего крика у этого пациента показала, что локус хромосомы 5p14 может содержать ген, связанный с синдромом Голденхара.

### Молекулярная генетика

Overhauser et al. (1994) анализировали контрольные точки делеций 5p у 49 индивидуумов, используя гибриды соматических клеток. Они использовали 5p-специфические ДНК-зонды для однозначного установления большинства хромосомных точек разрыва, путем гибридизации с гибридной ДНК соматических клеток. Сравнения между делециями, присутствующими у пациентов, и клиническими особенностями выявили несколько хромосомных областей, которые участвовали в конкретных клинических проявлениях. Критическая область хромосом, вовлеченная в высокий крик, нанесена на проксимальный участок 5p15.3 (зонд D5S727), в то время как хромосомная область, участвующая в остальных особенностях синдрома, картирована в небольшом участке в центре 5p15.2 (зонд D5S721). По оценкам, эта последняя область составляет около 2 МБ.

Cerruti Mainardi et al. (2001) изучали 80 пациентов с синдромом кошачьего крика. Шестьдесят два имели 5p-терминальную делецию с точками разрывов от p13 до p15.2. У семи пациентов была 5p интерстициальная делеция; 4 имел транслокацию *de novo*, а 3 - семейную транслокацию. У трех была аномалия *de novo* 5p с участием 2 перегруппированных клеточных линий, а у 1 была 5p-делеция, возникшая из-за отцовской инверсии. Cerruti Mainardi et al. (2001) идентифицировали критический участок на p15.2 для дисморфизма и умственной отсталости и отдельный участок на p15.3 для кошачьего крика, причем эта область ограничена маркерами D5S13 и D5S731. Они также предположили отдельный регион на p15.3 для задержки речи. 62 пациента были разделены на 4 группы в соответствии с размером делеции, выявлена значительная тенденция к повышению степени дисморфизма и задержки развития с увеличением размера делеции. Medina et al. (2000) определили, что ген CTNND2 (CATENIN, DELTA-2) (604275) относится к определенному участку в хромосоме 5p15.2, участвующему в фенотипе умственной отсталости при синдроме *cri-du-chat*. Они охарактеризовали точки разрывов у пациентов с 5p-терминальными делециями в отношении тяжести умственной отсталости и физического расположения гена CTNND2 и обнаружили сильную корреляцию между гемизиготной потерей CTNND2 и тяжелой умственной отсталостью. Medina et al. (2000) пришли к выводу, что эти данные и свойства CTNND2 как белка, специфичного для нейронов, экспрессирующегося в период раннего развития и участвующего в подвижности клеток, подтвердили его роль в умственной отсталости при синдроме *cri-du-chat*, когда он присутствует только в 1 копии.

Ген TERT локализуется в дистальной части хромосомы 5p (а именно, 5p15.33) и является компонентом, ограничивающим скорость активности теломеразы, который необходим для поддержания длины теломер и поддержания пролиферации клеток. Zhang et al. (2003) показали, что удаление аллеля TERT имело место у всех 10 исследованных пациентов с синдромом кошачьего крика. Индукция мРНК TERT в пролиферирующих лимфоцитах, полученных у 5 из 7 пациентов, была ниже, чем у непораженных контрольных лиц. В лимфоцитах пациентов были более короткие теломеры, чем в лимфоцитах у контрольных по возрасту лиц ( $P$  менее 0,0001). Снижение репликативной продолжительности жизни и высокая скорость слияния хромосом наблюдались в культивируемых фибробластах пациентов. Восстановление активности теломеразы посредством

эктопической экспрессии TERT удлиняло теломеры, увеличивало удвоение популяции и предотвращало слияние хромосом. Zhang et al. (2003) предположили, что гаплоне-достаточность при поддержании теломер *in vivo* может быть одним из генетических элементов, способствующих фенотипическим изменениям при синдроме cri-du-chat.

Perfumo et al. (2000) сообщили о 3 детях с мозаичными 5p-перегруппировками, 2 с частичной моносомной клеточной линией и частичной моносомной / трисомной клеточной линией и 1 с двумя различными частичными моносомными клеточными линиями.

Zhang et al. (2005) провели сравнительную геномную гибридизацию, используя сопоставление генотипов ДНК по изменению количества копий ДНК у 94 пациентов с синдромом кошачьего крика, которые были тщательно оценены на наличие характерного крика, задержки речи, лицевого дисморфизма и уровня умственной отсталости. У большинства испытуемых были простые делеции с участием 5p; делеция была терминальной у 67 и интерстициальной у 12.

### **9.5. Болезни хромосомные: аномалии половых хромосом, введение (0451, 0452)**

У человека около 20% беременностей заканчиваются естественным выкидышем в сроки до 12 недель, и в половине таких случаев у эмбрионов можно обнаружить хромосомные аномалии.

Численные нарушения в системе половых хромосом (моносомия и трисомия) не вызывают таких тяжелых последствий, как аутосомные аномалии. Ярко выраженные изменения фенотипа немногочисленны или вообще отсутствуют (например, у женщин с кариотипом 47, XXX). В предварительной диагностике болезней, обусловленных аномалиями половых хромосом, основное значение имеет анамнез: задержка полового развития, нарушение формирования вторичных половых признаков, бесплодие, самопроизвольные аборты. Экспресс-методы цитогенетического анализа (например, определение полового хроматина в соскобе со слизистой щек) не всегда дают надежные результаты. Поэтому при подозрении на аномалию половых хромосом требуется детальное цитогенетическое исследование большого числа клеток. Одна из основных задач такого исследования - исключение мозаицизма при дисгенезии гонад. Наличие у больного с мозаицизмом клона клеток, несущих Y-хромосому, свидетельствует о повышенном риске гонадобластомы. В тех случаях, когда вероятность аномалии половых хромосом высока, но в лимфоцитах аномалия не обнаружена, нужно исследовать клетки других тканей (обычно фибробласты кожи).

В отличие от аутосомной трисомии, трисомия по половым хромосомам относительно слабо влияет на фенотип. Во-первых, в соматических клетках активна лишь одна X-хромосома (остальные почти полностью инактивированы), во-вторых, псевдоаутосомный участок значительно короче любой из аутосом, и в-третьих, число генов на Y-хромосоме мало. Одинарной дозы X-сцепленных генов (в отличие от аутосомных) достаточно для нормального функционирования. Женщины, вследствие инактивации X-хромосомы, функционально гемизиготны по большинству X-сцепленных генов;

мужчины, имея одну X-хромосому, также гемизиготны по X-сцепленным генам, за исключением генов, находящихся в псевдоаутосомном участке X-хромосомы, и нескольких генов, расположенных в прицентромерном районе Y-хромосомы.

Таким образом, лишняя половая хромосома влияет на фенотип, но не настолько, чтобы привести к гибели плода.

Поскольку серьезные анатомические дефекты отсутствуют, кариотип 47,XXY и кариотип 47,XYY у мужчин и кариотип 47,XXX у женщин часто остаются нераспознанными.

Известны случаи мозаицизма 46,XY/47,XXY, при котором проявления синдрома Клайнфельтера смягчены. При наличии большего числа X-хромосом в мужском кариотипе ( кариотип 48,XXXU или кариотип 49,XXXXU ) проявления заболевания, и в том числе умственная отсталость, резко выражены.

Кариотип 47, XYY вызывает менее четкую клиническую картину. Часто наблюдаются высокий рост, поведенческие расстройства и бесплодие, но иногда лишнюю Y-хромосому обнаруживают и у внешне здоровых мужчин.

Редкий кариотип 48,XXYY вызывает бесплодие.

При женском кариотипе 47,XXX патологические проявления отсутствуют, либо выявляются умеренная умственная отсталость, поведенческие расстройства и нарушения менструального цикла.

### 9.5.1. Синдром Клайнфельтера (0329, 0225, 0272)

Синдром Клайнфельтера встречается у 1 из 500 мальчиков. Больные с классическим вариантом синдрома имеют кариотип 47,XXY . Возможны и другие кариотипы, а у 10% больных выявляется мозаицизм 46,XY/47,XXY, встречаются и более редкие кариотипы: 48,XXXU; 49,XXXXU; 48,XXYY; 49,XXXYY . Синдром обычно проявляется в подростковом возрасте как задержка полового развития. Половой член и яички уменьшены, телосложение евнухоидное , имеются гинекомастия и умеренная задержка психического развития. Больные предрасположены к сахарному диабету, заболеваниям щитовидной железы и раку молочной железы. Наличие в кариотипе не менее двух X-хромосом и одной Y-хромосомы - самая распространенная причина первичного гипогонадизма у мужчин.

Примерно у 10% больных с синдромом Клайнфельтера наблюдается мозаицизм 46,XY/47,XXY. Поскольку в формировании фенотипа участвует клон клеток с нормальным кариотипом, больные с мозаицизмом 46,XY/47,XXY могут иметь нормально развитые половые железы и быть фертильными. Добавочная X-хромосома в 60% случаев наследуется от матери, особенно при поздней беременности. Риск наследования отцовской X-хромосомы не зависит от возраста отца.

Для синдрома Клайнфельтера характерен фенотипический полиморфизм. Наиболее частые признаки: высокорослость, непропорционально длинные ноги, евнухоидное телосложение, маленькие яички (длинная ось менее 2 см).

Трисомия по половым хромосомам типа XXY (*синдром Клайнфельтера*) ведёт к развитию у мужчин ряда женских вторичных половых признаков (рисунок 9.11), а так-

же бесплодию и низкому уровню умственного развития. Трисомия типа ХУУ встречается у мужчин с частотой 1 на 1000, но среди заключённых в тюрьмах синдром обнаруживается в 20 раз чаще, что, возможно свидетельствует о большей склонности людей с такими генотипами к преступности, хотя фенотипически они ничем не отличаются от нормальных мужчин.



Рисунок 9.11. Синдром Клайнфельтера

Производные вольфова протока формируются нормально. В детском возрасте нарушения развития яичек незаметны и могут не выявляться даже при биопсии. Эти нарушения обнаруживают в пубертатном периоде и позднее. В типичных случаях при биопсии яичка у взрослых находят гиалиноз извитых семенных канальцев, гиперплазию клеток Лейдига, уменьшение численности или отсутствие клеток Сертоли; сперматогенез отсутствует. Как правило, психическое развитие задерживается, но у взрослых нарушения интеллекта незначительны. Нередко встречаются нарушения поведения, эпилептическая активность на ЭЭГ, эпилептические припадки. Сопутствующие заболевания: рак молочной железы, сахарный диабет, болезни щитовидной железы, хронические обструктивные заболевания легких.

Способы лечения бесплодия при синдроме Клайнфельтера пока не разработаны. Заместительную терапию тестостероном обычно начинают с 11-14 лет; при дефиците андрогенов она существенно ускоряет формирование вторичных половых признаков. У взрослых больных на фоне лечения тестостероном повышается половое влечение. При гинекомастии может потребоваться хирургическое вмешательство. Психотерапия способствует социальной адаптации больных с синдромом Клайнфельтера и больных с другими аномалиями половых хромосом.

Синдром Клайнфельтера (полисомия по X-хромосоме у мужчин -кариотип 47,XXY и другие варианты), предрасполагают к развитию острых миелоидных лейкозов.

### 9.5.2. Синдром Тернера

Единственный известный случай моносомии у человека - X0 (присутствует только одна X-хромосома) известен как *синдром Тернера* (рисунок 9.12).

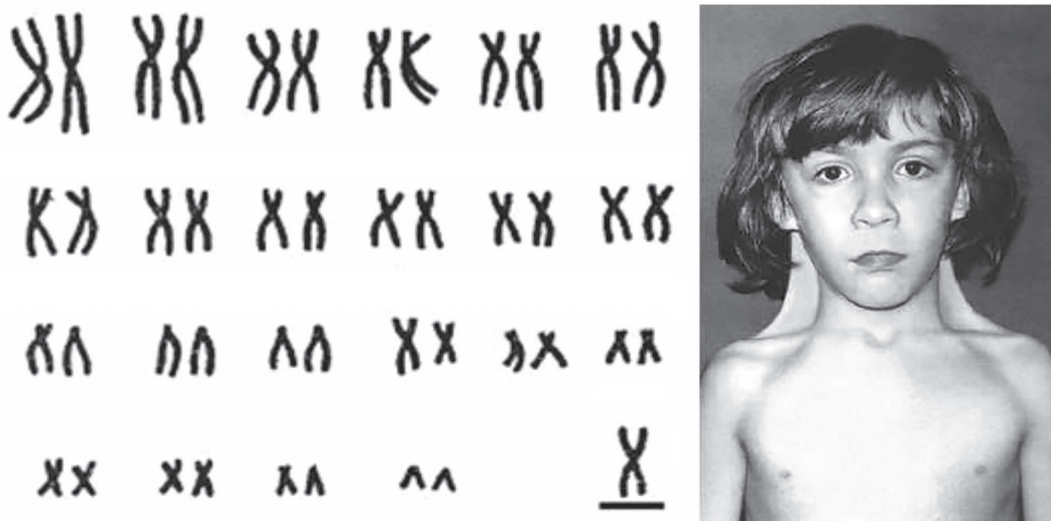


Рисунок 9.12. Синдром Тернера

Потеря Y- или второй X-хромосомы существенно нарушают развитие организма. Если это не приводит к самопроизвольному аборту, то у новорожденных (всегда - девочек) выявляют кожные складки на шее и отеки на руках и отеки на ногах как в сочетании с нарушением функции сердечно-сосудистой системы и почек, так и без них. С возрастом развиваются и другие проявления синдрома Тернера : низкорослость, дисгенезия внешних женских половых органов, дисгенезия внутренних женских половых органов, отсутствие половых клеток в гонадах (тяжевидные гонады), различные почечные аномалии, сердечно-сосудистые аномалии, скелетные аномалии и эктодермальные аномалии. Синдром Тернера может возникать и при других кариотипах.

Страдающие синдромом Тернера женщины стерильны, имеют атрофированные яичники и слабо развитые вторичные половые признаки.

Мозаицизм и aberrации второй половой хромосомы (Y или X) вызывают ряд нарушений, которые выявляют как по внешним признакам, так и с помощью цитогенетического анализа. Распространенные нарушения X-хромосом и нарушения Y-хромосом - образование изохромосомы (делеция одного плеча и дупликация второго) и частичная или полная делеция одного плеча. При этом все клетки имеют 46 хромосом, но набор половых хромосом состоит из нормальной X-хромосомы и аномальной Y- или X-хромосомы; например, при кариотипе 46,XXp- происходит делеция участка короткого плеча одной из X-хромосом. В других случаях наблюдается мозаицизм, например 45,X/46,XX/46,XXp-. Полная или частичная моносомия популяции клеток по X-хро-

мосоме может проявляться, как синдром Тернера. Однако, если клетки с Y-хромосомами сосуществуют с клетками кариотипа 45,X, например при 45,X/46,XY, то часто формируются наружные половые органы промежуточного типа, а морфология гонад варьирует от тяжевидных гонад до функционирующих яичек ( смешанная дисгенезия гонад ). При наличии клеток только с Y-хромосомой - 45,Y/46,XY - высока вероятность злокачественных новообразований половых желез. При сочетании клеток с кариотипом 46,XX и кариотипом 45,X функция яичников, включая способность к овуляции, в разной степени сохраняется.

**Таким образом, при моносомии по X-хромосоме и абберациях Y- и X- хромосом может быть выявлен практически любой половой фенотип - от мужского до женского, а синдром Тернера занимает промежуточное положение.**

Биохимические признаки. Уровни ЛГ и ФСГ значительно повышены в первые 3-4 года жизни, к 5-8 годам они снижаются до возрастной нормы, а позже вновь возрастают (сначала ФСГ, затем ЛГ). При обследовании по поводу задержки полового развития выявляется именно это повторное повышение.

Другие особенности синдрома. Тяжевидные гонады у больных с кариотипом 45,X или мозаицизмом 45,X/46,XX не подвержены злокачественному перерождению. У больных с мозаицизмом 45,X/46,XY в зачатках половых желез может присутствовать гормонально-активная ткань яичек, поэтому повышен риск гонадобластомы . В таких случаях зачатки половых желез надо удалять. Удаление половых желез показано также больным, у которых при цитогенетическом исследовании Y-хромосома не выявлена, но при молекулярно-генетическом исследовании обнаружен ген SRY, кодирующий фактор развития яичка.

**Дифференциальная диагностика.** Синдром Тернера нужно отличать от смешанной дисгенезии гонад, чистой дисгенезии гонад 46,XX и чистой дисгенезии гонад 46,XY и синдрома Нунан:

- При смешанной дисгенезии гонад с одной стороны выявляется яичко, а с другой - тяжевидная гонада.

- При чистой дисгенезии гонад с двух сторон выявляются тяжевидные гонады, но кариотип нормальный; 46,XX либо 46,XY.

- Синдром Нунан по клинической картине очень близок к синдрому Тернера. В отличие от синдрома Тернера, синдром Нунан встречается у обоих полов. Это моногенное заболевание с аутосомно-доминантным наследованием; при цитогенетическом исследовании аномалии кариотипа не выявляются. У девочек с синдромом Нунан функция яичников, как правило, не нарушена; иногда снижены уровни гонадотропных гормонов.

### **Ведение больных с синдромом Тернера**

Первоочередная задача - детальное обследование больных, особенно девочек младшего возраста. Цель обследования - выявление пороков сердца, расслаивания аорты, аномалий ЖКТ и почек, нарушений слуха. Может потребоваться хирургическое вмешательство. У девочек старшего возраста и у женщин часто встречаются хронический лимфоцитарный тиреоидит, хронические воспалительные заболевания кишечника и артериальная гипертензия; эти заболевания требуют длительного консервативного лече-

ния. Лечение соматропином (иногда в сочетании с анаболическими стероидами) ускоряет рост в детстве и увеличивает рост взрослых больных. Лечение соматропином можно начинать с 2 лет (но только в тех случаях, когда рост девочки меньше 5-го перцентиля). Заместительную терапию низкими дозами эстрогенов начинают, как правило, после ossификации эпифизов (с 14 лет). Если больная тяжело переживает отсутствие пубертатных изменений, эстрогены назначают раньше. Даже при лечении гормонами вторичные половые признаки часто формируются не полностью. Женщины с синдромом Тернера обычно бесплодны, но в редких случаях происходит спонтанная овуляция и может наступить беременность. У некоторых больных появляются менструации и нормализуется уровень гонадотропных гормонов в отсутствие заместительной гормональной терапии. Риск пороков развития у потомства больных повышен. Женщин с синдромом Тернера предупреждают о риске самопроизвольного аборта и преждевременной менопаузы, а при подозрении на беременность предлагают провести пренатальную диагностику.

### Литература

1. «Prevalence and Incidence of Patau syndrome». Diseases Center-Patau Syndrome. Advi-ware Pty Ltd. 2008-02-04. Retrieved 2008-02-17. mean maternal age for this abnormality is about 31 years
2. Andrew Pollack. Illumina Buys Maker of Down Syndrome Test (Dealbook blog) (January 7, 2013). Проверено 8 января 2013.
3. Battaglia A, Carey JC, Cederholm P, Viskochil DH, Brothman AR, Galasso C. Natural history of Wolf-Hirschhorn syndrome: experience with 15 cases. *Pediatrics*. 1999a;103:830–6. [PubMed]
4. Battaglia A, Carey JC, Cederholm P, Viskochil DH, Brothman AR, Galasso C. Storia naturale della sindrome di Wolf-Hirschhorn: esperienza con 15 casi. *Pediatrics*. 1999b;11:236–42.
5. Battaglia A, Carey JC, Viskochil DH, Cederholm P, Opitz JM. Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS): a history in pictures. *Clin Dysmorphol*. 2000;9:25–30.
6. Battaglia A, Carey JC, Wright TJ. Wolf-Hirschhorn (4p-) syndrome. *Adv Pediatr*. 2001;48:75–113.
7. Battaglia A, Carey JC. Seizure and EEG patterns in Wolf-Hirschhorn (4p-) syndrome. *Brain Dev*. 2005;27:362–4. [PubMed]
8. Battaglia A, Filippi T, Carey JC. Update on the clinical features and natural history of Wolf-Hirschhorn (4p-) syndrome: experience with 87 patients and recommendations for routine health supervision. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet*. 2008;148C:246–51.
9. Choong, Y. F., Watts, P., Little, E., Beck, L. Goldenhar and cri-du-chat syndromes: a contiguous gene deletion syndrome? *J. AAPOS* 7: 226-227, 2003.
10. Gersh, M., Goodart, S. A., Pasztor, L. M., Harris, D. J., Weiss, L., Overhauser, J. Evidence for a distinct region causing a cat-like cry in patients with 5p deletions. *Am. J. Hum. Genet*. 56: 1404-1410, 1995.
11. Jiang J., Jing Y., Cost G. J., Chiang J. C., Kolpa H. J., Cotton A. M., Carone D. M., Carone B. R., Shivak D. A., Guschin D. Y., Pearl J. R., Rebar E. J., Byron M., Gregory P. D., Brown C. J., Urnov F. D., Hall L. L., Lawrence J. B. Translating dosage compensation to trisomy 21. (англ.) // *Nature*. — 2013. — Vol. 500, no. 7462. — P. 296—300.
12. Katherine E. Nelson, MD1,2,3; Laura C. Rosella, PhD4,5; Sanjay Mahant, MD2,3,6; et al Original Investigation July 26, 2016 Survival and Surgical Interventions for Children With Trisomy 13 and 18 Astrid Guttman, MDCM2,3,5 Author Affiliations *JAMA*. 2016;316(4):420-428. doi:10.1001/jama.2016.9819
13. Klinefelter H. F. Jr., Reifenstein E. C. Jr., Albright F. Syndrome characterized by gynecomastia, aspermatogenesis without a-Leydigism and increased excretion of follicle-stimulating hormone //



Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. — 1942. — Vol. 2. — P. 615—624.

14. Klinefelter H. F. Klinefelter syndrome: historical background and development // Southern Medical Journal. — 1986. — Vol. 79, № 45. — P. 1089—1093.

15. Ladekarl, S. Combination of Goldenhar syndrome with the cri-du-chat syndrome. Acta Ophthal. (Copenh) 46: 605-610, 1968.

16. Medina, M., Marinescu, R. C., Overhauser, J., Kosik, K. S. Hemizyosity of delta-catenin (CTNND2) is associated with severe mental retardation in cri-du-chat syndrome. Genomics 63: 157-164, 2000.

17. Mole Beth Researchers turn off Down's syndrome genes // Nature. — 2013. — ISSN 1476-4687

18. Niebuhr, E. The cri du chat syndrome: epidemiology, cytogenetics, and clinical features. Hum. Genet. 44: 227-275, 1978.

19. O'Doherty A., Ruf S., Mulligan C., Hildreth V., Errington M. L., Cooke S., Sesay A., Modino S., Vanes L., Hernandez D., Linehan J. M., Sharpe P. T., Brandner S., Bliss T. V., Henderson D. J., Nizetic D., Tybulewicz V. L., Fisher E. M. An aneuploid mouse strain carrying human chromosome 21 with Down syndrome phenotypes. (англ.) // Science (New York, N.Y.). — 2005. — Vol. 309, no. 5743. — P. 2033—2037. —

20. Patau K, Smith DW, Therman E, Inhorn SL, Wagner HP (1960). «Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome». Lancet. 1 (7128): 790–3.

21. Perfumo, C., Cerruti Mainardi, P., Cali, A., Coucourde, G., Zara, F., Cavani, S., Overhauser, J., Dagna Bricarelli, F., Pierluigi, M. The first three mosaic cri du chat syndrome patients with two rearranged cell lines. J. Med. Genet. 37: 967-972, 2000.

22. Stene J., Fischer G., Stene E., Mikkelsen M., Petersen E. (1977) Paternal age effect in Down's syndrome. Annals of Human Genetics 40:299-306

23. Stene J., Stene J. (1977) Statistical methods for detecting a moderate paternal age effect on incidence of disorder when a maternal one is present. Annals of Human Genetics Lond 40:343-353

24. Steve Connor. Scientists 'switch off' Down's syndrome (англ.). iol.co.za (18 July 2013).

25. The Metabolic Basis of Inherited Disease (Stanbury J.B., Wyngaarden N.D., Fredrickson D.S., Goldstein J.L., Brown M.S., Eds.) McGraw-Hill Book Co., N.Y. et a., 1983, Part 1, Chap.1, pp. 12-14.

26. Бочков Н. П. Клиническая генетика. — М.: Медицина, 1997.

27. Мельниченко Г. А., Калининченко С. Ю., Гусакова Д. А. Синдром Клайнфельтера. Практическая Медицина. 2007 Москва

28. Мюнтцинг А. Генетика (пер. с англ.) М., Мир, 1967, гл.39, с.551-558.

29. Тоцкий В. М. Генетика. — Одесса: Астропринт, 2002.

30. Шевченко В. А. Генетика человека. — М. : ВЛАДОС, 2002.

### Контрольные вопросы

1. Какие нарушения относятся к геномным мутациям?
2. Какие типы нарушений относятся к хромосомным aberrациям?
3. Какие аутомсомные трисомии встречаются у новорожденных?
4. Какие признаки характерны для синдрома Дауна?
5. Какие хромосомные нарушения и признаки характерны для синдрома Патау?
6. Как проявляется синдром Эдвардса и какие хромосомные нарушения вызывают синдром Эдвардса?
7. Какие трисомии и моносомии по половым хромосомам известны у человека?
8. Какие признаки и какие нарушения описаны при синдроме Вольфа-Хиршхорна?
9. Какие нарушения хромосом связаны с синдромом «кошачьего крика»?
10. Какие хромосомные нарушения и признаки характерны для синдрома Клайнфельтера?
11. Какие признаки характерны для синдрома Тернера?

---

## ГЛАВА 10

---

### МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ ХРОМОСОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК

#### 10.1. Ана-телофазный метод анализа хромосомных aberrаций

**Ана-телофазный анализ** — генетический тест, основанный на визуальном учёте хромосомных aberrаций (повреждения хромосом) на стадии анафазы и телофазы митотического цикла клетки. Ана-телофазный анализ — простой, экономичный метод, который не требует знания кариотипа и идентификации хромосом. Он позволяет выявить лишь определенные типы хромосомных aberrаций, но его чувствительность вполне достаточна для заключения «мутагенен» или «не мутагенен» фактор. Ана-телофазный анализ является достаточно чувствительным, корректным и удобным на первом этапе экотоксикогенетического исследования [Прохорова И. М., Фомичёва П. Н., Ковалёва М. И.2003].

Ана-телофазный анализ был описан как экспрессный и экономичный генетический тест. Среди наиболее ранних исследований, в которых данный анализ был применен, следует отметить эксперименты на луке (A. Levan). До настоящего времени применяется как основной метод генетического анализа для растительной тест-системы *Allium test*, в которой исследуется влияние различных генотоксикантов на клетки корневых меристем [Jette Rank, 2003; Levan Albert 1938; Fiskesjo G.1985].

Ана-телофазный анализ высокочувствителен при тестах самой разной направленности. Будь то пробы субстратов из окружающей среды (вода, почва, донные отложения) или же вещества антропогенного происхождения, а также излучения различного спектра (как ионизирующие, так и неионизирующие). Кроме того достоинством данного анализа является его универсальность (он применим практически во всех случаях, когда идёт митоз) и простота в приготовлении препаратов, что очень важно при работе с клетками животных [W. Venegas, C. Lasne, R. Lowy, J.-P. Buisson and I. Chouroulinkov 1985]. Ана-телофазный анализ хромосомных aberrаций на клетках лука (*Allium cepa*), рекомендован как инструмент цитомониторинга окружающей среды. Путём измерения генотоксичности, он способствует оценке степени экологического риска от средств бытового и промышленного назначения, постоянно внедряемых и становящихся все более важными в повседневной жизни [Jette Rank, 2003; Калаев В.Н., Карпова С.С.2004].

#### 10.2. Вариация числа копий генов

**Вариация числа копий** (англ. *Copy number variation, CNV*) — вид генетического полиморфизма, к которому относят различия индивидуальных геномов по числу копий хромосомных сегментов размером от 1 тыс. до нескольких млн. пар оснований. CNV возникают в результате несбалансированных хромосомных перестроек, таких как делеции и дупликации. Значительный полиморфизм по CNV у человека стал очевиден после окончания полного секвенирования нескольких геномов. Крупные делеции или дупликации могут быть выявлены при микроскопическом анализе метафазных хромосом, однако, подавляющая часть CNV выявляется при помощи сравнительной геномной гибридизации и при полногеномном SNP-генотипировании.

Результатом вариации может явиться снижение или повышение числа копий определенного гена, и, следовательно, пониженная или повышенная экспрессия продукта гена — белка или некодирующей РНК. Влияние числа копий гена на фенотип было отмечено еще в 1930 годах, в

частности, было показано, что дупликация гена *Var* у дрозофилы вызывает сужение глаз, или «Var-фенотип» [Bridges, C. V., 1936].

Исследование количества копий генов при распространённых заболеваниях позволяет уточнить роль генов, поскольку число их копий ранее почти не учитывалось. Генетические карты, показывающие количество копий генов, могут использоваться для исследования унаследованных вариаций, связанных с передаваемыми из поколения в поколение отклонениями. Построение генетических карт здоровых людей полезно для отсеивания тех вариаций, которые, возникая при хромосомных aberrациях, не вносят вклад в патологические проявления; это позволит сузить круг генов-кандидатов. Наконец, изучение вариаций числа копий позволяет построить более точную геномную карту человека и других организмов. Ученые, исследующие эволюцию геномов, иногда используют знания о различиях в числе генов, сравнивая геномы двух родственных видов, например, человека и шимпанзе [Perry GH, Yang F, Marques-Bonet T. et al., 2008].

### Роль в заболеваниях

Различия в числе копий генов могут обуславливать предрасположенность, либо повышенную устойчивость организма к заболеваниям. Например, повышенное число копий гена *CCL3L1* ассоциировано со сниженной восприимчивостью к ВИЧ [Gonzalez, E. et al. (2005)], а пониженное число копий *FCGR3B* может способствовать развитию системной красной волчанки и иных воспалительных аутоиммунных заболеваний [Aitman T. J. et al. (2006)].

Вариации числа копий могут быть связаны с аутизмом [Sebat, J., et al. (2007); Cook EH, Scherer SW (2008)], трудностями в обучении [Knight, S., et al. (1999)], предрасполагать к развитию шизофрении [Cook EH, Scherer SW (2008); St Clair D (2008)].

*CCL3L1* (C-C motif) ligand 3-like 1 является протеином, который у человека кодируется геном **CCL3L1**. Этот ген является одним из хемокинов кластера генов на длинном плече (q) 17 хромосомы, 11 Кб. Хемокины участвуют в регуляции иммунных и воспалительных процессов. Хемокины привлекают лимфоциты к месту заражения и повреждения. Белок связывается с несколькими хемокиновыми рецепторами, включая хемокин-связывающий протеин 2 (chemokine binding protein 2 - CCBP2 или D6) и рецептор 5 хемокина (chemokine (C-C motif) receptor 5 - CCR5).

**FCGR3B** (Fc fragment of IgG, low affinity IIIb, receptor), также известный как CD16b (Cluster of Differentiation 16b), ген человека, 9 Кб. Мутации и вариации числа копий этого гена могут быть ассоциированы с клиническими случаями гломерулонефритов [Aitman TJ, Dong R, Vyse TJ, et al. (Feb 2006)].

## 10.3. Ломкие сайты хромосом

**Ломкие сайты хромосом**, или **фрагильные сайты** (от англ. *fragile* — ломкий, хрупкий) — участки хромосом человека, склонные к образованию разрывов, которые выявляются при цитогенетическом анализе препаратов метафазных хромосом. Различают *редкие*, или наследуемые, и *обычные*, или конститутивные, ломкие сайты. Ломкие сайты имеются во всех хромосомах человека, в целом их насчитывается около сотни [Durkin S. G., Glover T. W. .2007]. Молекулярная природа этого явления ещё не известна. Ломкие сайты обозначают в соответствии с тем, в каком хромосомном сегменте они находятся, например, ломкий сайт, ассоциированный с синдромом Мартина — Белл, имеет обозначение *fra(X)(q27.3)*. Кроме того, существуют названия для ломких сайтов, утверждаемые комитетом по номенклатуре HUGO. Например, вышеупомянутый ломкий сайт *fra(X)(q27.3)* имеет название FRAXA, что означает «ломкий сайт на хромосоме X в локусе А», причём буква «А» означает, что это был первый описанный ломкий сайт для хромосомы X (рисунок 10.1) [М. Р. Спейчер, С. Е. Антонаракис, А. Г. Мотулски. — 4-е издание].

### Наследуемые сайты ломкости

Явление повышенной ломкости хромосом в определённых сайтах было обнаружено в 70-х годах XX века. При цитогенетическом анализе метафазных хромосом у некоторых индивидов было обнаружено, что в большинстве проанализированных клеток один и тот же участок хромосом имел разрыв или пробел в окрашивании. Частота встречаемости отдельных ломких сайтов в популяции не превышает обычно 5 % [М. Р. Спейчер, С. Е. Антонракис, А. Г. Мотулски]. Для наследуемых ломких сайтов характерно менделевское наследование [Durkin S. G., Glover T. W. .2007]. Выявлению большей части наследуемых ломких сайтов способствует культивирование клеток *in vitro* в среде, обеднённой фолиевой кислотой.

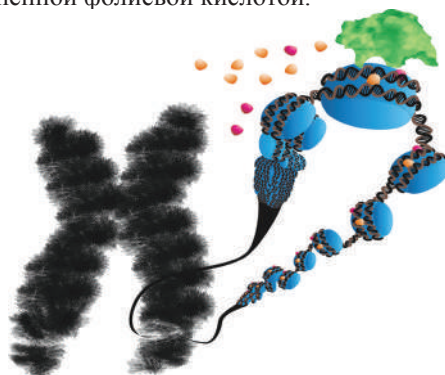


Рисунок 10.1. Схематическое изображение ломкого сайта FRAXA, связанного с синдромом Мартина — Белл

Большинство наследуемых фragильных сайтов не связано с какой-либо клинически значимой патологией, кроме наследуемого сайта ломкости FRAXA, который наблюдается у больных синдромом хрупкой X-хромосомы (Синдром Мартина — Белл). До развития молекулярно-генетических методов диагноз у пациентов с синдромом Мартина — Белл верифицировали по наличию ломкого сайта в локусе Xq27.3 [Oostra B. A. et al.]. Наследуемый фragильный сайт FRAXA находится в 5'-нетранслируемой области гена FMR1 и содержит повтор из триплетов ЦЦГ. Аномальная длина этого повтора у больных вызывает гиперметилирование промотора гена FMR1 и, как следствие, нарушение экспрессии гена [Naumann A. et al. , 2009].

### Конститутивные фragильные сайты

Конститутивные фragильные сайты — это разрывы и пробелы в окрашивании хромосом, которые появляются в определённых хромосомных сайтах в клетках у всех людей при умеренном репликативном стрессе, например, при применении в небольших концентрациях ингибиторов репликации ДНК [Debatisse M. et al. ,2012]. Это гораздо более обширный класс фragильных сайтов по сравнению с наследуемыми сайтами.

Конститутивные фragильные сайты вызывают особый интерес, потому что они являются «горячими точками» для хромосомных перестроек при различных раковых заболеваниях. Наиболее ярким примером является ломкий сайт FRA3B, располагающийся в хромосомном сегменте 3p14.2. Этот ломкий сайт находится в гене-супрессоре опухолевого роста FHIT<sup>[en]</sup>, который часто утрачивается в опухолях различных локализаций, включая раки кишечника, головы-шеи, лёгких и раке молочной железы [Генетика человека по Фогелю и Мотулски]. (*Bis(5'-adenosyl)-triphosphatase also known as fragile histidine triad protein (FHIT) is an enzyme that in humans is encoded by the FHIT gene. This gene, a member of the histidine triad gene family, encodes a diadenosine P1,P 3-bis(5'-adenosyl)-triphosphate adenylohydrolase involved in purine metabolism.*)

Природа явления ломкости хромосом до конца не изучена. Известно, что конститутивные фрагильные сайты обычно ассоциированы с позднореплицирующимся хроматином [Wang L. et al., 1999]. Они нередко находятся в пределах очень длинных генов (около 1 млн пар оснований и более), таких как FHT и WWOX (WW domain-containing oxidoreductase) [Smith D. I. et al., 2006]. Многие обычные сайты ломкости являются тканеспецифичными. Недавние исследования связывают ломкость хромосом с дефицитом сайтов инициации репликации в этих районах. Предполагают, что недостаточность сайтов инициации в конце S-фазы клеточного цикла может приводить к локальной незавершенности процесса репликации при репликативном стрессе и формировании в некоторых случаях двунитевого разрыва ДНК [Letessier A. et al., 2011].

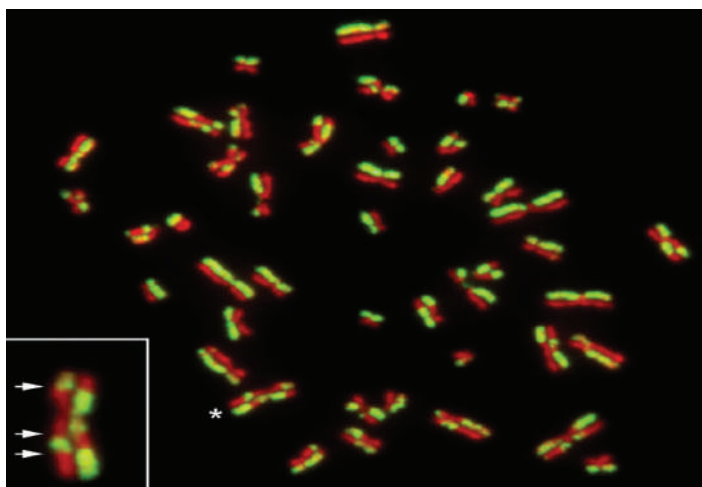
#### 10.4. Сестринский хроматидный обмен

**Сестринский хроматидный обмен (СХО)** — это обмен участками между сестринскими хроматидами одной хромосомы. Процесс обмена происходит во время S-фазы клеточного цикла путём гомологичной рекомбинации между сестринским хроматидами, генетическая информация при этом остаётся неизменной.

Сестринские хроматидные обмены выявляют в метафазах второго клеточного деления после добавления к пролиферирующим клеткам модифицированных нуклеозидов, способных после фосфорилирования встраиваться в ДНК при репликации. В качестве таких нуклеозидов используют, как правило, аналоги тимидина, такие как 5-бромдезоксисуридин или 5-этинилдезоксисуридин.

##### **Дифференциальная окраска сестринских хроматид**

Для получения дифференциальной окраски хроматид клетки культивируют *in vitro* в присутствии бромдезоксисуридина в течение двух клеточных циклов. В результате этого получают хромосомы, у которых тимидин в одной хроматиде замещён бромдезоксисуридином в обеих цепях ДНК, а в сестринской хроматиде — только в одной из цепей. После этого препарат метафазных хромосом, полученный из таких клеток, красят фотосенсибилизирующим флуоресцентным красителем Hoechst 33258 и облучают ультрафиолетовым светом, вследствие чего происходит фотодеградация ДНК [Goto K, Akematsu T, Shimazu H, Sugiyama T., 1975]. Хроматида, в которой тимидин замещен в обеих цепях ДНК, становится неспособной связывать краситель Гимза и остаётся бледной, а хроматида, в которой бромдезоксисуридин присутствует только в одной цепи ДНК, способна окрашиваться как обычный хроматин и станет тёмной при окраске. Полученную окраску называют дифференциальной окраской сестринских хроматид [Коряков Д.Е., Жимулев И.Ф., 2009]. Дифференциальную окраску сестринских хроматид иногда называют *ар-лекиновой* окраской (рисунки 10.2).



**Рисунок 10.2.** Сестринские хроматидные обмены в эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) человека.

Впервые сестринские хроматидные обмены увидел американский генетик Д. Г. Тейлор (*J. Herbert Taylor*) в 1958 году в апикальных клетках корня лилийного растения *Bellevalia romana* [Коряков Д.Е., Жимулев И.Ф., 2009]. В качестве модифицированного аналога тимидина он использовал тимидин, меченый тритием [Taylor JH (May 1958)]. Сестринские хроматидные обмены происходят спонтанно, их средняя частота в лимфоцитах человека в норме составляет 3 — 4 на клетку. Повышение частоты сестринских хроматидных обменов происходит при воздействии факторов, вызывающих репликативный стресс, поперечные сшивки ДНК или блокировку репликационной вилки [David M. Wilson III and Larry H. Thompson., 2007]. Повышенная частота сестринских хроматидных обменов обнаружена в клетках больных синдромом Блума [German J, Schonberg S, Louie, and Chaganti R S., 1977].

### Литература

1. McClintock B. A cytological demonstration of the location of an interchange between two non-homologous chromosomes of *Zea mays*. // Proc Natl Acad Sci USA.. — 1930. — Т. 16, № 12. — С. 791—796.
2. Aitman T. J. et al. (2006). «Copy number polymorphism in *Fcgr3* predisposes to glomerulonephritis in rats and humans». *Nature* 439: 851–855.
3. Ammitzbøll, Christian Gytz (28 November 2012). «Non-Synonymous Polymorphisms in the *FCN1* Gene Determine Ligand-Binding Ability and Serum Levels of M-Ficolin». *PLoS ONE* 7 (11).
4. Bridges, C. B. The Bar 'gene': a duplication. *Science* 83, 210—211 (1936)
5. Chenxing Liu et al. (2012). «MirSNP, a database of polymorphisms altering miRNA target sites, identifies miRNA-related SNPs in GWAS SNPs and eQTLs». *BMC Genomics*.
6. Gonzalez, E. et al. (2005). «The Influence of *CCL3L1* Gene-Containing Segmental Duplications on HIV-1/AIDS Susceptibility». *Science* 307: 1434–1440. DOI:10.1126/science.1101160. PMID 15637236.
7. Goto K, Akematsu T, Shimazu H, Sugiyama T. Simple differential Giemsa staining of sister chromatids after treatment with photosensitive dyes and exposure to light and the mechanism of staining. *Chromosoma*, 1975; 53(3):223-230. PMID 53133
8. IAEA, Cytogenetic analysis for radiation dose assessment, a manual, Technical Report Series No. 405. International Atomic Energy Agency 2001, Vienna, Austria; <http://www-pub.iaea.org/books/>

iaeabooks/6303/Cytogenetic-Analysis-for-Radiation-Dose-Assessment-A-Manual

9. Iafrate A, et al. (2004). «Detection of large-scale variation in the human genome». *Nature Genetics* 36: 949-51: 949. DOI:10.1038/ng1416. PMID 15286789.

10. J.T. Den Dunnen (2008). «Recommendations for the description of sequence variants». *Human Genome Variation Society*.

11. Jette Rank The method of Allium anaphase–telophase chromosome aberration assay // *Ekologija*. — Vilnius, 2003. — Т. 1. — С. 38-42.

12. Letessier A. et al. Cell-type-specific replication initiation programs set fragility of the FRA3B fragile site // *Nature*. — 2011. — V. 470. — №. 7332. — P. 120-123.

13. Michael Cariaso (2007). «SNPedia: A Wiki for Personal Genomics». *Bio-IT World*.

14. Michael Cariaso and Greg Lennon (2011). «SNPedia: a wiki supporting personal genome annotation, interpretation and analysis». *Nucleic Acids Research*.

15. Naumann A. et al. A Distinct DNA-Methylation Boundary in the 5'-Upstream Sequence of the FMR1 Promoter Binds Nuclear Proteins and Is Lost in Fragile X Syndrome (англ.) // *The American Journal of Human Genetics*. — 2009. — Vol. 85, no. 5. — P. 606-616.

16. Sax K. Chromosome aberrations induced by X-rays // *Genetics*. — 1938. — Vol. 23. — No. 5. — P. 494—516.

17. Sebat J, et al. (2004). «Large-scale copy number polymorphism in the human genome». *Science* 305: 525–528.

18. Генетика человека по Фогелю и Мотулски / М. Р. Спейчер, С. Е. Антонаракис, А. Г. Мотулски. — 4-е издание. — СПб: Н-Л. — С. 138-139. — 1056 с. — ISBN 978-5-94869-167-1.

19. Калаев В.Н., Карпова С.С. Цитогенетический мониторинг: методы оценки загрязнения окружающей среды и состояния генетического аппарата организма. — ВГУ, 2004. — 80 с.

20. Коряков Д.Е., Жимулев И.Ф. Хромосомы. Структура и функции. — Новосибирск: Из-во СО РАН, 2009. — 258 с. — ISBN 978-5-7692-1045-7.

21. Прохорова И. М., Фомичёва П. Н., Ковалёва М. И. Оценка митотоксического и мутагенного действия факторов окружающей среды // *ЯрГУ : Методические указания*. — Ярославль: ЯрГУ, 2003. — С. 23,26.

22. Цитология и генетика мейоза / В. В. Хвостова, Ю. Ф. Богданов. — М.: Наука, 1975. — С. 232—262. — 432 с.

### Контрольные вопросы

1. Какие методы применяют для оценки загрязнения окружающей среды и состояния генетического аппарата организма?
2. Как выявляются вариации числа копий генов и фрагментов ДНК?
3. Какие методы позволяют выявить сестринские хроматидные обмены ?
4. Как выявляются ломкие сайты хромосом?
5. Как получается дифференциальная окраска сестринских хроматид?

---

## ГЛАВА 11

---

### ГЕННЫЕ МУТАЦИИ

#### 11.1. Роль химических соединений в развитии мутаций. Химия и мутации генов

Широкое изучение химического мутагенеза началось после того, как в 1942 г. Шарлотта Ауэрбах и Дж. Робсон обнаружили в опытах на дрозофиле мощное мутагенное действие иприта и его производных. В 1946 г. советский генетик И.А. Рапопорт выявил такие же свойства у этиленimina и формальдегида. С тех пор было обнаружено множество химических соединений, способных вызывать в ДНК разного рода нарушения:

- 1) ковалентные сшивки двух близко расположенных оснований;
- 2) ковалентное связывание азотистых оснований с алифатическими и ароматическими радикалами;
- 3) химические перестройки азотистых оснований (дезаминирование, нарушение кольцевой структуры, полная элиминация);
- 4) нарушение сахарофосфатного каркаса полинуклеотида.

В соответствии со **спецификой мутагенной активности** среди химических агентов можно выделить:

- 1) соединения, мутагенные в отношении как реплицирующейся, так и не реплицирующейся ДНК (алкилирующие соединения, окислители-восстановители);
- 2) соединения, мутагенные только в отношении реплицирующейся ДНК (производные пуринов и пиримидинов, акридиновые красители);
- 3) прочие химические, в том числе биогенные мутагены (экзогенная ДНК, вирусы, бактериофаги и др.).

**Алкилирующие агенты**, представляющие собой наиболее обширную группу химических мутагенов - это химические соединения, которые переносят алкильные группы на биологические макромолекулы. Они являются источниками для введения в молекулы реагирующих с ними веществ радикалов (алкильных групп): метила (СН<sub>3</sub>), этила (С<sub>2</sub>Н<sub>5</sub>), пропила (С<sub>3</sub>Н<sub>7</sub>) и т.д. В общем виде процесс **алкилирования**, т.е. замещения атома водорода в молекуле алкильной группой, можно представить формулой X-H->X-R. К алкилирующим агентам относятся несколько гетерогенных классов химических соединений: этиленимины, алкилалкансульфонаты, эпоксиды, многоатомные спирты, производные нитрозомочевины и аминокимидазола и некоторые другие природные и синтезированные химические соединения. Среди алкилирующих агентов, непосредственно взаимодействующих с ДНК, - серный и азотистый иприты, пропиолактон, алкилсульфонаты, алкилнитрозамины и др. Фактически все потенциально нуклеофильные группы азотистых оснований реакционно активны в отношении метилирующих и этилирующих агентов. Возможные участки замещения в ДНК представляют собой: у аденина - атом азота в 1-м, 3-м и 7-м положениях (N-1, N-3, N-7), у гуанина - в тех же трех положениях, у цитозина - атом азота в N-1 и N-3, а у тимина - в N-3. Таким образом,



алкилируются преимущественно свободные атомы азота, которые не включены в формирование водородных связей, расположены близко к фосфатной группе и находятся на внешней стороне в закрученной двуспиральной ДНК.

Основной участок реакции (на его долю может приходиться до 90% общего алкилирования) для многих из перечисленных агентов – атом азота в 7-м положении гуанина. Такое взаимодействие ведет к ослаблению связи между алкилированным азотистым основанием и сахарофосфатным остовом и выпадению пурина из алкилированной ДНК (возникает апуриновая брешь).

На место выпавшего **пурина** в образовавшийся апуриновый сайт может встроиться какое-либо другое основание, что ведет к возникновению транзаций (GC–AT) –основного типа изменений, лежащих в основе мутаций под действием алкилирующих агентов. Кроме того, в результате ошибок генетической репарации могут возникать мутации типа транзаций AT - GC, трансверсий и сдвига рамки считывания.

## 11.2. Генные мутации. Характеристика генных мутаций

**Генные (точковые) мутации** - это изменения числа и/или последовательности нуклеотидов в структуре ДНК (вставки, выпадения, перемещения, замещения нуклеотидов) в пределах отдельных генов, приводящие к изменению количества или качества соответствующих белковых продуктов.

Замены оснований приводят к появлению трех **типов мутантных кодонов**: с измененным смыслом (миссенс-мутации), с неизменным смыслом (нейтральные мутации) и бессмысленных, или терминирующих кодонов (нонсенс-мутации).

**В результате миссенс-мутации** в кодируемом данным геном полипептиде одна аминокислота замещается на другую, поэтому фенотипическое проявление мутации зависит от функциональной значимости затронутого домена. Так замены аминокислот в активных центрах белков могут сопровождаться полной потерей их функциональной активности. К примеру, миссенс-мутация в 553-м кодоне гена FAS, приводящая к замене лейцина на пролин, делает продукт этого гена неспособным комплементировать функциональный дефект в клетках больных анемией Фанкони.

Не всякая замена **аминокислоты** отразится на функциональной активности белка, вследствие чего происшедшая мутация может остаться не выявленной. Этим объясняется факт отмечаемого несовпадения частоты мутаций в определенном гене и встречаемости мутантов по нему. Кроме того, в силу вырожденности генетического кода, не всякая замена основания приведет к миссенс-мутации, возможно, она окажется нейтральной.

В результате **нонсенс мутации кодон**, определяющий какую-либо аминокислоту, превращается в один из стоп-кодонов, не транслирующихся на рибосомах (UAA UAG, UGA). Появление такого кодона не в конце структурного гена, а внутри него, приводит к преждевременной терминации трансляции и обрыву полипептидной цепи. Нонсенс-мутации обладают наибольшим повреждающим действием, так как образующиеся при преждевременной терминации трансляции белки не способны к модификации, часто не защищены от действия протеолитических ферментов и быстро деградируют.

Вставки, перемещения или выпадения отдельных оснований или их коротких **последовательностей в пределах** гена вызывают сдвиг рамки считывания. Природа таких мутаций была изучена при анализе аминокислотной последовательности белков фага Т4, кодируемых геном дикого типа  $e^+$  и тремя разными мутантными генами  $e$ , содержащими взаимно супрессирующие фреймшифт (сдвигающие рамку считывания)-мутации. Оказалось, что некоторые единичные мутации являются следствием одновременных изменений нескольких соседних нуклеотидов. И, скорее всего, единичная мутация со сдвигом рамки возникает в результате вставки двух соседних нуклеотидов, а не одного. При возникновении мутаций со сдвигом рамки считывания меняются все триплеты ниже сайта дубликации или делеции по ходу считывания, при этом повышается вероятность возникновения стоп-кодонов и, соответственно, терминации трансляции.

С точки зрения **структурно-функциональной организации генов**, происходящие внутри них замены, вставки, выпадения, перемещения нуклеотидов можно объединить в следующие группы:

#### 1) мутации в регуляторных областях генов

мутации в промоторной части (например, регуляторном элементе с последовательностью PuPuCCC и внутри ТАТА-бокса у гена р-глобина) снижают уровень синтеза белкового продукта;

мутации в сайте полиаденилирования снижают уровень транскрипции (характерно для афроамериканцев, страдающих талассемией. Таким образом, мутации в регуляторных 5' и 3'-нетранслируемых областях генов вызывают количественные изменения соответствующих продуктов и проявляются фенотипически (клинически) в зависимости от порогового уровня белков, при котором их функция еще сохраняется;

#### 2) мутации в кодирующих областях генов

мутации в экзонах могут приводить к преждевременному окончанию белкового синтеза.

Именно это происходит, к примеру, в случае  $\alpha$ -талассемии: в результате мутаций внутри экзона гена гемоглобина белковая цепь оказывается укороченной и не обладает активностью. Мутации в интронах способны генерировать новые сайты сплайсинга, которые, конкурируя с нормальными (исходными), в итоге, заменяют их. Возникновение замен в гене гемоглобина, замедляющих сплайсинг, известно и для  $V0$ -, и для  $V+$ -талассемии. Мутации в сайтах сплайсинга (на стыках экзонов и нитронов), нарушают процессинг первичного РНК-транскрипта и приводят к трансляции бессмысленных белков: удлиненного при неправильном вырезании интронов либо укороченного при вырезании экзонов. Так, в результате одиночных замен в донорском участке сплайсинга гена гемоглобина процессинг нарушается, что приводит к развитию  $V0$ - или  $V+$ -талассемии. А мутация сдвига рамки считывания в акцепторном участке сплайсинга гена ХРА приводит к полной инактивации белка и, как следствие, к развитию тяжелой формы пигментной ксеродермы.

Замены нуклеотидов в кодирующих областях генов, не сопровождающиеся заменами аминокислот в силу вырожденности генетического кода, приводят к нейтральным мутациям, не оказывающим заметного влияния ни на функцию соответствующего белка, ни на его структуру.

### 11.3. Генные мутации. Генные болезни

Генные мутации - это изменения структуры отдельных генов путём вставки, выпадения, замены или изменения пары нуклеотидов. Наименьший участок молекулы ДНК, изменение которого приводит к мутации, называется **мутоном** (название «мутон» предложено Бензером в 1957 году). Мутон представляет собой пару нуклеотидов.

*Образование генной мутации происходит в два этапа.* На первом этапе изменение затрагивает лишь одну цепь молекулы ДНК (**потенциальная мутация**). С изменением гомологичного участка (например, комплементарного нуклеотида) во второй цепи возникает **истинная мутация**. Она может возникнуть только в ходе ближайшего цикла редупликации ДНК, например, в ходе интерфазы клеточного цикла.

*Генные мутации бывают спонтанными (самопроизвольными) - происходящими вне прямой связи с физическим или химическим факторами внешней среды и индуцированными (искусственно вызванными воздействием на организм факторов известной природы).* Спонтанные мутации возникают, например, как ошибки при воспроизведении генетического материала (редупликация ДНК, синтез иРНК). Их частота выше у организмов с коротким жизненным циклом, и, наоборот, ниже у организмов с длинным жизненным циклом.

Фактор, индуцирующий мутации, называется **мутагеном**. К физическим мутагенам относятся все виды ионизирующих излучений (гамма- и рентгеновские лучи, протоны, нейтроны и др.), ультрафиолетовое излучение, высокие и низкие температуры.

*Химическими мутагенами* являются алкилирующие соединения, алкалоиды, некоторые биополимеры (чужеродные ДНК и РНК), вещества, используемые в сельском хозяйстве (гидразид малеиновой кислоты), в медицине (нитрофураны), в различных производствах (формальдегид, гидроксилламин, бисульфит натрия и др.).

К биологическим мутагенам относятся вирусы, бактерии, простейшие, гельминты, а также продукты их жизнедеятельности. Наряду с указанными выделяют ещё *супермутагены*, повышающие частоту мутаций в сотни и более раз (нитрозопроизводные мочевины и др.).

По влиянию на жизнедеятельность организма мутации подразделяют на летальные, полумлетальные, нейтральные и благоприятные. Большинство мутаций либо вредны для организма, либо вызывают его гибель. Различают **летальные мутации**, обладатели которых погибают, как правило, в эмбриональный период и **полумлетальные (семилетальные) мутации**, вызывающие снижение жизнеспособности и гибель организма до наступления репродуктивного периода. Очень редко генные мутации не изменяют или улучшают те или иные свойства организма. Первые называют **нейтральными**, вторые - **благоприятными мутациями**. Они обычно поставляют материал для эволюционного процесса или используются в селекции.

*Большая часть мутаций является по своей природе рецессивными.* Не проявляясь в фенотипе, они не устраняются в ходе эволюции и накапливаются в генофондах видов в большом количестве. Реже происходят доминантные мутации, проявляющиеся уже в первом поколении.

В качестве примера нейтральных мутаций можно указать генные мутации одного

и того же локуса, приводящие к появлению серии аллельных генов. Так, у мухи-дрозофилы, имеющей в норме красные глаза, появились мутанты с белыми и абрикосовыми глазами, глазами цвета слоновой кости и т.д. Типичной нейтральной генной мутацией является альбинизм у животных.

По месту возникновения мутации подразделяются на **генеративные, происходящие в половых клетках и передающиеся последующим поколениям, и соматические, которые происходят в любых других (неполовых) клетках организма и наследуются только непосредственными потомками этой клетки или всем клоном при вегетативном размножении.** Чем в более ранней стадии развития возникла соматическая мутация, тем большим окажется участок ткани, несущий данную мутацию. *Обладатели соматических мутаций называются мозаиками* (например, люди, у которых цвет одного глаза отличается от цвета другого). Соматические мутации, влияющие на метаболические процессы, являются одной из причин старения организма и развития злокачественных опухолей. Соматические мутации, вероятно, возникают часто и остаются незамеченными, но в некоторых случаях могут образоваться клетки с повышенной скоростью роста и деления. Эти клетки могут дать начало опухолям - либо доброкачественным, которые не оказывают особого влияния на весь организм, либо злокачественным, ведущим к раковым заболеваниям. Типы и характеристики мутаций приведены ниже в таблице 11.1

**Таблица 11.1. Классификация мутаций**

Мутации	Характеристика
1. Спонтанные	Возникают самопроизвольно, без видимых причин
2. Индуцированные	Возникают при действии известных факторов
1. Геномные	Изменение количества хромосом на уровне генома и отдельных хромосом
2. Хромосомные	Изменение структуры хромосом
3. Генные	Изменение структуры гена (ДНК)
1. Доминантные	Проявляются в гетерозиготном состоянии
2. Рецессивные	Проявляются в гомо- и гемизиготном состоянии
1. Прямые	Приводят к изменению фенотипа
2. Обратные	Восстанавливают первоначальный фенотип
1. Ядерные	Возникают в генетическом материале ядра
2. Цитоплазматические	Возникают в генетическом материале, локализующемся в цитоплазме
1. Генеративные	Возникают в половых клетках и передаются следующим поколениям
2. Соматические	Возникают в соматических клетках организма, не наследуются
1. Гиперморфные	Усиливают действия гена, увеличивают количество белка, синтезируемого данным геном
2. Гипоморфные	Ослабляют действие гена, снижают количество белка, синтезируемого данным геном
3. Неоморфные	Мутационный ген синтезирует белок, отличающийся по структуре и функции от первоначального белка
4. Аморфные	Инактивируют действие гена, блокируют синтез кодируемого им белка
5. Антиморфные	Действуют противоположно генам дикого типа

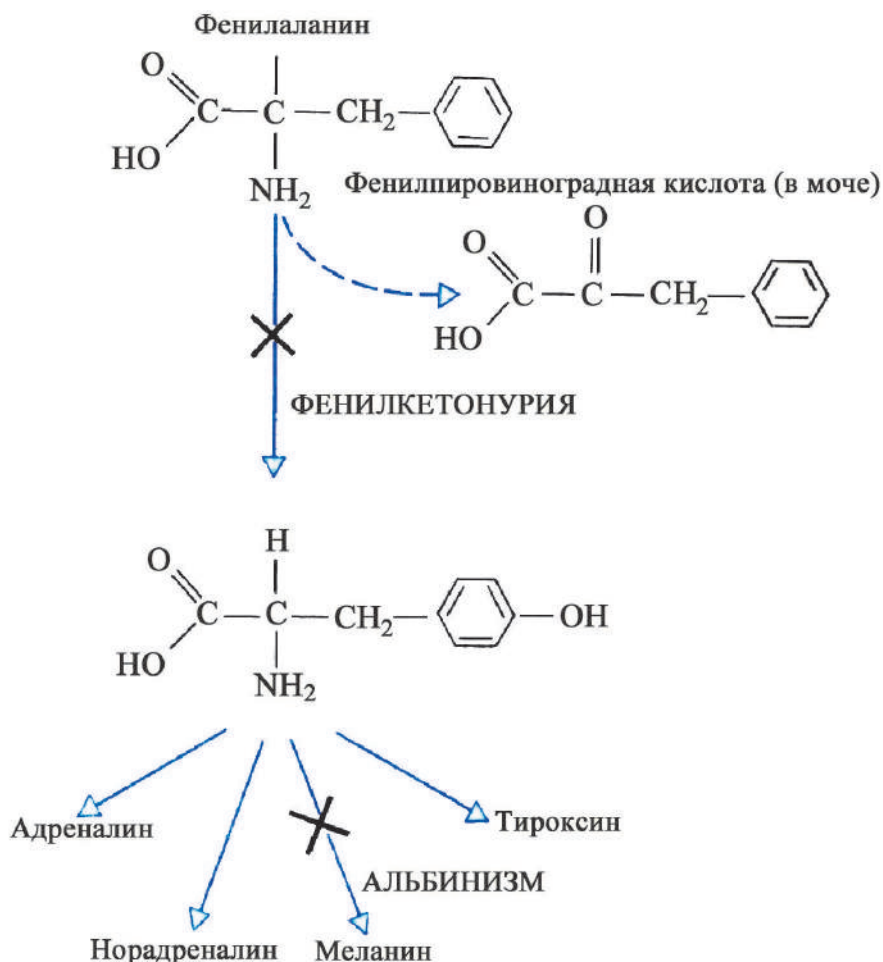
1. Летальные	Приводят к гибели мутанта
2. Полулетальные	Снижают жизнеспособность мутанта
3. Условно летальные	Мутации в одних условиях летальны, в других – не влияют на жизнеспособность
4. Стерильные	Сопровождаются резкими нарушениями репродуктивной функции
5. Нейтральные	Не влияют на жизнеспособность и плодовитость организма
6. Усиливающие	Повышают жизнеспособность и плодовитость особей
1. Морфологические	Влияют на формирование морфологических признаков
2. Физиологические	Влияют на функции тех или иных систем
3. Поведенческие	Влияют на характер поведения
4. Биохимические	Влияют на характер биохимических процессов

Неблагоприятные (летальные и полулетальные) мутации у человека являются причиной самых разнообразных генных болезней и наследственных аномалий. Примерно у 4% новорождённых проявляются симптомы наследственных аномалий, являющихся результатом самых разнообразных мутаций. **Патологические состояния организма, обусловленные генными мутациями, названы генными болезнями.** У человека известно несколько сот генных заболеваний. Некоторые из наследственных аномалий контролируются одной, другие - несколькими парами генов. В проявлении наследственной патологии существенное значение могут иметь гены-модификаторы, комплементарные гены, среда с её климатическими, физическими, биологическими и социальными факторами.

Известно, что мутирование происходит в самых разнообразных направлениях и его результат непредсказуем. Не случайно Ч. Дарвин назвал этот вид изменчивости «неопределённой». Однако это многообразие направлений мутирования подчиняется закономерности, обнаруженной Н.И. Вавиловым (1920) и обобщённой им в виде закона гомологических рядов в наследственной изменчивости: **«Виды и роды, генетически близкие, характеризуются сходными рядами наследственной изменчивости с такой правильностью, что, зная ряд форм в пределах одного вида, можно предвидеть существование параллельных форм у других видов и родов».** Например, у мягкой пшеницы, твёрдой пшеницы и ячменя известны формы с длинными остями, короткими остями, безостные, а также формы со вздутиями вместо остей.

**Сущность генных мутаций заключается в основном в:** 1) замене нуклеотида (А-Т → Т-Т); 2) сдвиге рамки считывания наследственной информации в ходе транскрипции из-за вставки или выпадения нуклеотида.

Среди генных болезней особенно часто встречаются наследственные нарушения процессов обмена веществ. Так, известна мутация, которая ведёт к появлению рецессивного гена, блокирующего образование фермента, способствующего превращению аминокислоты фенилаланина в тирозин. Вместо этого фенилаланин превращается в фенилпировиноградную кислоту, которая накапливается в крови (рисунок 11.1).



**Рисунок 11.1.** Метаболический путь превращения аминокислоты фенилаланина в тирозин, который, в свою очередь, может превращаться в ряд других веществ. Жирные стрелки – катализируемые ферментами этапы данного метаболического пути. Блокированные этапы (перечёркнуты чёрным крестом) – это этапы, на которых соответствующий фермент отсутствует. Здесь показано два таких блокированных этапа: один из них обуславливает фенилкетонурию, а другой - сопряжённый с ней альбинизм

Средняя частота мутирования у живых организмов составляет  $10^{-4}$ - $10^{-6}$  мутации на 1 locus за 1 поколение. Следовательно, в гаплоидном наборе генов человека за поколение может возникать от 1 до 10 новых мутаций. Молекулярные механизмы генных мутаций окончательно не выяснены. Скорее всего, они заключаются в ошибках в ходе внутриклеточных процессов, особенно таких как редупликация и рекомбинация ДНК. В результате развивается *фенилкетонурия*, сопровождающаяся определённой формой умственной отсталости. Однако раннее выявление болезни (методом выявления фенилпировиноградной кислоты в моче путём прикладывания реактивного карандаша к пелёнкам новорождённого) позволяет заблаговременно назначить специальную диету

и, тем самым, предотвратить у детей патологические изменения в нервной и других системах организма.

Мутация гена, контролирующего синтез фермента галактазы (без которого невозможно усвоение молочного сахара – галактозы) приводит к развитию генного заболевания - *галактоземии*. При этом галактоза появляется в крови, ведёт к поражению печени и других органов, вызывает психические нарушения и иные симптомы тяжелого наследственного заболевания. Если же это заболевание удаётся диагностировать сразу после рождения ребёнка и исключить из диеты новорождённого молоко, то можно полностью предотвратить тяжёлые клинические проявления.

Достаточно распространённым является такое генное заболевание как *серповидноклеточная анемия*. Оно контролируется доминантным аллельным геном. Результат мутации заключается в том, что в молекуле  $\beta$ -полипептида (146 аминокислотных остатков) остаток молекулы глутаминовой кислоты заменяется на остаток молекулы валина в 6 положении. Обладатели гена в гомозиготном состоянии отличаются аномальным строением гемоглобина, его меньшей растворимостью и, в связи с этим, выпадением в осадок. Последнее ведёт к деформации и разрушению эритроцитов, следствием чего становится выделение гемоглобина с мочой (гемоглобинурия). Гомозиготы по гену серповидноклеточной анемии погибают в возрасте от 3 месяцев до 2-х лет. В бассейне реки Конго ген, вызывающий серповидноклеточную анемию, встречается у 28, 6% населения. Широко распространён этот ген и в других странах Африки. Находясь в гетерозиготном состоянии, он вызывает серповидность эритроцитов, однако больные серповидноклеточной анемией не заболевают малярией и отличаются большей выживаемостью в очагах тропической малярии.

Различают прямую и непрямую ДНК-диагностику моногенных наследственных болезней.

В генодиагностике используют следующие основные подходы:

- клонирование генов и фрагментов ДНК с помощью методов рекомбинации;
- определение последовательности фрагментов ДНК;
- гибридизацию нуклеиновых кислот;
- идентификацию рестрикционных сайтов;
- амплификацию ДНК с использованием ПЦР;
- транскрипцию ДНК с последующей трансляцией *in vitro* для анализа белкового продукта.

Обычно используется сочетание методов, причем иногда исходным материалом служит не ДНК, а мРНК.

## 11.4. Механизмы генных мутаций. Молекулярный генез генных мутаций

В предыдущем разделе уже говорилось о том, что **генные мутации** могут представлять собой замены оснований, а также их вставки, перемещения или выпадения. Различают два типа замен оснований: 1) **замены пурина** на другой пурин или пиримидина на пиримидин (рисунок 11.2). Их называют транзигциями:  $A = G$ ,  $T = C$  (т. е.

такие замены пар нуклеотидов, которые не изменяют ориентации:  $AT = GC$ ;  $TA = CG$ ); 2) **замены пурина на пиримидин** или пиримидина на пурин называются **трансверсиями**:  $A = T$ ,  $A = C$ ,  $G = C$ ,  $G = T$  (т. е. такие замены пар нуклеотидов, которые изменяют ориентацию:  $AT = TA$ ,  $AT = CG$ ).

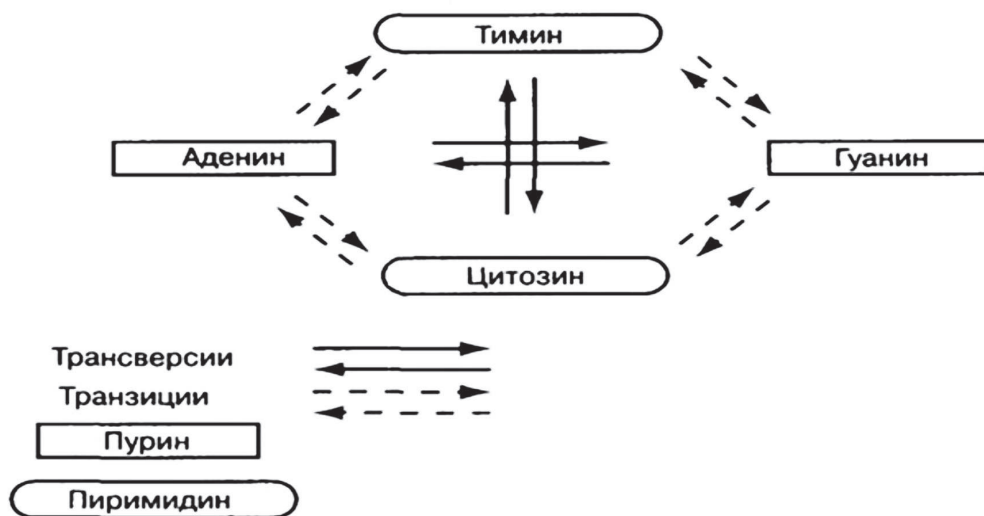


Рисунок. 11.2. Механизм возникновения мутаций на нуклеотидном уровне. Возможны четыре транзиции и восемь трансверсий

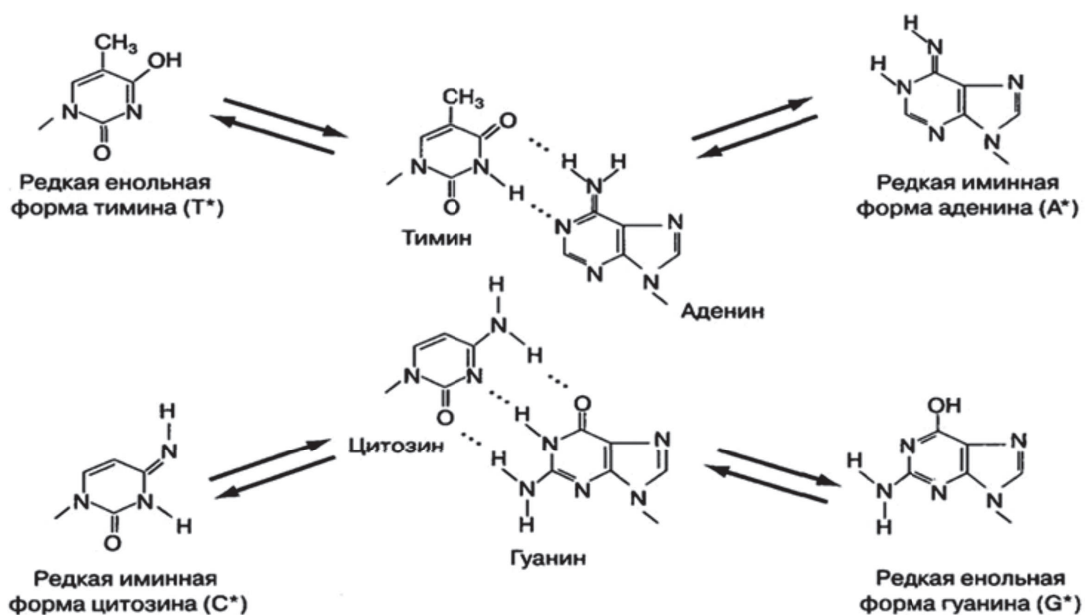
Установлено, что **спонтанные транзиции** могут происходить при репликации ДНК вследствие таутомеризации, изменяющей способность нуклеотидов образовывать водородные связи: аденин приобретает свойства гуанина, гуанин – аденина, цитозин – тимина, тимин – цитозина (рисунок 11.3).

Участие процесса репликации в мутагенезе было установлено при изучении биологических эффектов аналогов оснований ДНК, например, 5-бромурацила, вызывающего мутации у бактериофагов и бактерий. **Ошибка при считывании** связана с тем, что 5-бромурацил включается при репликации на место тимина, а затем спаривается, находясь в редкой енольной форме, с гуанином; в третьем цикле репликации гуанин нормально спаривается с цитозином, завершая транзицию  $AT - CG$ .

Аналогичным образом действует **другой аналог оснований ДНК** - 2-аминопурин. Транзиции строго в направлении  $GC - AT$  можно получить с помощью гидроксилamina, который, специфически реагируя с цитозином, переводит его в форму, способную образовывать водородные связи с аденином.

**Находясь в аминоформе**, 2-аминопурин, подобно аденину, спаривается с тиминном, а в иминоформе - с цитозином. Это приводит к появлению транзиций  $GC - AT$  либо  $AT - GC$ . Кроме прямого действия, аналоги оснований могут увеличивать чувствительность молекул к другим мутагенам (так 5-бромурацил делает ДНК более чувствительной к ультрафиолетовым лучам и ионизирующим излучениям).





**Рисунок 11.3.** Таутомерные формы оснований ДНК (из: Айала и Кайгер, 1988). В центре изображены наиболее распространенные формы, когда аденин образует водородную связь с тиминном, а гуанин - с цитозином. Сравнительно более редкие таутомеры, образующие водородные связи по-другому, указаны стрелками. С\* образует водородную связь с А, G\* - с Т, Т\* - с G, А\* - с С

Появляющиеся в результате алкилирования модифицированные азотистые основания могут быть как химически нестабильными, так и стабильными. В первом случае они подвергаются неферментативному гидролизу с образованием апуриновых и апирииминовых участков. Во втором случае модифицированные основания могут быть удалены N-гликозилазами, что также приводит к образованию апуриновых и апирииминовых участков, которые в дальнейшем репарируются по эксцизионному типу. Оставшиеся нерепарированными стабильные модифицированные азотистые основания обуславливают ошибки считывания генетической информации в ходе репликации и транскрипции (рисунок 11.4). **Алкилирующие** соединения вызывают также поперечные сшивки цепей в молекуле ДНК, приводящие к разрывам хромосом и появлению хромосомных aberrаций. По скорости алкилирования ДНК различают быстро реагирующие сшивающие агенты (например, иприты) и медленно, пролонгированно реагирующие (например, тиофосфамид), при действии которых количество сшивок нарастает с течением времени. Репарация таких тяжелых повреждений ДНК, как внутри- и межмолекулярные сшивки, ингибирующие ее синтез и транскрипцию, также происходит по эксцизионному типу.

Кроме того, под действием **алкилирующих соединений** могут образовываться сшивки ДНК-белок, причем двух типов: сшивки белка с одной молекулой ДНК и соединение двух молекул ДНК с помощью белкового мостика. Помимо названных, не исключена возможность образования в хроматине мостиков белок-белок, затрудняющих контакт

ДНК-полимеразы с матрицей. Уменьшение числа сшивок ДНК-белок при длительном инкубировании клеток после воздействия сшивающих алкилирующих агентов показано на многих объектах, но механизм их репарации не изучен. <http://medicalplanet.su/reabilitatia/>

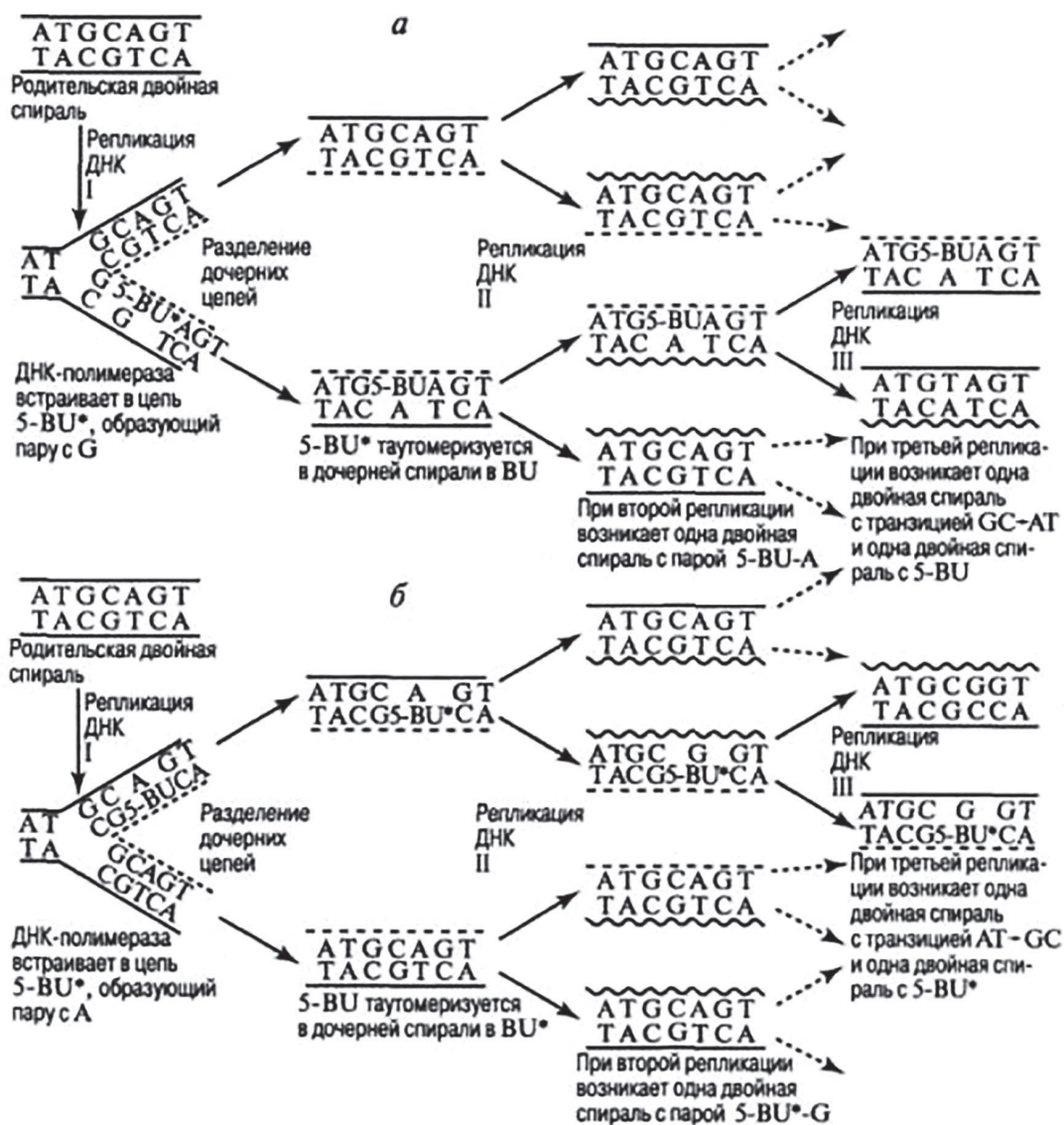


Рисунок 11.4. Индукция транзиций 5-бромурацилом при репликации. (Из: Айала и Кайгер, 1988, а – ошибка включения; б – ошибка считывания)

Из числа **алкилирующих соединений** особо выделяется группа так называемых супермутагенов; нитрозометил-/нитрозоэтилмочевина, диэтилнитрозомочевина, этилметансульфонат, 1, 4-бис-диазоацетилбутан и некоторые другие вещества, проявляющие особенно высокую мутагенную активность. Кроме того, многие алкилирующие

соединения обладают также канцерогенными свойствами, вызывая возникновение злокачественных опухолей, и оказывают тератогенные эффекты.

Окисление органических молекул сопровождается **потерей ими атома водорода**, который при присоединении к другим молекулам вызывает их восстановление. Типичный представитель мутагенов окислительно-восстановительного типа – азотистая кислота, действующая путем окислительного дезаминирования оснований, в состав которых входят аминогруппы (гуанин, аденин, цитозин). Дезаминирование цитозина превращает его в урацил, спаривающийся с аденином (мутация замены пар оснований GC - AT).

**Дезаминирование гуанина** переводит его в ксантин, однако, это не нарушает специфичности спаривания, так как оба они образуют водородные связи с цитозином. Замещение аминогруппы кетогруппой превращает аденин в гипоксантин, который спаривается преимущественно не с тиминном, а с цитозином (мутация замены пар оснований типа AT - GC).

**Поскольку азотистая кислота** индуцирует транзиции в обоих направлениях, вызываемые ею мутации, как уже было сказано выше, способны ревертировать при повторной обработке тем же мутагеном. Помимо замен оснований азотистая кислота индуцирует делеции, что обусловлено ее способностью к поперечному сшиванию молекул ДНК и нарушению закономерностей репликации.

Аналоги оснований, **механизм мутагенного действия** которых уже частично рассматривался нами – это соединения, имеющие кольцевую структуру, сходную с обычными для ДНК азотистыми основаниями, но отличающиеся от них по химическим свойствам (5-бромурацил, 5-бромдезоксимуридин, 5-фтордезоксимуридин, 8-азагуанин, 2-аминопурин, кофеин и др.). Прямой механизм мутагенного действия аналогов оснований связан с их более выраженной по сравнению с нормальными основаниями способностью к таутомерным переходам: из нормальной кетоформы в редкую енольную форму (у пиримидинов) и из нормальной аминоформы в редкую иминоформу (у пуринов).

**Акридиновые красители** (акридин оранжевый, профлавин и др.) индуцируют мутации типа сдвига рамки считывания (рисунок 11.5). Они внедряются между соседними основаниями в ДНК, молекула ДНК растягивается на длину одного нуклеотида, и при последующей репликации напротив внедрившейся молекулы красителя встраивается дополнительный дезоксирибонуклеотид. Другая возможность индукции мутаций типа сдвига рамки считывания связана со встраиванием акридина между основаниями с дальнейшими ошибками синтеза ДНК при рекомбинации и генетической репарации.

Довольно **близкими к химическим мутагенам**, но значительно превосходящими их по специфичности действия являются экзогенные ДНК, а также препараты вирусов и бактериофагов. Мутагенное действие ДНК открыл в 1939 г. СМ. Гершензон. Введение в организм дрожофилы препаратов ДНК, выделенных из разнообразных живых организмов, приводило к формированию множества видимых и летальных перестроек, представленных исключительно генными мутациями и микроделециями (крупные перестройки хромосом практически отсутствовали). При этом виде мутагенеза отмечается высокая локуспецифичность (частота мутаций некоторых генов возрастает на 2-3 порядка), и поэтому спектр индуцируемых действием ДНК мутаций сильно отличается от того, который характерен для воздействия другими мутагенами, а также для факторов спонтанного мутагенеза.

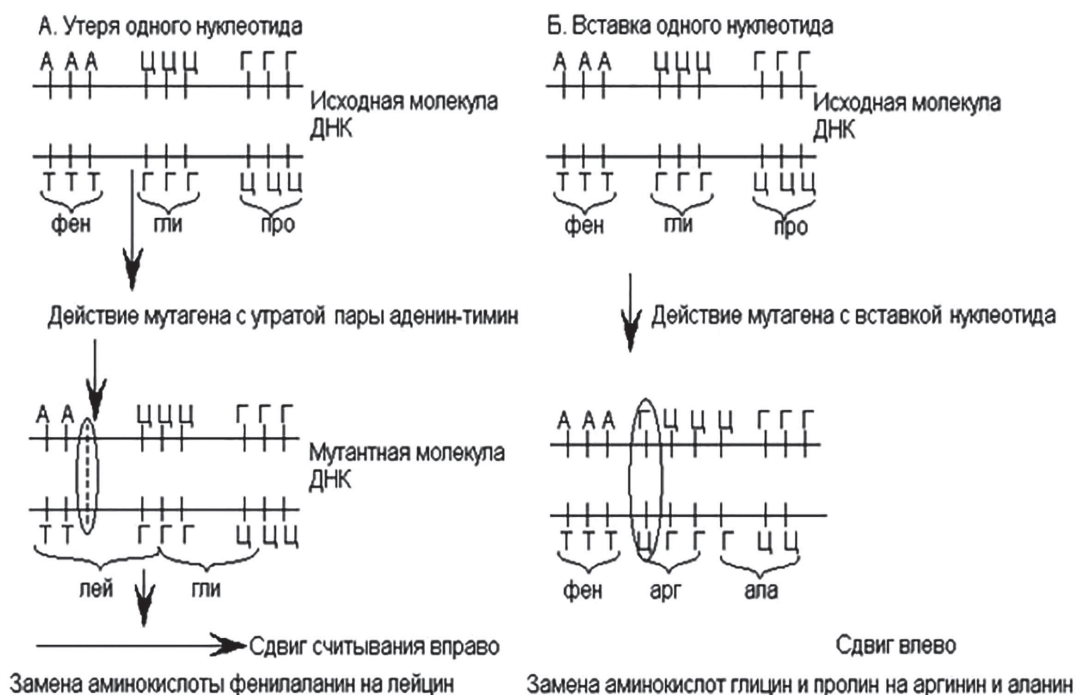


Рисунок 11.5. Мутации со сдвигом рамки считывания

Наконец, **мутагенному действию ДНК** присущ чрезвычайно пролонгированный эффект, не описанный для других мутагенов. Мутации индуцировались не только в потомстве подвергавшихся воздействию чужеродной ДНК дрозофил, но и в нескольких последующих поколениях. Установлено, что мутагенными свойствами обладают некоторые искусственно синтезированные полинуклеотиды, причем характер их действия подобен таковому у природной ДНК.

Суммируя представленные данные, отметим основные **особенности химического мутагенеза**:

- 1) зависимость от дозы и продолжительности обработки;
- 2) более высокая частота генных мутаций по сравнению с хромосомными перестройками;
- 3) задержанный мутагенез (проявление мутации через ряд клеточных поколений);
- 4) региональная специфичность при действии на хромосомном уровне (большая поражаемость гетерохроматина);
- 5) специфичность действия на уровне генов (одни гены мутируют чаще других);
- 6) неаддитивность эффекта при комбинированном воздействии разными мутагенами;
- 7) канцерогенность и тератогенность большинства химических мутагенов. <http://medicalplanet.su/genetica/103.html>

## 11.5. Учет спонтанных мутаций у человека. Техника учета спонтанных мутаций

Для оценки **частоты возникновения мутаций** (скорости мутирования) у человека, необходим подсчет числа так называемых спорадических случаев мутации, когда какой-либо признак или наследственная болезнь возникают у данного индивида *de novo*, т.е. их нет ни у его родителей, ни у других членов семьи. В 1967 г. Курт Браун предложил определять частоту мутаций на популяционной выборке новорожденных по формуле:

*Число спорадических случаев проявления данной аномалии / (2 x Число обследованных индивидов)*

**Наличие коэффициента 2** обусловлено тем, что мутация может возникнуть как в отцовской, так и в материнской хромосоме. Кроме того, в качестве необходимого условия принимается, что все спорадические случаи рождения носителей рассматриваемого признака обусловлены мутациями *de novo*, характеризующимися полной пенетрантностью, и не являются фенотипиями.

Для выполнения этих условий необходим анализ многих **родословных**, причем не содержащих пропусков признака в поколениях. Кроме того, не всегда удается получить данные, свидетельствующие о моногенном характере наследования изучаемого мутантного признака.

**Когда оценка основана** на данных о новорожденных, ее следует считать заниженной, т.к. учтены лишь те мутации, носители которых выживают к моменту рождения. У человека же, равно как и у других млекопитающих, преобладающее большинство геномных и хромосомных мутаций летальны и обуславливают гибель зиготы. Частоты такого типа мутаций оказываются выше при обсчете данных амниоцентеза, проведенного на 16–17 неделе беременности.

Этот, так называемый, **прямой метод** используется в работах по геномным мутациям и структурным aberrациям хромосом, его можно применять и в отношении доминантных генных мутаций. Однако, прямой метод совершенно неприменим в случае рецессивных мутаций, так как они чаще всего возникают в половых клетках индивидов, состоящих в браке с гомозиготными носителями нормального аллеля. Часть их потомков окажутся гомозиготными по нормальному аллелю, а часть гетерозиготными, т.е. будут нести и нормальный, и мутантный аллель. Но надежных методов **для выявления гетерозигот** по различным патологическим генам, к сожалению, пока нет. <http://medicalplanet.su/genetica/105.html>

## 11.6. Мутации: методы обнаружения: общие сведения

В общем случае секвенирование полноразмерной кДНК, или всех экзонов, для генотипирования мутаций у отдельных пациентов достаточно трудоемко, дорого и требует больших затрат времени. Поэтому на практике чаще проводят предварительный отбор более простыми методами амплифицированных, а иногда клонированных фрагментов ДНК, предположительно содержащих мутации, а затем секвенируют только

эти участки ДНК. Методы поиска фрагментов ДНК, предположительно содержащих мутации, основаны на сравнительном анализе мутантных и нормальных последовательностей по целому ряду физических и химических характеристик, которые в значительной степени варьируют в зависимости от типа мутационного повреждения. Следует подчеркнуть, что, независимо от метода детекции мутации и практически независимо от ее природы (замены нуклеотидов, делеции, дупликации и пр.), точные молекулярные характеристики каждой мутации могут быть получены только путем прямого секвенирования. При наличии в амплифицированном фрагменте известных сайтов рестрикции положение мутации может быть предварительно уточнено. Для этого продукты амплификации разрезают соответствующей эндонуклеазой и исследуют более короткие фрагменты.

### 11.6.1. Однонуклеотидный полиморфизм

(ОНП, англ. *Single nucleotide polymorphism, SNP*, произносится как *снуп*) – отличия последовательности ДНК размером в один нуклеотид (А, Т, Г или С) в геноме (или в другой сравниваемой последовательности) представителей одного вида или между гомологичными участками гомологичных хромосом (рисунок 11.6).

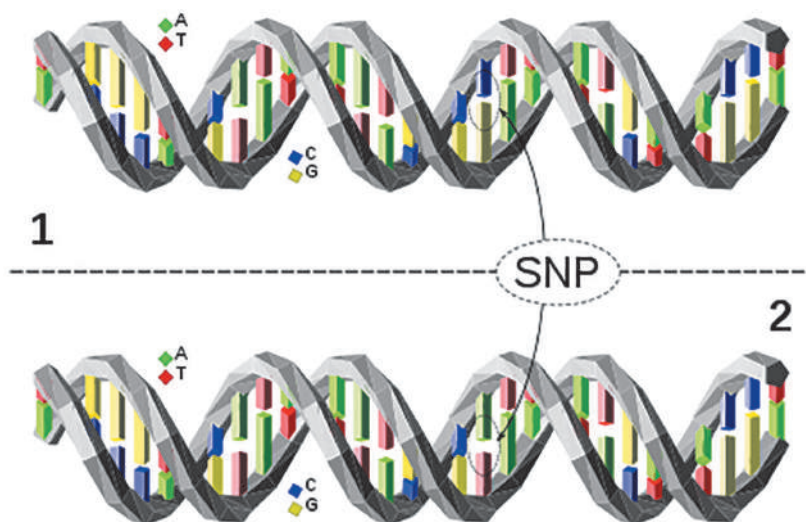


Рисунок 11.6. Однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs) в результате точечных мутаций

Если две последовательности ДНК – AAGCCTA и AAGCTTA – отличаются на один нуклеотид, в таком случае говорят о существовании двух аллелей: С и Т. Однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs) возникают в результате точечных мутаций.

Однонуклеотидный полиморфизм (наряду с полиморфизмом длин рестрикционных фрагментов (англ. RFLP) и ПДАФ (англ. AFLP)) широко используют в качестве молекулярно-генетических меток (маркеров) для построения кладограмм молекулярно-генетической систематики на основе дивергенции (расхождения) гомологич-

ных участков ДНК в филогенезе. В данной области наиболее часто используются спейсеры генов рибосомальной РНК. Ввиду того, что мутации в данных спейсерах не сказываются на структуре конечных продуктов гена (теоретически они не влияют на жизнеспособность), в первом приближении постулируется прямая зависимость между степенью полиморфизма и филогенетическим расстоянием между организмами.

Единой номенклатуры для SNPs нет: часто существуют несколько различных вариантов названия для одного конкретно выбранного SNP, к какому-то согласию в этом вопросе прийти пока не удается. Один из подходов – писать SNPs с префиксом, точкой и знаком «больше чем», показывающим нуклеотид или аминокислоту дикого типа и измененную (например, с.76A>T) [J.T. Den Dunnen (2008)]. Однонуклеотидный полиморфизм встречается в пределах кодирующих последовательностей генов, в некодирующих участках или в участках между генами. SNPs, встречающиеся в кодирующих участках, могут не менять аминокислотную последовательность белка из-за вырожденности генетического кода.

Однонуклеотидные полиморфизмы кодирующих участков бывают двух типов: синонимические и несинонимические. Синонимические SNPs оставляют аминокислотную последовательность белка без изменения, тогда как несинонимические SNPs изменяют её. Несинонимические SNPs можно разделить на missense и nonsense. Однонуклеотидный полиморфизм, встречающийся в некодирующих участках гена, возможно, влияет на генетический сплайсинг, деградацию мРНК, связывание транскрипционных факторов.

Разнообразием последовательностей ДНК у людей, возможно, объясняется то, как у них происходит течение различных заболеваний, реакции в ответ на патогены, прием лекарств, вакцин и т.п. Огромное значение SNPs в биомедицинских исследованиях состоит в том, что их используют для сравнения участков генома между исследуемыми группами (например, одна группа – люди с определенным заболеванием, а вторая – без него) [Carlson et al. (2008)].

Однонуклеотидные полиморфизмы также используют в полногеномном поиске ассоциаций GWAS (Genome-Wide Association Studies) в генетическом картировании как маркеры с высоким разрешением, благодаря их количеству и стабильной наследуемости в ряду поколений. Знание об однонуклеотидном полиморфизме, вероятно, поможет в понимании фармакокинетики и фармакодинамики действия различных лекарств на человека. Широкий спектр заболеваний, такие как рак, инфекционные аутоиммунные заболевания, серповидноклеточная анемия и многие другие, возможно, возникают из-за однонуклеотидного полиморфизма [Ingram et al. (1956)]. Полногеномный поиск ассоциаций [Utkin Lev Vladimirovich, Zhuk Yulia Alexandrovna, 2016] (англ. GWAS, Genome-Wide Association Studies) – направление биологических (как правило, биомедицинских) исследований, связанных с исследованием ассоциаций между геномными вариантами и фенотипическими признаками.

Для SNPs существует большое количество баз данных.

### **Исследование SNPs**

Аналитические методы открытия новых SNP и обнаружения уже известных SNPs включают:

#### **1. Гибридизационные методы**

- Принцип молекулярных маяков (англ. *Molecular Beacons*)

Суть этого принципа в том, что концы пробы (на которых находятся соответственно метка и тушителем флуоресценции) комплементарны друг другу. В результате при температуре отжига праймеров они схлопываются и образуют структуру типа «ручки сковородки» (stem-loop), где зона комплементарности пробы с матрицей находится в петле. При гибридизации пробы с матрицей вторичная структура разрушается, флуоресцентная метка и тушитель расходятся в разные стороны, и флуоресценция от метки может быть детектирована.

- Детекция с помощью микрочипов
- Динамическая аллель-специфическая гибридизация

#### **2. Ферментативные методы**

- Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов
- Методы, основанные на ПЦР
- Удлинение праймеров
- TaqMan пробы
- Лигирование олигонуклеотидов
- Капиллярный электрофорез [Drabovich et al. (2006)]

#### **3. Методы, основанные на физических свойствах ДНК:**

- Одноцепочечный конформационный полиморфизм (SSCP)
- Электрофорез по градиенту температур (TGGE)
- Высокоэффективная жидкостная хроматография в денатурирующих условиях
- Масс-спектрометрия [Griffin et al. (2000)]

**4. секвенирование ДНК** [Altshuler et al. (2000)]. Для картирования SNP на протяжении всего генома сейчас применяют методы секвенирования нового поколения.

#### **Методы прямого секвенирования**

Любые типы мутаций могут быть обнаружены путем прямого секвенирования мутантной кДНК или отдельных экзонов, и часто первичный поиск нарушений в кодирующих областях гена осуществляют именно таким образом. Для некоторых генов, имеющих небольшие размеры, метод прямого секвенирования с успехом применяется как основной метод сканирования мутаций. Так, в частности, особенно удобным оказалось его применение для детекции мутаций в сравнительно небольших по размеру генах, таких, например, как ген фактора IX свертывания крови (гемофилия В).

Использование эктопической мРНК для получения амплифицированных фрагментов кДНК открывает особенно широкие возможности для применения метода прямого секвенирования.

#### **Мутационный анализ: общие сведения**

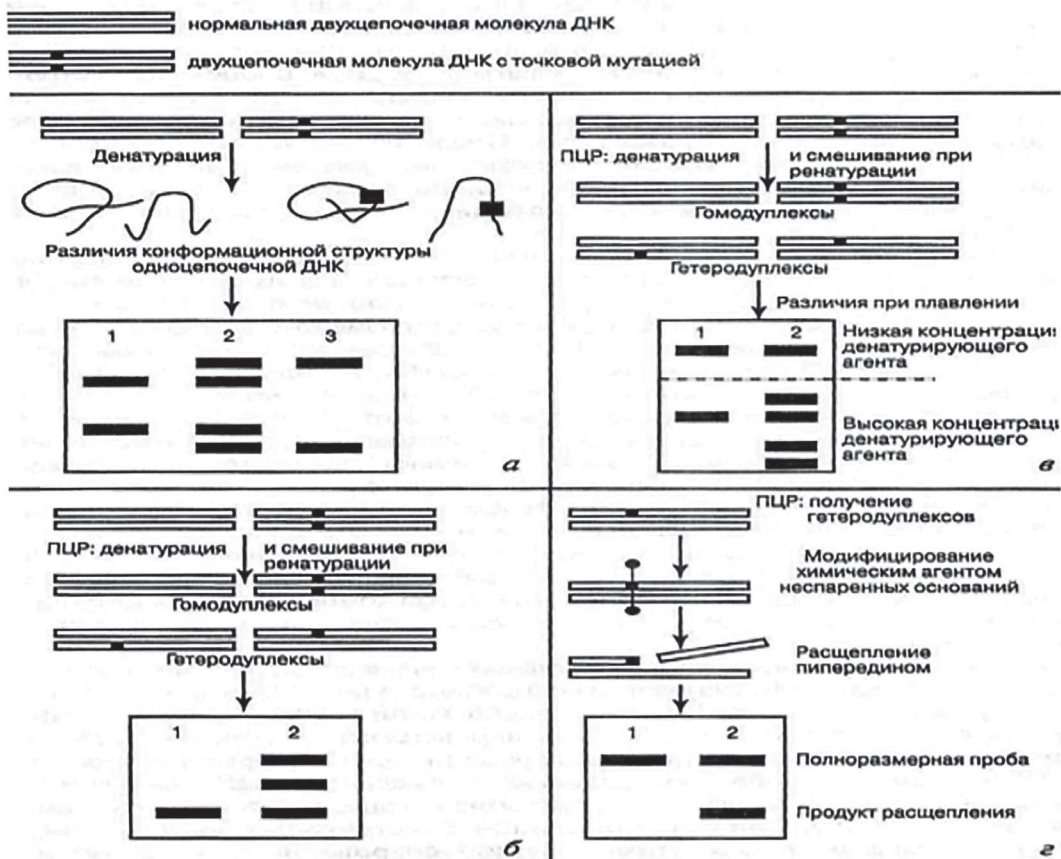
Краткие сведения о методах выявления неизвестных мутаций представлены на рисунках 11.7.-11.8.



Метод	Норма	Мутация	Принцип
Модификация карбодимидом			Коньюгаты карбодимида менее подвижны при электрофорезе в геле или блокируют удлинение праймера
Электрофорез денатурирующем градиентном гене			Мутанты менее подвижны при электрофорезе в геле
Анализ конформационного полиморфизма одноцепочечной ДНК			Мутанты менее подвижны при электрофорезе в геле
Гетеродуплексный анализ			Мутанты менее подвижны при электрофорезе в геле
Ферментативное или химическое расщепление некомлементарных сайтов			Некомплементарные сайты расщепляются
Гибридизация с аллель-специфическим олигонуклеотидным зондом			Олигонуклеотидный зонд не связывается с мутантом
Метод лигирования олигонуклеотидных зондов			на мутанте не происходит лигирования двух олигонуклеотидных зондов
Аллель-специфическая амплификация			При ПЦР мутант не амплифицируется
Метод увеличения праймера на один нуклеотид			На мутанте не происходит удлинения праймера
Создание рестрикционных сайтов			Рестриктаза расщепляет мутант во встроенном сайте

Рисунок 11.7. Методы выявления мутаций (Рисунок 65.9, Harrison).  
Звездочкой обозначено положение мутации.

Поиск неизвестных мутаций и выявление известных мутаций - это разные диагностические задачи. Крупные мутации легче обнаружить.



**Рисунок 11.8.** Принципы и результаты идентификации точковых мутаций различными методами (По: В. Н. Горбунова, В. С. Баранов, 1997) а – SSCP-анализ; б – HA-метод; в – DGGE-метод; г – CMC-метод. Дорожка 1 – образец ДНК нормальной гомозиготы; дорожка 2 – образец ДНК гетерозиготы по точковой мутации; дорожка 3 – образец ДНК гомозиготы по точковой мутации.

Блоттинг по Саузерну и ПЦР позволяют выявить увеличение числа тринуклеотидных повторов, делеции, вставки и другие перестройки ДНК. Если предполагается, что транскрипция мутантного аллеля может быть резко снижена, то сначала подтверждают гетерозиготность по исследуемому экзону с помощью обычных методов анализа полиморфизма, а затем методом ПЦР с обратной транскрипцией анализируют соотношение между мРНК двух аллелей. Такой подход позволяет выявить любую мутацию, существенно снижающую уровень мРНК. Для выявления точечных мутаций нужны методы с более высоким разрешением.

Для выявления неизвестных мутаций лучше всего подходят следующие методы: электрофорез в денатурирующем градиентном геле, модификация карбодимидом,

химическое или ферментативное расщепление некоплементарных сайтов, анализ конформационного полиморфизма одноцепочечной ДНК, гетеродуплексный анализ и определение нуклеотидной последовательности ДНК

Основные характеристики этих методов приведены в таблице. 11.2. ([humbio.ru/humbio/moldiagn/0001b20d.htm](http://humbio.ru/humbio/moldiagn/0001b20d.htm), табл. 4.3 md).

**Таблица 11.2. Преимущества и недостатки различных методов детекции мутаций**

Название	Размер исследуемого участка, тыс.п.о.	Чувствительность	Локализация	Токсичность	Сканирование экзонов	Сканирование мРНК
SSCP	250	80%	Нет	Нет	+++	+
DGGE	600	95%	Нет	Формамид	++	++
CMC	1700	>95%	Да	Да	+	+++
PCR DS	500	>99%	Да	Нет	++	++
HA	300	80%	Нет	Нет	++	+

Примечание. Чувствительность - приблизительный процент мутаций, обнаруживаемых данным методом; локализация - да - означает, что метод дает возможность точной локализации мутации внутри исследуемого фрагмента; +++ - высокая, ++ - средняя, + - ограниченная возможность использования данного метода для указанных целей.

### 11.6.2. Методы Обнаружения Неизвестных Мутаций

ПЦР (Полимеразная цепная реакция)

Прямое секвенирование продуктов ПЦР

Электрофорез продуктов ПЦР в денатурирующем градиентном геле

Методы, основанные на обнаружении ошибочно спаренных нуклеотидов

Метод SSCP

Анализ гетеродуплексов

Метод ПДРФ

#### ПЦР (Полимеразная цепная реакция)

За создание метода ПЦР (полимеразная цепная реакция) Керри Мюллису в 1993 году была присуждена Нобелевская премия.

ПЦР позволяет найти в исследуемом клиническом материале небольшой участок генетической информации (несколько десятков пар нуклеотидов ДНК или РНК) любого организма, содержащийся в следовых количествах среди огромного количества нуклеотидных последовательностей иной природы, и быстро размножить его. По сути дела метод ПЦР имитирует в пробирке естественную репликацию ДНК, только повторяющуюся с огромной скоростью и столько раз, сколько это необходимо исследователю.

В результате такого «тиражирования» за 2-3 часа количество копий фрагмента ДНК увеличивается в геометрической прогрессии, и через 25 циклов амплификации синтезируется  $10^6$  копий фрагмента. Такого количества ДНК достаточно, чтобы визуальнo регистрировать с помощью простых приемов, которые давно используются молекулярными биологами.

Метод амплификации ДНК с помощью ПЦР (полимеразной цепной реакции) оказал революционное влияние на генодиагностику. Для использования метода необходимо знать последовательность нуклеотидов на исследуемом участке ДНК

Исходным материалом для ПЦР служит геномная ДНК или мРНК. В последнем случае из мРНК путем обратной транскрипции получают кДНК, которую затем используют в ПЦР, - так называемый метод ПЦР с обратной транскрипцией.

Метод ПЦР служит основой для дальнейших исследований амплифицированной последовательности:

- расщепления рестриктазами;
- гибридизации с аллель-специфическими олигонуклеотидными зондами;
- определения нуклеотидной последовательности;
- исследования экспрессии *in vitro* с целью поиска мутаций, укорачивающих молекулу белка.

Различные модификации метода применяются для:

- синтеза одноцепочечной ДНК путем изменения соотношения олигонуклеотидных праймеров;
- создания рекомбинантных ДНК;
- исследования мутагенеза клонированной ДНК;
- сравнения экспрессии разных аллелей;
- выявления редких нуклеотидных последовательностей или ДНК возбудителей инфекции.

ПЦР можно провести всего за один день, ее легко автоматизировать, реакция сравнительно недорога и чрезвычайно специфична.

Для определения продукта реакции, как правило, используют хемилюминесценцию.

### **SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)**

SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) - метод анализа конформационного полиморфизма однонитевой ДНК, предложенный М. Орита с соавт. [ Orita M. et al., 1989 ; Glavac D., Dean M., 1993 ], основан на регистрации различий в электрофоретической подвижности однонитевых ДНК, одинаковых по величине, но различающихся вследствие нуклеотидных замен по пространственной организации молекул. Скручивание, или конформация, небольших однонитевых ДНК существенно зависит от их нуклеотидной последовательности, так что замена даже одного основания в молекулах одинакового размера приводит к изменению их пространственной структуры.

Метод включает амплификацию специфических сегментов ДНК размером от 50 до 300 пар оснований, обычно в присутствии меченых dNTP, денатурацию образовавшихся продуктов ПЦР и нативный высокоразрешающий электрофорез в полиакриламидном геле.

Иногда амплификацию проводят без использования метки, но тогда для лучшего разделения ДНК и однозначной идентификации бэндов на электрофореграмме используют специальные гели - Hydrolink либо MDE (AT Biochem, USA), а также более чувствительные по сравнению с бромидом этидия методы окрашивания, такие как окраска нитратом серебра. На процесс конформации оказывают влияние различные внешние

факторы: температура, концентрация акриламида и глицерина в геле, ионная сила буферных растворов [ Glavac D., Dean M., 1993 ]. Оптимальный подбор этих параметров позволяет эффективно разделять амплифицированные фрагменты ДНК, различающиеся даже всего на один нуклеотид.

Конформационный метод выявления точечных мутаций получил широкое распространение благодаря своей простоте и возможности обнаруживать любые типы замен. Эффективность детекции мутаций при размерах амплифицируемого фрагмента менее 200 п.о. составляет 70- 95%, но при длине фрагмента, превышающей 400 п.о., вероятность обнаружения мутаций уменьшается до 50%.

### **DGGE (Denaturation Gradient Gel Electrophoresis) метод**

DGGE (Denaturation Gradient Gel Electrophoresis) - метод денатурирующего градиентного гель-электрофореза - основан на зависимости свойств плавления (или денатурации) небольших двухнитевых молекул ДНК от их нуклеотидной последовательности, а точнее - от соотношения А-Т- и G-С-пар в исследуемых фрагментах [ Майерс Р. и др., 1990 ; Fodde R., Losekoot M., 1994].

Объясняется это тем, что G-С-связь более прочна по сравнению со связью между нуклеотидами А и Т. Подобные различия в динамике плавления могут быть выявлены путем сравнения подвижности нормальных и мутантных двухнитевых фрагментов ДНК при их электрофорезе в денатурирующих условиях (рисунок 11.8)

Градиент денатурации достигается разницей температур, различной концентрацией мочевины или формальдегида в гелях. При этих условиях одинаковые по величине двухнитевые молекулы ДНК, отличающиеся по нуклеотидной последовательности, денатурируют по-разному. Разработан компьютерный алгоритм, позволяющий предсказывать характер плавления в зависимости от нуклеотидной последовательности [ Lerman L.S., Silverstein K., 1987 ].

При электрофорезе амплифицированных двухнитевых фрагментов ДНК в геле с линейно возрастающим градиентом концентраций денатурирующих агентов плавление нитей ДНК происходит в строго специфичной для данной последовательности области, эквивалентной температуре плавления -  $t_m$ , т. е. такой температуре, при которой каждая пара оснований с 50 % вероятностью может соединиться или разойтись. После начала плавления продвижение двухнитевого фрагмента ДНК в геле резко замедляется вследствие сложной пространственной конфигурации молекул, причем эта задержка будет длиться до тех пор, пока не наступит полная денатурация ДНК. В результате происходит разделение фрагментов ДНК, различающихся по нуклеотидному составу. Таким способом удастся идентифицировать лишь около 50% однонуклеотидных замен в фрагментах ДНК длиной от 50 до нескольких сотен нуклеотидов. Связано это с тем, что при прохождении ДНК через гель может начаться частичная денатурация концов молекул еще до достижения оптимальной области плавления. Поэтому мутации, локализованные вблизи концов амплифицированных участков ДНК, оказывают меньшее влияние на процесс плавления и могут не выявляться.

Эффективность обнаружения мутаций с помощью градиентного денатурирующего электрофореза может быть существенно повышена за счет присоединения к концам амплифицированной геномной ДНК синтетических фрагментов GC-нуклеотидов длиной

в несколько десятков пар оснований. Такие монотонные тугоплавкие концы выполняют роль своеобразных зажимов и резко увеличивают шансы обнаружения всех точечных мутаций, независимо от их локализации внутри исследуемого фрагмента ДНК. Эта модификация делает метод очень чувствительным (таблица 11.3, [humbio.ru/humbio/moldiagn/00016cf4.htm](http://humbio.ru/humbio/moldiagn/00016cf4.htm) 4.2 md).

**Таблица 11.3, Примеры обозначения мутаций в гене муковисцидоза (табл. 4.2 md [humbio.ru/humbio/moldiagn/00016cf4.htm](http://humbio.ru/humbio/moldiagn/00016cf4.htm))**

Название	Изменения в нуклеотидах	Позиция	Изменения в аминокислотах	Позиция	Экзон
Миссенс					
D44G	A-G	263	Asp-Gly	44	2
A455E	C-A	1496	Ala-Glu	455	9
S549(A-C)	A-C	1777	Ser-Arg	549	11
S549(T-G)	T-G	1779	Ser-Arg	549	11
Нонсенс					
Q39X	C-T	247	Gln-Stop	39	2
W1282X	G-A	3978	Trp-Stop	1282	20
Вставка, делеция, сдвиг рамки считывания					
delF508	Делеция 3 п.о.	1652-1655	Делеция F	508	10
241delAT	Делеция AT	241	Сдвиг рамки		2
852del22	Делеция 22 п.о.	852	Сдвиг рамки		6а
1154insTC	Вставка TC	1154	Сдвиг рамки		7
Сплайсинг					
621+1G-T	G-T	621+1	5'-сигнал		Интрон 4
622-2A-C	A-C	622-2	3'-сигнал		Интрон 4
3849+10kbC-T	C-T		Ошибочный сплайсинг		Интрон 19
Полиморфизмы					
M/V470	AG	1540	M или G	470	10
1716G/A	GA	1716	Без изменений	528	10
125G/C	GC	125	5'-нетранслируемая область	-	-

В отличие от SSCP, он пригоден для более крупных амплифицированных фрагментов ДНК. При исследовании фрагментов до 600 п.о. эффективность выявления мутаций этим методом достигает 95%. Чаще всего DGGE-метод применяется для скрининга мутаций в амплифицированных экзонах, при этом в качестве матрицы используют геномную ДНК.

Этот метод может быть с успехом применен также для анализа индуцированных мутаций, так как позволяет улавливать точечные мутации, возникшие даже в одной из 100

обработанных мутагеном клеток. К недостаткам метода следует отнести техническую сложность получения равномерного градиента денатурирующего агента в полиакриламидном геле, а также высокую стоимость искусственно синтезированных GC-концов.

### **СМС (Chemical Mismatch Cleavage)**

СМС (Chemical Mismatch Cleavage) - метод химического расщепления некомплементарных сайтов - основан на способности некоторых химических агентов специфически разрывать нить ДНК в месте локализации неспаренного основания (рисунки 11.8). Так, цитозин чувствителен к действию гидроксилamina, а тимин - к действию осмия тетраоксида. Некоторые модификации метода используют чувствительность тимина и гуанина к карбодиимиду. Последующая обработка пиперидином приводит к полному разрыву молекулы ДНК в модифицированном сайте. Выявление мутаций осуществляют с помощью меченых ДНК-зондов, соответствующих, как правило, нормальным вариантам последовательности ДНК. Такими зондами могут быть синтезированные олигонуклеотиды, клонированные последовательности ДНК или ее амплифицированные фрагменты [Cotton R.G.H., 1990 ; Cotton R.G.H., Malcolm A.D.B., 1991].

При проведении исследования эталонную меченую ДНК смешивают с избытком тестируемой ДНК (или РНК). Тестируемыми образцами ДНК могут служить клонированные ДНК, обработанные соответствующими эндонуклеазами, либо амплифицированные фрагменты. Смесь нагревают до полной денатурации двухнитевых молекул и затем охлаждают, чтобы создать условия для образования дуплексов. При наличии мутаций в тестируемых образцах ДНК в гетеродуплексах, возникших в результате гибридизации между однонитевыми молекулами эталонной и тестируемой ДНК, образуются места негомологичного спаривания. После обработки соответствующими химическими агентами идентификация и локализация мутантных сайтов в исследуемых участках ДНК проводится путем электрофореза и радиоавтографии. Появление укороченных фрагментов ДНК на электрофореграмме (а точнее - необычных бэндов в нижней части геля) свидетельствует о наличии мутантного сайта, а определение размера укороченных фрагментов однозначно определяет локализацию этого сайта в исходной тестируемой молекуле ДНК.

Модификации метода СМС позволяют идентифицировать до 95-100% мутаций [Grompe M., 1993 ].

Преимуществами метода являются: возможность исследовать протяженные участки ДНК - до 2 тыс. п.о.; способность одновременно выявить и локализовать несколько мутаций в одном фрагменте ДНК; возможность одновременно использовать несколько ДНК-зондов для поиска мутаций - мультиплексный вариант методики.

К недостаткам можно отнести высокую токсичность используемых химических реактивов, которая может быть ослаблена использованием карбодиимида для идентификации GT- гетеродуплексов.

### **Анализ гетеродуплексов (НА) метод для поиска мутаций**

НА (Heteroduplex analysis) - гетеродуплексный анализ позволяет идентифицировать мутации, находящиеся в компаунде или в гетерозиготном состоянии. У подавляющего большинства пациентов с генными болезнями, наследуемыми по аутосомно-рецессивному типу, мутации в гомологичных хромосомах находятся в компаунде, т. е. в

каждом из гомологичных генов имеются функционально значимые нарушения, но их молекулярная природа и внутригенная локализация различны. Исключение составляют лишь мажорные мутации, частота которых в популяции достигает десятков процентов. Примерами таких мутаций являются дельта-F508 в гене муковисцидоза или мутация R408W в гене фенилкетонурии.

Принцип НА-метода заключается в том, что при амплификации относительно небольших фрагментов генов гетерозигот или гомозиготных компаундов мутация может быть локализована лишь в одной из гомологичных нитей матричной ДНК. Поэтому в амплификационной смеси наряду с двумя типами гомодуплексов образуются гетеродуплексы между нормальной и мутантной цепочками ДНК. Наличие в двухцепочечном фрагменте ДНК неспаренных оснований изменяет конформацию такого гетеродуплекса, что проявляется в изменении электрофоретической подвижности фрагмента при проведении гель-электрофореза (рисунок 11.8).

Гетеродуплексные молекулы ДНК имеют иную электрофоретическую подвижность по сравнению с гомодуплексами (не отличающимися между собой по подвижности) за счет конформационных особенностей в местах несовпадения нуклеотидов (mismatch). Эти различия могут быть обнаружены при электрофорезе в обычном полиакриламидном геле. Метод позволяет находить до 80% мутаций.

Значительно более эффективное разделение гомо- и гетеродуплексов может быть достигнуто при использовании новых вариантов гелей - Hydrolink либо MDE. Вероятность идентификации точечных мутаций этим способом на фрагментах ДНК менее 300 п.о. достигает 80-90%. Детекция мутаций осуществляется как изотопным, так и неизотопными методами [ Grompe M., 1993 ].

### **ПДРФ-анализ (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism) метод**

Наличие сайтов рестрикции в геномной ДНК и их взаимное расположение однозначно определяются последовательностью нуклеотидов исследуемой ДНК, поскольку сам сайт рестрикции - не что иное, как строго определенная последовательность нуклеотидов ДНК, узнаваемая и расщепляемая рестриктазами. Следовательно, любая мутация, изменяющая последовательность нуклеотидов сайта рестрикции, уничтожает этот сайт. Полное расщепление анализируемой геномной ДНК отдельными рестриктазами приводит к образованию определенного набора фрагментов ДНК, число и размеры которых соответствуют расположению сайтов рестрикции. Гибридизация по Саузерну позволяет определять размеры и взаимное расположение рестрикционных фрагментов ДНК после их электрофоретического разделения.

Анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов, так называемый ПДРФ-анализ (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP analysis) включает следующие этапы: выделение геномной ДНК, ее рестрикцию специфической эндонуклеазой, электрофоретическое разделение образующихся фрагментов ДНК и идентификацию фрагментов ДНК, содержащих полиморфный сайт рестрикции, путем блот-гибридизации по Саузерну.

При отсутствии рестрикции в полиморфном сайте на электрофореграммах или радиоавтографах (в зависимости от типа мечения ДНК-зонда) будет выявляться один крупный фрагмент, соответствующий по длине последовательности ДНК между двумя



соседними константными сайтами рестрикции для той же эндонуклеазы. При наличии рестрикции в полиморфном локусе на электрофореграмме будет присутствовать меньший по размерам фрагмент, равный расстоянию между полиморфным сайтом рестрикции и одним из ближайших константных сайтов рестрикции.

Метод ПДРФ широко используется в генетических исследованиях популяций, поскольку наличие в геноме исследуемого организма рестрикционного фрагмента ДНК определенной длины является прекрасным генетическим маркером и одновременно фенотипическим признаком, тесно связанным с генотипом организма. Это позволяет следить за распространением такого маркера в популяциях, передачей его от родителей к потомству при скрещиваниях и использовать для построения генетических карт исследуемых организмов классическими генетическими методами. ПДРФ-маркеры благодаря их четкой принадлежности определенным генетическим локусам не уступают по информативности распространенным биохимическим маркерам и во многих случаях оказываются удобнее сложных фенотипических признаков (таких, как цвет глаз, окраска волос или шерсти, форма цветков и листьев), определяемых многими генными локусами.

### **Методы расщепления гетеродуплексов РНКазой А**

Весьма близким по принципу к СМС-методу является метод расщепления гетеродуплексов РНКазой А. С этой целью создаются условия для образования гетеродуплексов между тестируемой ДНК и комплементарной ей радиоактивно меченой РНК-пробой. При обработке РНКазой А происходит разрезание молекул РНК в местах нарушения спаривания оснований. Места точечных мутаций определяются, как и в случае СМС, по размерам образовавшихся фрагментов после электрофореза и радиоавтографии. Необходимость использования радиоактивно меченой РНК-пробы и возможность детекции только около 50% точечных мутаций лимитируют широкое применение метода [ Grompe M., 1993 ].

### **Асимметричная ПЦР (Однонаправленная ПЦР)**

Разработанные модификации методов ПЦР облегчили секвенирование амплифицированных фрагментов и повысили его эффективность. Предложен вариант асимметричной ПЦР, когда при амплификации концентрация одного из олигопраймеров в несколько десятков раз превосходит концентрацию другого праймера, в результате чего синтезируется преимущественно только одна, нужная для секвенирования цепочка ДНК. Для этой же цели (получения одноцепочечной ДНК) предложено использование магнитных частиц с фиксированным на их поверхности стрептавидином. При этом один из праймеров для проведения ПЦР метится биотином. Затем к продуктам амплификации добавляют магнитные частицы с пришитым стрептавидином. Благодаря прочному связыванию биотин - стрептавидин, меченная биотином последовательность ДНК фиксируется на магнитных частицах. С помощью щелочного лизиса с частиц удаляют вторую немеченую комплементарную последовательность ДНК, которую и используют для секвенирования.

Асимметричная ПЦР (*asymmetric polymerase chain reaction*, греч. *a* – отрицат. частица и *symmetria* – соразмерность, строгая правильность в расположении; греч. *polymeres* – состоящий из многих частей, многообразный; лат. *re-* – приставка, обозначающая повторность действия и *actio* – действие) - вариант ПЦР, при котором концентрация одно-

го из двух праймеров очень низка, и он быстро истощается в ходе реакции. С этого момента синтез ДНК продолжается с одного праймера и нарабатываются одноцепочечные фрагменты ДНК. Асимметричная ПЦР проводится тогда, когда нужно амплифицировать преимущественно одну из цепей исходной ДНК. Используется в некоторых методиках секвенирования ДНК и гибридизационного анализа.

### **GAWTS (genome amplification with transcript sequences) метод**

В одном из вариантов ПЦР амплификацию проводят в присутствии праймеров, несущих сайт узнавания для фермента T7 - РНК-полимеразы. После амплификации в системе *in vitro* проводят транскрипцию амплификата с помощью T7 - РНК-полимеразы, и образовавшуюся одноцепочечную РНК используют для секвенирования - метод GAWTS (genome amplification with transcript sequences).

### **Мутации, изменяющие длину амплифицированных фрагментов: обнаружение**

Наиболее просто обнаруживаются мутации, изменяющие длину амплифицированных фрагментов, так как подобные нарушения легко выявляются при электрофоретическом анализе. Так, протяженные делеции, захватывающие целые экзоны, могут быть выявлены по изменению длины рестрикционных фрагментов, гибридизующихся со специфическими ДНК-зондами. Более простая и эффективная методика выявления таких мутаций в генах, сцепленных с полом, основана на одновременной амплификации различных экзонов, наиболее часто вовлекаемых в подобные перестройки, так называемый мультиплексный вариант ПЦР. Разница в размерах и числе амплифицированных фрагментов позволяет легко идентифицировать такие мутации на электрофореze. Особенно широко этот метод используется для идентификации делеций в гене дистрофина, на долю которых приходится около 60% всех мутаций, приводящих к миодистрофии Дюшенна.

При отсутствии делеций все амплифицированные фрагменты после электрофоретического разделения и окрашивания можно наблюдать в виде отдельных полос. Если в исследуемой ДНК какие-то из экзонов делетированы, будут отсутствовать и соответствующие им полосы на электрофореграмме. Выбирая специфические участки гена для амплификации, можно оценить размер делеции с точностью до отдельных экзонов, а также определить ее внутригенную локализацию.

Метод этот, однако, не обнаруживает подобные делеции, находящиеся в гетерозиготном состоянии или локализованные в аутосомных генах, так как нормальная гомологичная последовательность геномной ДНК может служить матрицей для амплификации любых фрагментов. Данный подход применим к анализу делеций в аутосомных генах только в тех случаях, когда возможно дополнить ПЦР количественной оценкой результатов амплификации, провести так называемую количественную ПЦР.

### **Электрофорез в полиакриламидном или агарозном гелях**

Небольшие делеции и вставки нуклеотидов не приводят к отсутствию амплифицированных фрагментов ДНК, но изменяют их размеры. Эти изменения могут быть зарегистрированы при электрофореze продуктов амплификации в полиакриламидном или агарозном гелях. Именно этот метод используется для детекции наиболее часто встре-

чающейся мутации в гене муковисцидоза - делеций трех нуклеотидов - дельтаF508. После выявления различий между нормальной и мутантной ДНК по длине рестрикционных или амплифицированных фрагментов гена необходимо провести секвенирование необычного фрагмента с целью определения изменений в первичной структуре мутантной ДНК-последовательности по сравнению с нормальной.

**Метод лигирования «по-соседству», метод близкого лигирования (proximity ligation assay, PLA)**[греч. *methodos* – способ познания; лат. *ligo* – связываю] – высокочувствительный метод анализа взаимодействия белков (обычно факторов транскрипции) с ДНК, основанный на лигировании (см. ДНК лигирование) двух олигонуклеотидов, один из которых содержит нуклеотидную последовательность-мишень, а другой связан с антителами (см. Антитела) к белку. Когда происходит взаимодействие белок-ДНК, олигонуклеотид коннектор соединяет эти два олигонуклеотида, а ДНК-лигаза осуществляет их лигирование. Наличие лигированных олигонуклеотидов определяется с помощью полимеразной цепной реакции в режиме настоящего времени (см. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, количественная полимеразная цепная реакция). Метод предложен С. Густавдоттиром с соавт. в 2007 г.

### **Прямое секвенирование продуктов ПЦР**

Прямое секвенирование продуктов ПЦР является эффективным и чувствительным методом выявления мутаций. С помощью прямого секвенирования одноцепочечных и двухцепочечных продуктов ПЦР стандартными методами можно обнаруживать до 99% мутаций при минимальном количестве ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Метод позволяет не только точно локализовать мутацию в исследуемой последовательности нуклеотидов, но и определить ее тип и возможный механизм возникновения с учетом контекста окружающих ее нуклеотидов.

Современные методики позволяют определить последовательность не более чем из 300-400 нуклеотидов, поэтому прямое определение нуклеотидной последовательности информативно только в тех случаях, когда большинство мутаций находятся на одном небольшом участке. Этот метод позволяет выявить новые мутации и редко дает ложноотрицательные результаты. Порой вызывает сложности трактовка впервые обнаруженных миссенс-мутаций, которые могут быть как отражением бессимптомного полиморфизма белков, так и причиной болезни. Последнее особенно вероятно, если в семье наблюдается однозначное соответствие между наличием мутации и симптомами болезни или произошла замена консервативной аминокислоты, особенно в функционально значимой области белка.

### **Количественная ПЦР**

Количественная ПЦР (quantitative PCR, qPCR, ) - количественная ПЦР в режиме реального времени (real-time polymerase chain reaction, quantitative polymerase chain reaction, qPCR).

Количественная ПЦР (греч. *polymeres* – состоящий из многих частей, многообразный; лат. *re-* – приставка, обозначающая повторность действия, и *actio* – действие) - вариант ПЦР, при котором непрерывно регистрируется кинетика реакции, что позволяет количественно оценивать содержание определенных нуклеотидных последовательностей ДНК в сложной смеси молекул.

Первый вариант этого метода был предложен П. Холландом с соавт. в 1991 г. (метод

«TaqMan»). Согласно протоколу в реакционную смесь кроме обычных двух праймеров добавляют олигонуклеотидный зонд, меченный по 5'-концу флуорофором и содержащий в своей центральной или 3'-части глушитель флуоресценции, который отжигается в каждом цикле реакции с центральным участком ампликона(2) между двумя амплифицирующими его праймерами. Сам зонд не используется в качестве праймера, поскольку 3'-концевая гидроксильная группа блокирована ортофосфатом. В ходе реакции термостабильная Taq-полимераза вытесняет зонд из дуплекса, а затем за счет своей 5'-3'-экзонуклеазной активности отщепляет его 5'-концевой нуклеотид, меченный флуорофором. Чем выше концентрация амплифицируемой нуклеотидной последовательности в реакционной смеси, тем меньше требуется количество циклов для того, чтобы интенсивность флуоресценции освободившегося флуорофора в пробе превысила базальный уровень свободного зонда с глушителем. С этого момента (порог числа циклов) появляется возможность наблюдать за кинетикой реального накопления флуорофора в реакционной смеси.

С помощью методов количественной ПЦР обнаруживают качественные изменения в генах: точковые мутации, делеции и вставки. Однако при некоторых наследственных заболеваниях соответствующие симптомы возникают в ответ на изменение дозы определенных генов.

Типичным примером наследственного заболевания, обусловленного изменением числа копий участка хромосомы 21 в геноме человека, является синдром Дауна. Цитогенетически это заболевание может быть диагностировано по трисомии хромосомы 21 или по наличию крупных транслокаций части этой хромосомы на другие, на фоне присутствия двух нормальных хромосом 21. Описаны клинические случаи синдрома Дауна, при которых не происходит видимых изменений кариотипа. Это обусловлено дубликацией небольшого участка хромосомы 21. Выявление таких мутаций невозможно традиционными цитогенетическими методами. Однако с помощью количественной ПЦР определение полуторакратного возрастания дозы соответствующего участка хромосомы 21 становится совершенно реальным.

В молекулярной биологии, **ПЦР в реальном времени** (или *количественная ПЦР*, англ. *Real-time PCR, qPCR, qRT-PCR*) – лабораторный метод, основанный на методе полимеразной цепной реакции, используется для одновременной амплификации и измерения количества данной молекулы ДНК. Метод ПЦР в реальном времени включает в себя одновременно детекцию и количественное определение (измерение непосредственно количества копий, либо измерение копий относительно внесённой ДНК или дополнительных калибровочных генов) специфической последовательности ДНК в образце [VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM (2008)].

Метод использует общие принципы ПЦР. Основное отличие состоит в том, что измеряется количество амплифицированной ДНК в реальном времени после каждого цикла амплификации. Для количественного определения используют два метода – флуоресцентные красители, интеркалирующие в двуцепочечные молекулы ДНК, и модифицированные олигонуклеотиды (ДНК-зонды), которые флуоресцируют после гибридизации с комплементарными участками ДНК.

Часто ПЦР в реальном времени комбинируют с ОТ-ПЦР (обратная транскрипция) для измерения малых количеств мРНК, что позволяет исследователю получать количе-

ственную информацию о содержании данной мРНК в клетке и, соответственно, позволяет судить об уровне экспрессии данного гена в отдельной клетке или ткани [ Nolan T, Hands RE, Bustin SA (2006)].

### Описание метода

Процедура очень похожа на процедуру классической ПЦР, то есть присутствуют все стадии реакции – плавление или денатурация двухцепочечных ДНК при температуре 95°C, отжиг праймеров (температура отжига зависит от используемых праймеров) и элонгация при температуре 72°C, если используется Taq-полимераза. Принцип ПЦР в реальном времени заключается в детекции ПЦР-продукта по мере его накопления. Сегодня это возможно сделать благодаря высокоспецифичным флуоресцентным зондам. Существует два основных подхода генерации света у таких зондов – во время элонгации и отжига, но, в обоих случаях флуоресценция усиливается с каждым новым циклом. Таким образом, сила сигнала говорит о первоначальном количестве интересующей молекулы [Maurizio Provenzano and Simone Mocellin, 2007].

На начальных этапах флуоресценция слабая, так как продукта ещё не очень много, поэтому её трудно отличить от фона. По мере накопления продукта, сигнал растёт сначала экспоненциально, а затем выходит на плато. Выход на плато объясняется нехваткой того или иного компонента реакции – могут закончиться праймеры, нуклеотидилтрифосфаты, метка. Если продукта реакции накопилось слишком много, то лимитирующим фактором может стать фермент, и тогда зависимость количества продукта от цикла станет линейной. Стоит отметить, что в стандартной реакции ПЦР в реальном времени все образцы выйдут на плато и достигнут примерно одного уровня сигнала. Таким образом, конечная точка ничего не скажет о начальном количестве исследуемого образца. С другой стороны, в экспоненциальной фазе можно проследить отличия в скорости роста продукта. Различия в начальном количестве молекул влияют на количество циклов, необходимых для поднятия уровня флуоресценции выше уровня шума [ Mikael Kubist et al., 2006].

Количество циклов, необходимое для того, чтобы флуоресценция достигла порогового уровня (над шумом) называется **СТ-величиной**. Пороговый уровень – не строго определённая величина, может подбираться для каждого случая отдельно.

Однако СТ-величина может зависеть от многих случайных факторов, например чувствительности детектора, качество фильтра и так далее. Поэтому точно начальное количество интересующего продукта померить нельзя. Для решения этой проблемы существуют методы нормировки. Измеряют отношение количеств двух молекул в пробе. Нормируют обычно на продукты генов домашнего хозяйства – таких генов, количество которых в клетке всегда примерно одинаковое (Пример – ген *infA*, кодирующий фактор инициации трансляции у бактерий). Соотношение определяют по следующей формуле:

$$[N_0]_A / [N_0]_B = (1+E)^{(CT_B - CT_A)}$$

Где  $[N_0]_A$  и  $[N_0]_B$  – начальные количества двух образцов,  $CT_B$  и  $CT_A$  – соответствующие СТ-величины, а  $E$  – эффективность ПЦР, которая часто приравнивается к 1 или 0.9 [Mikael Kubist et al., 2006].

## **Разнообразие зондов**

### **Мечение двуцепочечной ДНК**

В данном случае меткой служит химическое соединение, способное интеркалировать в двойную спираль ДНК. Такой зонд меняет свою конформацию при взаимодействии с продуктами ПЦР и становится флуорофором. Детекцию можно проводить в конце каждого цикла, перед стадией денатурации. Примером такой краски может служить широко используемый *syberGreen*.

### **Метка, работающая в фазу элонгации**

Существует другой способ использования зондов, к которым с 5' и 3' концов пришиты флуорофор и его гаситель. Если последовательность зонда не очень длинная, то даже в связанном с ДНК состоянии два химических реагента будут взаимодействовать друг с другом, и не будет испускаться флуоресценция. Во время элонгации ДНК полимеразы, обладающая 5'-3'-экзонуклеазной активностью, по одному нуклеотиду диссоциирует зонд от ДНК-мишени. В результате этого процесса и флуорофор и его гаситель попадут в раствор, где вероятность нахождения этих веществ рядом будет небольшой, и флуоресценция восстановится [Maurizio Provenzano and Simone Mocellin, 2007].

### **Метки, работающие в фазу отжига**

#### **Флуорогенная шпилька**

Флуорогенная шпилька – небольшая одноцепочечная молекула ДНК, которая в свободном состоянии способна образовывать [пространственную структуру| вторичная структура ДНК] – шпильку. На один конец цепочки пришивают флуорофор, а на второй – вещество, его гасящее. Последовательность зонда комплементарна ДНК-мишени, которую нужно детектировать. В таком случае те молекулы зонда, которые плавают в растворе, не будут давать флуоресцентный сигнал, а связавшиеся с молекулами ДНК будут претерпевать конформационные изменения, в результате которых произойдет пространственное разнесение флуорофора и его гасителя и восстановление флуоресценции. Детекцию целесообразно проводить после денатурации [Maurizio Provenzano and Simone Mocellin, 2007].

### **Метка, основанная на методе FRET**

Другой вариант мечения вновь-образующегося ПЦР-продукта основывается на методе FRET. Основа этого метода – наличие двух зондов, которые связываются с ДНК-мишенью на небольшом расстоянии друг от друга. На 5'-конец одного зонда и 3'-конец второго пришиты флуорофор-донор и флуорофор-акцептор соответственно. При их близком расположении происходит следующее: флуорофор-донор поглощает свет определённой длины волны и испускает свечение в более длинноволновом спектре. Эту волну, в свою очередь, поглощает флуорофор-акцептор и испускает свет, который можно детектировать [Maurizio Provenzano and Simone Mocellin, 2007].

Можно также использовать несколько зондов, у которых флуорофоры имеют разные спектры испускания. В таком случае появляется возможность в одной пробирке детектировать сигнал от разных молекул ДНК. Метод носит название множественный ПЦР (*multiplex PCR*).

### **ПЦР в реальном времени с реакцией обратной транскрипции**

Метод был изобретён для детекции количества ДНК в пробе, однако, последнее время все чаще используется немного видоизменённый количественный ПЦР для детекции РНК. Метод носит название ПЦР в реальном времени с реакцией обратной транскрипции (ОТ-кПЦР, RT-qPCR). Этот метод широко используется для характеристики или сравнения уровней мРНК в разных популяциях [S A Bustin, 2002].

Прежде, чем проводить стандартный ПЦР в реальном времени, нужно провести реакцию обратной транскрипции, для синтеза кДНК. Реакция обратной транскрипции проводится с помощью фермента – обратной-транскриптазы (РНК-зависимой ДНК полимеразы, ревертазы). Реакцию можно проводить без добавления праймера, однако наибольшая эффективность достигается, когда праймер добавлен. Существует три основных типа праймеров:

1. Олиго dT праймеры – гибридизуются с polyA последовательностью, которая есть на 3' -конце многих эукариотических мРНК.

2. Случайная последовательность. Обычно используют либо гексамеры, либо нонамеры. Такие последовательности могут транскрибировать все мРНК

Ген-специфичные праймеры используются, когда исследуется мРНК, экспрессируемая с определённого гена [Mikael Kubist et al., 2006].

Реакция обратной транскрипции – ключевой этап в данном подходе, так как количество кДНК должно соответствовать количеству изучаемой мРНК. РНК-молекула менее стабильна, чем ДНК, поэтому при выделении РНК и проведении ОТ-кПЦР нужно тщательно следить за чистотой процедур и не допускать попадания большого количества РНКаз.

### **Полуколичественный ПЦР**

Полуколичественный ПЦР (semi-quantitative PCR) – немного модифицированный метод количественного ПЦР с реакцией обратной транскрипции. Он часто используется для сравнения экспрессии нескольких генов. В данном случае измеряют количество накопленного продукта только в одной точке – после остановки реакции. ПЦР реакция останавливается, когда предполагается, что накопление продукта находится в экспоненциальной фазе роста и ПЦР-продукт можно детектировать. Далее, после электрофореза или саузерн-блота, можно измерить разницу в экспрессии нескольких образцов [S A Bustin, 2002].

### **Применение**

ПЦР в реальном времени широко используется для решения многих исследовательских задач в лабораториях. Кроме того, этот метод нашёл применение в медицине (для диагностики заболеваний) и в сфере биотехнологий (для определения содержания микроорганизмов в продуктах питания и растительных материалах; для детекции ГМО). Также кПЦР используется для генотипирования вирусов и других патогенов человека и определения их количественного содержания.

### **Диагностические исследования**

Количественная ПЦР применяется для быстрого выявления генов или фрагментов ДНК, являющихся маркерами инфекционных заболеваний, генетических отклонений

и т. д. Внедрение этого метода в клинические лаборатории значительно улучшило качество диагностики инфекционных заболеваний [Sails AD (2009)]. Кроме того, кПЦР используется в качестве инструмента для детектирования вновь возникающих заболеваний. Например, новых штаммов гриппа [FDA News, April 27, 2009].

Использование кПЦР также позволяет проводить количественные измерения и генотипирование (характеристика штаммов) вирусов, например, вируса гепатита В [Yeh S.H. et al., 2004]. Степень инфекции, которая оценивается, как число копий вирусного генома на единицу ткани пациента, имеет большое значение во многих случаях. Например, вероятность реактивации вируса простого герпеса типа 1 зависит от количества инфицированных ганглиев [Sawtell N.M. (1998)]. В зависимости от того, интегрировал ли вирус в геном пациента (как, например, в случае вируса папилломы человека) или нет, количественный анализ осуществляется с применением обратной транскрипции или без неё.

Количественная ПЦР также широко используется для детекции опухолевых клеток в материале из плотных опухолей (solid tumours) [Cen, P.; Ni, X.; Yang, J.; Graham, D.Y.; Li, M., 2012; Young, R. et al., 2012] и даже при некоторых формах лейкемии [Bruggemann M., Gokbuget N., Kneba M. 2011; Dinardo C.D., Luger S.M. 2013].

### **Выявление циркулирующих опухолевых клеток**

Рак молочной железы все ещё является наиболее частой причиной смерти среди раковых больных. Причём, часто смерть вызвана не только самой опухолью, но и возникшими метастазами. Сами метастазы возникают в результате того, что особенные клетки, способные к пролиферации, отделяются от опухоли, выходят в кровяное русло и вторично поселяются в какой-то части организма. Эти клетки называются циркулирующими стволовыми клетками (ЦСТ). Присутствие таких клеток в крови пациентов, больных раком молочной железы, как правило, связано с плохим прогнозом исхода терапии и выживаемости в целом, поэтому является очень важным диагностическим параметром. Но из-за очень низкого количества, выявление ЦСТ – является довольно трудной задачей. И кПЦР, как высокочувствительный метод, может быть использован для решения этой проблемы. Дело в том, что, как и все раковые клетки, ЦСТ имеют эпителиальное происхождение и, следовательно экспрессируют определённый набор генов, отличающийся от окружающих их клеток крови, имеющих мезенхимальное происхождение. Для применения этого метода необходимо определить набор генов-маркеров ЦСТ и оценить их уровень экспрессии [Ulrich Andergassen, et al., 2013].

### **В микробиологии**

ПЦР в реальном времени также применяется для микробиологических работ в сфере безопасности продуктов питания, для оценки качества вод (питьевых и сточных) и в сфере здравоохранения [Filion, M (editor) (2012)]. Кроме того, данный метод используется для идентификации кишечной микрофлоры [Giselle Nobre Costa and Lucia Helena S. Miglioranza DOI: 10.5772/50048].

### **Научные исследования**

В ходе проведения исследований, кПЦР в основном используется для проведения количественных измерений транскрипции генов. Данный метод широко применяется для оценки изменений во времени экспрессии определённого гена, например, в ответ на вве-



дение лекарственного средства или изменения условий окружающей среды. Он также используется для определения зиготности трансгенных животных, используемых в исследовании. Для решения некоторых задач данный метод специально модифицируется.

#### **кПЦР для определения количества малых ядрышковых РНК (мяРНК)**

мяРНК отличаются по свойствам от мРНК тем, что имеют очень малую длину (около 22 нуклеотидов), не имеют консервативной последовательности на концах, при этом мяРНК одной популяции могут отличаться на один или несколько нуклеотидов. Для решения этих проблем используют подходы, основанные на добавлении небольшого участка ДНК (линкера) к кДНК в реакции обратной транскрипции. Затем проводится ПЦР в реальном времени стандартными способами с использованием праймеров, комплементарных линкеру [Vladimir Benes a, Mirco Castoldi b, c, \*, 2010].

#### **ПЦР в реальном времени для измерения количества белка**

Для измерения количества белка в клетке используют следующий подход:

1. Создают два вида антител к целевому белку с пришитыми последовательностями ДНК таким образом, что при взаимодействии с белком, 3' конец одной последовательности оказывается недалеко от 5'-конца второй ДНК последовательности.

Получается, что каждой молекуле белка соответствует известная нам последовательность ДНК, количество которой потом можно анализировать с помощью классического кПЦР-анализа [Elana Swartzman et al. \*, 2010].

#### **Обнаружение фитопатогенов**

Агропромышленность стремится производить семена и рассаду, не содержащую патогенных микроорганизмов, с целью предотвращения экономических потерь и увеличения срока хранения. Поэтому были разработаны системы, позволяющие обнаружить небольшие количества ДНК фитопторы (*Phytophthora ramorum*), оомицетов и некоторых других патогенов, которые приводят к гибели дубов и других видов растений, в смеси с ДНК растения-хозяина. Возможность различить ДНК возбудителя и растения-хозяина основана на амплификации последовательностей ITS (internal transcribed spacer), внутренних транскрибируемых участков, расположенных в кодирующей области гена рибосомной РНК, которые характерны для каждого таксона. [Baldwin, B.G. (1992)]

#### **Детекция генетически модифицированных организмов**

кПЦР (с использованием обратной транскрипции) может быть использована для детекции ГМО (генетически модифицированных организмов), так как является более чувствительным по сравнению со многими другими методами. При этом специфические праймеры используются для амплификации промотора, терминатора или даже промежуточных последовательностей, используемых в процессе создания вектора. Так как процесс создания трансгенного растения обычно приводит к вставке более, чем одной копии трансгена, его количество также обычно оценивается с помощью кПЦР. При этом в качестве контроля используют растение, содержащее данный ген в единственном экземпляре [Holst-jensen A, R{o}nning S.B, L{o}vseth A, Berdal K.G. (2003); Brodmann P.D, Ilg E.C, Berthoud H, Herrmann A. (2002)].

### Литература

1. Cotton R.G.H. Heterogeneity of phenylketonuria at the clinical, protein and DNA levels //J. Inherit. Metabol. Dis. -1990.-Vol.13.-P.739-750.
2. Cotton R.G.H. Detection of mutations in DNA and RNA by chemical cleavage //Methods in Molecular Biology. - 1990. - Vol.7. - P.3-12.
3. Cotton R.G.H., Malcolm A.D.B. Mutation detection //Nature. - 1991. - Vol.353. - P.582-583.
4. Grompe M. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids //Nature Genet. -1993. -Vol.5.-P. 111-116.
5. Orita M., Ivahana H., Kanazawa H., Sekya T. Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single cell conformation polymorphism //Proc. Natl. Acad. Sci. - 1989. -Vol.86.-P.2766-2770.
6. Glavac D., Dean M. Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations //Hum. Mutat. - 1993. - Vol.2, \*5. -p. 404-414.
7. Майерс Р., Шеффилд В., Кокс Д. Обнаружение единичных нуклеотидных замен в ДНК: расщепление РНКазой и денатурирующий градиентный гель-электрофорез //Анализ генома: Методы. - М.: Мир, 1990. - С. 123-175.
8. Fodde R., Losekoot M. Mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) //Hum. Mutat. - 1994. - Vol.3, \*2. - P. 83-94.
9. Lerman L.S., Silverstein K. //Methods Enzymol. - 1987. - Vol.155. - P.482-501.
10. VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM (2008). "Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis". Biotechniques. 44: 619–626. DOI: 10.2144/000112776. PMID 18474036.
11. Nolan T, Hands RE, Bustin SA (2006). "Quantification of mRNA using real-time RT-PCR". Nat. Protoc. 1: 1559–1582. DOI:10.1038/nprot.2006.236. PMID 17406449.
12. Validation of Gene Expression Data by Quantitative Real Time PCR, Maurizio Provenzano and Simone Mocellin, 2007.
13. The real-time polymerase chain reaction Mikael Kubista a, \*, Jose' Manuel Andrade b, Martin Bengtsson a, c, Amin Forootan d, Jiri Jona'k e, Kristina Lind a, f, Radek Sindelka e, Robert Sjo'back a, Bjo'rn Sjo'green d, Linda Stro'mbom a, Anders Sta'hlberg a, g, Neven Zoric a, 2006
14. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems, S A Bustin, 2002.
15. Sails AD (2009). «Applications in Clinical Microbiology». Real-Time PCR: Current Technology and Applications. Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-39-4.
16. FDA Authorizes Emergency Use of Influenza Medicines, Diagnostic Test in Response to Swine Flu Outbreak in Humans. FDA News, April 27, 2009.
17. Yeh S.H. Tsai C.Y. Kao J.H. Liu C.J. Kuo T.J. Lin M.W. Huang W.L. Lu S.F. Jih J. Chen D.S. Others (2004). "Quantification and genotyping of hepatitis B virus in a single reaction by real-time PCR and melting ...". Journal of Hepatology 41(4): 659–666.
18. Sawtell N.M. (1998). «The Probability of in Vivo Reactivation of Herpes Simplex Virus Type 1 Increases with the Number of Latently Infected Neurons in the Ganglia».Journal of Virology 72 (8): 6888-6892. PMC 109900.PMID 9658140.
19. Cen, P.; Ni, X.; Yang, J.; Graham, D.Y.; Li, M. Circulating tumor cells in the diagnosis and management of pancreatic cancer. Biochim. Biophys. Acta 2012, 1826, 350–356.
20. Young, R.; Pailler, E.; Billiot, F.; Drusch, F.; Barthelemy, A.; Oulhen, M.; Besse, B.; Soria, J.C.; Farace, F.; Vielh, P. Circulating tumor cells in lung cancer. Acta Cytol. 2012, 56, 655–660.
21. Bruggemann M., Gokbuget N., Kneba M. Acute lymphoblastic leukemia: Monitoring minimal residual disease as a therapeutic principle. Semin. Oncol.2012;39:47-57. doi: 10.1053/j.seminoncol.2011.11.009.

22. Dinardo C.D., Luger S.M. Beyond morphology: Minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Curr. Opin. Hematol.* 2012;19:82-88.

23. Detection of Circulating Tumour Cells from Blood of Breast Cancer Patients via RT-qPCR. Ulrich Andergassen, Alexandra C. Kölbl, Stefan Hutter, Klaus Friese, Udo Jeschke. *Cancers (Basel)* 2013 December; 5(4): 1212–1220. Published online 2013 September 25. doi: 10.3390/cancers5041212 PMID:PMC3875936.

24. Fillion, M (editor) (2012). *Quantitative Real-time PCR in Applied Microbiology*. Caister Academic Press. ISBN 978-1-908230-01-0.

25. Probiotics: The Effects on Human Health and Current Prospects By Giselle Nobre Costa and Lucia Helena S. Miglioranza DOI: 10.5772/50048

26. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available Vladimir Benes a, Mirco Castoldi b, c, \*, 2010.

27. Expanding applications of protein analysis using proximity ligation and qPCR q Elana Swartzman \*, Mark Shannon, Pauline Lieu, Shiaw-Min Chen, Chad Mooney, Eric Wei, Julie Kuykendall, Rouying Tan, Tina Settineri, Levente Egrý, David Ruff, 2010

28. Baldwin, B.G. (1992). «Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositaogy». *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1 (1): 3-16. doi:10.1016/1055-7903(92)90030-K. PMID 1342921.

29. Holst-jensen A, R{ }nning S.B, L{ }vseth A, Berdal K.G. (2003). «PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs)» (w). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 375 (8): 985–993.

30. Brodmann P.D, Ilg E.C, Berthoud H, Herrmann A. (2002). «Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Methods for Four Genetically Modified Maize Varieties». *Journal of AOAC International* 85 (3): 646–653.

31. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. – Москва: Мир, 2002. – 589 с. – ISBN 5030033289.

### Контрольные вопросы

1. Какие методы позволяют обнаруживать ошибочно спаренные нуклеотиды?
2. Какие химических соединения вызывают мутации генов ?
3. Какие виды генных мутаций возникают под влиянием факторов среды?
4. Как проводится учет спонтанных мутаций у человека?
5. Какие методы используются для обнаружения неизвестных мутаций?
6. Как проводится анализ известных мутаций?
7. Какие методы детекции и диагностики различных мутаций основаны на ПЦР в реальном времени?

## ГЛАВА 12

---

### РЕПАРАЦИЯ ДНК

#### 12.1. Репарация ДНК: общие сведения

Системы репарации ДНК обеспечивают точность воспроизведения и сохранения генетической информации.

Репаративные механизмы, которые использует клетка для поддержания стабильности информации, заложенной в ДНК, универсальны - функциональная, а иногда и структурная гомология элементов, образующих эти механизмы, прослеживается от бактерий до человека.

Чем сложнее клетка, тем большее количество структурных и регуляторных генов и их продуктов участвуют в процессах репарации ДНК, хотя принципиальная схема конкретного процесса, как правило, остается неизменной.

Репаративные механизмы образуют сложную сеть, сплетенную функциональными связями или заимствованиями структурных элементов, которая обеспечивает баланс между стабильностью информации в ДНК и ее эволюционной изменчивостью.

Точность воспроизведения ДНК и передачи информации, в ней заложенной, обеспечивается двумя матричными процессами - репликацией и транскрипцией ДНК.

Хотя ДНК-полимераза обладает корректирующей активностью, репликация не абсолютно точна, и, если возникают неспаренные основания, то системы коррекции оснований исправляют ошибку.

Если в ДНК появляются одно- и двунитевые разрывы, то в действие вступает гомологичная рекомбинация, которая за счет сестринских обменов точно восстанавливает целостность ДНК. Однако рекомбинация - это «тяжелая артиллерия», и предназначена она более всего для изменчивости. При поступлении в клетку ДНК, которая лишь частично гомологична ДНК клетки, вероятно ее интеграция в геном с помощью гомологичной рекомбинации. На страже точности этого процесса стоит система коррекции неспаренных оснований с длинным ресинтезируемым участком (ДКНО), которая прерывает рекомбинацию, если гомология взаимодействующих молекул ДНК излишне несовершенна. Более того, ДКНО ликвидирует большинство рекомбинационных застроек на уровне онДНК, если они нарушают комплементарность спаривания нуклеотидов. Тем самым ДКНО снижает частоту рекомбинационных обменов в ДНК. Так система ДКНО отстаивает стабильность генома и его видоспецифичность. Наследственные нарушения клеточных репаративных систем у человека приводят к тяжелым врожденным аномалиям и/или предрасположенности к развитию раковых заболеваний.

#### 12.2. Репарация ДНК: основные механизмы

Два типа нарушений структуры ДНК приводят к мутациям. Это, во-первых, включение нормальных нуклеотидов в аномальное окружение из последовательностей нуклеотидов, приводящих к образованию неправильно спаренных оснований и петель разных размеров.

Во-вторых, появление повреждений ДНК в виде аномальных нуклеотидов в правильных последовательностях ДНК. В этом случае речь идет о различных химических модификациях нуклеотидов, включая их разрушение и образование поперечных сшивок. Повреждения ДНК могут приводить к задержке и блокированию репликации и транскрипции.

При исследовании механизмов репарации ДНК важные результаты были получены на клетках, облученных УФ-светом с длинами волн 240-280 нм. УФ-облучение клеток часто сопровождается их гибелью, образованием мутаций и злокачественной трансформацией. Среди первичных повреждений наиболее часто встречаются биспиримидиновые фотопродукты: пиримидиновые димеры циклобутанового типа, соединенные связью 6-4. Как про-, так и эукариоты имеют несколько ферментных систем, которые разделяют пиримидиновые димеры или восстанавливают исходную структуру азотистых оснований. К таким репаративным системам относится, прежде всего, система эксцизионной репарации ДНК (NER), осуществляющая вырезание поврежденных нуклеотидов (NER - nucleotide excision repair) или азотистых оснований (BER - base excision repair). Система ферментативной фотореактивации ДНК (PHR - photoreactivation), основным компонентом которой является ДНК- фотолиаза, разделяет пиримидиновые димеры, превращая их в нормальные пиримидиновые основания. Кроме того, поврежденные УФ-светом молекулы ДНК могут репарироваться с участием систем рекомбинации и в процессе пострепликативного синтеза ДНК. Действие систем репарации поврежденной ДНК распространяется не только на фотопродукты, но и на другие модифицированные основания, образующиеся под действием химических мутагенов. Отдельно следует упомянуть систему, распознающую неправильно спаренные основания в двойной спирали ДНК, возникающие в результате ошибок репликации. В Таблице 12.1. представлены системы репарации ДНК у различных организмов.

**Таблица 12.1. Системы репарации ДНК у различных организмов.**

Организмы Тип репарации	бактерии	растения	насекомые	животные	человек
Фотореактивация	+	+	+	+	+
Репарация O <sup>6</sup> -гуанинов	+	+	+	+	?
Эксцизионная репарация оснований	+	+	+	+	+
Эксцизионная репарация нуклеотидов	+	+	+	+	+
Мисмэтч-репарация	+	?	?	+	+
Пострепликативная репарация	+	+	?	+	+
SOS-репарация	+	?	?	+	+

Большинство исследованных организмов обладают системами репарации ДНК в различных комбинациях. Так, клетки *E. coli* для удаления фотопродуктов используют системы NER и PHR, тогда как у человека пиримидиновые димеры циклобутанового типа удаляются исключительно системой NER.

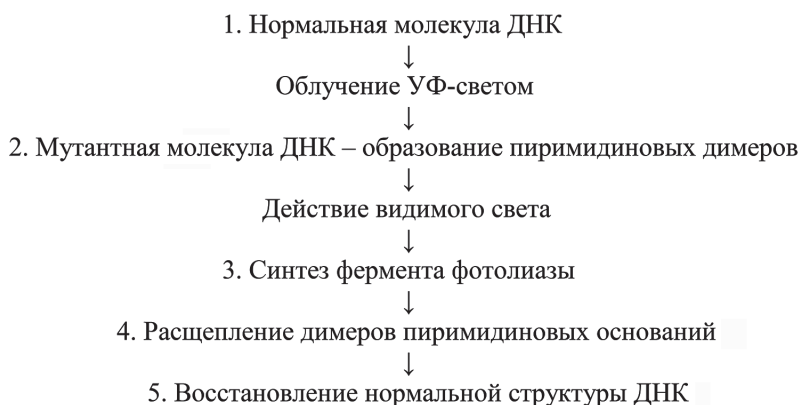
### 12.3. Виды репарации ДНК. Фотореактивация

**Прямая репарация ДНК** обеспечивает прямое восстановление исходной структуры ДНК или удаление повреждения. Широко распространенная система репарации такого рода – фотореактивация пиримидиновых димеров. Кроме нее, к этому типу относятся: репарация ДНК за счет 3'-5'-экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы, репарация одноцепочечных разрывов ДНК с помощью полинуклеотидлигазы, а также генетическая репарация повреждений, вызванных алкильными или метильными группами, путем удаления этих групп специфическими ферментами.

#### **Фотореактивация**

В 1949 г. А.Кельнер и в 1950 г. Р. Дульбекко установили, что **жизнеспособность** актиномицетов и бактерий, подвергнутых УФ-облучению в летальных дозах, восстанавливается, если затем воздействовать на них видимым светом. Явление было названо фотореактивацией. Эффективность ее зависит от уровня рН, температуры и физиологического состояния клетки. Восстановительный эффект при фотореактивации связан с действием фермента – дезоксирибозидпиримидинфотолиазы, представляющего собой полипептид, ассоциированный для его активности с небольшой молекулой РНК (10-15 нуклеотидов).

**Схематически световая репарация выглядит следующим образом:**



**Этот фермент** расщепляет димеры двух соседних пиримидинов циклобутанового типа в одной цепи ДНК, образующиеся под влиянием УФ-лучей. Каждый из димеров задерживает репликацию примерно на 10 секунд.

Фермент присоединяется к ним и в темноте, и на свету, но реакция расщепления связей, объединяющих две молекулы пиримидинов, энергетически зависит от действия видимого света с большей длиной волны. На свету пиримидиновые димеры расщепляются, за счет разрыва ковалентных связей происходит мономеризация и таким образом восстанавливается нативная структура ДНК. К эффективному диапазону (365-490 нм) относятся наиболее длинноволновые УФ-лучи (365-390 нм) и примыкающие к ним видимые синие лучи (435-495 нм). Наибольшая эффективность фотореактивации отмечена для голубой части видимого спектра. Если же необходимо исключить возможность реактивации, то опыты следует проводить в более длинноволновой части спектра, начиная с желтого света 570-590 нм).

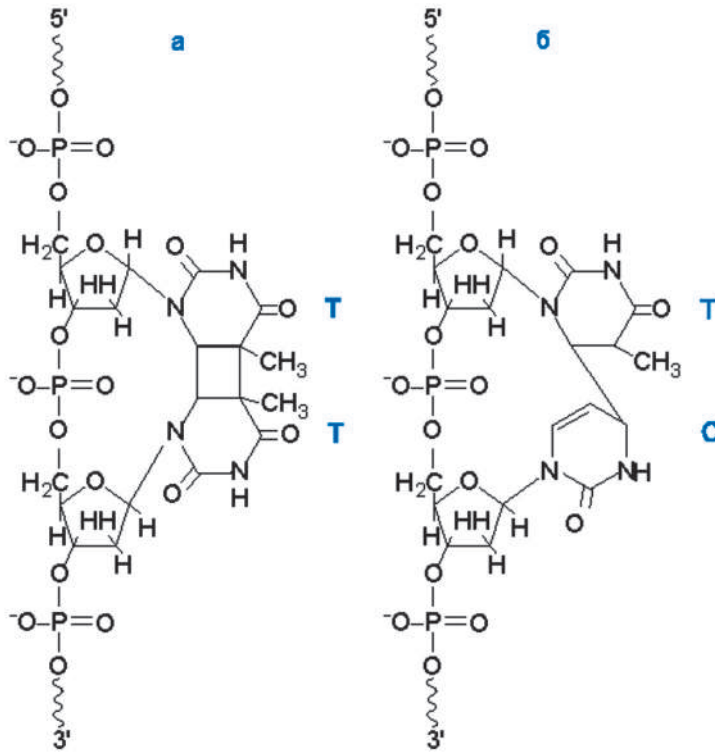


Рисунок 12.1. Участок ДНК с основными повреждениями, вызываемыми УФ-светом а - тиминный димер циклобутанового типа; б - пиримидиновый димер, соединенный 6-4 связью. С - цитозин; Т – тимин.

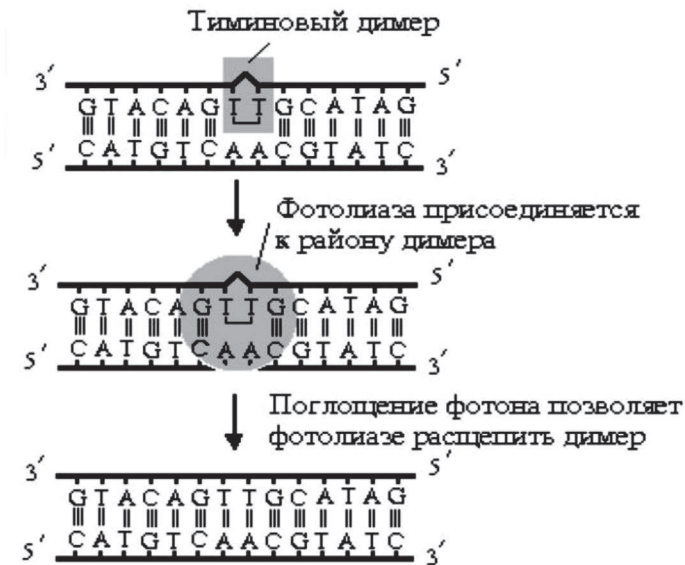


Рисунок 12.2. Репарация тиминового димера фотореактивацией [ Russell, 1998. P. 638]

За 1 минуту молекула фототлиазы может расщепить 2,4 димера. У *E. coli* система фотореактивации удаляет до 90% пиримидиновых димеров и контролируется одним геном - *phr*. Штаммы, несущие мутацию по этому гену не способны к репарации ДНК.

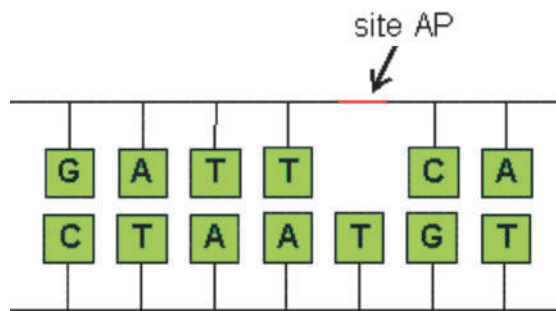
## 12.4. ЭКЦИЗИОННАЯ РЕПАРАЦИЯ ОСНОВАНИЙ (BER)

**Экцизио́нная репара́ция осно́ваний** (англ. *base excision repair (BER)*) – система репарации ДНК, удаляющая из двойной спирали повреждённые азотистые основания. BER начинается с распознавания и удаления повреждённого основания ДНК-гликозилазами. Далее особая эндонуклеаза удаляет фрагмент цепи, содержащей нуклеотид без основания, и ДНК-полимеразы застраивают брешь. Различают BER с точечной заплаткой, при которой удаляется только нуклеотид, лишённый азотистого основания, или BER с короткой заплаткой, при которой удаляется короткий фрагмент, содержащий повреждённый нуклеотид [Кребс, Голдштейн, Килпатрик, 2017, с. 397].

### Механизм

BER начинается с распознавания ДНК-гликозилазами повреждённых оснований (например, алкилированных), неспаренных оснований, а также урацила, который в норме отсутствует в ДНК и есть только в РНК. Гликозилаза разрезает связь азотистого основания с дезоксирибозой, удаляя его из ДНК. Некоторые гликозилазы также являются лиазами и вносят разрыв в цепь ДНК с 3'-конца повреждённого нуклеотида, используя аминогруппу в качестве атакующей группы. Дальнейший ход репарации определяется тем, участвовала ли лиаза в удалении повреждения [Кребс, Голдштейн, Килпатрик, 2017, с. 397-398].

Если гликозилаза функционировала как лиаза, то BER идёт по пути с точечной заплаткой. AP-эндонуклеаза APE1 вносит разрыв у 5'-конца повреждённого нуклеотида, и он покидает ДНК. Образовавшаяся брешь застраивается ДНК-полимеразой  $\beta$  и лигируется ДНК-лигазой XRCC1 /Lig3 [Кребс, Голдштейн, Килпатрик, 2017, с.398].



Схематическое представление AP-сайта

Если лиазной активности не было, то с образовавшимся AP-сайтом (то есть апуриновым и апириридиновым) связывается эндонуклеаза APE1, которая удаляет



повреждённый нуклеотид и от двух до десяти его соседей. Далее репликативный комплекс, состоящий из ДНК-полимераз  $\delta$  и  $\epsilon$  и других компонентов, застраивает брешь, вытесняя близлежащие нормальные нуклеотиды. Вытесненные при этом нормальные нуклеотиды удаляются эндонуклеазой FEN1. Далее новосинтезированный участок лигируется лизагой 1 [Кребс, Голдштейн, Килпатрик, 2017, с.398].

Механизм распознавания повреждённых оснований обычно основан на том, что они нарушают структуру двойной спирали ДНК и «выскакивают» из спирали, попадая непосредственно в активный центр гликозилазы [Кребс, Голдштейн, Килпатрик, 2017, с.398-399].

Повреждённые основания не всегда подлежат удалению. Например, при репарации метилированных адениновых нуклеотидов метильная группа окисляется специальными ферментами до  $\text{CH}_2\text{OH}$ , далее высвобождается формальдегид ( $\text{HCHO}$ ) и исходная структура аденина восстанавливается [Кребс, Голдштейн, Килпатрик, 2017, с.399].

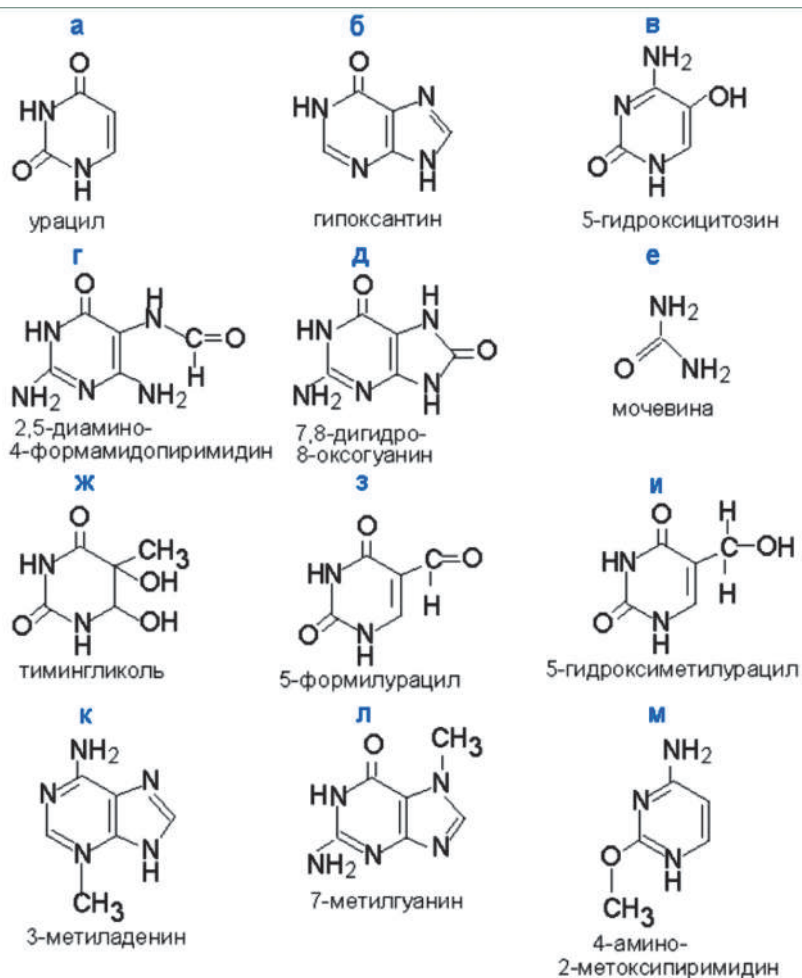
Выбор пути BER – с точечной или с короткой заплаткой – может также зависеть от стадии клеточного цикла и степени дифференцировки клетки [Fortini P., Dogliotti E., 2007]. Кроме того, два механизма используются разными организмами с различной частотой. Например, у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, по-видимому, отсутствует репарация точечной заплаткой, так как у них не выявлено гомологов человеческих генов, белковые продукты которых участвуют в этом пути [Gellon L., Carson D. R., Carson J. P., Demple B., 2008].

#### **Клиническое значение**

Дефекты в различных путях репарации ДНК способствуют развитию рака, и BER не является исключением. В самых разных организмах нарушения в генах, белковые продукты которых задействованы в BER, приводят к резкому повышению частоты мутаций, что является предпосылкой для раковых заболеваний. Действительно, соматические мутации, затрагивающие ДНК-полимеразу  $\beta$ , наблюдаются в 30 % случаев рака, и некоторые из них вызывают злокачественную трансформацию у мышей [Starcevic D., Dalal S., Sweasy J. B., 2004]. Мутации ДНК-гликозилазы MUTYH повышают риск развития рака толстой кишки [Farrington S. M. et al., 2005].

Экцизионная репарация нуклеотидных оснований (BER) начинает функционировать с отщепления ошибочно включенных или модифицированных оснований от дезоксирибозы под действием ключевого фермента - ДНК-гликозилазы, обладающего способностью отщеплять большое число модифицированных оснований ДНК (рисунки 12.3- 12.5).

Иницирующими BER белками являются гликозилазы, которые распознают и удаляют поврежденные или неправильные основания, гидролизуя N-гликозидную связь между сахарофосфатным остовом и поврежденным основанием. На сегодняшний день в клетках млекопитающих идентифицировано не менее 11 различных гликозилаз, которые отличаются по субстратной специфичности и репарируемым повреждениям. Обычно определенные гликозилазы репарируют определенные повреждения. Экцизионная репарация является наиболее распространенным способом репарации модифицированных оснований ДНК.



**Рисунок 12.3.** Модифицированные основания ДНК, удаляемые при BER

Модифицированные азотистые основания ДНК, удаляемые ДНК-гликозилазами при функционировании BER: а - урацил; б - гипоксантин; в - 5-гидроксицитозин; г - 2,5-диамино-4-формаидопиримидин; д - 7,8-дигидро-8-оксогуанин; е - мочеви́на; ж - тимингликоль; з - 5-формилурацил; и - 5- гидроксиметилурацил; к - 3-метиладенин; л - 7-метилгуанин; м - 2-метилцитозин (<http://humbio.ru/humbio/genexp/001af3e1.htm>).

При этом существуют гликозилазы, специфически распознающие присутствие в ДНК определенных модифицированных оснований (оксиметилурацила, гипоксантина, 5-метилурацила, 3-метиладенина, 7-метилгуанина и т.д.см таблицу 12.2).

**Таблица 12.2.** Основные типы обнаруженных к настоящему времени гликозилаз

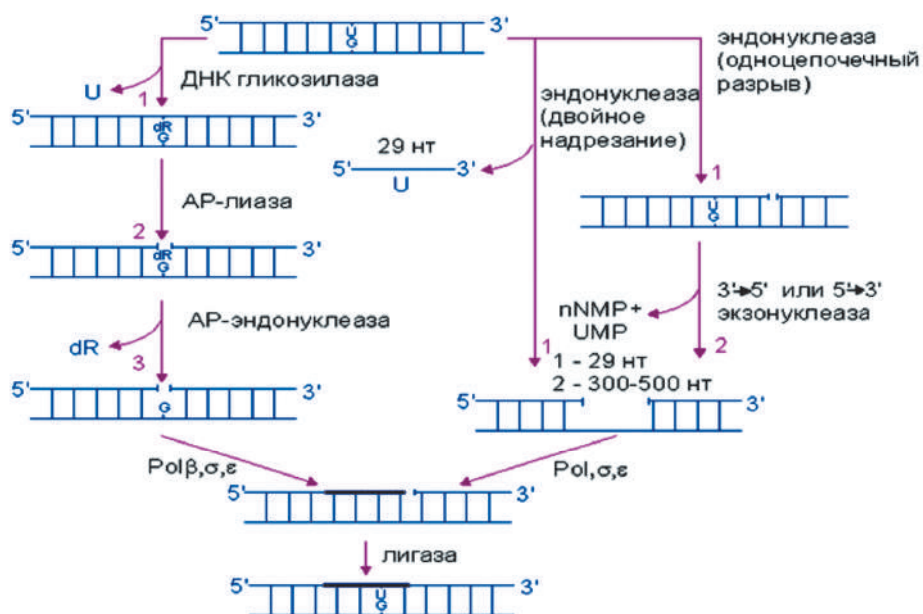
Фермент	Субстрат	Продукт реакции
Ura- ДНК гликозилаза	ДНК, содержащая урицил	Урацил+АП-сайт
Hmu- ДНК-гликозилаза	ДНК, содержащая оксиметилурацил	Оксиметилурацил +АП-сайт

5mC-ДНК-гликозилаза	ДНК, содержащая 5-метилцитозин	5-метилцитозин+АП-сайт
Нх-ДНК-гликозилаза	ДНК, содержащая гипоксантин	Гипоксантин+АП-сайт
ДНК-гликозилаза тиминового мисмэтча	ДНК, содержащая ошибочную пару оснований Г-Т (Г-Т мисмэтч)	Тимин+АП-сайт
MutY-ДНК-гликозилаза	ДНК, содержащая ошибочную пару оснований Г-А (ГА-мисмэтч)	Аденин+АП-сайт
3mA-ДНК-гликозилаза I	ДНК, содержащая 3-метиладенин	3-метиладенин+АП-сайт
3mA-ДНК-гликозилаза II	ДНК, содержащая 3-метиладенин, 7-метилгуанин или 3-метилгуанин	3-метиладенин, 7-метилгуанин или 3-метилгуанин+АП-сайт
FaPy-ДНК-гликозилаза	ДНК, содержащая остат-ки формамидопирими-динов или 8-оксигуанин	2,6-диамино-4-окси-5-N-метилформамидопиримидин или 8-оксигуанин+АП-сайт
5,6-НТ-ДНК-гликозилаза (эндонуклеаза III)	ДНК, содержащая 5,6-гидратированные остатки тимина	5,6-дигидроксигидротимин или 5,6-дигидротимин
PD- ДНК-гликозилаза	ДНК, содержащая димеры пиримидинов	Пиримидиновые димеры с гидролизованными 5'-гликозидными связями +АП-сайт

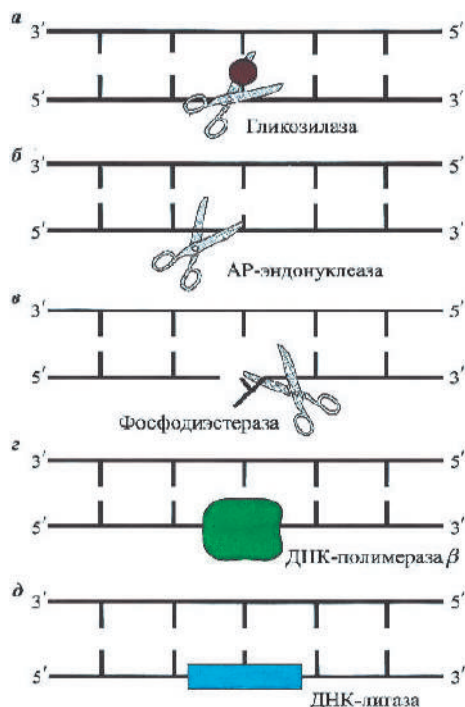
Для многих гликозилаз к настоящему времени описан полиморфизм, связанный с заменой одного из нуклеотидов в кодирующей последовательности гена. Для ряда изоформ этих ферментов была установлена ассоциация с повышенным риском возникновения онкологических заболеваний [Chen, 2003].

Среди гликозилаз млекопитающих можно выделить четыре структурно различных группы: урацил-ДНК-гликозилазы, спираль-шпилька-спираль-гликозилазы, 3-метилпурингликозилазы и эндонуклеаза-VIII-подобные гликозилазы. Несмотря на их структурное разнообразие, все ДНК-гликозилазы используют механизм «отгибания оснований» (base-flipping), при котором основание-мишень перед отщеплением отгибается в сторону от спирали ДНК.

Одновременно с присоединением нового нуклеотида полимеразы вытесняют нуклеотид с поврежденным 5'-концом и последующие нуклеотиды, которые образуют отделенный от матричной цепи «болтающийся» олигонуклеотид – flap structure. В результате, разрыв в репарируемой цепи ДНК смещается в сторону от первоначального участка повреждения, а небольшой «лишний» отрезок цепи нуклеотидов удаляется с помощью эндонуклеазы FEN1 (Flap endonuclease-1, флэп-эндонуклеаза-1), также зависящей от PCNA. FEN1 присоединяется к 5'-концу свисающего участка, перемещается к месту разветвления на этой цепи ДНК и гидролизует связь. Помимо репарации этот фермент принимает активное участие в репликации ДНК: при удалении праймера фрагментов Оказаки также образуются свисающие (flap) концы.



**Рисунок 12.4.** (рис.1.58 пат) Эксицизионная репарация у животных: основные пути и этапы. Цифрами обозначены последовательные этапы функционирования BER и NER. <http://humbio.ru/humbio/genexp/001af599.htm>



**Рисунок 12.5.** Модель репарации гликозилазами [Lehmann, P. 147]

Помимо вышеперечисленных факторов, существуют также второстепенные белки, исполняющие в BER вспомогательные функции. Наиболее известные среди них – XRCC1 (X-ray-induced damage repair cross complementating) и PARP1 (poly(ADP-ribose) polymerase-1). **Белок**, кодируемый геном **XRCC1** (X-ray cross-complementing group I, локус 19q13.2), считается интегральным регулятором эксцизионной репарации.

Лигирование фосфодиэфирной связи осуществляется ДНК-лигазами I и III. Лигаза I взаимодействует PCNA и Pol  $\beta$ , но участвует в основном в длиннозаплаточной BER. ДНК-лигаза III взаимодействует с XRCC1, Pol  $\beta$  и PARP-1 и включается только в короткозаплаточной BER. Также важную роль в регуляции BER играет белок p53. In vitro этот белок стимулирует BER, непосредственно взаимодействуя с APE и Pol  $\beta$ , стабилизируя Pol  $\beta$  и связывая ее с АП-сайтом.

Эксцизионная репарация ДНК путем удаления поврежденных азотистых оснований (BER) вызывает защиту геномной ДНК от повреждений алкилирующими агентами и эндогенными генотоксическими соединениями. Биологическая функция ЭРО заключается в восстановлении исходной структуры модифицированных оснований ДНК. Эта система высокоспецифична [Lindahl T., 1993, Lindahl T., ea, 1997].

В целом, система ЭРО - чрезвычайно действенный барьер мутациям оснований.

Ярким примером этому является тройная система защиты ДНК от окисления гуанинов, выявленная у *E. coli* [Kolodner R., 1995, Friedberg E.C., Walker G.C., ea., 1995].

Как в любой другой репаративной реакции, в системе ЭРО завершающим является ресинтетический этап, восстанавливающий правильность спаривания с помощью ДНК-полимеразы I (у *E. coli*) и ДНК-лигазы. Естественно, что столь изощренная система специализированной защиты не могла не оказаться универсальной: активности, свойственные белкам MutT, MutM и MutY, как и Эндонуклеазе III, уже выявлены у *S. cerevisiae* и человека. Однако пока не найдены гены, кодирующие эти и другие N-гликозилазы высших. Не найдены также и генетические заболевания, сопряженные с нарушением системы ЭРО.

## 12.5. Коррекция неспаренных оснований (КНО) в ДНК

Неспаренные основания в ДНК могут возникать в результате трех событий:

- 1) прямого повреждения оснований ДНК или их предшественников продуктами клеточного метаболизма;
- 2) ошибочной подстановки некомплементарного основания ДНК-полимеразой в ходе репликации;
- 3) рекомбинационной интеграции одонитевого участка ДНК в неабсолютно идентичную ДНК, партнера по рекомбинации.

Все события приведут к образованию гетеродуплексной ДНК, которая и становится субстратом для ферментов, корректирующих неправильные пары оснований.

Принято различать 2 системы КНО: с длинным ресинтезируемым трактом (ДКНО, LPMR, long patch mismatch repair) и очень коротким трактом (ОККНО, VSPMR, very short patch mismatch repair).

### Коррекция неспаренных оснований (КНО) у бактерий

ДКНО наиболее детально изучена у *E. coli*, процесс коррекции ДНК в которой был реконструирован *in vitro* [Modrich P., 1993]. ДКНО включает в себя следующую цепь реакций.

1) Опознание неспаренного основания продуктом гена *mutS* (Рисунок 12.6);

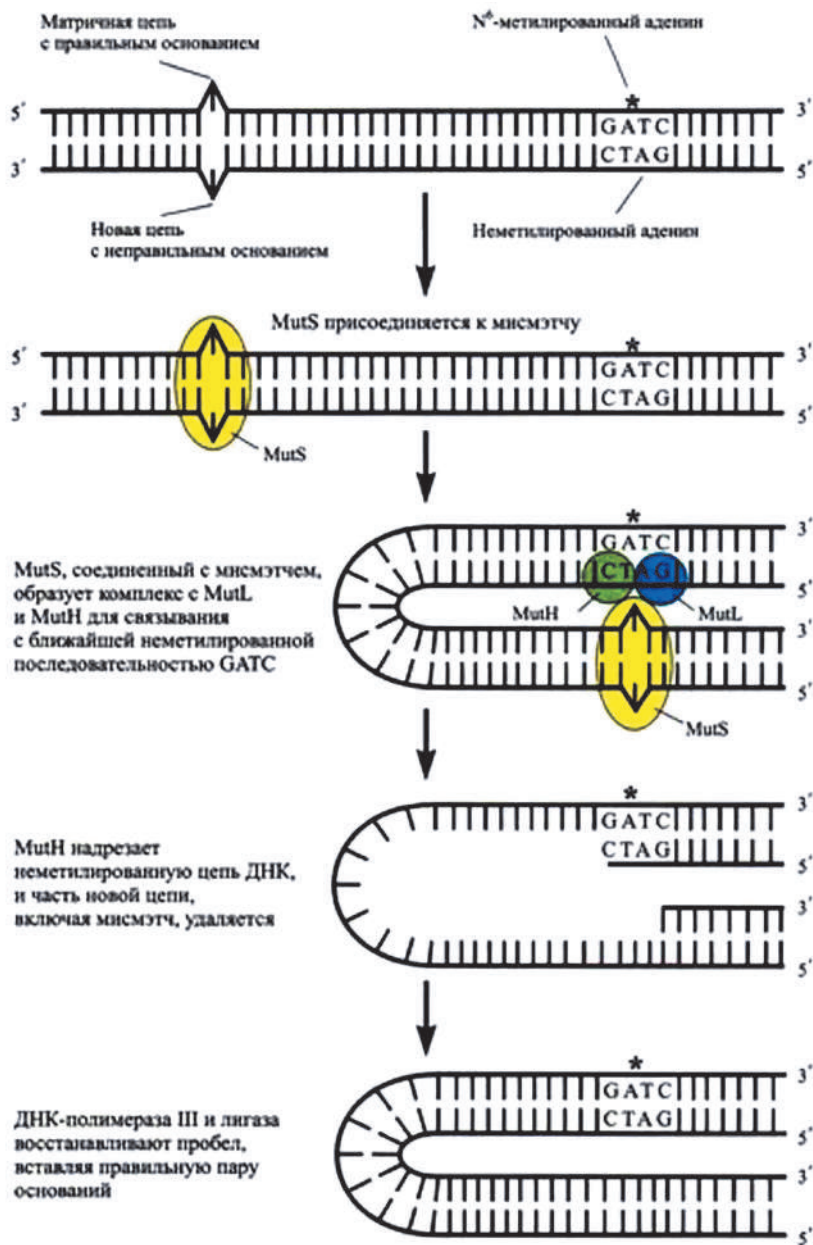


Рисунок 12.6. Механизм мисмэтч-системы репарации [Russel,1998. P. 641]

2) Образование комплекса MutS - MutL, стабилизирующего связывание белка MutS с неспаренным основанием, что сопровождается активированием белка MutH, который осуществляет эндонуклеазную атаку ближайшего к этому основанию полуметилированного (т.е. метилированного лишь в одной нити ДНК) сайта GATC, локализованного с любой стороны от основания;

3) Эكцизия сегмента онДНК в месте разрыва, требующая участия ДНК-геликазы II (продукта гена  $mutU = uvrD = uvrE = gesL$ ) и одной из онДНК-экзонуклеаз:  $ExoI$  (3'-экзо),  $Exo VIII$  (3'- или 5'-экзо) или  $Rec J$  (5'-экзо). Последнее зависит от направления деградации в сторону неспаренного основания;

4) Ресинтез удаленного участка ДНК длиной до нескольких тысяч оснований, осуществляемый голоэнзимом Pol III, белком SSB (онДНК-связывающий белок, который защищает онДНК от атаки эндонуклеазой и препятствует возникновению вторичных структур в ней) и ДНК-лигазой. Такова коррекционная система MutHLSU у грамотрицательных бактерий *E. coli*.

Система ДКНО у *E. coli* не обладает строгой специфичностью. Она опознает и корректирует все неспаренные основания (хотя транзиции репарируются более эффективно, чем трансверсии) за исключением одного - С-С.

В отличие от этого система ОККНО у *E. coli* строго специфична. Она репарирует только неправильные пары G-T, в которых T появляется в результате дезаминирования 5-метилцитозина, а последний образуется в ходе модификации цитозинов в ДНК с помощью метилазы Dmc. Как и в системе ДКНО, неправильные основания узнают белки MutS и MutL, которые стимулируют специфическую эндонуклеазу Vsr, чтобы разрезать ДНК с 5'-конца от T. Экцизия и последующий ресинтез требуют присутствия Pol I и ДНК-лигазы.

#### ДКНО у человека и канцерогенез

В клетках человека обнаружено два MutS - подобных комплекса, hMutSa (hMsh2 + hMsh6) и hMutSb (hMsh2 + hMsh3), причем с разным спектром опознаваемых повреждений. Первый взаимодействует с одиночными неспаренными основаниями и вставками, а второй эффективен для петель, включающих 2-3 основания [Palombo F., Iaccarino I., et al., 1996, Arnheim N., Shibata D., 1997].

Гетеродимер образуется, вероятно, и в структуре MutL-подобных комплексов эукариот: Mlh1 + Pms1 - у дрожжей и Mlh1 + Pms2 у человека. В этом случае у человека выявлен третий гомолог - ген hPMS1 [Nicolaidis N.C., ea, 1994]. PMS1 homolog 1, mismatch repair system component [*Homo sapiens*(human)] Mismatch repair endonuclease PMS2 является энзимом, который у человека кодируется геном *PMS2*. Система ДКНО у высших эукариот усложняется и возможным участием в ней белка PCNA [Umar A., ea, 1996].

*Gene: [03p213/MLH1] mutL (E. coli) homolog 1; colon cancer, nonpolyposis type 2; [COCA2].* Гомологи PMS2, HNPCC4, PMS2CL, PMSL2, MLH4, PMS1 homolog 2, mismatch repair system component MGI: 104288 HomoloGene: 133560 GeneCards:PMS2.

Сравнительное изучение системы ДКНО у человека имеет большое медико-биологическое значение. Наследственный неполипозный рак толстой кишки (ННРТК), который составляет, по разным оценкам, от 5 до 15 % всех случаев колоректальных раков,

сопряжен, главным образом, с повреждениями трех генов hMLH1 (49%), hMSH2 (45%) и hPMS2 (6%) [Fishel R., Lescoe M.K., et al. 1993]. К концу 90-х гг выявлено до 40 мутаций в каждом из первых двух генов и небольшое число в других, включая hPMS2 и hPMS1 [Kolodner R., 1995].

Складывается также и генетическая картина перехода от предрасположенности к заболеванию, к его развитию в результате инактивации обоих аллелей одного из генов системы ННРТК [Arnheim N., Shibata D., 1997].

Среди спорадических раковых опухолей различной локализации от 10 до 30 % показывают нестабильность структуры микросателлитной ДНК в их клетках (так называемый фенотип RER#+ (replication error), являющийся результатом неисправленной ошибки репликации ДНК микросателлита), что автоматически подразумевает существование дефекта в системе ДКНО.

Результаты исследований клеточных линий, происходящих из спорадических раковых клеток с фенотипом RER+, показывают, что они несут мутации в генах hMSH2, hMLH1, hPMS2 и GTPB [Eshelman J.R., Marcowitz S.D., 1995].

## 12.6. Исправление ошибок спаривания ДНК. Мисмэтч-репарация (MMR)

Этот вид репарации исправляет ошибки, возникшие в процессе удвоения ДНК. В ходе репликации с частотой от 1:10000 до 1:100000 полимеразы вставляют некомплементарные нуклеотиды. Такие, ошибочно вставленные, основания называются мисмэтчи (mismatches).

Основным белком-инициатором MMR является MSH2, который обнаруживает ошибку в структуре нити ДНК и, в зависимости от типа повреждения образует гетеродимер либо с MSH6 либо с MSH3: для коррекции мисмэтча требуется MSH6, а для исправления ПДВ необходимо участие и MSH6, и MSH3.

После ассоциации MSH2 со вторым белком образуются комплексы-MutS $\alpha$  или MutS $\beta$ , которые формируются на нити ДНК в месте локализации ошибки.

Репарация ошибочно спаренных оснований у эукариот происходит при участии комплекса белков, подобного системе MutHLS бактерий. Белок GTPB человека представляет собой гомолог бактериального белка MutS, а у дрожжей в соответствующей роли выступает белок Msh6. Распознавание ошибочно спаренных нуклеотидов у человека осуществляется гетеродимером MSH2-GTPB.

Гомологами MutL в клетках *S. cerevisiae* являются белки MLH1 и PMS2, которые также существуют в виде гетеродимерных комплексов. Мутации в генах, кодирующих эти белки у человека, сопровождаются формированием мутаторного фенотипа и развитием наследственного неполипозного рака кишечника (синдром HNPCC - hereditary nonpolyposis colon cancer).

Механизм коррекции, при котором восстановлению подвергается определенная цепь ДНК, называется направленным. Эксцизионная репарация обнаружена как у простейших, так и в культуре клеток млекопитающих. В частности, в культуре клеток здоровых людей после облучения ее ультрафиолетом через 20 ч из ДНК исчезает до 90%

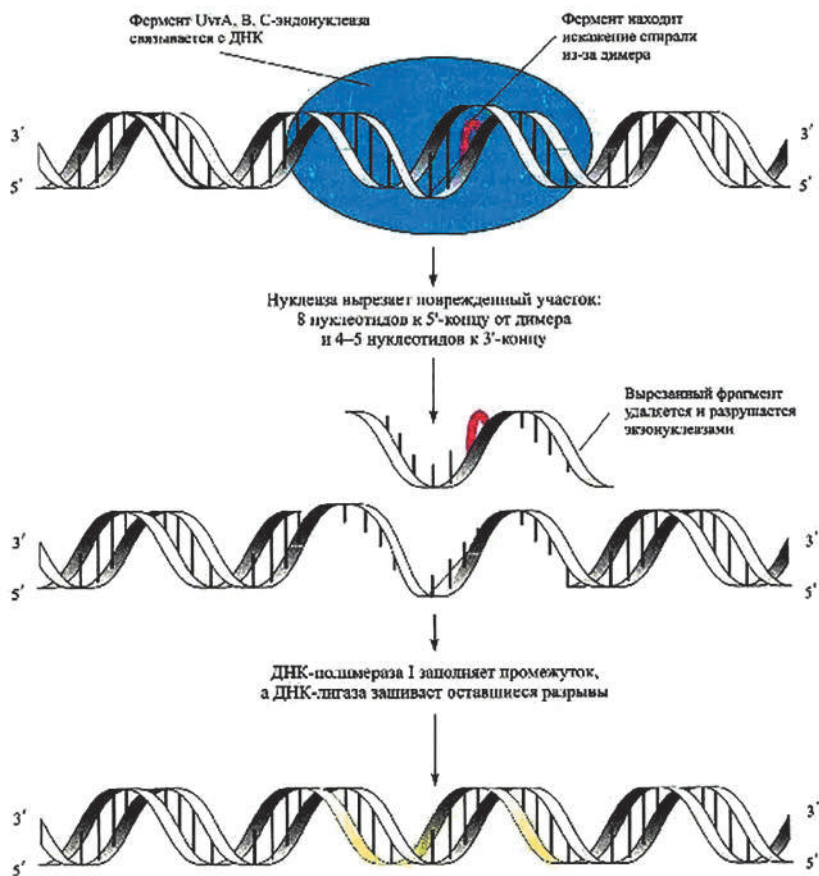


тиминовых димеров (со скоростью около 40 000 димеров в час). С нарушением этого механизма репарации связаны такие наследственные заболевания как пигментная ксеродерма и Синдром Коккейна.

## 12.7. Эксцизионная репарация нуклеотидов (NER)

**Эксцизионная репарация нуклеотидов (NER, англ. *Nucleotide Excision Repair*)** – один из механизмов репарации ДНК [Carroll SB, Wessler SR, Griffiths AJF, Lewontin RC., 2008]. (рисунок 12.7).

Наряду с эксцизионной репарацией оснований (BER) и мисметч-репарацией (MMR), он позволяет исправить односторонние повреждения ДНК, используя в качестве матрицы неповреждённую комплементарную цепь. Но, в отличие от вышеуказанных механизмов, он предназначен для более крупных повреждений ДНК, таких как, например, образование пиримидиновых димеров, что особенно важно при повреждениях ДНК ультрафиолетом [Carroll SB, Wessler SR, Griffiths AJF, Lewontin RC., 2008, Russell, 1998. P. 639].



**Рисунок 12.7.** Эксцизионная репарация пиримидинового димера и других нарушений ДНК, инициированная ферментом UvrA, B, C-эндонуклеазой [Russell, 1998. P. 639]

У *E. coli* эксцинуклеаза формируется, в результате димеризации двух молекул белка UvrA в присутствии АТФ и связывания с одной молекулой UvrB. Гетеротример UvrA2B связывается с ДНК и с помощью 5'-3'-ДНК-геликазной активности перемещается вдоль ДНК в поисках повреждения. Такова предполагаемая картина узнавания эксцинуклеазой UvrABC неспецифического повреждения в ДНК (рисунок 12.7) [Кребс, Голдштейн, Килпатрик, 2017, с. 393.; Neeijmakers J., 1993]. Результатом узнавания повреждения этим комплексом явится внедрение субъединицы UvrB в ДНК, сопровождающееся конформационными изменениями ДНК в сайте внедрения (изломы, локальная денатурация), диссоциация обеих субъединиц UvrA из комплекса и последующее связывание с ним молекул UvrD и UvrC. Гетеродимер UvrBC из состава нового комплекса делает два разрыва в поврежденной нити ДНК на расстоянии 8 н. с 5'-конца от повреждения и 5 н. с 3'-конца, катализируемых субъединицами UvrC и UvrB соответственно, что приводит к появлению 12-13-мерного олигонуклеотида, вытесняемого из комплекса с помощью геликазы UvrD. Образующаяся при этом брешь заполняется ДНК-полимеразой I, синтезирующей ДНК по неповрежденной матрице, и сшивается ДНК-лигазой. Описанный процесс зависит от АТФ. Действительно, АТФ стимулирует димеризацию молекул UvrA, гидролиз АТФ необходим для образования комплекса UvrA2B и проявления его геликазной активности, АТФ необходим для формирования комплекса UvrB-ДНК и, наконец, для описанной выше бимодальной инцизии ДНК [Кребс, Голдштейн, Килпатрик, 2017, с. 393; Friedberg E.C., Walker G.C., ea., 1991]. У *E. coli* транскрипционно-зависимую ветвь ЭРН (ТЭРН) осуществляет продукт гена *mfd* (mutation frequency decline). Этот ген был открыт за 35 лет до того, как его продукт признали фактором TRCF. Последний способствует диссоциации РНК-полимеразы от дефектной транскрибируемой нити ДНК, и связывается с субъединицей UvrA эксцинуклеазного комплекса. Иными словами, именно белок Mfd отыскивает повреждения на транскрибируемой нити и направляет ТЭРН на эту мишень. Согласно недавним наблюдениям, два главных белка системы ДКНО - MutL и MutS - необходимы для ТЭРН [Кребс, Голдштейн, Килпатрик, 2017, с. 393.]. Причина такой взаимосвязи систем ДКНО и ТЭРН или заимствования белков MutL и MutS для выполнения сходных функций пока остается загадочной, хотя сам факт несомненен и нашел подтверждение также и для белков Msh2, Mlh1, Pms1 и Msh3 у *S. cerevisiae* [Кребс, Голдштейн, Килпатрик, 2017, с. 393.].

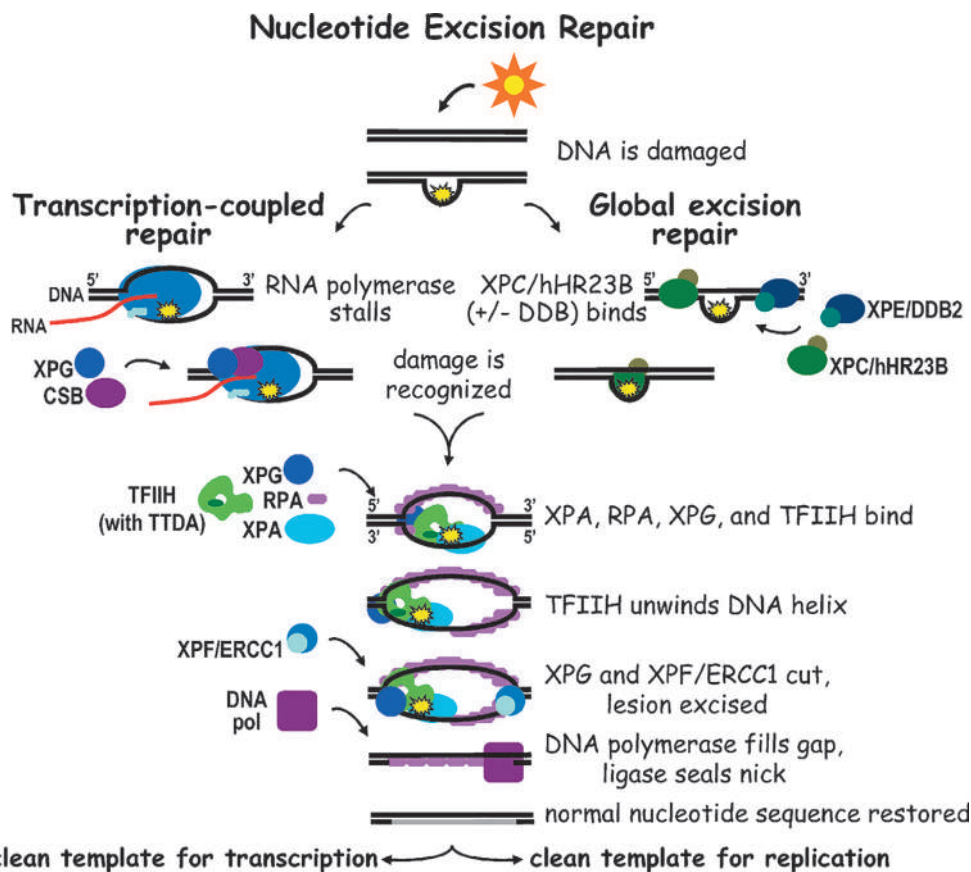
### **Эксцизионная репарация нуклеотидов (ЭРН) у человека**

Большому прогрессу в раскрытии механизма ЭРН у эукариот мы обязаны наследственному заболеванию человека - пигментной ксеродерме ХР.

У эукариот существует два механизма эксцизионной репарации нуклеотидов: репарация всего генома и репарация, связанная с транскрипцией. При первом пути белок ХРС узнаёт повреждение в любом месте генома. У млекопитающих белок ХРС входит в состав комплекса, распознающего повреждение, в который также входят белки HR23В и центрин-2. ХРС также распознаёт повреждения, которые не может устранить эксцизионная репарация нуклеотидов, например, короткие участки частично денатурированной ДНК. Для распознавания некоторых типов повреждений, например, пиримидиновых димеров, ХРС нуждается в дополнительных белках, которые помогают ему

связаться с местом повреждения [ Fuss J. O., Cooper P. K., 2006 ]. При втором пути, связанном с транскрипцией, повреждение распознаётся самой РНК-полимеразой II, при этом фермент останавливает движение по матрице ДНК. В некоторых случаях для протекания процесса фермент должен быть особым образом модифицирован или даже разрушен. Так, при остановке РНК-полимеразы II на месте пиримидинового димера её большая субъединица деградирует [ Fuss J. O., Cooper P. K., 2006 ].

Изучение молекулярных основ этого заболевания выявили их сопряженность с дефектами системы ЭРН, результатом чего и явилось раскрытие генетического контроля ЭРН. Комплементационный анализ различных клеточных линий ХР определил 8 комплементационных групп (7 от ХРА до ХРГ и одна «вариантная форма» ХРВ) [Friedberg E.C., Walker G.C., ea., 1991], а комплементационная коррекция возможных мутантных линий клеток китайского хомячка, чувствительных к УФ-свету, способствовала выявлению дополнительных генов системы ЭРН. Последние получили название гены ERCC (excision repair cross-complimenting), и поэтому в названии генов и белков ЭРН используются обе аббревиатуры ( рисунок 12.8).



**Рисунок 12.8.** Схема путей эксцизионной репарации нуклеотидов у эукариот [Citation: Fuss JO, Cooper PK (2006) DNA Repair: Dynamic Defenders against Cancer and Aging. PLoS Biol 4(6): e203. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040203>]

Хотя детали процесса ЭРН у человека не ясны, так как не определена роль целого ряда генов, в первом приближении он выглядит так, белок ХРА в комплексе с онДНК-связующим белком RPA ( репликационным белком А ), транслоцируясь вдоль онДНК, опознает конформационное повреждение. Взаимодействуя через другой участок белка ХРА с базальным фактором транскрипции ТFIIN (две из субъединиц которого, белки ХРВ и ХРD , обладают геликазной активностью с противоположной ориентацией раскручивания днДНК), они образуют комплекс, который расплетает ДНК вокруг повреждения (в состав этого комплекса входит и белок ХРС с неясными функциями). Через третий участок белка ХРА к комплексу примыкает гетеродимер ERCC1-XPB , который вносит односторонний разрыв в ДНК с 5'-конца на расстоянии 16-25 н. от повреждения, тогда как белок ХРG, входящий в комплекс белков эксцизунуклеазы через взаимодействие с белком RPA, делает надрез с 3'-конца на расстоянии 2-9 н. (в разрезании принимает участие и белок ХРС , а белок ХРЕ активизирует реакцию). В результате бимодальной инцизии участок ДНК размером около 29 н. высвобождается, а образующаяся брешь ресинтезируется с помощью ДНК-полимеразы эпсилон или ДНК-полимеразы дельта, сопутствующего репликации фактора PCNA , репликационного фактора C-RFC и ДНК-лигазы I. Представленная картина во многом основана на реконструировании процесса в открытой системе с участием 10 хорошо очищенных белков [Wood R.D., 1994]. Как видно, эукариотическая система ЭРН лишь функционально подобна прокариотической. В ней задействовано значительно больше белков, число которых должно еще возрасти за счет белков, осуществляющих разборку и сборку хроматина. Раскрытие природы ТЭРН у человека также связывают с пониманием молекулярного дефекта, приводящего к развитию двух мультисистемных генетических заболеваний - синдрома Кокейна (CS) и трихотиодистрофии (TTD) [Кребс Дж., Голдштейн Э., Килпатрик С., 2017]. При обоих заболеваниях соматические клетки больных оказались неспособны к ТЭРН (ТЭРН - сопряжение транскрипции и репарации ДНК). Классические случаи CS оказались связанными с повреждениями в двух генах, CSA и CSB, а редкие смешанные формы CS+XP (CS с дополнительными симптомами XP), с повреждениями в генах ХРВ, ХРD и ХРG. При TTD дефекты были обнаружены также в генах ХРВ и ХРD и в новом пока не клонированном гене TTDA, продукт которого является частью корового домена транскрипционного фактора ТFIIN [Lehmann A.R., 1995, Lindahl T., ea, 1997].

Фактор ТFIIN состоит из 6 субъединиц, две из которых - белки ХРВ и ХРD. Связываясь с белками РНК-полимеразного комплекса, кор ТFIIN принимает участие в иницировании транскрипции [Buratowski S., 1994 ], а вкпе с белками репарационного комплекса кор этого фактора участвует в ЭРН. Если допустить, что белки CSA и CSB способствуют превращению транскрипционного комплекса в репарационный [Lindahl T., ea, 1997, Bregman D.B., 1996], то следствием повреждения этих белков может стать дефектность в ТЭРН. Таким образом, либо прямыми воздействиями на коровый домен фактора ТFIIN (мутации в генах ХРВ, ХРD и TTDA), либо косвенными (через гены CSA и CSB) можно модифицировать способность этого фактора к диссоциации из РНК- полимеразного комплекса для участия в ТЭРН. Что касается белка ХРG, то он, подобно своему гомологу из *S. cerevisiae* - белку Rad2 [Bregman D.B., 1996], способен взаимодействовать с ТFIIN, что допускает возможность его воздействия на ТFIIN для участия

в ТЭРН. Таковы гипотетические объяснения взаимосвязи молекулярных дефектов при CS и TTD с нарушениями ТЭРН, которые могут быть полезными для раскрытия механизма ТЭРН у эукариот. Связь же между молекулярными дефектами и клиническими проявлениями рассматриваемых наследственных заболеваний пока не имеет даже упрощенных толкований [Kolodner R., 1995].

Так случилось, что изучение молекулярных механизмов ЭРН и ТЭРН на клетках человека развивались параллельно, или даже опережая исследования на популярной эукариотической модели дрожжей *S. cerevisiae*. Несомненно, однако, что при исследовании детального механизма ЭРН именно эта модельная система будет играть ведущую роль. Например, немаловажной особенностью системы ЭРН у *E. coli* является ее связь с SOS-функциями клетки. Действительно, центральные гены системы ЭРН, *uvrA* и *uvrB*, находятся под контролем SOS-регулона [Friedberg E.C., Walker G.C., ea., 1991]. Системы, подобной SOS, у эукариот пока не обнаружено. Однако целый ряд генов системы ЭРН у дрожжей, таких, как RAD2, RAD7, RAD23, CDC8 и CDC9, индуцируется при повреждении ДНК, а последние два гена дополнительно регулируются клеточным циклом [Friedberg E.C., Walker G.C., ea., 1995]. Природу этой индукции еще предстоит выяснить.

#### **Экцизионная репарация нуклеотидов ЭРН (NER): структура и функции белков**

В таблице 12.3 суммированы свойства белков животных, участвующих в NER. Большинство этих белков существует *in vivo* в виде комплексов, поэтому ферментативные активности, обнаруживаемые у отдельных белков в очищенном состоянии, могут не иметь прямого отношения к их функциям в системе NER.

ХРА - белок с молекулярной массой 31 кДа, обладает доменом типа «цинковые пальцы», участвует в распознавании поврежденного участка ДНК, взаимодействует с другими компонентами системы и может функционировать в качестве фактора нуклеации для экзонуклеазы. ХРА взаимодействует своим N-концевым доменом с гетеродимером ERCC1-XPF, а C-концевым доменом - с TFIIH.

Белок RPA (HSSB) образует комплекс с ХРА и усиливает его специфичность в отношении поврежденной ДНК. RPA (HSSB) - тример, состоящий из белковых субъединиц p70, p34 и p11, необходим для репликации ДНК и репаративного синтеза, а также для прохождения этапа двойного надреза ДНК во время экцизионной репарации. Он обладает умеренным сродством к поврежденной ДНК.

TFIIH - олигомерный комплекс, в состав которого входят белки p89, p80, p62, p44, p41, p38 и p34. Этот белковый комплекс был открыт как один из семи основных факторов транскрипции, необходимых для эффективного функционирования РНК-полимеразы II. Субъединица p89 идентична белку репаративного комплекса ХРВ. Обнаружено отсутствие функциональной комплементации между бесклеточными экстрактами клеток с мутантными белками ХРВ и ХРД, определяемой по восстановлению репарирующей активности в смешанных экстрактах. Комплекс TFIIH представляет собой фактор репаративной системы. Белки ХРВ и ХРД являются ДНК-зависимыми АТРазами, обладают хеликазными доменами и могут (как и сам фактор TFIIH) вызывать диссоциацию гибридов, образованных между короткими фрагментами ДНК и одноцепочечной ДНК.

**Таблица 12..3. Белки животных, участвующие в NER**

Белковая система	Белки системы	Ферментативная активность	Функция в репарации
XPA	XPA (p31)	Связывание ДНК	Распознавание повреждения
RPA	p70 p34 p11	То же	То же
TFIIH	XPB/ERCC3 (p89) XPD/ERCC2 (p80) p 62 p 44 Cdk7 (p41) CycH (p38) p34	ДНК-зависимая АТРаза Локальное расплетание ДНК Фактор транскрипции Киназа, активирующая Cdk	Образование преинцизионного комплекса Сопряжение транскрипции и репарации
XPC	XPC (p125)/ HHR23B (p112)	Связывание ДНК	?
XPF	XPF/ERCC4 (p112) ERCC1 (p33)	Эндонуклеаза	5'-Концевое надрезание ДНК
XPG	XPG/ERCC5 (p135)	»	3'-Концевое надрезание ДНК

XPC - белок с молекулярной массой около 125 кДа, существует в виде гетеродимера в комплексе с белком p58, который является гомологом белка Rad23 дрожжей (HHR23B). XPC слабо связывается с TFIIH и очень прочно - с одноцепочечной ДНК.

ERCC1/XPF - прочный белковый комплекс, с которым взаимодействует белок XPA, обладающий эндонуклеазной активностью, специфичной в отношении одноцепочечной ДНК.

XPG - белковый комплекс, обладающий эндонуклеазной активностью, специфичной в отношении одноцепочечной ДНК; вовлекается в эксцизионный комплекс посредством взаимодействия с TFIIH и RPA.

### **PARP (ПАРП): модели управления процессом эксцизионной репарации ДНК**

ПАРП - один из первых ядерных факторов, распознающих повреждение ДНК, и поэтому в идеальном случае управляет запуском механизма репарации ДНК в живых клетках с места повреждения ДНК. Эта модель поддерживается идентификацией ЭР-комплекса, включающего ПАРП, XRCC1, ДНК-лигазу III и ДНК-полимеразу бета. Присутствие ПАРП в таком мультипротеиновом комплексе доказывает, что этот фермент может направлять аппарат репарации ДНК к сайтам повреждения ДНК *in vivo* и облегчает осуществление репарации по этому пути.

XRCC1-белок действует как молекулярные «леса», формируя ЭР-комплекс путем индивидуального взаимодействия с каждым компонентом. С тех пор, как была обнаружена возможность поли(АДФ-рибозил)ирования XRCC1-белка *in vitro*, можно предпо-

ложить, что ПАРП способен регулировать активность комплекса путем модифицирования XRCC1-белка *in vivo* и нарушать его способность взаимодействовать с другими компонентами комплекса. Было показано, что сверхэкспрессия XRCC1-белка подавляет активность ПАРП в живых клетках.

Аналогично ДНК-лигаза III ингибирует активность ПАРП *in vitro*, когда ее количества превышают количества ПАРП.

ПАРП может также рекрутировать факторы репарации ДНК путем модификации хроматиновых белков. Длинные цепи ПАР действительно способны направить ферменты репарации к сайтам разрывов ДНК значительно быстрее, нежели если они ищут повреждение сами по всему ядру. Такая модель согласуется с активностью ПАРП перед и/или после удаления поврежденных оснований.

#### **PARP (ПАРП): антирекомбинационная модель репарации ДНК**

Модель, описывающая потенциальную роль ПАРП в ЭР, была предложена Сато и Линдал (Sato and Lindahl, 1992). Согласно этой модели, ПАРП ингибирует репарацию ДНК и препятствует осуществлению рекомбинации ДНК. Путем взаимодействия с разрывами ДНК и поли(АДФ-рибозил)ирования соседних белков ПАРП способен специфически защищать концы ДНК от нуклеаз и/или рекомбинации. Это подтверждается примером дефицитных по гену ПАРП животных, на которых показано, что отсутствие ПАРП стимулирует рекомбинацию и приводит к увеличению случаев образования лимфомы. Однако было отмечено, что ингибирование ЭР и ингибирование рекомбинации - два различных процесса.

## **12.8. Пострепликативная репарация**

Гомологичная рекомбинация (ГР) имеет важное значение в делении клеток эукариот: растений, животных, грибов и протистов. В клетках, делящихся путем митоза, ГР является инструментом репарации повреждений ДНК, вызванных ионизирующим излучением или химическими веществами [Lodish H. et al., 2000]. Будучи неотрепарированными, эти повреждения способны привести к масштабной перестройке хромосом в соматических клетках [Griffiths AJF, 1999], а потом и к раку [Khanna K. K., Jackson S. P., 2001].

В 1968 году американцы У. Рапп и П. Ховард-Фландерс исследовали облученные УФ-светом бактерии, у которых был нарушен синтез эндонуклеаз, участвующих в эксцизионной репарации нуклеотидов. Опыты проводили в темноте для того, чтобы не мог осуществиться и процесс фотореактивации. Таким образом, после УФ-облучения в ДНК этих клеток оказывалось много невырезанных пиримидиновых димеров. В тот момент, когда ДНК-полимераза, ведущая репликацию, доходила до первого из них, она на 10 секунд застывала на месте. Этот обнаруженный Раппом и Ховардом-Фландерсом факт задержки синтеза был неоднократно подтвержден другими исследователями. Необходимо сознавать, что задержка на 10 секунд весьма значительна, так как репликация у кишечной палочки идет со скоростью 1000 нуклеотидов в секунду. Затем ДНК полимеразы каким-то образом ухитрялась перебраться за пиримидиновый димер и возобновить синтез позади повреждения. Тоже самое повторялось и перед следующим димером. В результате такого перемещения ДНК-полимеразного комплекса и после-

дующего ресинтеза формируется дочерняя ДНК с бреши, то есть участок дочерней нити, иногда длиной в несколько генов, оказывается неувдвоенным, причем в родительской нити напротив брешы так и остается нерепарированное повреждение ДНК. Такая ситуация может привести клетку к гибели, и чтобы этого избежать, в клетке включается специальный механизм, основанный на рекомбинации, в процессе которой белок RecA ведет гомологичное спаривание нитей. Из изначально свободной от дефектов комплементарной нити матричной ДНК, на которой процесс репликации ДНК был правильно завершен, вырезается участок ДНК, равный по длине участку брешы, и встраивается в брешь. Затем лигазы соединяют концы вставленного фрагмента с концами нормально синтезированного участка дочерней нити. После этого другие ферменты репарации устраняют дефект в исходно поврежденной нити. Одновременно брешь, оставшаяся после вырезания участка из родительской нити, застраивается ДНК полимеразой I. Эта модель, представленная на рисунке 12.9, как мы уже говорили, описывает только один из механизмов пострепликативной репарации.

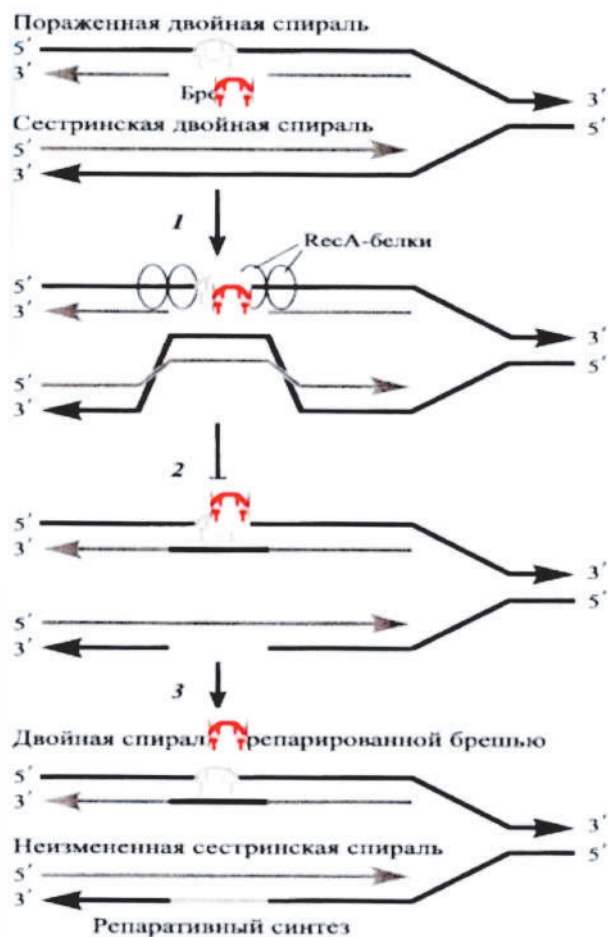


Рисунок 12.9. Пострепликативная репарация ДНК [Сойфер, 1997]



В дополнение к устранению повреждений гомологичная рекомбинация (ГР), как уже было отмечено, обеспечивает генетическое разнообразие при мейотическом делении с последующим образованием гамет и спор. Центральную роль здесь играет кроссинговер, в результате которого хромосомы обмениваются участками ДНК [Nelson DL, Cox MM., 2005; Marcon E., Moens P. B, 2005]. Благодаря этому появляются новые, возможно, полезные комбинации генов, которые могут дать потомству эволюционное преимущество [Альбертс и др., 2013].

Чаще всего кроссинговер начинается, когда белок Spo11 [Inagaki A, Schoenmakers S, Baarends WM (May 2010)] делает целевые двойные разрезы в цепи ДНК строго определённым образом, преимущественно в промоторах и GC-обогащённых областях [Longhese M. P., et al., 2009]. Обычно эти области находятся в так называемых горячих точках рекомбинации – участках, состоящих из приблизительно 1000–2000 пар оснований и имеющих высокую частоту рекомбинации. Отсутствие горячих точек рядом с двумя генами в одной и той же хромосоме часто означает, что эти гены будут унаследованы будущими поколениями в равной пропорции [Cahill L. P., Mariana J. C., Mauléon P., 1979].

**Данный вариант пострепликативной репарации** использует рекомбинацию для получения неповрежденной копии генетического материала. Этот тип репарации ДНК был открыт в клетках мутантов *E. coli*, неспособных вырезать тиминовые димеры.

После действия ультрафиолета в таких клетках с помощью **ДНК-полимеразы III** синтезируется ДНК с одноцепочечными пробелами - брешами, которые исчезают при последующей инкубации клеток в питательной среде за счет рекомбинации между двумя сестринскими дуплексами. У *E. coli* эти обмены осуществляются с помощью продуктов генов *hes* (A, B и C). Кроме них, в заключительном этапе ресинтеза и сшивания участвуют ДНК-полимераза I и лигаза.

Эта система играет особенно важную роль у **эукариот**, обеспечивая возможность копирования даже с поврежденной матрицы (хотя и с увеличенным количеством ошибок). Одна из разновидностей этого типа репарации ДНК- рекомбинационная репарация.

**Механизм пострепликативной репарации ДНК**, происходящей уже в первые минуты после облучения, наименее специфичен, так как отсутствует этап узнавания повреждения. Это быстрый способ восстановления нативной структуры, по крайней мере, части дочерних молекул ДНК. Таким образом, данная система позволяет полностью пройти процессу репликации на матрице поврежденной ДНК, но не удаляет повреждения: оно остается в исходных родительских цепях и может быть удалено на других этапах клеточного цикла, например, с помощью эксцизионной репарации.

У эукариот процесс пострепликативной репарации существенно сложнее, причем репаративные реакции могут идти различными путями, один из которых приводит к появлению **мутаций** (является мутагенным) и, вероятно, связан с ДНК-полимеразами, способными вести синтез на поврежденной матрице. Этот механизм еще иногда называют «проходом» повреждения. В то же время накопленные экспериментальные данные показывают, что существует и механизм зашивания брешей без ошибок, причем преимущественным механизмом является безошибочный обход повреждения.

Очевидно, что есть момент «решения», каким именно путем будет идти пострепликативная репарация.

К настоящему времени сложилось представление, что ключевую роль в процессах пострепликативной репарации и выборе того или иного ее пути у эукариот играет убиквитинирование вовлеченных белков

### Rad6-зависимая пострепликативная репарация

Процесс пострепликативной репарации (PRR, post replication repair) у дрожжей называется еще Rad6-зависимой репарацией, так как была обнаружена группа белков, эпистатически связанных с Rad6 и вовлеченных в этот процесс. Rad6-зависимый путь контролируется белками Rad6 и Rad18, образующими гетеродимер, способный к связыванию с ДНК и обладающий убиквитин-связывающей активностью.

Rad5 является ДНК-связывающим белком, который привлекает комплекс Ubc13/Mms2 к ДНК, а также служит связующим звеном между комплексами Ubc13/Mms2 и Rad6/Rad18. Белок Rad18 обладает способностью связываться с одонитевой ДНК, таким образом комплекс Rad6Rad18 способен связаться с остановившейся вилкой репликации, так как там имеется одонитевой «хвост». При этом Rad6 может убиквитинировать белки остановившегося комплекса репликации.

Мутагенный путь пострепликативной репарации основан на способности полимераз семейства  $\gamma$  вести синтез на поврежденной матрице. Это процесс аналогичный SOS-репарации у прокариот. Вероятнее всего, убиквитинирование процессивной ДНК-полимеразы  $\delta$  необходимо для ее деградации или перемещения, позволяющего полимеразам  $\gamma$ -семейства занять ее место и провести синтез на поврежденной матрице.

Безошибочный путь пострепликативной репарации состоит из одного из вариантов синтеза на поврежденной матрице (Rad30-зависимого) и путей обхода повреждений, для которых необходимы белки Rad5, Mms2, Ubc13, Srs2, а также ДНК-полимераза- $\delta$ , PCNA и некоторые белки гомологической рекомбинации. Схема этого процесса предложена на рис.12.10.

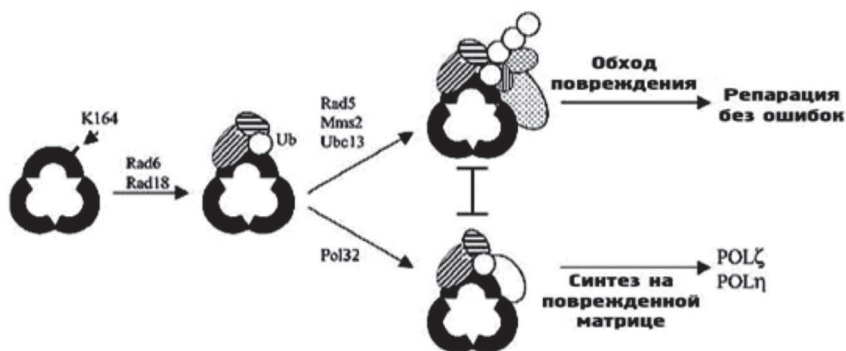


Рисунок 12.10. Два пути пострепликативной репарации у эукариот

Возможно, что сам Rad51 является ингибитором одонитевого отжига по прямым повторам (вытесняя Rad52). Вероятно, Rad51-зависимую рекомбинацию можно считать репликацией, индуцированной разрывами. Мишенью для Rad51 могут служить не только одонитевые бреши, но и отождённые друг на друге вновь синтезированные сестринские хроматиды остановившейся вилки репликации, так как там есть двунитевые концы, или просто разрушающаяся вилка с двойными концами ДНК.

Роль чекпойнт-сигналов и привлечения факторов репарации в процессах пострепликативной репарации до конца неясна.

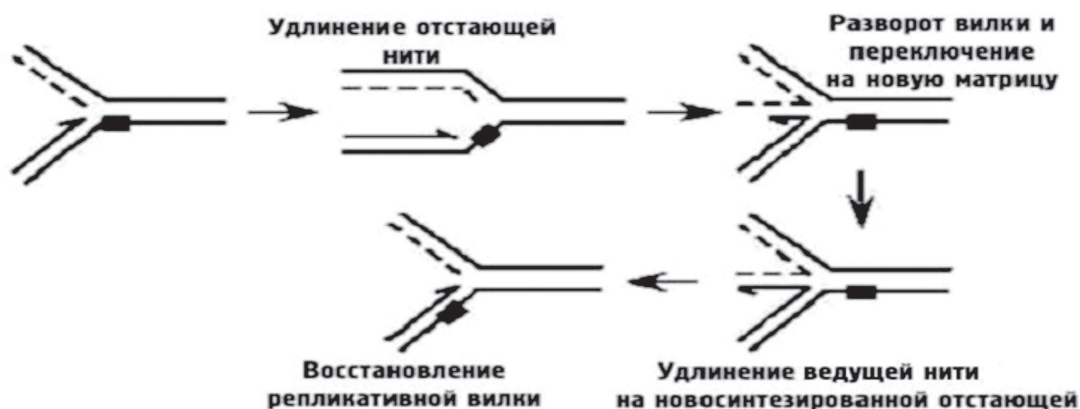
### **Модель прохода повреждения с переключением матрицы. Репарации поврежденных вилок репликации и ресинтез.**

Гетеродимер Rad6/Rad18 совершенно необходим для работы любой системы, способной успешно завершать репликацию поврежденной ДНК. Мутанты по обоим этим генам крайне УФ-чувствительны и неповрежденные новосинтезированные нити ДНК в них после УФ-облучения не образуются.

Специфическая для структуры Холлидея геликазная-эндонуклеазная активность, способствующая ее разрешению, связана с комплексами Rad1/XPF и Mus81-Mms4. Одновременно оба эти комплекса способны к распознаванию остановившейся вилки репликации (выглядеющей как вилка с «хвостом») и не проявляют сродства к обычным вилкам репликации. Вероятно, комплекс Mus81-Mms4 привлекается в район остановившейся вилки репликации белками чекпойнт-ответа, а его эндонуклеазная активность может участвовать в процессах, направленных на продолжение репликации. Для этого предложено множество моделей.

Белок Mgs1 (WHIP) является еще одним из возможных участников специального субпути PRR. Это ДНК-независимая АТФаза, способная образовывать комплекс с ДНК-полимеразой- $\delta$  и геликазой Sgs1 (так же как человеческий WHIP с WRN), появляется в районе остановившейся репликативной вилки и способствует проходу репликативным комплексом зоны повреждения. Схематически эти модели изображены на рисунках 12.11 и 12.12.

Первый способ, изображенный на рисунке 12.11, основан на том, что при остановке вилки репликации перед повреждением на лидирующей нити, синтез на отстающей может продолжаться и приводить к появлению более длинного фрагмента вновь синтезируемой нити. Происходит разворот вилки с отжигом на сестринской хроматиде и продолжением синтеза лидирующей нити на вновь синтезированной отстающей. Как только лидирующая нить удлинится так, чтобы перекрыть остановившее продвижение вилки повреждение, вилка разворачивается обратно и матричные нити спариваются со вновь синтезированными. Таким образом синтез продолжается, а повреждение оказывается обойденным.



**Рисунок 12.11.** Модель обхода повреждения с восстановлением репликативной вилки (1).

На рисунке 12.12 показано, что этот процесс может проходить и несколько иначе.

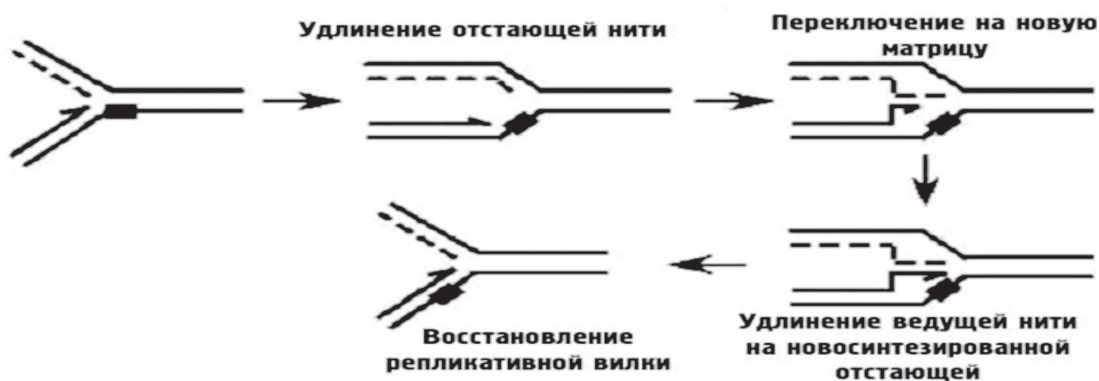


Рисунок 12.12. Модель обхода повреждения с восстановлением репликативной вилки (2).

При остановке вилки репликации перед повреждением на лидирующей нити, синтез на отстающей может продолжаться и приводить к появлению более длинного фрагмента вновь синтезируемой нити.

Эта вновь синтезированная нить может спариться со вновь синтезированной ДНК на лидирующей нити, так что вновь образованная ДНК на лидирующей нити сможет обойти повреждение. После прохождения поврежденного участка восстанавливается нормальная структура вилки репликации.

#### **Остановка репликации и ресинтез. Привлечение белков репарации**

Как мы уже неоднократно говорили, повреждения ДНК можно разделить на те, которые приводят к мутациям, но не способны остановить движение репликативной вилки, и те массивные повреждения ДНК, которые напрямую останавливают ее репликацию. Мы уже обсуждали возможные пути репарации таких повреждений и последующего ресинтеза. Индуцированная повреждениями ДНК остановка репликации приводит к привлечению многих белков репарации к месту повреждения, то есть к остановленной вилке репликации. Как именно происходит это привлечение до сих пор окончательно не ясно. Во время нормального процесса репликации ДНК PCNA (proliferating cell nuclear antigen) образует скользящий зажим и стимулирует процесс репликации ДНК-полимеразами. «Загрузка» PCNA на ДНК осуществляется так называемым «загрузчиком зажима» (clamp loader), которым является фактор репликации C (RFC). При аресте репликации многочисленные факторы могут выполнять функции PCNA и RFC. Функцию PCNA при репарации ДНК берет на себя, вероятнее всего, «зажим, специфический для поврежденной ДНК» (Rad9-1-1 комплекс), состоящий из белков Rad9, Hus1 и Rad1. Эти белки служат стыковочной платформой для многочисленных репарационных белков. Здесь уместно отметить, что Hus1 под действием ионизирующей радиации перемещается из цитоплазмы в ядро, где соединяется с PCNA и Rad9.

Другой человеческий белок Rad17 связан с хроматином еще до повреждения ДНК. В ответ на повреждение он фосфорилируется белком АТМ и затем способствует присоединению к хроматину комплекса Rad9-1-1. У человека и дрожжей показано непосредственное

объединение Rad17 с комплексом Rad9-1-1. Rad17 может замещать большую субъединицу комплекса RFC, образуя новый комплекс с малыми субъединицами RFC, обозначаемый Rad17– RFC. Комплекс Rad17– RFC функционирует как загрузчик зажима для Rad9-1-1 и таким образом указывает генам репарации на сайт повреждения. У дрожжей показано, что высокоошибочная низкопроцессивная полимераза DinB взаимодействует с белками Hus1Rad1, а их совместная ассоциация с хроматином является зависимой от Rad17.

## 12.9. SOS-система (регулон) у *E. coli*

Существуют системы генетической **репарации**, при которых точность синтеза невысока. Они являются индуцибельными, и, очевидно, обусловлены необходимостью синтеза ДНК даже на матрице, содержащей повреждения. При этом синтез ДНК на матрице, оставшейся неповрежденной, будет сопровождаться большим количеством ошибок. Индукцию процессов репарации, сопровождающуюся увеличением числа ошибок последней, обнаружил в 1953 г. Дж. Уэйгл (при заражении УФ-облученных клеток *E. coli* облученным же фагом X).

При прохождении репликативного комплекса через некодирующий или ошибочно кодирующий поврежденный участок ДНК наблюдается включение в синтезируемую цепь случайных или соответствующих мутантному участку нуклеотидов. Затем репликация ДНК продолжается в обычном режиме. Таким образом, появляются поврежденные участки ДНК.

У *E. coli* в ответ на повреждения ДНК происходит координированная экспрессия большого числа генов (примерно 26 белков). Такая реакция бактериальных клеток на генотоксические воздействия получила название SOS-ответа, а процесс образования мутаций - SOS- мутагенеза. В индукции SOS-ответа у *E. coli* определяющую роль играют ген *lexA* и ген *recA*. Белок *LexA* является репрессором гена *recA* и более 20 других генов и оперонов, составляющих SOS-регулон. В ответ на повреждение ДНК или ингибирование репликации, при прохождении ДНК- полимеразой поврежденного участка ДНК вырабатывается SOS-сигнал (рисунок 12.13).

Продукт гена *recA* связывается с одноцепочечными участками ДНК и в результате конформационного перехода обратимо превращается в активированную форму *RecA\**. Молекулы белка *LexA* диффундируют к *RecA\** и взаимодействуют с ним, что сопровождается протеолитическим расщеплением *LexA* вблизи середины его полипептидной цепи (связь Ala-84-Gly-85), что инактивирует *LexA* как репрессор. В результате происходит индукция *LexA*-зависимых генов SOS- регулона, репрессор *LexA*, связываясь с SOS-блоком (палиндромом длиной до 20 п.н.) в регуляторной части генов SOS-регулона, тормозит их экспрессию. Удивительна по разнообразию степень этого торможения, которая регулируется как количеством SOS- блоков, так и их «совершенством» (т.е. близостью к структуре идеального палиндрома), что, в конечном счете, позволяет поддерживать заданный уровень конститутивного синтеза конкретного белка.

Белок *RecA* в SOS-ответе участвует в формировании нуклеиново-белковых филаментов в местах одноцепочечных брешей на поврежденной ДНК. С этими филаментами могут соединяться белки *UmuD'* и *UmuC* в составе активного комплекса. В результате такого взаимодействия комплекс (*UmuD'*)<sub>2</sub>-*UmuC* осуществляет переключение репаративного синтеза ДНК с гомологичной рекомбинации на SOS-мутагенез.

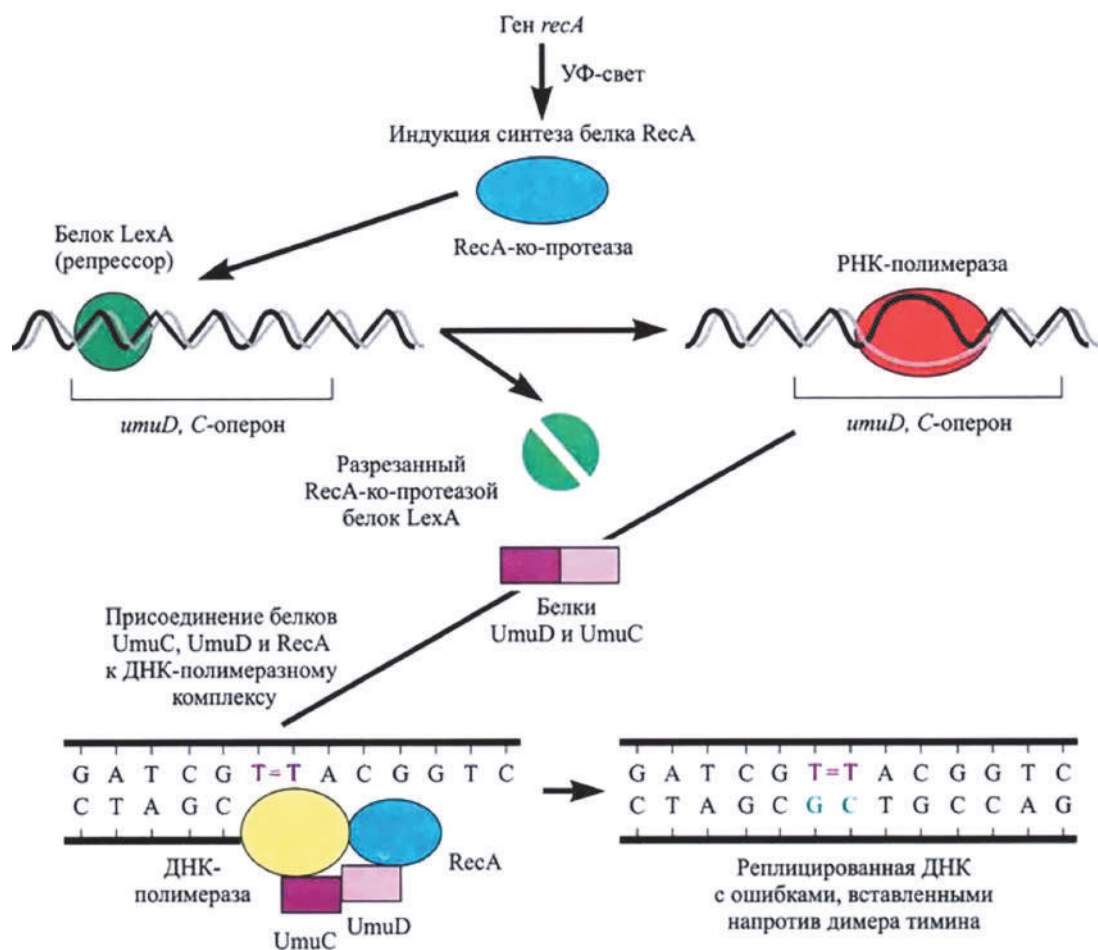


Рисунок 12.13. Индуцируемая УФ – светом SOS – репарация [Сойфер, 1997]

Среди других белковых компонентов системы SOS-мутагенеза *E. coli* необходимо отметить холофермент ДНК-полимеразы III, который проводит включение нуклеотидов в строящуюся цепь ДНК на поврежденном участке. Для нормального функционирования системы SOS-мутагенеза необходимы продукты генов *groEL* и *groES*, являющиеся молекулярными шаперонами. Их роль сводится к стабилизации и обеспечению правильного фолдинга белка UmuC.

Механизм SOS-индуцированного мутагенеза выяснен, хотя и далеко не во всех деталях [Friedberg E.C., Walker G.C., ea., 1991, Woodgate R., Levine A.S., 1996].

Как видно, белок RecA принимает участие в трех разных событиях: он индуцирует синтез белков UmuD и UmuC, расщепляет UmuD до активной формы UmuD' и обозначает место сборки мутасомы. Однако в основе этих событий лежит лишь одно свойство белка RecA - способность образовывать активный филамент в составе тройного комплекса RecA::ATP::онДНК. Это же свойство оказывается достаточным, чтобы

объяснить и другие события SOS-ответа, приводящие к изменчивости генома, такие, как повышенная частота рекомбинационных обменов, хромосомные перестройки и межвидовая рекомбинация.

Итак, SOS-система - генетическая программа изменения ДНК путем ее мутагенной репарации или рекомбинации с целью адаптации клетки к изменившимся внешним условиям, результатом чего является наращивание ее эволюционного потенциала.

## 12.10. Репарация ДНК и наследственные болезни

### Пигментная ксеродерма.

В 1964 г. была показана решающая роль **эксцизионной репарации** в восстановлении поврежденной ультрафиолетом ДНК *E. coli*. Было высказано предположение, что соответствующие механизмы у эукариот имеют более сложную организацию, поскольку призваны обеспечить более высокий уровень надежности. Уникальное значение систем репарации ДНК для нормального функционирования организма человека становится совершенно очевидным при анализе заболеваний, обусловленных нарушением работы репарационных механизмов.

Классический пример такого рода болезней - **пигментная ксеродерма** (ХР от англ. Xeroderma pigmentosum) - редкая, наследуемая по аутосомно-рецессивному типу патология. В результате повышенной чувствительности к солнечному свету (ультрафиолету) у больных уже в раннем возрасте появляются пигментация, сухость кожи, изъязвления, рубцы, а затем развивается рак кожи, включая меланомы и карциномы. Средний возраст появления первой опухоли у ХР-пациентов - 8 лет, а вероятность развития карцином слизистой рта в 20 000 раз превышает средние значения в популяции. Частота встречаемости заболевания в разных странах составляет от 1/250 000 человек до 1/40 000 человек.

Существенная особенность пигментной ксеродермы - наличие примерно у трети пациентов неврологических симптомов, обусловленных ранней гибелью нейронов, т.е. эксцизионная репарация играет важную роль в обеспечении продолжительности их жизни. Было обнаружено, что в клетках ХР-больных вырезание димеров у большинства пораженных, по-видимому, связано с нарушениями эксцизии или более ранней стадии - распознавания поврежденного участка. Выраженная гетерогенность ХР (клинических различий между разными пациентами с данным заболеванием) может быть обусловлена возникновением дефектов либо в различных сайтах одного и того же гена, либо в генах, кодирующих разные полипептиды. Для решения этой проблемы использовали метод непарной клеточной гибридизации фибробластов от разных ХР-больных.

**Анализ результатов** был основан на том, что дочерняя гибридная клетка, может осуществлять эксцизионную репарацию, если дефекты ферментов репарации связаны с разными локусами. В таком случае наличие одного неповрежденного фермента обеспечивается одним геномом, а другого - вторым геномом, взаимно компенсируя дефекты. Если же ферментативные дефекты идентичны, то даже при повреждении разных сайтов одного гена компенсация не возможна и гибридная дочерняя клетка будет иметь репарационный дефект. С помощью этого метода было идентифицировано 7 групп компле-

ментации (7 различных локусов) в случае дефектов генов эксцизионной репарации ХР (А, В, С, D, E, F, G), Между группами комплементации, и даже внутри одной комплементационной группы наблюдаются выраженные клинические различия. Большинство генов, мутации которых вызывают пигментную ксеродерму, известны, и соответствующие белки по своим функциям в целом сходны с ферментами прокариотической эксцизионной репарации.

Но частоты встречаемости разных групп **комплементации** в разных странах различны: в Европе наиболее распространена группа ХРС, в Японии - ХРА. Причем среди европейских пациентов не было обнаружено групп ХРВ и ХРF, а в Японии при таком же отсутствии группы ХРВ группа ХРF была представлена значительным количеством индивидов.

Продукт гена ХРА картирован в длинном плече девятой хромосомы (9q34.1), – это ДНК-связывающий белок, имеющий два цинковых «пальца». В облученных ультрафиолетом клетках ДНК-связывающие свойства этого белка усиливаются в 1000 раз. Показано, что для осуществления эксцизионной репарации необходимы С-конец и один из цинковых «пальцев». Белковым продуктом гена ХРВ, картированным в локусе q21 хромосомы 2 –(2q21), является геликаза, входящая в состав ТFПН-фактора транскрипции размером 89 кДа. Ген ХРС, картированный на хромосоме 3, кодирует белок Р125, функция которого пока не совсем ясна. Тем не менее, показано его участие совместно с полипептидом Р58 в восстановлении репарационной активности. Ген ХРD, подобно гену ХРВ, кодирует одну из субъединиц фактора транскрипции ТFПН размером около 87 кДа (общее число этих субъединиц не менее 5 и, вероятно, более 9). Ген ХРD картирован в локусе (q 13.2-q 13.3) хромосомы 19; его белковый продукт имеет геликазную активность. Ген ХРF, картированный в коротком плече хромосомы 16 - (16p 13.13), по-видимому, продуцирует эндонуклеазу, надрезающую ДНК с 5'-стороны. А продуктом гена ХРG, локализованного в длинном плече хромосомы 13 – (13q33), является эндонуклеаза, надрезающая ДНК с противоположной – 3'-стороны. Важно отметить, что повышенный риск новообразований уже в молодом возрасте, по ряду данных, связан с увеличением интенсивности УФ-излучения, вызывающим перегрузку эксцизионной системы репарации, которая успешно справляется с низким уровнем облучения. Так установлено, что для гетерозигот по пигментной ксеродерме вероятность возникновения рака кожи повышена на юге США, но не в других районах этой страны.

Установлено, что в клетках пациентов с **ХР пиримидиновые димеры** удаляются с такой же скоростью и эффективностью, что и в клетках здоровых доноров, т.е. при внешних признаках болезни дефекты эксцизионной репарации не обнаруживаются. У таких больных выявляется другое нарушение - полная репликация поврежденных участков ДНК. Подобный дефект пострепликативной репарации наблюдается и в других группах больных ХР, но в значительно меньшей степени. Таким образом, в случае ХР превалирующим фактором является изменение параметров репликации ДНК.

**Синдром Коккейна. Трихотиодистрофия. Генетические основы синдрома Коккейна и трихотиодистрофии.**

Три из семи групп комплементации (ХРВ, ХРD и ХРG) могут иметь внешние признаки другого наследственного заболевания аутосомно-рецессивного **синдрома**



**Коккейна (CS)**, в основе формирования которого лежат дефекты эндонуклеаз эксцизионного пути репарации. Синдром проявляется как карликовость при нормальном уровне гормонов роста. Кроме того, для больных характерны кальцификация костей черепа, атрофия зрительного нерва, глухота и ускоренное старение. Предположить дефект репарации у CS-пациентов позволила их необычная чувствительность к солнечному свету.

Третье заболевание, характеризующееся повышенной фоточувствительностью ДНК у его носителей (примерно у половины) – это наследуемая по аутосомно-рецессивному типу **трихотиодистрофия (TTD)**. Важнейший диагностический признак TTD - специфическая ломкость волос, обусловленная уменьшением содержания в них низкомолекулярных богатых серой белков. К этому основному клиническому проявлению следует добавить аномалии зубов и кожи, ихтиоз, дефекты полового развития, часто наблюдающиеся умственную и физическую отсталость, а также повышенную предрасположенность к раку кожи. Специфический паттерн волос при микроскопировании характеризуется чередованием темных и светлых полос (напоминает тигровый хвост).

**Белки с высоким содержанием серы** в таких волосах претерпевают не только количественные, но и качественные изменения. Они содержат меньше цистеина и имеют сильно измененный аминокислотный состав. Исследование в культуре клеток фоточувствительных пациентов с TTD показало, что дефект репарации в них соответствует дефекту уже рассмотренного белка XPD, Кроме того установлено, что часть фоточувствительных клеточных линий комплементирует как с XPD, так и с XP (A, C, E, F и G), а также восстанавливает свои репарационные функции при микроинъекции белка XPB. Среди больных TTD, страдающих повышенной фоточувствительностью, обнаружены индивиды, в культивируемых клетках которых вообще отсутствует комплементация с клетками XP. Это обстоятельство послужило стимулом для интенсивного изучения гена XPD у пациентов с пигментной ксеродермой и с трихотиодистрофией. Результатом проведенных исследований стала гипотетическая схема, предложенная в 1990 г. Б. Броутоном с соавторами. Согласно этой гипотезе, ген XPD **полифункционален**, а продукт принимает участие как в эксцизионной репарации, так и в РНК-полимераза II-зависимой транскрипции. В дальнейшем было показано, что, кроме белков XPB и XPD, в основе клинических проявлений может быть задействован еще один компонент транскрипционного комплекса TFIIH, состоящий из трех субъединиц. Кроме того, выявление большого количества TTD-пациентов, не страдающих повышенной фоточувствительностью, свидетельствует о наличии еще одной, четвертой, субъединицы TFIIH. Всесторонний анализ всех полипептидных компонентов транскрипционного комплекса TFIIH поможет определить роль каждого из них в формировании всевозможных комбинаций из перечисленных выше клинических признаков.

### Литература

1. Arnheim, N. and Shibata, D. (1997) DNA mismatch repair in mammals: role in disease and meiosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 7, 364-370.
2. Banerjee S. K., Borden A., Christensen R. B., LeClerc J. E., Lawrence C. W. SOS-dependent replication past a single trans-syn T-T cyclobutane dimer gives a different mutation spectrum and increased error rate compared with replication past this lesion in unduced cell // *J. Bacteriol.* – 1990. – 172. – P. 2105–2112.
3. Bresler S. E. Theory of misrepair mutagenesis // *Mutat. Res.* – 1975. – 29. – P. 467–472.
4. Cahill L. P., Mariana J. C., Mauléon P. Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates. (англ.) // *Journal of reproduction and fertility.* – 1979. – Vol. 55, no. 1. – P. 27–36.
5. Cannistraro V. J., Taylor J. S. Acceleration of 5-methylcytosine deamination in cyclobutane dimers by G and its implications for UV-induced C-to-T mutation hotspots // *J. Mol. Biol.* – 2009. – 392. – P. 1145–1157.
6. Carroll SB, Wessler SR, Griffiths AJF, Lewontin RC. Introduction to genetic analysis. – New York : W.H. Freeman and CO, 2008. – P. 534. .
7. D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva, Poirier G.G. (1999) Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem. J.* 342: 249-268.
8. Danilov V. I., Les A., Alderfer J. L. A theoretical study of the cis-syn pyrimidine dimers in the gas phase and water cluster and a tautomer – bypass mechanism for the origin of UV-induced mutations // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2001. – 19. – P. 179–191.
9. Farrington S. M., Tenesa A., Barnetson R., Wiltshire A., Prendergast J., Porteous M., Campbell H., Dunlop M. G. Germline susceptibility to colorectal cancer due to base-excision repair gene defects. (англ.) // *American Journal Of Human Genetics.* – 2005. – July (vol. 77, no. 1). – P. 112–119.
10. Fishel R., Lescoe M.K, Rao M.R, Copeland N.G et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. // *Cell.*-1993.-V.75.-N.5.-P. 1027-1038.
11. Fortini P., Dogliotti E. Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. (англ.) // *DNA Repair.* – 2007. – 1 April (vol. 6, no. 4). – P. 398–409.
12. Friedberg E. C., Walker G. C., Siede W., Wood R. D., Schultz R. A., Ellenberger T. DNA repair and mutagenesis. – part 3. Washington: ASM Press. – 2006. 2nd ed.
13. Friedberg E.C., Walker G.C., Siede W. // *DNA repair and mutagenesis*, Washington, D.C.: ASM Press, 1995. 698 p.
14. Fuss J. O., Cooper P. K. DNA repair: dynamic defenders against cancer and aging. (англ.) // *PLoS Biology.* – 2006. – June (vol. 4, no. 6). – P. e203–203.
15. Gellon L., Carson D. R., Carson J. P., Demple B. Intrinsic 5'-deoxyribose-5-phosphate lyase activity in *Saccharomyces cerevisiae* Trf4 protein with a possible role in base excision DNA repair. (англ.) // *DNA Repair.* – 2008. – 1 February (vol. 7, no. 2). – P. 187–198.
16. Gorb L., Podolyan Y., Dziekonski P., Sokalski W. A., Leszczynski J. Double-proton transfer in adenine-thymine and guanine-cytosine base pairs. A post-Hartree-Fock ab initio study // *J. Am. Chem. Soc.* – 2004. – 126. – P. 10119-10129.
17. Grebneva H. A. One of mechanisms of targeted substitution mutations formation at SOS-replication of double-stranded DNA containing cis-syn cyclobutane thymine dimers // *Environ. Mol. Mutagen.* – 2006. – 47. – P. 733–745.
18. Griffiths AJF. 8: Chromosome Mutations: Chromosomal Rearrangements // *Modern Genetic Analysis.* – W. H. Freeman and Company, 1999. – ISBN 0-7167-3118-5.
19. Haber J. E., Ira G., Malkova A., Sugawara N. Repairing a double-strand chromosome break by homologous recombination: revisiting Robin Holliday's model. (англ.) // *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences.* – 2004. – Vol. 359, no. 1441. – P. 79–86.

20. Hiom K. DNA repair: common approaches to fixing double-strand breaks. (англ.) // *Current biology* : CB. – 2009. – Vol. 19, no. 13. – P. 523–525.
21. Inagaki A, Schoenmakers S, Baarends WM (May 2010). «DNA double strand break repair, chromosome synapsis and transcriptional silencing in meiosis». *Epigenetics*. 5 (4): 255–66.
22. Jasin M., Rothstein R. Repair of strand breaks by homologous recombination. (англ.) // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. – 2013. – Vol. 5, no. 11. – P. 012740. – DOI:10.1101/cshperspect.a012740. – PMID 24097900. [исправить]
23. Khanna K. K., Jackson S. P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. (англ.) // *Nature genetics*. – 2001. – Vol. 27, no. 3. – P. 247–254. –
24. Kolodner R. // *TIBS*. 1995. V. 20. P. 397-401.
25. Lindahl T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362(6422) 709–715.
26. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. 12.5: Recombination between Homologous DNA Sites: Double-Strand Breaks in DNA Initiate Recombination // *Molecular Cell Biology*. – 4th. – W. H. Freeman and Company, 2000. – ISBN 0-7167-3136-3.
27. Longhese M. P., Bonetti D., Guerini I., Manfrini N., Clerici M. DNA double-strand breaks in meiosis: checking their formation, processing and repair. (англ.) // *DNA repair*. – 2009. – Vol. 8, no. 9. – P. 1127–1138.
28. Marcon E., Moens P. B. The evolution of meiosis: recruitment and modification of somatic DNA-repair proteins. (англ.) // *BioEssays* : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology. – 2005. – Vol. 27, no. 8. – P. 795–808.
29. Modrich P. Mismatch repair, genetic stability, and cancer. *Science*, 1994, v..266,№5193, p. 1959-1960
30. Modrich P. Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu. Rev. Genet.*, 1991, v. 25, p. 229-253.
31. Morita R., Nakane S., Shimada A., Inoue M., Iino H., Wakamatsu T., Fukui K., Nakagawa N., Masui R., Kuramitsu S. Molecular mechanisms of the whole DNA repair system: a comparison of bacterial and eukaryotic systems. (англ.) // *Journal Of Nucleic Acids*. – 2010. – 14 October (vol. 2010). – P. 179594–179594. – DOI:10.4061/2010/179594. – PMID 20981145. [исправить]
32. Nelson DL, Cox MM. *Principles of Biochemistry*. – 4th. – Freeman, 2005. – P. 980–981.
33. Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, et al.: Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 371 (6492): 75-80, 1994.
34. Palombo F., Iaccarino I., Nakajima E. et al. hMutSbeta, a heterodimer of hMSH2 and hMSH3, binds to insertion/deletion leaps in DNA. *Curr Biol* 1996;6:1181-1184.
35. Satoh, M. S. and Lindahl, T. (1992). Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature* 356, 356-358.
36. Starcevic D., Dalal S., Sweasy J. B. Is there a link between DNA polymerase beta and cancer? (англ.) // *Cell Cycle* (Georgetown, Tex.). – 2004. – August (vol. 3, no. 8). – P. 998–1001.
37. Wood, R.D. Nucleotide excision repair DNA synthesis by DNA polymerase epsilon in the presence of PCNA, RFC, and RPA//*Biochemistry*. -1995. -v. 34. -No. 15. -p.5011-5017.
38. Б. Альберте, А. Джонсон, Д. Льюис и др. Молекулярная биология клетки: в 3-х томах. – М. – Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», Институт компьютерных исследований, 2013. – Т. 1. – 808 с.
39. Кребе Дж., Голдштейн Э., Килпатрик С. Гены по Льюину. – М.: Лаборатория знаний, 2017. С. 397-399, 919 с.
40. Kuan CT, Liu SK & Tessman I (1991) Excision and transposition of Tn5 as an SOS activity in *Escherichia coli*. *Genetics* 128: 45-57

41. Kuan C. T., Tessman I. (1991) LexA protein of *Escherichia coli* represses expression of the Tn5 transposase gene. *J. Bacteriol.* ... *J. Bacteriol.* 174:6872–6877.
42. Trobner W, Piechocki R (1984) Selection against hypermutability in *Escherichia coli* during long term evolution. *Mol Gen Genet* 198: 177–178.
43. Бреслер С. Е., Ланцов В. А., 1978. Индуцибельная рекомбинация в *Escherichia coli* K-12 ... 1978. Т. 238. С. 715–717.
44. Rayssiguier C., Thaler D. S., Radman M. , 1989 The barrier to recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is disrupted in mismatch-repair mutants. *Nature* 342: 396–401.
45. Wood RD, Robins P, Lindahl T. Complementation of the xeroderma pigmentosum DNA repair defect in cell-free extracts. *Cell* 1988; 53:97–106. PubMedCrossRefGoogle Scholar. ...
46. Woodgate R, Levine AS. Damage inducible mutagenesis: recent insights into the activities of the Umu family of mutagenesis proteins. *Cancer Surv* 1996; 28:117–140. PubMedGoogle Scholar. 80.
47. Matic, I., Rayssiguier, C. & Radman, M. (1995). Interspecies gene. exchanges in bacteria: the role of SOS and mismatch repair systems in. evolution of species. *Cell* 80, 507–515.

**Контрольные вопросы (обратная связь):**

1. Какие типы Репарации существуют?
2. Каков Механизм световой репарации?
3. Какие виды и какие Механизмы эксцизионной репарации существуют?
4. Как и когда осуществляется Пострепликативная репарация?
5. Как и когда клетка использует SOS – репарацию?

## ГЛАВА 13

## ФАРМАКОГЕНЕТИКА

## 13.1. Успехи в предсказании лекарственных взаимодействий

**Фармакогенетика** (др.-греч. *φάρμακον* – лекарство и генетика) – раздел медицинской генетики, изучающий наследственные основы variability эффектов лекарственных средств [Курылев А. А., Андреев Б. В., 2012] и позволяющий предсказывать степень проявления возможных побочных эффектов действия лекарства в случае каждого пациента. Побочные эффекты, вызванные большинством препаратов, имеют прямые корреляции с известными полиморфизмами в генах, кодирующих ключевые метаболические белки, поэтому на данный момент фармакогенетика вызывает большой интерес в клинической практике.

Наряду с термином фармакогенетика, сейчас часто используется термин фармакогеномика. Данные области науки изучают одно и то же, но в качестве данных фармакогеномика использует последовательность полного генома человека, а фармакогенетика – все возможные последовательности [Ma Q., Lu A. Y., 2011].

**История**

Историю фармакогенетики можно проследить с античных времен, когда в 510 году до нашей эры Пифагор отметил проявление потенциально смертельной реакции на бобы не у всех людей, а лишь у некоторых. С тех пор произошло много событий, позволивших определить фармакогенетику как отдельное научное направление [Brausi M., Soloway M. S., 1991].

Год	Личность, сделавшая открытие	Событие
510 до нашей эры	Пифагор	Осознание опасности бобов в качестве пищи (впоследствии оказалось связано с недостаточностью глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы) [Nebert D. W., 1999]
1866	Мендель	Установление законов наследственности [Mendel JG., 1866]
1906	Гаррод	Публикация «Врожденные ошибки метаболизма» [Garrod A.E.B., 1906]
1932	Снайдер	Характеристика «неспособности ощущать вкус фенилтиокарбамида» как аутосомно-рецессивной болезни [Snyder L.H., 1932]
1956	Карсон et al.	Открытие недостаточности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [Alving A. S., Carson P. E., Flanagan C. L., Ickes C. E., 1956]
1957	Мотульски	Уточнение концепта, что наследственные дефекты метаболизма могут объяснить индивидуальные различия в ответе на лекарственную терапию [Motulsky A. G., 1957]

1957	Кэлоу и Дженест	Характеристика недостаточности псевдохолинэстеразы [Kalow W., Genest K., 1957]
1957	Фогель	Изобретение термина «фармакогенетика» [Vogel F., 1959]
1960	Прайс Эванс	Характеристика ацетилаторного полиморфизма [Muller F., Boué A., 1990]
1962	Кэлоу	Публикация «Фармакогенетика – Наследственность и ответ на лекарственную терапию» [Kalow W., 1962]
1977/79	Махджуб et al. and Айхельбаум et al.	Открытие полиморфизма дебрисокингидроксилазы и спартеиноксидазы [Mahgoub A., et al., 1977; Eichelbaum M., et al., 1979]
1988	Гонзалез et al.	Характеристика генетического дефекта в дебрисокингидроксилазе, позже названного CYP2D6 [Gonzalez F. J., et al., 1988]
1988–2000		Определение специфичных полиморфизмов в ферментах различных фаз лекарственного метаболизма и в лекарственных транспортёрах
2000	Проект «Геном Человека»	Завершение первого черновика генома человека [Venter J. C., et al., 2001; Lander E. S., et al., 2001]
2000	The International SNP Map Working Group	Завершение карты вариаций последовательности генома человека, содержащей 1.42 миллиона однонуклеотидных полиморфизмов [Sachidanandan R., et al., 2001]

Большинство лекарственных препаратов, вызывающих побочные эффекты, имеют взаимосвязь с известными полиморфизмами в геномах ключевых метаболических белков. Терапевты и онкологи используют фармакогенетическое тестирование для подбора лекарств и выбора стратегии лечения.

Plavix – пролекарство, одним из активных компонентов которого является ингибитор агрегации тромбоцитов. Препарат является лидером продаж в мире и часто используется для предотвращения атеротромбических осложнений. Но несмотря на распространенность, известно, что для определенной группы людей он имеет жесткие ограничения в дозировке принимаемого препарата [Shuldiner A. R., et al., 2009]. Исследование GWAS провели взаимосвязь между геном **CYP2C19** и отклонениями в метаболизме препарата. Ученые выяснили, что Plavix вызывает у пациентов преждевременное свертывание, если принимающий имеет определенный полиморфизм в геноме.

Как известно, **витамин Е** – это жирорастворимый витамин, который выполняет множество функций в организме человека. Было доказано, что витамин Е может оказывать как положительное, так и отрицательное действие на организм диабетика в зависимости от генотипа человека. Гаптоглобин – это антиоксидант, нейтрализующий окислительную активность гемоглобина. Существует две аллели этого белка: аллель 2 про-

являет менее окислительные свойства, чем аллель 1. В связи с чем диабетики с генотипом гаптоглобин 2-2 имеют более повышенный риск заболевания сердечно-сосудистыми заболеваниями. Также данный белок является важным звеном в поддержании функционирования липопротеинов высокой плотности – липопротеинов, убирающих холестерин из крови. В свою очередь, витамин Е увеличивает их активность. Таким образом, у человека с генотипом гаптоглобин 2-2 витамин Е значительно повышает функцию ЛВП, чем при менее активном гаптоглобине, что снижает риск сердечно-сосудистых заболеваний. Но при генотипе гаптоглобин 2-1 витамин Е и гаптоглобин совместно повышают функционирование ЛВП, что приводит к увеличению риска сердечно-сосудистых заболеваний [Farbstein D., et al., 2011].

Полиморфизм вблизи гена интерферона человека может предсказать эффективность искусственного лечения **гепатита С**. Для генотипа 1 гепатит С лечится пегилированным интерфероном-альфа-2а или пегилированным интерфероном-альфа-2б (коммерческие названия: Пегасис и Пегинтрон) в комбинации с Рибавирином. Было показано, что генетические полиморфизмы вблизи IL28B гена, кодирующего интерфероновую лямбду 3, существенно влияют на реакцию пациента в ответ на лечение. Вполне вероятно, что больные гепатитом С генотипа 1, имеющие определенные генетически различные аллели около гена IL28B, поддаются вирусологическому ответу после лечения лучше, чем другие, и было показано, что те же самые генетические различия также связаны с естественным разрешением гепатита С генотипа 1 [Thomas D. L. et al., 2009].

### **Фармакогенетика в онкологии**

Фармакогенетика является мощным инструментом в клинической онкологии, поскольку у большинства противораковых препаратов очень узкий терапевтический спектр использования, и пациенты с ослабленным состоянием могут испытывать детоксикацию от лекарств. На практике генетические дерегуляции связаны с генами DPD, UGT1A1, TPMT, CDA и CYP2D6. Так, на основе геномных данных подбирают терапию, связанную с выбором между таким препаратом как 5-FU и капецитабином, иринотеканом, меркаптопурином и азатиоприном, гемцитабином и капецитабином, АгаС и тамоксифеном [Yang C. G., et al., 2011].

### **Интеграция фармакогенетики в здравоохранение**

Несмотря на многочисленные успехи медикаментозного лечения, большинство лекарств не тестируется с помощью GWAS [Frueh F. W., et al., 2008]. Однако было установлено, что более 25% распространенных лекарственных методов опираются на генетическую информацию, которая может быть использована в области медицины. Если персонализированная медицина станет широко распространена, то лекарственная терапия будет более эффективной и менее дорогостоящей за счёт прекращения выписывания рецептов препаратов, которые были признаны безрезультатными или сильно опасными из-за побочных эффектов, появляющихся у определённых генотипов. Для фармацевтических компаний очень затратно останавливать производство лекарства из-за того, что небольшая часть населения испытывает сильные побочные действия, но при помощи фармакогенетики возмож-

на разработку и лицензирование препарата, предназначенного специально для той группы людей, которые генетически предрасположены к вредоносным побочным эффектам.

Способность анализировать ДНК индивидуума, чтобы определить, может ли конкретное лекарство усвоиться организмом, имеет применение во всех областях медицины. Фармакогенетика – это потенциальное решение по предотвращению значительного количества смертей, происходящих ежегодно из-за побочных эффектов медикаментов. Компании или лаборатории, ответственные за проведение таких тестов, могут проанализировать лекарства любых направлений – гипотензивное, антиангинальное или диуретическое – и показать, какие лекарства организм может нормально усваивать, а какие вызывают явные отклонения. Лишь единожды проведенный анализ даст такую ценную информацию как обобщение о генетических полиморфизмах индивидуума, что может помочь в экстренных ситуациях [Dr Soram Khalsa..2015].

### **Этика**

Фармакогенетика стала неоднозначной темой в области биоэтики. По сути, это нововведение не только для медицины, но и для всей общественности – она может оказать огромное влияние на общество, так как предполагает изменение стандартных методов лечения как распространенных, так и редких заболеваний. В связи с этим уже возникают некоторые вопросы этического плана, многие из которых, стоит заметить, находят решение. Такого рода этические вопросы, возникшие с внедрением фармакогенетики, можно разделить на три группы. Во-первых, как именно изменится разработка лекарств и будут ли тесты доступны для всех пациентов [Breckenridge A., et al.,2004]. Вторая проблема касается конфиденциальности хранения и использования генетической информации [Yip R., Scanlon K., Trowbridge F., 1992]. В-третьих, будут ли пациенты иметь какой-либо контроль над подобными тестами.

Фармакогенетика – новый процесс, который может улучшить лекарственную терапию, при этом существенно снизив вероятность проявления побочных эффектов. Но этические проблемы проводимых тестов всё ещё остаются под вопросом и требуют введения жёсткой политики в будущем [Breckenridge Alasdair, et al.,2004].

**Фармакогеномика** – отрасль фармацевтики и фармакологии, которая исследует влияние генетической вариации каждого человека в его ответе на лекарственное средство. Фармакогеномика связывает экспрессию конкретного гена или однонуклеотидного полиморфизма в геноме человека с эффективностью или токсичностью лекарства, для того, чтобы разработать рациональные средства оптимизации фармакотерапии.

Фармакогеномика учитывает генотипы людей для обеспечения максимальной эффективности при минимальных побочных действиях. Подобный подход в будущем может привести к созданию «персонализированной медицины», в которой лекарственные средства и их сочетания будут оптимизированы для генетических характеристик конкретного человека. Фармакогеномика – это прикладное применение



ние всего генома человека, в котором фармакогенетика исследует взаимодействия отдельного гена с лекарствами.[Середенин С. Б., 2004].

Разработки фармакогеномики в настоящее время применяют при лечении рака молочной железы, ВИЧ, лейкемии, для выявления потенциальных побочных реакций в ответ на действие лекарственных препаратов.

На сегодняшний день есть немногим более 100 лекарств, взаимодействие которых с ДНК FDA признало проверенным и значимым [Эрик Тополь, 2016].

### История

История фармакогеномики начинается с 1957 г., когда Арно Мотульски (Arno G. Motulsky) предположил, что «... идиосинক্রазия по отношению к лекарственным средствам может быть вызвана генетическими особенностями и дефицитом ферментов, ничем другим себя не проявляющими...». В 1959 г. Фридрих Фогель (Friedrich Vogel) ввел термин «фармакогеномика» для деятельности по изучению клинически значимых наследственных особенностей.

## 13.2. Метаболизм лекарства, эффективность и токсичность

**Фармакогенетика** изучает индивидуальные различия в ответах на лекарства, обусловленные аллельными вариациями в генах, определяющих метаболизм лекарства, эффективность и токсичность. Это направление как раздел **экологической медицинской генетики и клинической фармакологии** зародилось в результате практической потребности разобраться в осложнениях лекарственного лечения. Клиническая фармакология накапливала наблюдения патологических реакций на лекарства, а медицинская генетика расшифровывала механизмы их возникновения.

Врач сталкивается с **повышенной чувствительностью** индивида к лекарству, похожей на передозировку, хотя больному назначена доза, соответствующая его возрасту и полу; с **частичной** или **полной толерантностью больного к лекарству**, даже несмотря на увеличение дозы; с **парадоксальными реакциями** на лекарство, включающими совсем другие осложнения, чем те, которые могли бы быть обусловлены механизмами действия лекарства. Основные положения фармакогенетики были сформулированы в 1950-1970 гг. Термин «фармакогенетика» был введен в 1958 г. немецким ученым Ф. Фогелем. Развитие фармакогенетики основывалось на регистрации нежелательных лекарственных реакций с их анализом сначала клинико-генеалогическим и близнецовым методами, а в последующем – молекулярно-генетическим. При этом изучался не только конечный патологический фенотип, но и биохимические ступени метаболизма лекарства, что давало возможность понять сущность нежелательных лекарственных реакций и их ключевые точки.

**Для понимания фармакогенетических закономерностей необходимо усвоить принципы биотрансформации (детоксикации) ксенобиотиков.** Все ступени биотрансформации лекарственных средств осуществляются соответствующими ферментами и белками. Список основных из них представлен в таблице 13.1.

**Таблица 13.1. Ферменты и белки биотрансформации лекарственных средств**

I фаза	II фаза	Транспортеры
Цитохромы P450 ДПДГ Бутирилхолинэстераза (псевдохлинэстераза) PON ADH и ALDH и другие ферменты, отвечающие за микросомальное окисление	UGT NAT тпмт SULT Глутатионтрансферазы Эпоксидгидролазы	Гликопротеин Р Транспортные системы олигопептидов, нуклеотидов, органических анионов, органических катио- нов, множественной лекарственной устойчивости

Примечание. ДПДГ – дигидропиримидиндегидрогеназа. SULT – сульфотрансфераза.

Генетическое разнообразие человека – основа индивидуальных различий биотрансформации ксенобиотиков, к которым и относятся лекарства. Следовательно, теоретической базой фармакогенетики является **функциональная геномика человека**, а именно сведения о полиморфизме генов, вовлеченных в биотрансформацию лекарств и в генетический контроль их взаимодействия. Таким образом, основная задача фармакогенетики – изучение аллельных вариантов генов, определяющих индивидуальные особенности фармакокинетических и фармакодинамических характеристик организма. Расшифровка генома человека и прогресс фармакологии выдвинули фармакогенетику на одно из первых мест в **персонализированной медицине** (индивидуализированное лечение).

Индивидуальные вариации в ответе на лекарства осуществляются двумя путями. Во-первых, за счет **фармакокинетических процессов** (всасывания, транспортировки, метаболизма и выведения лекарства или метаболитов). Во-вторых, за счет **фармакодинамики** лекарства. Вследствие аллельных вариаций наблюдаются различия в мишенях (рецепторах, энзимах) или метаболических путях. Таким образом, говоря обобщенно, фармакогенетика изучает любые генетически детерминированные вариации в ответе на лекарства в отношении эффективности и токсичности.

Генетический полиморфизм определяет три главных фенотипа метаболиторов (лиц, принимающих лекарства): экстенсивные, медленные и быстрые.

**Экстенсивные метаболиторы** – индивиды с нормальной скоростью метаболизма рассматриваемых лекарственных средств. К этой группе принадлежит большинство населения. Они являются чаще всего гомозиготами по «дикому» аллелю соответствующего фермента.

**Медленные метаболиторы** (иногда нулевые) характеризуются сниженной скоростью метаболизма рассматриваемого лекарственного средства. С генетической точки зрения они являются гомозиготами (при аутосомно-рецессивном типе наследования) или гетерозиготами (при аутосомно-доминантном типе наследования) по мутантному

(«медленному») аллелю соответствующего фермента. У таких лиц синтез фермента отсутствует или синтезируется неактивный («дефектный») фермент, в результате чего лекарственное средство накапливается в высоких концентрациях, что и приводит к появлению нежелательных побочных реакций. Отсюда ясно, что для медленных метаболизаторов доза лекарства должна быть меньшей или назначают другое лекарство.

**Быстрые** (или сверхактивные) **метаболизаторы** характеризуются повышенной скоростью метаболизма определенных лекарств. В основном это гомозиготы (при аутосомно-рецессивном типе наследования) или гетерозиготы (при аутосомно-доминантном типе наследования) по «быстрому» аллелю соответствующего фермента. Достаточно часто встречаются индивиды с копиями функциональных аллелей, что также приводит к повышенному метаболизму лекарства. Быстрый метаболизм лекарства не позволяет при стандартных дозах достичь его терапевтической концентрации в крови, поэтому доза лекарства для быстрых метаболизаторов должна быть выше, чем для нормальных метаболизаторов.

### 13.3. Фармакогенетические закономерности I фазы биотрансформации

Наибольшее значение в вариациях фармакокинетических реакций имеет **цитохром P450**, обеспечивающий I фазу метаболизма лекарств. Цитохром P450 – большое семейство из 56 дифференциально функциональных ферментов, каждый из которых кодируется отдельным геном *CYP*. С фармакогенетической точки зрения особенно важны шесть генов – *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6* и *CYP3A4*. Они ответственны за I фазу биотрансформации 90% широко распространенных лекарств. Например, *CYP3A4* вовлечен в метаболизм более 40% всех лекарств, используемых в клинической медицине, а *CYP2D6* метаболизирует более 70 различных лекарств. Вполне понятно, что все вариации в метаболизме обусловлены аллелями с различной функциональной значимостью. Есть аллели, повышающие метаболизм, другие понижают его, а третьи вообще не участвуют в биотрансформации. В таблице 13.2 приведены избранные примеры полиморфных генов цитохрома P450, участвующих в метаболизме лекарств.

**Таблица 13.2. Примеры генов цитохрома P450, вовлеченных в метаболизм лекарств**

Геи	Наличие аллелей			Лекарства (избранные примеры)
	Повышающих метаболизм	Понижающих метаболизм	Нулевая активность	
<i>CYP1A2</i>	+	+	-	Кофеин (?), пропранолол
<i>CYP2C9</i>	+	+	+	Блокаторы рецептора ангиотензина II, нестероидные противовоспалительные средства, метронидазол (?), оральные гипогликемические, варфарин

<i>CYP2C19</i>	-	+	+	Антиэпилептические, антидепрессанты, анксиолитики
<i>CYP2D6</i>	+	+	+	Антиаритмические, антидепрессанты, антипсихотические, β-адренергические блокаторы, наркотические анальгетики
<i>CYP3A4</i>	+	+	+	Парацетамол, противогрибковые, кокаин, кодеин, циклоспорин А, диазепам, эритромицин, статины, паклитаксел, варфарин

Более подробные сведения о семействе цитохрома P450 и биотрансформации лекарств представлены в книге В.Г. Кукеса, Н.П. Бочкова «Клиническая фармакогенетика», гл. 2.

Генетические вариации в I фазе биотрансформации отмечены по следующим ферментам – ДПДГ, PON, псевдохолинэстеразе (бутирилхолинэстеразе), ADH, ALDH.

ДПДГ отвечает за восстановление урацила и тимидина, а также метаболизирует фторурацил, применяемый в составе комбинированной химиотерапии злокачественных новообразований многих органов. Низкая активность ДПДГ – причина осложнений лечения фторурацилом. Эта особенность наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Молекулярно-генетическими исследованиями выявлены мутации в гене, кодирующем синтез ДПДГ, наличие которых приводит к сниженной активности фермента и, следовательно, к повышенной чувствительности к фторурацилу. Распространенность мутантных гомозигот определена только в Японии. Она составляет 1:10 000 населения. Гетерозиготы, по-видимому, также имеют сниженный уровень ферментов. Современные представления о генетическом полиморфизме ДПДГ позволяют рекомендовать внедрение фенотипирования и генотипирования этого фермента в генетическую практику.

PON – фермент из группы арилэстераз – метаболизирует фосфорорганические антихолинэстеразные соединения (параоксон, метифосфакол, дихлорвос, зарин, табун и др.), эфиры уксусной кислоты (фенилацетат, тиофенилацетат, венилацетат и др.), органофосфорные соединения (EPN-оксон, этилнитрофенилэтилфосфонат), карбаматы (севин, N-диметилкарбамилфлуорид). Генетический полиморфизм PON не вызывает сомнений. Из известных 3 изоформ PON наиболее важным с фармакогенетической точки зрения является PON1. Мутация в этом гене (Gln192Arg) ведет к повышенной чувствительности к фосфорорганическим соединениям. Распространенность этой мутации достаточно высокая: среди испанского населения – 16%, североамериканского – 9%, японского – 41,4%. Именно высокой частотой мутации у японского населения объясняется большое число жертв после применения зарина при террористическом акте в токийском метро в 1995 г.

**Псевдохолинэстераза** (бутирилхолинэстераза) катализирует реакцию гидролиза ацетилхолина. В фармакогенетике этот фермент давно уже известен в

связи с его участием в гидролизе деполяризирующего миорелаксанта суксаметония, широко применяющегося в анестезиологии. В гене бутирилхолинэстеразы (аномальной псевдохлинэстеразы) обнаружено несколько мутаций, которые ведут к синтезу фермента со сниженной активностью, а это приводит к продолжительной остановке дыхания (апноэ) при применении суксаметония (вместо 2-3 мин – 2 ч и более). Наследуется эта аномальная реакция по аутосомно-рецессивному типу. Повышенная чувствительность к суксаметонию наблюдается у гомозигот. Разные мутации этого гена ведут к апноэ разной длительности, и гомозиготы встречаются с разной частотой (от 1 : 3000 до 1 : 150 000). Частота гомозигот по всем мутантным аллелям, определяющим сниженную активность бутирилхолинэстеразы, согласно литературным данным, следующая: у европейцев – 1 : 2500, у чехов и словаков – 1 : 400, у жителей Ирана и Ирака – 1 : 400. Распространенность гетерозигот следующая: у европейцев 2-4 : 100, у чехов и словаков – 7 : 100, у жителей Ирана и Ирака – 10 : 100.

Профилактика осложнений, вызываемых мутантными формами псевдохлинэстеразы, может осуществляться путем фенотипирования с помощью так называемого дибукаинового теста или путем генотипирования, поскольку структура гена и мутаций хорошо изучена. Генетическая и биохимическая расшифровка данного фармакогенетического варианта позволяет точно выявить лиц с повышенной чувствительностью к суксаметонию и обеспечить безопасность его применения.

**ADH** экспрессируется в печени и является ключевым ферментом в окислении этанола и других спиртов до альдегидов. Ген этого фермента хорошо изучен, особенно его полиморфный вариант G141A. Следовательно, возможна и его ПЦР-диагностика. Аллель А обуславливает повышенную активность фермента, что ведет к накоплению альдегидов (весь алкоголь «перерабатывается»), которые обладают выраженным токсическим эффектом. Такие индивиды имеют резко повышенную чувствительность к этиловому спирту и поэтому менее подвержены алкоголизму. Даже небольшие дозы алкоголя ведут к сильнейшему отравлению.

**ALDH** экспрессируется в печени в двух формах: ALDH-1 (цитозольная) и ALDH-2 (митохондриальная). С генетической точки зрения лучше изучен ген *ALDH-2*, мутации в котором ведут к алкогольной интоксикации. Фермент ALDH-2 вовлечен в патогенез различных злокачественных новообразований, связанных со злоупотреблением алкоголем. Распространенность мутантных форм *ALDH-2* очень высокая среди населения монголоидной расы (до 50%). Молекулярно-генетическая диагностика гетеро- и гомозигот по патологическим мутациям возможна.

### 13.4. Фармакогенетические закономерности II фазы биотрансформации

Во II фазе биотрансформации лекарственных средств осуществляется конъюгация их или их метаболитов с эндогенными веществами с образованием гидрофильных конъюгатов.

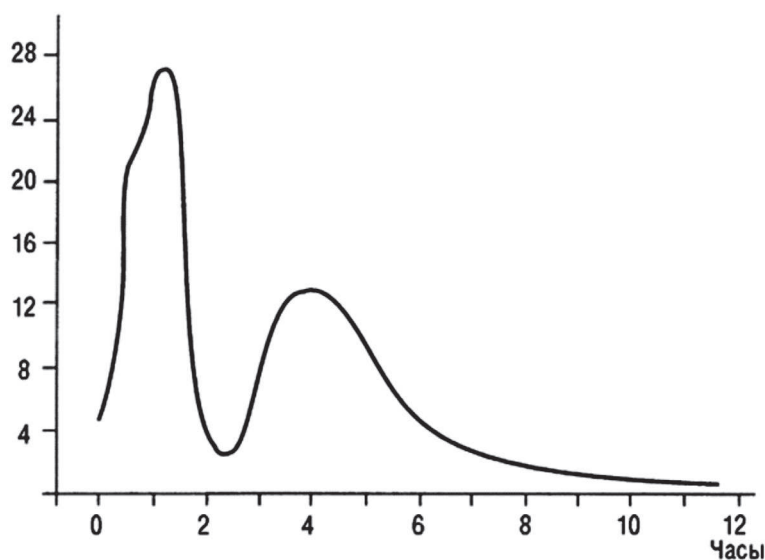
**Глюкуронирование** является наиболее важной реакцией II фазы метаболизма

лекарств. К лекарственному средству присоединяется УДФ за счет катализа с помощью ферментов [УДФ- глюкуронилтрансферазы (UGT)], включающих два семейства и более 20 изоферментов. Они катализируют большое число лекарств (морфин, хлорамфеникол, парацетамол и др.), их метаболитов, гормонов, пестицидов, канцерогенов. Физиологической функцией UGT является глюкуронирование эндогенных соединений (например, билирубина). Глюкуронированию подвергаются лекарственные средства из следующих групп:

- фенолы (пропофол, парацетамол);
- спирты (хлорамфеникол, кодеин, оксазепам);
- алифатические амины (ламотриджин, амитриптилин);
- карбоновые кислоты (фенилбутазон и др.);
- карбоксильные кислоты (напроксен, кетопрофен).

Наследственное нарушение глюкуронирования билирубина наблюдается при синдромах Жильбера и Криглера-Найяра. Мутации в гене *UGT1* приводят к синтезу UGT с активностью на 25-30% меньшей по сравнению с нормой, поэтому у больных с синдромом Жильбера наблюдается снижение клиренса толбутамида, парацетамола, рифампицина. Другие генетические полиморфизмы (мутации) генов, кодирующих разные изоформы UGT, влияют на фармакокинетику и фармакодинамику лоразепама, морфина, карведилола и других лекарств. Исследование полиморфизма гена *UGT1A1* разрешено в США для коррекции терапии иринотеканом (высокоэффективным цитостатиком) с целью профилактики развития гипербилирубинемии.

**Ацетилирование.** Эта реакция осуществляется двумя NAT (NAT1 и NAT2). N-ацетилтрансфераза (NAT1) не обладает генетическим полиморфизмом, а для NAT2, напротив, важная роль в фармакогенетике хорошо доказана. Ген локализован в хромосоме 8p23, известно более 20 мутантных аллелей. В зависимости от активности фермента NAT2 все люди разделяются на «быстрых», «промежуточных» и «медленных» ацетиляторов. Впервые фармакогенетические закономерности *NAT2* были установлены в 1960-е годы на примере лечения изониазидом больных туберкулезом. У «медленных» ацетиляторов обнаруживается повышенная чувствительность не только к изониазиду, но и к сульфаниламидам, ариламинам, гидразинам, к некоторым антиаритмическим и другим препаратам. Механизм токсического действия препаратов связан с медленным выведением лекарств из-за сниженной скорости ацетилирования, а следовательно, и выведения препарата. Происходит накопление препарата (рисунок. 13.1).



**Рисунок 13.1.** Распределение индивидов по скорости ацетилирования изониазида: по оси абсцисс – время после введения, часы; по оси ординат – число лиц

Распространенность «медленных» ацетиляторов составляет 10-15% у монголоидного населения и почти 50% у населения европеоидной расы. Помимо ассоциации полиморфизма гена *NAT2* с неблагоприятными побочными эффектами лекарств, обнаружена также связь с различными многофакторными заболеваниями. Частота рака мочевого пузыря в 2-3 раза выше у «медленных» ацетиляторов, чем у «быстрых», а среди последних почти в 2 раза чаще встречается колоректальный рак.

**S-метилирование.** Реакцию S-метилирования катализирует фермент ТПМТ. Это основной путь метаболизма эффективных цитостатиков (меркаптопурина, азатиоприна и тиогуанина). Ген *TPMT* хорошо изучен (локализован в хромосоме 6q22.3). Хотя низкая эффективность ТПМТ наследуется по аутосомно-рецессивному типу, повышенная чувствительность к тиопуринам отмечается не только у гомозигот, но и у гетерозигот. Известно уже 8 различных аллелей, кодирующих фермент с низкой активностью, что ведет к нарушению метаболизма меркаптопурина. При наличии таких аллелей требуется снижение стандартной дозы цитостатика в 2-4 раза. Распространенность гомозигот по всем аллельным вариантам гена *TPMT* среди европейского и афроамериканского населения составляет 4-5%. Безопасные дозы меркаптопурина для пациентов гомозигот по мутантным аллелям в 10-15 раз ниже среднетерапевтических, для гетерозигот – в 2-4 раза. Для обеспечения безопасности химиотерапии меркаптопурином (острый лимфобластный лейкоз, лимфомы) необходимо проводить фенотипирование (активность ТРМТ в эритроцитах) или генотипирование на мутантные варианты гена *TPMT*. В клиниках Европы и США одна из этих процедур типирования является обязательной перед началом лечения.

**Сульфатирование.** В организме человека сульфатированию подвергаются фено-

лы (экзогенные), гормоны щитовидной железы, катехоламины, некоторые стероидные гормоны. Идентифицировано 40 изоферментов SULT, которые кодируются 10 генами. С фармакогенетической точки зрения наибольший интерес представляют две формы изофермента. SULT1A1 метаболизирует парацетамол, морфин, продукты распада лидокаина, эстрадиол и другие лекарственные препараты фенольной структуры. Субстратами SULT1A3 являются допамин, серотонин, норэпинефрин и некоторые другие соединения. Хотя обнаружен широкий генетический полиморфизм SULT, данных об ассоциации полиморфизмов генов этих ферментов с дозами соответствующих лекарственных препаратов пока не выявлено.

**Водная конъюгация.** Эту реакцию, важнейшую в детоксикации большого количества ксенобиотиков, катализирует фермент эпоксидгидроксилаза (EPAX). Известны две его изоформы и их гены. Большая часть водной конъюгации токсических метаболитов лекарственных препаратов (например, фенитоина) осуществляется с помощью EPAX1. Обнаружен генетический полиморфизм *EPAX1*. Точечная мутация является причиной снижения активности фермента (меньше 30% от нормы), что ведет к повышенному риску врожденных пороков развития, если женщина во время беременности принимает фенитоин. Медленный аллель *mEPHX1* встречается примерно у 6% европейского населения. У носителей мутаций нарушен процесс окисления ксенобиотиков. Выявлена ассоциация этого аллеля с заболеваниями органов дыхания, особенно у курильщиков (рак, эмфизема, обструктивные пневмонии), а также с нарушениями в репродуктивной системе (спонтанные аборт, рак яичников).

**Конъюгация с глутатионом.** Среди лекарственных препаратов конъюгации с глутатионом подвергаются этакриновая кислота и гепатотоксический метаболит парацетамола – N-ацетилбензохинонимин, превращающиеся в нетоксические соединения. Ассоциации между аллельными вариантами генов и изменениями фармакологического ответа представлены в таблице 13.3.

**Таблица 13.3. Ассоциации между аллельными вариантами генов глутатион-S-SH-трансфераз и изменениями фармакологического ответа (по Кукесу В.Г. и Бочкову Н.П., 2007)**

Ген	Аллельные варианты	Изменение активности фермента	Лекарственные средства	Изменение фармакологического ответа
<i>GSTT1</i>	Нулевые аллели	Снижение активности глутатион-трансферазы <i>GSTT1</i>	Пиоглитазон*	Гепатотоксичность



<i>GSTM1</i>	Нульсвыс аллели	Снижение активности глутатион-трансферазы <i>GSTM1</i>	Пиоглитазон*	Гепатотоксичность
			Пеницилламин	Повышение эффективности терапии ревматоидного артрита
<i>GSTP1</i>	<i>GSTP*А/*В</i>	Снижение активности глутатион-трансферазы <i>GSTP1</i>	Доцетаксел	Миелотоксичность

Конъюгацию с глутатионом катализируют ферменты глутатион-S-SH-трансферазы (GST). Выделено пять изоферментов GST, ген *GSTM1* принимает важнейшее участие в инактивации канцерогенов. Распространенность носителей нулевого аллеля, у которых отсутствует экспрессия *GSTM1*, составляет 40-45% у европейского населения и 60% – у негроидного.

Глутатионопосредованная детоксикация имеет важнейшее значение в сохранении резистентности клеток к перекисному окислению липидов, алкилированию белков, освобождению от свободных радикалов, а также она предотвращает поломки ДНК. Таким образом, глутатион-D-SH-трансферазы прежде всего представляют интерес с эко-токсикологической точки зрения. Их значение в фармакогенетике требует дальнейшего изучения.

### 13.5. Фармакогенетические закономерности транспорта лекарственных средств (III Фаза Биотрансформации)

Ферменты, обеспечивающие фармакокинетические функции всасывания, распределения и выведения из организма лекарственных средств, называют «транспортерами лекарств». К ним относятся гликопротеин P, транспортеры органических анионов и катионов и др. Характеристика основных транспортеров лекарственных средств (название, локализация, функция, лекарственные средства и их метаболиты-субстраты, ингибиторы, индукторы) представлена в книге В.Г. Кукеса и Н.П. Бочкова (с. 218-226).

Наибольший интерес с фармакогенетической точки зрения представляет полиморфизм гена *MDR1*- *Multidrug resistance gene*, кодирующий **гликопротеин P** (локус 7q21.1). Этот фермент контролирует выброс различных ксенобиотиков из клетки, препятствует всасыванию лекарственных средств из кишечника. Субстратами гликопротеина P являются сердечные гликозиды, блокаторы медленных кальциевых каналов, статины, макролиды, цитостатики, противовирусные препараты. Полный перечень субстратов, индукторов и ингибиторов гликопротеина P представлен в книге В.Г. Кукеса и Н.П. Бочкова (с. 214-217). Четыре ОНП гена *MDR1* изучены детально (таблица 13.4).

Наиболее значимой мутацией гена *MDR1* является C3435T. Замена цитозина на ти-

мин в 26-м экзоне ведет к серьезному нарушению функции гликопротеина Р, что может быть причиной тяжелой интоксикации в случае применения многих лекарств. Частота аллелей и генотипов по полиморфному аллелю С3435Т значительно варьирует в разных этнических группах, в том числе на территории РФ.

Хотя многое из фармакогенетики гликопротеина Р еще требует клинической проверки, но на основании уже проведенных исследований обнаружены ассоциации полиморфных маркеров с изменением фармакологического ответа на многие лекарства. Эти результаты представлены в табл. 13.5 (по В.Г. Кукесу и Н.П. Бочкову). Отсюда следуют приведенные ниже практические рекомендации фармакологов клиницистам при обнаружении у пациента полиморфного маркера (Сычев Д.А. и др., 2007):

- следует снижать дозу лекарств-субстратов гликопротеина Р с узкой терапевтической шириной (дигоксин, циклоспорин);
- не следует применять лекарства-субстраты гликопротеина Р, нежелательные лекарственные реакции которых связаны с их проникновением через гистогематические барьеры (фексофенадин, лоперамид);
- назначать препараты с низкой биодоступностью, так как они могут оказаться у лиц с мутациями наиболее эффективными (статины, ингибиторы ВИЧ-протеиназы);
- назначать препараты, мишени которых расположены в ЦНС, а проникновение через гематоэнцефалический барьер затруднено, так как у этой категории они могут оказаться наиболее эффективными (противосудорожные, галоперидол).

**Таблица 13.4. Полиморфные маркеры гена, кодирующего гликопротеин Р**

Полиморфный маркер	Экзон	Изменения и нуклеотидной последовательности ДНК	Результат полиморфизма
G2677T	21	2677GT	Ala893Ser
G2677A	21	2677GA	Ala893Thr
C1236T	12	1236CT	Снижение экспрессии
C3435T	26	3435CT	Снижение экспрессии

Исходя из вышеизложенных сведений о генетическом полиморфизме гликопротеина Р, необходимость их использования для индивидуализации лечения не вызывает сомнений.

К транспортерам лекарственных средств также относятся трансмембранные белки – транспортеры органических анионов и катионов. К субстратам этих транспортеров относятся широко применяемые лекарства (антибиотики, диуретики, противовирусные, противоопухолевые средства, статины). Ассоциации между носительством аллельных вариантов гена *OATP-C* (органический анионтранспортирующий полипептид С) и не-

благоприятным фармакологическим ответом представлены в таблице 13.6 (по Кукесу В.Г. и Бочкову Н.П., 2007).

**Таблица 13.5. Ассоциации между носительством генотипов по полиморфным вариантам гена MDR1, кодирующим гликопротеин P, и изменением фармакологического ответа**

Полиморфные маркеры	Изменение активности транспортера	Лекарственные средства	Изменение фармакологического ответа
C3435T G2677G G2677A C1236T	Снижение активности гликопротеин P/ экспрессии гена <i>MDR1</i>	Дигоксин	Гликозидная интоксикация
		Лопурамид	Миоз (сужение зрачка)
		Циклоспорин	Нефротоксичность, нейротоксичность
		Такролимус	Нейротоксичность
		Фексофенадин	Сонливость
		Блокаторы медленных кальциевых каналов	Гиперплазия десен
		Доцетаксел	Миелотоксичность
		Ингибиторы протонного насоса	Усиление антисекреторного действия
		Антиконвульсанты	Повышение эффективности лечения эпилепсии
		Галоперидол	Повышение эффективности лечения шизофрении
		Антагонисты 5-ТНЗ рецепторов (трописетрон, ондансетрон, гранизетрон)	Усиление противорвотного действия
		Аторвастатин	Усиление гиполипидемического действия
		Нслфинавир	Усиление антиретровирусного действия
MDR1-h4		Флувастатин	Более интенсивное снижение холестерина ЛПНП
MDR1-h10			Менее интенсивное снижение концентрации триглицеридов

**Таблица 13.6. Ассоциации носительства генотипов гена OATP-C с изменением фармакологического ответа**

Полиморфизмы	Изменение активное и транспортера	Лекарственные средства	Изменение фармакологического ответа
OATP-C*1b, OЛTP-C*15, T521C, G-11127A	Снижение активности OATP-C	Правастатин, аторвастатин, симвастатин	Ослабление гиполипидемического действия
T1628G	Снижение активности OATP-C	Правастатин, аторвастатин	Повышение риска развития миопатий
G-11187A	Снижение активности OATP-C	Репаглинид	Гипогликемия

В фармакокинетике (всасывание, распределение, выведение) лекарственных средств принимают участие и другие транспортеры (олигопептидов, нуклеозидов, множественной лекарственной устойчивости), генетический полиморфизм которых в настоящее время интенсивно изучается.

Более подробную информацию о фармакогенетике препаратов для лечения сердечно-сосудистых заболеваний и антитромботических препаратов можно посмотреть в статьях В.В. Ляхович с соавт. «Основы фармакогенетики в клинике сердечно-сосудистых заболеваний» и О.В. Сироткиной с соавт. «Фармакогенетика антитромботических препаратов» на компакт-диске.

### 13.6. Фармакодинамика и генетический полиморфизм

Мутации в генах, кодирующих белки-мишени для лекарственных средств (рецепторы, ферменты, ионные каналы), ведут к изменениям фармакологического ответа. Эти генетические полиморфизмы активно изучаются и сведения о них уже применяются в клинической практике. Перечислим некоторые из наиболее изученных полиморфизмов (табл. 13.7).

**Таблица 13.7. Примеры аномальных ответов у носителей мутаций в фармакодинамических реакциях**

Мишень	Патологические проявления или изменение ответа у носителей мутаций
$\beta_2$ -Адренорецептор	Отсутствие бронхолитического эффекта при применении короткодействующих агонистов $\beta_2$ -адренорецепторов
АПФ	Ингибиторы АПФ у больных гипертонией менее эффективны у лиц с генотипом Ю

$\beta_2$ -Брадикининовые рецепторы	Осложнение в виде сухого кашля на фоне лечения гипертонии ингибиторами АПФ
Ионные каналы	Удлинение интервала $Q-T$
Г6ФДГ	Гемолиз эритроцитов при применении многих лекарств
Рианодиновые рецепторы 1-го типа	Злокачественная гипертермия при применении местных анестетиков, средств для ингаляционного наркоза

Примечание. АПФ – ангиотензинпревращающий фермент.

Таким образом, генетический полиморфизм играет существенную роль в вариациях фармакодинамических процессов.

### Заключение

Как известно, судьба лекарств в организме определяется всасыванием, распределением (по органам, клеткам, органеллам), взаимодействием с клеточными элементами, метаболизмом и выведением. Все ступени кинетики лекарства и динамики его действия осуществляются с помощью специфических и неспецифических ферментов и белков. Учитывая широкий биохимический полиморфизм человеческих популяций, можно предполагать, что судьба каждого лекарства на каком-то фармакокинетическом или фармакодинамическом этапе связана с полиморфной системой фермента, белка, рецептора и других клеточных мишеней. Это и обуславливает весьма разнородные реакции индивидов на лекарства.

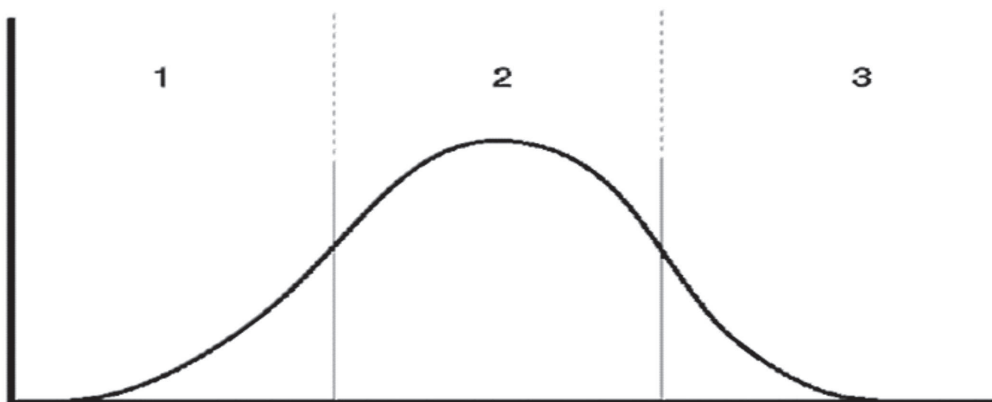
С фармакологической точки зрения вариации ответов на лекарства могут быть обусловлены изменением либо метаболизма лекарств в организме, либо динамики их действия (нарушение клеточных мишеней лекарств).

По поводу аномалий метаболизма лекарств (первая группа) можно сказать, что генетическая детерминация ферментов, обеспечивающих метаболизм или фармакокинетику лекарств, не вызывает сомнений. Возникновение мутаций в таких генах приводит к отсутствию синтеза фермента или потере его ферментативной активности. Как правило, эти мутации наследуются по аутосомно-рецессивному типу, поэтому дефект фермента проявляется только у гомозигот, следовательно, не очень часто, хотя в некоторых популяциях частота мутантного аллеля и соответственно частота лиц с патологической реакцией на лекарства могут быть высокими.

Вторая группа неадекватных реакций на лекарства – это фармакологические эффекты через взаимодействие с белками-мишенями, такими, как рецепторы, ферменты, белки сигнальной трансдукции, контроля клеточного цикла и других событий. Молекулярно-генетическими исследованиями показано, что многие гены, кодирующие такие лекарственные мишени, полиморфны. Их мутантные формы приводят соответственно к нарушению специфических взаимодействий лекарства и мишени, а отсюда и к аномальной реакции на уровне организма.

Во многих работах показано, что судьба большинства лекарств определяется функ-

ционированием нескольких взаимодействующих генов, поэтому кривые распределения индивидов в зависимости от концентрации лекарств в крови при введении стандартной дозы соответствуют кривым полигенного наследования (Рисунок. 13.2). В этих случаях фармакогенетический подход мало применим для индивидуализации лекарственной терапии.



**Рисунок 13.2.** Распределение индивидов по концентрации лекарства в плазме крови после введения стандартной дозы при полигенной детерминации: по оси абсцисс – условная концентрация вещества в плазме; по оси ординат – условное число лиц; 1 – отсутствие эффекта от лекарства; 2 – оптимальный эффект; 3 – токсический эффект

Как было показано в данной главе, число генов, мутации в которых ведут к фармакогенетическим последствиям, достаточно большое, и перечень их постоянно пополняется. Патологические реакции на лекарства касаются разных функций и систем организма при разных заболеваниях. Следовательно, ознакомление с фармакогенетикой необходимо врачу любой специальности. Знание фармакогенетических особенностей обеспечит лучшую эффективность и большую безопасность назначаемой лекарственной терапии. Однако для этих целей необходима разработка недорогих, быстрых, адаптированных к клинической практике методов тестирования аллельных вариантов соответствующих генов (генотипирование) или концентрации лекарств (фенотипирование).

Что касается методов генотипирования, то в их основе лежит ПЦР-реакция, а современные разработки по созданию биочипов делают реальным и доступным обследование пациента на фармакогенетические варианты в еще более широком масштабе. В онкологической практике во многих странах используются биочипы для тестирования пациентов с повышенным риском токсичности цитостатических препаратов на основе меркаптопурина. В США применяется несколько фармакогенетических тестов для индивидуализации выбора лекарственных средств и их доз (антидепрессантов, нейролептиков, меркаптопурина, варфарина и других лекарств).

Безусловно, в некоторых случаях практичнее ориентироваться на методы фенотипирования ферментов и продуктов биотрансформации (изониазидовый тест, антипириновый тест, дибукаиновый тест).

В заключение следует подчеркнуть, что фармакогенетика решает не все проблемы персонализации лекарственной терапии. Анализ ситуации на сегодня показывает, что предсказательным гено- и фенотипированием может быть обеспечено примерно 15-20% случаев индивидуального подбора лекарств или их доз, что позволяет избежать нежелательных лекарственных реакций. Для 15-40% случаев анализ генетического полиморфизма имеет меньшее значение из-за полигенного влияния на исход лекарственного лечения, а для 50% пациентов фармакогенетический подход никак не будет влиять на подбор лекарств, потому что другие физиологические и средовые факторы влияют сильнее, чем наследственные.

### Литература

1. Генетический паспорт – основа индивидуальной предиктивной медицины / под ред. В.С. Баранова. – СПб.: Изд-во Н-Л, 2009. – 527 с.
2. Середенин С.Б. Лекции по фармакогенетике. – М.: МИА, 2004. – 303 с.
3. Сычев Д.А., Раменская Г.В., Игнатъев И.В., Кукес В.Г. Клиническая фармакогенетика // под ред. В.Г. Кукеса, Н.П. Бочкова: учеб. пос. -М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 245 с.
4. Сычев Д.А., Савельева М.И., Кукес В.Г. Проблема внедрения фармакогенетики в реальную клиническую практику: Медицинская гентика. – 2008. – № 1. – С. 21-27.
5. Эрик Тополь. Будущее медицины: Ваше здоровье в ваших руках. – М.: Альпина нон-фикшн, 2016. – 491 с.
6. Курылев Алексей Александрович, Андреев Борис Владимирович Фармакогенетические особенности эффективности и безопасности применения галоперидола и рисперидона (обзор литературы) // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 11. Медицина. – 2012-01-01. – Вып. 3.
7. Ma Q., Lu A. Y. Pharmacogenetics, pharmacogenomics, and individualized medicine. (англ.) // Pharmacological reviews. – 2011. – Vol. 63, no. 2. – P. 437–459.
8. Shuldiner A. R., O'Connell J. R., Bliden K. P., Gandhi A., Ryan K., Horenstein R. B., Damcott C. M., Pakyz R., Tantry U. S., Gibson Q., Pollin T. I., Post W., Parsa A., Mitchell B. D., Faraday N., Herzog W., Gurbel P. A. Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy. (англ.) // JAMA. – 2009. – Vol. 302, no. 8. – P. 849–857.
9. Farbstein D., Blum S., Pollak M., Asaf R., Viener H. L., Lache O., Asleh R., Miller-Lotan R., Barkay I., Star M., Schwartz A., Kalet-Littman S., Ozeri D., Vaya J., Tavori H., Vardi M., Laor A., Bucher S. E., Anbinder Y., Moskovich D., Abbas N., Perry N., Levy Y., Levy A. P. Vitamin E therapy results in a reduction in HDL function in individuals with diabetes and the haptoglobin 2-1 genotype. (англ.) // Atherosclerosis. – 2011. – Vol. 219, no. 1. – P. 240–244.
10. Thomas D. L., Thio C. L., Martin M. P., Qi Y., Ge D., O'Huigain C., Kidd J., Kidd K., Khakoo S. I., Alexander G., Goedert J. J., Kirk G. D., Donfield S. M., Rosen H. R., Tobler L. H., Busch M. P., McHutchison J. G., Goldstein D. B., Carrington M. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. (англ.) // Nature. – 2009. – Vol. 461, no. 7265. – P. 798–801.
11. Yang C. G., Ciccolini J., Blesius A., Dahan L., Bagarry-Liegey D., Brunet C., Varoquaux A., Frances N., Marouani H., Giovanni A., Ferri-Dessens R. M., Chefrou M., Favre R., Duffaud F., Seitz J. F., Zanaret M., Lacarelle B., Mercier C. DPD-based adaptive dosing of 5-FU in patients with head and neck cancer: impact on treatment efficacy and toxicity. (англ.) // Cancer chemotherapy and pharmacology. – 2011. – Vol. 67, no. 1. – P. 49–56.
12. Frueh F. W., Amur S., Mummaneni P., Epstein R. S., Aubert R. E., DeLuca T. M., Verbrugge R. R., Burckart G. J., Lesko L. J. Pharmacogenomic biomarker information in drug labels approved by the

United States food and drug administration: prevalence of related drug use. (англ.) // *Pharmacotherapy*. – 2008. – Vol. 28, no. 8. – P. 992–998.

13. Dr Soram Khalsa. Pharmacogenetics: What It Is and Why You Need to Know (англ.). Huffington Post (28 июня 2015). Проверено 12 апреля 2017.

14. Breckenridge A., Lindpaintner K., Lipton P., McLeod H., Rothstein M., Wallace H. Pharmacogenetics: ethical problems and solutions. (англ.) // *Nature reviews. Genetics*. – 2004. – Vol. 5, no. 9. – P. 676–680.

15. Yip R., Scanlon K., Trowbridge F. Improving growth status of Asian refugee children in the United States. (англ.) // *JAMA*. – 1992. – Vol. 267, no. 7. – P. 937–940.

16. Breckenridge Alasdair, Lindpaintner Klaus, Lipton Peter, McLeod Howard, Rothstein Mark, Wallace Helen Pharmacogenetics: ethical problems and solutions // *Nature Reviews Genetics*. – 2004. – Сентябрь (т. 5, № 9). – С. 676–680.

17. Лильин Е. Т. Введение в современную фармакогенетику. – Москва: Медицина, 1984. – 160 с.

18. Скакун Н. П. Клиническая фармакогенетика. – Киев: Здоровье, 1

19. Соради И. Основы и педиатрические аспекты фармакогенетики. – Будапешт: Издательство Академии наук Венгрии, 1984. – 248 с.

20. Сычев Д. А., Раменская Г. В., Игнатъев И. В., Кукес В. Г. Клиническая фармакогенетика: Учебное пособие/ Под ред. академика РАМН В. Г. Кукеса и академика РАМН Н. П. Бочкова. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 248 с.

#### **Ключевые слова и понятия**

Ацетилирование Белки-мишени Водная конъюгация  
Генетические основы фармакодинамики Генетические основы фармакокинетики Глюкуро-  
нирование Конъюгация с глутатионом S-метилирование  
Патологические реакции на лекарства  
Персонализированная медицина  
Субстрат  
Сульфатирование  
Типы метаболитов  
Фазы биотрансформации  
Фармакогенетика

#### **Контрольные вопросы**

1. Какие вопросы решает фармакогенетика?
2. С чем связаны нарушения фармакокинетики и фармакодинамики?
3. Какие патологические реакции возникают при нарушении фармакодинамики лекарств?
4. Какие нарушения мишеней изменяют фармакокинетику?
5. Как происходит 1 фаза биотрансформации при участии Цитохромов 450?
6. Как происходит 2 фаза биотрансформации (ацетилирование, сульфатирование, глюкуро-  
нирование и метилирования)?
7. Как происходит транспорт лекарственных средств, 3 фаза биотрансформации?
8. Как генетический полиморфизм изменяет катаболизм лекарств?
9. Как происходит первичная и вторичная биотрансформация лекарств?
10. Как фармакогенетика решает проблемы персонализации лекарственной терапии?
11. Как гено- и фенотипированием может быть обеспечен индивидуальный подбор лекарств или их доз?
12. Как фармакогенетика позволяет избежать нежелательных лекарственных реакций?



## ГЛАВА 14

## ГЕННЫЕ НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ

**14.1. Генные наследственные болезни: общие сведения**

Хотя лишь немногие болезни полностью обусловлены мутацией одного гена, концепция моногенных болезней по-прежнему важна. Для таких болезней обычно характерен один из трех типов наследования: аутосомно-доминантный, аутосомно-рецессивный или X-сцепленный.

Общая распространенность моногенных болезней составляет 10 на 1000 новорожденных, причем соотношение аутосомно-доминантного, аутосомно-рецессивного и X-сцепленного (исключая дальтонизм) типов наследования составляет 7 : 2,5 : 0,4.

Генные болезни – это разнородная по клиническим проявлениям группа заболеваний, обусловленных мутациями на генном уровне. Основой для объединения их в одну группу служат этиологическая генетическая характеристика и, соответственно, закономерности наследования в семьях и популяциях. Хотя мутации в индивидуальных генах являются этиологическим фактором генных болезней, то закономерности их наследования соответствуют менделевским правилам расщепления в потомстве, т. е. формальная генетика генных наследственных болезней ничем не отличается от поведения в семьях любых менделирующих признаков. Необходимо, однако, сразу сделать пояснения в отношении содержания понятий генных мутаций и менделирующей наследственности у человека.

Во-первых, согласно многочисленным исследованиям разных наследственных болезней и генома человека в целом, можно говорить о многообразии видов мутаций в одном и том же гене, которые являются причиной наследственных болезней. У человека описаны следующие виды генных мутаций обуславливающие наследственные болезни: миссенс, нонсенс, сдвиг рамки считывания, делеции, вставки (инсерции), нарушения сплайсинга, увеличение числа (экспансия) тринуклеотидных повторов. Любой из этих видов мутаций может вести к наследственным болезням. Даже одна и та же генная болезнь может быть обусловлена разными мутациями. Например, в гене муковисцидоза описано свыше 200 вызывающих болезнь мутаций следующих типов: делеции, миссенс, нонсенс, сдвиг рамки считывания, нарушения сплайсинга. Более 30 патологических мутаций известно для гена фенилкетонурии (миссенс, нонсенс, делеции, нарушения сплайсинга).

Во-вторых, современная генетика, принимая в полной мере менделизм, делает некоторые поправки в определенных случаях: условность понятий о доминантности и рецессивности, неоднородность проявления аллеля, унаследованного от отца или матери, – импринтинг, сложный характер взаимодействия генов, гонадный мозаицизм и т. д.

Более того, установлено, что мутации в разных частях одного гена ведут к различным болезням. Например, мутации в разных частях RET-онкогена (Gene: [10q112/RET] proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor ret) ведут к 4 клинически разным

наследственным болезням: двум формам множественной эндокринной неоплазии (ZA) и (ZB), семейной медуллярной тиреоидной карциноме, семейной болезни Гиршпрунга (синонимы: *аганглиоз*, *HSCR*) – аномалии развития толстой кишки врожденной этиологии, приводящая к нарушению иннервации фрагмента кишки (врожденный аганглиоз) – проявляется упорными запорами. У новорожденных клиническая картина своеобразна и разнообразна – связана с протяженностью и высотой расположения (по отношению к анальному отверстию) зоны аганглиоза. Чем протяженнее зона аганглиоза и чем выше она расположена, тем острее и ярче проявляются симптомы заболевания. Впервые заболевание было описано в 1888 году датским педиатром Гаральдом Гиршпрунгом (англ. *Harald Hirschsprung*) у двух мальчиков, которые умерли от хронических запоров [Hirschsprung, H. (1888). «Stuhlträgheit Neugeborener in Folge von Dilatation und Hypertrophie des Colons». *Jahrbuch für Kinderheilkunde und physische Erziehung* 27: 1–7.].

Мутации, вызывающие наследственные болезни, могут затрагивать структурные, транспортные и эмбриональные белки, ферменты. Существует несколько уровней регуляции синтеза белков: претранскрипционный, транскрипционный, трансляционный. Можно предположить, что на всех этих уровнях, которые обусловлены соответствующими ферментативными реакциями, могут возникать наследственные аномалии. Если принять, что у человека примерно 36 000 генов и каждый ген может мутировать и контролировать синтез белка с другим строением, то, казалось бы, должно быть не меньшее число наследственных болезней. Более того, по современным данным, в каждом гене может возникать до нескольких сотен вариантов мутаций (разные типы в различных участках гена).

На самом деле более чем для 50% белков изменения генетической природы (первичная структура) приводят к гибели клетки и мутация не реализуется в наследственную болезнь. Такие белки называются мономорфными белками. Они обеспечивают основные функции клетки, консервативно сохраняя стабильность видовой организации этой клетки. Так или иначе, но число генных болезней действительно велико. Уже сейчас их тысячи (около 3500 на 1996 г.), если рассматривать болезни с клинической (фенотипической) точки зрения, а с генетической – их в несколько раз больше. При рассмотрении генных болезней как менделирующих признаков организма принимается, что речь идет о так называемых полных формах, т.е. формах, обусловленных гаметическими (в зародышевых клетках) мутациями. Это могут быть новые или унаследованные от предыдущих поколений мутации. Следовательно, в этих случаях патологические гены присутствуют во всех клетках организма. Мутации генов, которые не кодируют белки (например, генов тРНК в геноме митохондрий), встречаются редко.

Однако теоретически можно представить возможность появления и мозаичных форм генных болезней, а не только полных, подобно тому, как это уже хорошо известно, для хромосомных болезней.

Генодиагностика применяется для выбора лечения и медико-генетического консультирования при многих моногенных болезнях. Клонированы гены, мутации в которых вызывают распространенные заболевания – нейрофиброматоз, синдром Марфана, семейную гиперхолестеринемию, несовершенный остеогенез, атрофическую миотомию, ахондроплазию, аденоматозный полипоз толстой кишки, болезнь Гентингтона, поликистоз почек, муковисцидоз, гемоглобинопатии.

При этих заболеваниях генодиагностика позволяет поставить или подтвердить диагноз даже в отсутствие симптомов, выявить заболевание у родственников больного, иногда предсказать тяжесть заболевания. На основе результатов генодиагностики проводят медико-генетическое консультирование.

Традиционное определение моногенных заболеваний содержит в целом корректные допущения – стабильность мутаций, наследование по одному аллелю аутосомных генов от каждого родителя, одинаковая экспрессия обоих аллелей аутосомного гена и случайная передача потомству одного из двух аллелей. На этих допущениях основаны медико-генетическое консультирование, анализ сцепления и интерпретация данных генетического исследования. Однако из этих правил менделевских принципов наследования есть много исключений.

К этим исключениям из правил следует отнести в первую очередь динамические мутации, однородительскую дисомию, геномный импринтинг и мейотический дрейф.

### **14.2. Генные наследственные болезни: мозаичные формы**

Любые мутации, в том числе и генные, могут возникать на ранних стадиях дробления зиготы в одной из клеток, и тогда индивид будет мозаичен по данному гену. В одних клетках у него будет функционировать нормальный аллель, в других – мутантный или патологический. Если эта мутация доминантная, то она проявится в соответствующих клетках и приведет к развитию болезни, очевидно, менее тяжелой. Если возникшая мутация в одной из клеток на ранних стадиях развития зародыша рецессивная, т.е. эффект проявится только у гомозиготы. Вероятность появления двух рецессивных мутаций в одном и том же локусе гомологичных хромосом в одной клетке чрезвычайно мала. Проблема мозаичных форм генных болезней и в генетическом, и в клиническом плане исследована недостаточно. Частота возникновения мозаичных форм не может быть высокой, поэтому выявлять их трудно. Современные молекулярно-генетические методы позволяют диагностировать мозаицизм на клеточном или тканевом уровне. Уже обнаружена мозаичная форма, «мягкая» по течению, миопатии Дюшенна (больной умер в возрасте 22 лет). С мозаичными формами генных болезней не следует путать мозаицизм гонад. Мозаицизм гонад является частным случаем органного мозаицизма, возникающего на более поздних стадиях эмбрионального развития в процессе органогенеза. Наличие его у клинически здорового индивида может обусловить несколько случаев рождения детей с полной формой доминантной наследственной болезни.

#### **Генные болезни: родительский мозаицизм.**

Современные молекулярно-генетические исследования показали, что родительский мозаицизм (в том числе гонадный) ответствен не менее чем за 5-15% случаев доминантных и X-сцепленных рецессивных болезней. Мозаицизм у здоровых родителей убедительно доказан в случае рождения детей (по соответствующим генам) с несовершенным остеогенезом, синдромом Элерса-Данло (тип IV), гемофилией (фактор VIII и фактор IX).

### 14.3. Болезни аутосомно-доминантные моногенные

Известно более 3700 таких болезней. Как правило, они обусловлены дефектами структурных белков или нарушениями регуляции экспрессии генов.

Эти болезни поражают мужчин и женщин с одинаковой частотой. Исключение составляют аутосомные дефекты, наследование которых зависит от пола. Так, синдромы Опица и Опица-Фриаса встречаются главным образом у мужчин и распознаются по наличию гипоспадии. Алопеция считается доминантным признаком, но проявляется преимущественно у мужчин (а у женщин наблюдается при нарушениях метаболизма стероидных гормонов, например при избытке тестостерона).

Для аутосомно-доминантных болезней характерен фенотипический полиморфизм (даже внутри одной семьи). Полиморфизм зависит от пенетрантности и экспрессивности аллеля. Пенетрантностью аллеля называют частоту проявления в популяции. Экспрессивностью аллеля называют выраженность проявления у одной особи. При полной пенетрантности аллеля признак наблюдается у всех особей популяции. При неполной пенетрантности признак наблюдается не у всех особей. Организм, несущий дефектный аллель с низкой экспрессивностью, может иметь нормальный фенотип. При неполной пенетрантности или низкой экспрессивности аллель «теряется» в одном или нескольких поколениях и может быть принят за новую мутацию при последующем проявлении.

Мутация доминантного гена в половых клетках проявляется, как правило, уже в первом поколении потомков. Поэтому вновь возникающие мутации считаются основной причиной аутосомно-доминантных болезней. Показано, что риск некоторых болезней этой группы повышен у детей пожилых отцов. Таким образом, возраст отца является фактором, предрасполагающим к возникновению мутаций доминантных генов.

Болезнь, обусловленная дефектом доминантного гена с нормальной экспрессивностью, обычно проявляется во всех поколениях одной семьи. Исключение составляют случаи, когда мутация доминантного гена летальна или существенно снижает фертильность (как за счет нарушения образования гамет, так и за счет снижения выживаемости плода). Вероятность наследования дефектного гена ребенком составляет:

- 100%, если хотя бы один из родителей гомозиготен по доминантному гену;
- 75%, если оба родителя гетерозиготны;
- 50%, если один родитель гетерозиготен, а второй гомозиготен по рецессивному гену.

Наследование гена аутосомно-доминантной болезни не зависит от пола ребенка и тяжести болезни у родителя. Нельзя прогнозировать тяжесть болезни у ребенка по фенотипу родителя. У здоровых родителей, уже имеющих одного ребенка с аутосомно-доминантным заболеванием, повторный риск рождения ребенка с тем же заболеванием низок.

Гиперплазия и неоплазия эндокринных желез, подобно другим семейным опухолевым болезням, обычно наследуется аутосомно-доминантно. Примеры: синдромы МЭН типа I, IIa и IIb; факриоматоз; синдром Горлина-Гольца (базальноклеточный невус).

#### 14.4. Аутосомно-рецессивные болезни: общие сведения

Известно более 1600 таких болезней. Поскольку экспрессия рецессивного аллеля в присутствии нормального аллеля невозможна, больные всегда являются гомозиготными по рецессивному аллелю. Если болезнь определяется экспрессией двух разных генов, детерминирующих один и тот же признак, больной может быть дигетерозиготен по двум рецессивным аллелям. Летальные рецессивные гены редко встречаются в природных популяциях.

Признаки аутосомно-рецессивных болезней проявляются только у гомозигот или смешанных гетерозигот, т.е. только когда изменены оба аллеля одного гена. Различают фенотипических гомозигот (больных), которые могут быть как гомозиготами, так и смешанными гетерозиготами, и молекулярных гомозигот с идентичными мутациями в обоих аллелях.

Аутосомно-рецессивные болезни чаще всего обусловлены дефектами ферментов, реже – дефектами структурных белков. Именно поэтому многие врожденные нарушения обмена веществ попадают в эту группу болезней.

Эти болезни поражают мужчин и женщин с одинаковой частотой. Исключение составляют аутосомные дефекты, наследование которых зависит от пола.

Для рецессивных генов характерна полная пенетрантность и высокая экспрессивность. Фенотипический полиморфизм выражен в меньшей степени, чем при аутосомно-доминантном наследовании.

Многообразие рецессивных аллелей и обязательное наличие двух мутантных аллелей для проявления признаков заболевания определяют особенности аутосомно-рецессивного наследования:

- чем реже встречается мутантный аллель в популяции, тем больше вероятность, что больные – дети от близкородственных браков;
- если оба родителя – носители одного аутосомно-рецессивного аллеля, вероятность, что их дети будут больны, составляет 25%, гетерозиготны (носители) – 50% и здоровы (не унаследуют мутантный аллель) – 25%;
- если один из родителей болен, а другой гетерозиготен, то вероятность заболевания для каждого из их детей составляет 50%, как при доминантном наследовании;
- если у обоих родителей имеется одинаковая рецессивная болезнь, то все их дети будут больны.

Проявления аутосомно-рецессивных болезней в целом более однородны, чем проявления доминантных болезней, и первые чаще диагностируют в детском возрасте. Однако многие аутосомно-рецессивные заболевания проявляются лишь у взрослых, в том числе гемохроматоз, недостаточность альфа1-антитрипсина, гемоглобинопатии, некоторые формы гиперлиппротеидемий и лизосомные болезни накопления с поздним началом.

Наследование аутосомно-рецессивных болезней может быть ограничено полом, например, мужской псевдогермафродитизм при недостаточности 5 альфа-редуктазы.

Болезнь, обусловленная рецессивным генетическим дефектом, может не проявляться во всех поколениях одной семьи (родители и дети пробанда часто здоровы).

У супружеских пар, в которых один родитель с неизвестным генотипом здоров, а второй является гетерозиготой, риск рождения больного ребенка невелик. Однако риск значительно возрастает, если брак близкородственный или если мутантный рецессивный ген сильно распространен среди населения (например, в случае муковисцидоза или фенилкетонурии).

Большинство эндокринных болезней, связанных с дефицитом гормонов, врожденные нарушения метаболизма белков и синтеза гликогена, а также лизосомные болезни накопления наследуются аутосомно-рецессивно. Наследственные нарушения биосинтеза тиреоидных гормонов и различные формы ВГКН – примеры аутосомно-рецессивных болезней, при которых гиперплазия эндокринных желез развивается вторично (вследствие нарушения механизмов отрицательной обратной связи). Успешность лечения аутосомно-рецессивных болезней зависит от точности диагноза. Для многих болезней этой группы разработаны молекулярно-генетические пробы на гетерозиготность (носительство мутантных генов) и методы пренатальной диагностики.

### **Пример аутосомно-доминантного заболевания**

**Нейрофиброматоз I (первого) типа** (*нейрофиброматоз с феохромоцитомой, болезнь фон Реклингхаузена, синдром Реклингхаузена, NF-1*) – самое распространённое наследственное заболевание, предрасполагающее к возникновению опухолей у человека. Описан во второй половине XIX века рядом исследователей, в том числе в 1882 году учеником Рудольфа Вирхова Фридрихом фон Реклингхаузенем. Устаревшие названия – болезнь Реклингхаузена, периферический нейрофиброматоз и др. Является аутосомно-доминантным, встречается с одинаковой частотой у мужчин и у женщин, у 1 из 3500 новорождённых. Другие типы нейрофиброматозов (на первую половину 2011 года выделяют 7 типов, из которых наибольшее клиническое значение имеют первые два) характеризуются наличием как сходных проявлений с I типом, так и отличий. Нейрофиброматоз I типа проявляется рядом патогномичных симптомов. К ним относят наличие пигментных пятен на коже цвета «кофе с молоком», нейрофибром, большинство из которых располагаются поверхностно на коже, узелки Лиша – гамартомы радужной оболочки глаза [Doran S.E., Thorell W.E., 2004].

Проявления нейрофиброматоза I типа часто начинаются со сколиоза (искривления позвоночника), затем возникают трудности в обучении, проблемы со зрением и эпилепсия.

Нейрофибромы чаще локализуются по ходу периферических нервов. Однако может поражаться спинной и головной мозг, находят нейрофибромы на веках, конъюнктиве, в средостении, брюшной полости. В зависимости от расположения нейрофибромы могут вызвать различную клиническую симптоматику: судороги, нарушение функции черепных нервов и сегментов спинного мозга, паралич глазных мышц, птоз, сдавление органов средостения.

Нейрофиброматоз I типа был первым опухолевым заболеванием с доказанным генетическим происхождением [Ponder B. 1990]. Локус генов, поломка которых приводит к развитию нейрофиброматоза, располагается на длинном плече 17 хромосомы (17q11.2) [Viskochil D, Buchberg AM, Xu G et al 1990]. Он состоит из 400 тысяч нуклеотидных

пар. В нём содержится информация, ответственная за синтез одного из составляющих миелингликопротеина, нейрофибромина и других белков. При нейрофиброматозе I типа в данном локусе отмечены различные типы мутаций и перестроек – транслокации, делеции, инверсии и точковые мутации [Wallace MR, Marchuk DA, Andersen LB, et al., 1990]. Нейрофибромин представляет собой цитоплазматический белок, состоящий из 2818 аминокислот [Williams V.C., Lucas J., Babcock M.A. et al., 2009]. Он участвует в инактивации белков-промоторов (белка RAS и его аналогов) [Xu GF, O'Connell P, Viskochil D et al., 1990], обеспечивая динамический контроль клеточного роста. Ген НФ-1 является одним из основных генов-супрессоров опухолевого роста для примерно половины тканей организма, в первую очередь нейроэктодермального происхождения, пролиферация которых определяется системой белков RAS [Козлов А. В., 2004]. Нейрофибромин также влияет на содержание в клетке аденозинмонофосфата (АМФ). АМФ в свою очередь опосредованно тормозит процессы клеточного деления [Williams V.C., Lucas J., Babcock M.A. et al., 2009]

В случае утраты вследствие мутации аллельного нормального гена НФ1 возникает бурный неконтролируемый рост клеток, т.е. развивается злокачественная опухоль (чаще всего нейрофибросаркома или нейробластома) Вероятность их возникновения составляет 3–15 % [Шнайдер Н. А., 2007]. Вероятность развития ассоциированной с нейрофиброматозом I типа злокачественной опухоли превышает таковую в популяции в сотни раз (только в отношении миелолейкоза в 200–500 раз)[Козлов А. В., 2004].

Клинически повреждение нерва проявляется хроническими болями, онемением и/или параличами мышц.

При нейрофиброматозе I типа частота опухолей центральной нервной системы составляет от 5 до 30 %. Во многих случаях опухоли ЦНС у больных нейрофиброматозом не выявляются. Впервые взаимосвязь между нейрофиброматозом I типа и внутричерепными новообразованиями была отмечена в 1940 году [Davis F. A., 1940].

Наиболее часто возникающими при данном заболевании опухолями ЦНС являются глиомы зрительных нервов, астроцитомы, эпендимомы, невриномы слухового нерва, менингиомы и нейрофибромы.

Прогноз при данном заболевании, как правило, благоприятный. Озлокачествление нейрофибром наступает редко. Трудоспособность обычно не страдает, однако при распространённом поражении резко снижается [Мельников Р. А., Китаев В. В., 1981].

### **Пример аутосомно-рецессивного заболеваний**

**Муковисцидоз** (кистозный фиброз) – системное наследственное заболевание, обусловленное мутацией гена трансмембранного регулятора муковисцидоза и характеризующееся поражением желёз внешней секреции, тяжёлыми нарушениями функций органов дыхания. Муковисцидоз представляет особый интерес не только из-за широкой распространённости, но и потому, что это одно из первых наследственных заболеваний, которое пытались лечить.

Ген, ответственный за муковисцидоз, был клонирован в 1989 году. Благодаря этому удалось выяснить природу мутации и усовершенствовать метод выявления носителей. В основе заболевания лежит мутация в гене CFTR, который локализован в середине

длинного плеча 7-й хромосомы [Rommens J. M. et al., 1989]. Муковисцидоз наследуется по аутосомно-рецессивному типу и регистрируется в большинстве стран Европы с частотой 1:2000 – 1:2500 новорождённых. В России в среднем частота болезни 1:10000 новорождённых. Если оба родителя гетерозиготные (являются носителями мутировавшего гена), то риск рождения больного муковисцидозом ребёнка составляет 25 %. Носители только одного дефектного гена (аллели) не болеют муковисцидозом. По данным исследований частота гетерозиготного носительства патологического гена равна 2–5 %.

*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR)* – белок, участвующий в транспорте ионов хлора через мембрану клетки. Мутации в гене CFTR приводят к возникновению заболевания муковисцидоза, а также могут быть причиной мужского бесплодия. Наиболее часто встречается мутация  $\Delta F508$  (более 50 % из всех выявляемых мутаций гена), при которой происходит делеция остатка фенилаланина-508 из полипептидной цепочки, что приводит к нарушению укладки белка в плазматической мембране.

Идентифицировано около 200 мутаций гена муковисцидоза. Следствием мутации гена является нарушение структуры и функции белка, получившего название муковисцидозного трансмембранного регулятора проводимости (МВТП). Следствием этого является сгущение секретов желез внешней секреции, затруднение эвакуации секрета и изменение его физико-химических свойств, что, в свою очередь, и обуславливает клиническую картину заболевания. Изменения в поджелудочной железе, органах дыхания, желудочно-кишечном тракте регистрируются уже во внутриутробном периоде и с возрастом пациента неуклонно нарастают. Выделение вязкого секрета экзокринными железами приводит к затруднению оттока и застою с последующим расширением выводных протоков желез, атрофией железистой ткани и развитием прогрессирующего фиброза. Активность ферментов кишечника и поджелудочной железы значительно снижена. Наряду с формированием склероза в органах имеет место нарушение функций фибробластов. Установлено, что фибробласты больных муковисцидозом продуцируют цилиарный фактор, или М-фактор, который обладает антицилиарной активностью – он нарушает работу ресничек эпителия.

В настоящее время рассматривается возможное участие в развитии патологии лёгких при МВ генов, ответственных за формирование иммунного ответа (в частности, генов интерлейкина-4 (IL-4) и его рецептора), а также генов, кодирующих синтез оксида азота (NO) в организме [<http://usefulnurse.ucoz.ru/publ/9-1-0-80>].

Различают следующие клинические формы муковисцидоза:

- преимущественно лёгочная форма (респираторная, бронхолёгочная);
  - преимущественно кишечная форма;
  - смешанная форма с одновременным поражением желудочно-кишечного тракта и органов дыхания;
- мекониевая непроходимость кишечника;
- атипичные и стёртые формы (отечно-анемическая, цирротическая и др.).

70% случаев муковисцидоза выявляются в течение первых двух лет жизни ребёнка. С внедрением неонатального скрининга время выявления значительно сократилось.



Диагноз муковисцидоза определяется данными клинических и лабораторных методов обследования пациента. В целях ранней диагностики муковисцидоз входит в программу обследования новорождённых на наследственные и врождённые заболевания. Исследуют уровень иммунореактивного трипсина в сухом пятне крови. При положительном результате тест повторяют на 21–28 день жизни. При повторном положительном результате назначают потовый тест.

Особое место в диагностике занимает молекулярно-генетическое тестирование. Пренатальная диагностика: исследование изоэнзимов тонкокишечной щелочной фосфатазы из околоплодных вод, возможно с 18–20 недели беременности. Ложноположительные и ложноотрицательные значения получают в 4 % случаев.

Лечение муковисцидоза симптоматическое. Очень важное значение имеет питание больного. Суточный калораж должен на 10–30 % превышать возрастную норму за счёт увеличения в рационе белкового компонента. Больному обеспечивают потребление достаточного количества жидкости. В питание должны быть включены содержащие витамины продукты, фруктовые и овощные соки, сливочное масло.

Прогноз при муковисцидозе до настоящего времени остаётся неблагоприятным. Летальность составляет 50–60 %, среди детей раннего возраста – выше. При поздней диагностике и неадекватной терапии прогноз значительно менее благоприятный. Большое значение приобретает медико-генетическое консультирование семей, в которых есть больные муковисцидозом.

Критерием качества диагностики и лечения муковисцидоза является средняя продолжительность жизни больных. В европейских странах этот показатель достигает 40 лет, в Канаде и США – 48 лет, а в России – 22–30 лет.

### **14.5. Мутации динамические (экспансия повторов ДНК) и наследственные болезни**

Открытие динамических мутаций, обусловленных увеличением числа тринуклеотидных повторов, показывает, что некоторые мутации изменяются при делении соматических или зародышевых клеток. Одни мутации летальны, и они не могут передаваться следующему поколению, а другие не столь опасны и сохраняются в потомстве.

Самые яркие примеры динамических мутаций – это увеличение числа тринуклеотидных повторов, которые вызывают синдром ломкой X-хромосомы, атрофическую миотонию, болезнь Гентингтона, X-сцепленную бульбоспинальную амиотрофию, спинocerebellарные дегенерации и другие заболевания. До открытия увеличения числа тринуклеотидных повторов природа антиципации (усугубления болезни в каждом последующем поколении) оставалась неясной. Оказалось, что умеренное увеличение числа тринуклеотидных повторов (возможно, с незначительными отличиями в нуклеотидной последовательности по сравнению с устойчивыми аллелями) играет роль премутации. Премутации сами по себе не вызывают явных признаков болезни, но они способствуют дальнейшему увеличению числа повторов, обуславливающих раннее начало или более тяжелую форму болезни у потомков. Под экспансией ДНК понимают увеличение числа копий коротких повторяющихся последовательностей нуклеотидов

внутри кластера при передаче генетической информации от родителей потомкам. Различают два класса этих генетических явлений. При экспансии ДНК первого класса происходит резкое и стабильное увеличение числа копий определенных повторов (>10). При экспансии ДНК второго класса изменения затрагивают меньшее число повторов (<4) FMR1-гена (Xq27.3). Аналогичные нестабильные повторы обнаружены еще в трех ломких сайтах, причем два из них (FraXE и FraXF) расположены дистальнее FraXA на небольшом расстоянии от него. Во всех четырех случаях CGG-повторы локализованы вблизи от CpG-островков, при этом увеличение числа копий триплетов выше определенного порогового уровня сопровождается гиперметилированием всей регуляторной GC-богатой области, вследствие чего и происходит резкое снижение и полное выключение транскрипционной активности – мутации по типу «утраты функции» (loss-of-functions). Таким образом, область CGG-повторов в этих локусах можно рассматривать как своеобразный cis-действующий элемент транскрипции [Mandel J.- L., 1994; Willems P.J., 1994].

Другой тип динамических мутаций описан для 6-ти различных тяжелых аутосомно-доминантных нейродегенеративных расстройств. Для всех этих заболеваний обнаружено присутствие удлиненных CAG-повторов в открытой рамке считывания (ORF). Эти повторы транслируются в протяженные полиглутаминовые треки, предположительно локализованные в ДНК-связывающих доменах соответствующих белковых продуктов. В результате белковые молекулы приобретают новые свойства, нарушающие нормальные метаболические связи. Таким образом, нестабильные CAG-повторы можно рассматривать как gain-of-function мутации. Интенсивно обсуждается также возможность участия амплификации CAG-повторов в формировании предрасположенности к таким частым расстройствам центральной нервной системы, как шизофрения и маниакально-депрессивный психоз.

Примером третьей группы болезней экспансии служит миотоническая дистрофия. При этом заболевании огромные CTG (или CAG) повторы локализованы в 3'-нетранслируемой области гена. Они также рассматриваются как факторы, нарушающие нуклеосомную организацию гена и подавляющие его транскрипцию.

## 14.6. Дисомия однородительская. Импринтинг

Однородительская дисомия, т.е. наследование обеих копий целой хромосомы или ее части от одного родителя (при отсутствии соответствующего генетического материала от другого родителя), является исключением из менделевских принципов наследования. Она встречается редко и вызывает, например, синдром Прадера-Вилли и синдром Ангельмана.

Роль дисомии в патологии во многом усугубляется геномным импринтингом, который приводит к неодинаковой экспрессии материнской и отцовской копий гена.

Возможный механизм дисомии – элиминация лишней хромосомы у плода с трисомией на ранних стадиях эмбриогенеза. Болезнь проявляется в том случае, если элиминируется лишняя хромосома, происходящая из нормальной гаметы.

Однородительская дисомия была описана при муковисцидозе, когда оба мутантных

аллеля наследовались от одного родителя. В таких случаях дисомия имитирует аутосомно-рецессивное наследование.

У 20-30% больных с синдромом Прадера-Вилли, имеющих по данным цитогенетического исследования нормальный кариотип, с помощью молекулярно-биологических методов обнаруживается дисомия материнской 15-й хромосомы. Отцовская 15-я хромосома у таких больных отсутствует.

Предполагают, что однопородительская дисомия является причиной внутриутробной задержки развития, умственной отсталости и микроцефалии. Эти предположения пока не подтверждены молекулярно-биологическими исследованиями.

### **Импринтинг**

(imprinting, англ. imprint – отпечатывать, запечатлевать).

У насекомых явления импринтинга обычно означают сайленсинг генома у самцов и поэтому вовлечены в процессы определения пола. У млекопитающих процессы геномного импринтинга вовлечены в функциональное неравенство между родительскими аллелями генов [Feil, Robert Feil; Frédéric Berger (April 2007)].

При импринтинге специфический характер дифференциальной активности генов определяется полом организма, от которого эти гены унаследованы. У некоторых насекомых, например, грибных комариков (Sciaridae), весь набор отцовских хромосом элиминируется во время сперматогенеза. У этих организмов отцовские хромосомы маркируются в цитоплазме клеток зародышевой линии, удаляются при созревании гамет и не передают свои гены следующему поколению. У млекопитающих и высших цветковых растений отцовские и материнские гены оказывают разный эффект на развитие эмбриона, но в одинаковой степени представлены в гаметах, образующихся в результате мейоза. В этом случае вклады отцовского и материнского геномов в развитие организмов не эквивалентны и происходит видимое искажение менделевских правил наследования некоторых признаков.

Иными словами, характер экспрессии отцовского и материнского аллелей одного и того же гена в организме-потомке может быть различным, так как зависит от их происхождения. Молекулярные механизмы этого явления в настоящее время до конца непонятны. Предполагается, что в развитие феномена импринтинга вносят вклад зависимые от пола модификации ДНК определенных генов, в частности метилирование их регуляторных участков.

Импринтинг распространяется на узкую группу (более 20) генов млекопитающих, отличающихся от большинства генов тем, что их аллели функционально неравноценны.

Геномным импринтингом называют зависимость фенотипических проявлений от пола родителя, передающего по наследству специфический генетический материал (определенные гены и участки хромосом).

Геномный импринтинг предполагают на основании анализа родословной с необычным характером наследования. Имиринтинг, вероятно, имеет место во многих различных частях генома, но считается, что он имеет особенно важное значение при экспрессии генов, связанных с развитием, ростом, образованием злокачественных опухолей, эволюцией и поведением.

Импринтинг у людей отмечается при фенотипических различиях синдрома Пра-

дера-Вилли и синдрома Ангельмана, которые ассоциируются с делецией в одной и той же области хромосомы 15 и унипарентальной дисомией. В результате унипарентальная дисомия по материнскому типу в отсутствие сегмента на отцовской хромосоме 15 также приводит к развитию синдрома Прадера-Вилли. При этом синдроме делеция, если она имеет место, всегда выявляется на хромосоме 15, полученной от отца. Это позволяет предположить, что фенотип синдрома Прадера Вилли обусловлен отсутствием генетической информации, полученной от отца, которую несет этот сегмент хромосомы 15. Напротив, при обнаружении делеции хромосомы 15 при синдроме Ангельмана, хромосома, содержащая делецию, всегда наследуется от матери; унипарентальная дисомия в этих случаях встречается всегда по отцовскому типу, т.е. имеет место отсутствие материнской генетической информации. Вероятно, существует много других заболеваний, в основе которых также лежит механизм импринтинга. Первые опыты, обнаружившие различие в хромосомах, полученных от отца или от матери, были проделаны практически одновременно учёными, работавшими в Филадельфии [McGrath J., Solter D. 1984] и Кембридже [Barton S. C., Surami M. A. H., Norris M. L. 1984] в 1984 году.

Пятью годами позже Дэвид Хэйг[en] из Оксфорда высказал гипотезу, что отцовские гены отвечают за образование плаценты, а материнские – за дифференцировку клеток эмбриона при формировании тканей и органов. Из этого он сделал вывод, что у яйцекладущих и даже у сумчатых не должно быть импринтинга отцовских или материнских генов. Этот вывод был экспериментально подтверждён [Haig D., Westoby M. 1989]. Но исследования Хейга объясняют лишь некоторые случаи импринтинга [Hurst L. D., McVean G. T. 1997; Hurst L. D. 1997].

Импринтинг генов осуществляется с помощью процесса метилирования ДНК. Если по каким-то причинам импринтинг не сработает, это может привести к появлению генетических нарушений (например, синдром Прадера-Вилли). [Horsthemke B. 1997]

Для понимания концепции импринтированных генов важно различать импринтированные гены и гены, демонстрирующие кажущуюся специфичную в отношении родителя экспрессию из-за неравного родительского генетического вклада в зародыш. Примерами неравного родительского генетического вклада являются гены, сцепленные с Y-хромосомой и присутствующие только у самцов, гены, избежавшие X-инактивации у самок, митохондриальные гены, привносимые в основном матерью, и иРНК и белки, присутствующие в цитоплазме только спермия или только яйцеклетки.

Изменения одиночных генов или целых районов хромосом родителей при мейозе могут приводить к появлению гамет с генетическими дефектами. В таких случаях фенотипическое проявление дефекта у ребенка зависит от того, какая именно гамета участвует в образовании зиготы.

Характер проявления аутосомно-доминантных болезней зависит от происхождения дефектного аллеля. Например, ювенильная форма болезни Гентингтона наблюдается только у детей больных отцов, а наследственная атрофическая миотония – только у детей больных матерей.

Роль одnorодительской дисомии в патологии во многом усугубляется геномным импринтингом, который приводит к неодинаковой экспрессии материнской и отцовской копий гена.

У мыши и человека отцовские копии гена ИФР-II (IGF2) и гена полипептида малого ядерного рибонуклеопротеида N (SNRPN) экспрессируются, а материнские – нет, и наоборот, материнская копия гена H19 (Gene: [11p15/ASM] adult skeletal muscle transcript (H19) экспрессируется, а отцовская – нет. Ген (или гены), вызывающий синдром Прадера-Вилли, по-видимому, экспрессируется с отцовской копии, а ген, вызывающий синдром Ангельмана, – с материнской. Характер наследования болезней при геномном импринтинге отличается от обычного менделевского.

Как показано на рисунке 14.1 (Рисунок 65.18 Harrison), семейная параганглиома проявляется только при наследовании мутантного аллеля от отца. Напротив, синдром Ангельмана проявляется только при наследовании мутантного аллеля от матери.

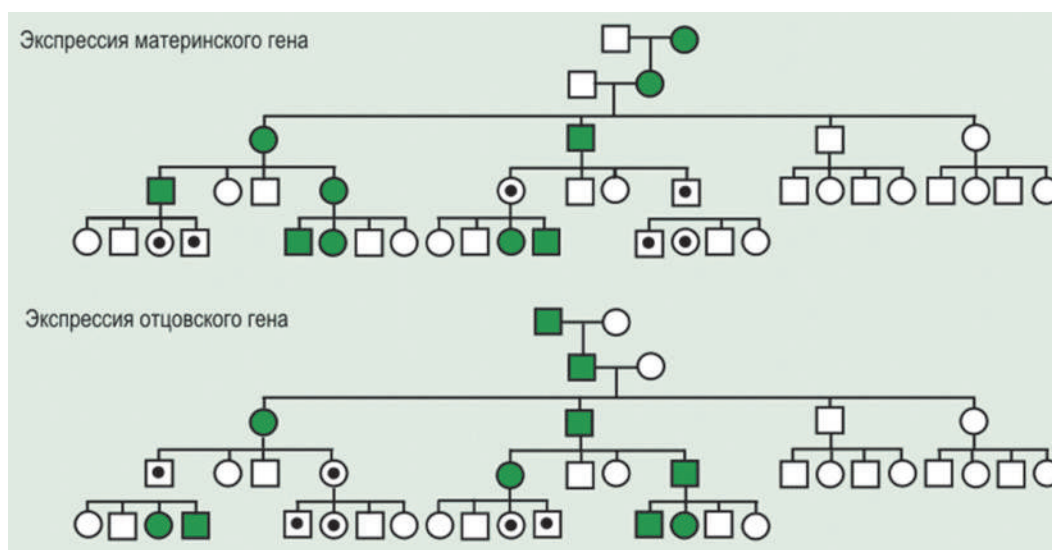


Рисунок 14.1. (Рисунок 65.18, Harrison). Геномный импринтинг

На рисунке показаны упрощенные схемы наследования болезней. Темные значки обозначают больных людей с мутацией. Значки с точкой в центре обозначают здоровых людей, у которых мутантным является молчащий аллель. Светлые значки обозначают людей без мутации. Верхняя родословная показывает наследование гена, который экспрессируется, если он унаследован от матери, как при синдроме Ангельмана; нижняя – наследование гена, который экспрессируется, если он унаследован от отца, как при семейной параганглиоме [Scriver C. R. et al., 1995].

Если в результате геномного импринтинга экспрессируется только один аллель аутосомного гена, а экспрессия другого аллеля подавлена, то этот ген функционально гемизиготен. Хотя в таком случае признак нельзя рассматривать как доминантный, но болезнь, как и в случае доминантного наследования, проявляется в нескольких поколениях (вертикальное наследование). Описаны большие родословные, в которых геномный импринтинг влияет на наследование болезни.

### 14.7. Синдром Прадера-Вилли (PWS)

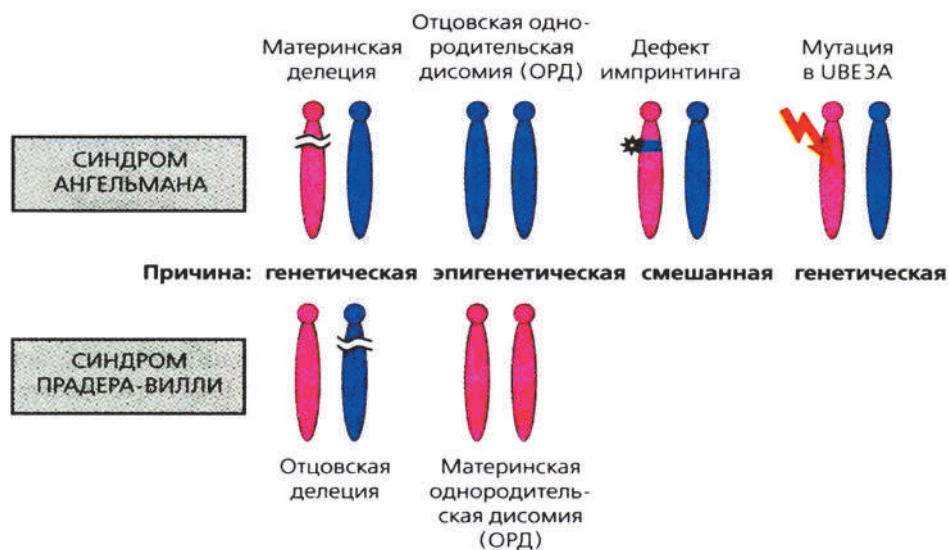
Синдром Прадера-Вилли – наследственное заболевание, проявляющееся в первые годы отставанием в росте, умственной отсталостью, недоразвитием половых желез, снижением мышечного тонуса (мышечной гипотонией), ожирением, гипогонадизмом в сочетании с крипторхизмом, олигофренией. Характерны округлое лицо, миндалевидные глаза (косоглазие), низкий лоб. Клинические проявления: мышечная гипотония у новорожденных, ожирение, непропорционально маленькие стопы и кисти, микропения, крипторхизм, гинекомастия. Синдром чаще спорадический; у половины больных выявляется делеция 15q11-13. Механизм развития гипогонадизма не выяснен (предполагается патология гипоталамуса).

Редкие формы ожирения встречаются при врожденных генетически детерминированных синдромах, например, при синдроме Прадера-Вилли.

Хотя в 1988 г. некоторые считали, что однородительская дисомия (UPD) хромосомы это редкое явление, сейчас мы знаем, что случаи UPD отмечались до сих пор практически для всех человеческих хромосом, кроме хромосомы 3 и хромосомы 19.

Изучение необычных пациентов не только установило случаи UPD для дополнительных хромосом, но и привело в 1989 г. к предположению, что UPD вызывает заболевания вследствие изменений в эпигенотипе и нарушения геномного импринтинга (Nicholls et al., 1989). Николс (Nicholls) с соавторами изучали пациента с синдромом Прадера-Уилли (PWS, Prader-Willi syndrome), у которого была сбалансированная робертсоновская транслокация t(13;15), которая также присутствовала у его матери, не имевшей симптоматики, и у родственников по материнской линии. Тот факт, что пробанд унаследовал свою вторую свободную хромосому 15 от своей матери (тогда как все индивидуумы, не имевшие симптоматики, наследовали ее от отцов), привело авторов к заключению, что материнская UPD привела к фенотипу PWS. После того, как наличие материнской UPD по хромосоме 15 подтвердилось у второго пациента с PWS и с внешне нормальным кариотипом, авторы предположили, что в этиологии PWS свою роль играет геномный импринтинг. Более того, они заключили, что либо отцовские делеции, либо материнская UPD с 15q11-13 обычно приводит к PWS, и они предсказали, что отцовская UPD15 точно так же, как материнские делеции данного района, может вызвать синдром Ангелмана (Angelman syndrome). Все эти предсказания оказались верными (рисунок 14.2).

См. « Эпигенетика и синдромы Прадера-Уилли (PWS) и Ангелмана (AS)».



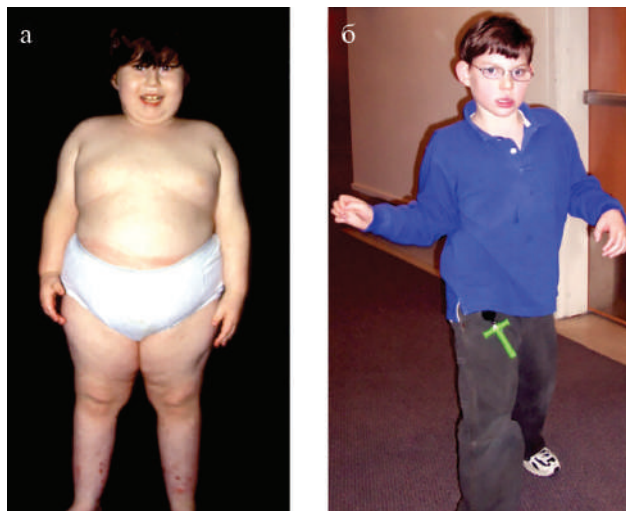
**Рисунок 14.2.** (Рисунок 23.3,epig). Синдром Прадера-Вилли и синдром Ангелмана <http://humbio.ru/humbio/epihumblu/001cfdee.htm>

Оба синдрома могут быть вызваны генетическими, эпигенетическими или смешанными дефектами.

### 14.7.1. Эпигенетика и синдромы Прадера-Уилли (PWS) и Ангелмана (AS)

Сестринские синдромы – синдром Прадера-Уилли (PWS; OMIM 176270) и синдром Ангелмана (AS; OMIM 105830) – в большинстве случаев вызываются одной и той же делецией 15q11-q13, размером 5-6 млн. нуклеотидов, но их фенотипы во многом различны. Геномный импринтинг в области 15q11-q13 объясняет эти фенотипические различия, с учетом того, что PWS вызывается делециями, унаследованными по отцовской линии, тогда как при AS делеции имеют материнское происхождение [Ledbetter et al., 1981; Magenis et al., 1987; Nicholls et al., 1989]. PWS, который случается с частотой примерно 1/10000, был описан в середине прошлого столетия и характеризуется младенческой гипотонией, задержкой развития, невозможностью роста вследствие плохого питания, апатией, за которыми следуют гиперфагия, тяжелое ожирение, низкорослость, вторичный гипогонадизм с гипоплазией гениталий и ослабление познавательных способностей. Пациенты с PWS также имеют отличительные физические черты, такие как небольшой размер кистей и стоп, миндалевидные глаза и тонкая верхняя губа. Большинство пациентов с PWS имеют слабое или среднее замедление умственного развития, подавляющее большинство из них проявляет разнообразные типы навязчиво-маниакального поведения, беспокойства, и иногда они замкнуты и несчастливы (рисунок 14.3а). Наоборот, пациенты с AS имеют «счастливый настрой», часто улыбаются, и подвержены необъяснимым приступам смеха. Они страдают тяжелыми задержками

развития, минимальными (если вообще имеют их) речевыми навыками, проблемами с равновесием (атаксией), производят аномальные похлопывающие движения кистями, характеризуются микроцефалией, припадками и некоторыми искаженными чертами, такими как выдающаяся нижняя челюсть и широкий рот (рисунок 14.3б).



**Рисунок 14.3.** (epig). Синдром Прадера-Вилли и синдром Ангелмана  
Пациент с синдромом Прадера-Уилли (а) и пациент с синдромом Ангелмана (б).

Эти фотографии иллюстрируют существенные различия в клинической картине нарушений, вызванных дефектами в импринтированном участке.

При обоих нарушениях могут наблюдаться гипотония, гипопигментация кожи и радужной оболочки и косоглазие. Большинство PWS и AS (приблизительно 70%) вызваны отцовскими и материнскими делециями 15q11 и 15q13, соответственно. Около 25% случаев PWS вызвано материнской UPD 15q11-q13, тогда как отцовская однородительская дисомия этого участка отвечает за 2-5% пациентов с AS (Рисунок 22.2). Разница в частоте однородительской дисомии между PWS и AS обычно инициируется материнским нерасхождением, поскольку на него влияет возраст матери, приводящий к зачатиям с трисомией или моносомией по хромосоме 15. Эти случаи затем подвергаются «спасению», что приводит к материнской UPD и PWS или отцовской UPD и AS, соответственно. Разница в частоте встречаемости этих двух однородительских дисомий предположительно связана с частотой образования двух аномальных яйцеклеток и с вероятностью «спасения» при обоих этих обстоятельствах. Транслокации в пределах критического PWS/AS участка отвечают менее чем за 10% таких случаев, но следует заметить, что такие транслокации связаны с высоким риском рецидива (до 50%), в зависимости от пола передающего родителя. Действительно, PWS и AS сосуществовали в некоторых семьях благодаря транслокациям или другим структурным аномалиям 15q11-q13, и фенотип при этом определялся полом передающего родителя (Hasegawa et al., 1984; Smeets et al., 1992).

Дефекты импринтинга представляют еще один класс мутаций, ведущих к фенотипам PWS или AS. Такие дефекты, которые включают в себя разделенный на две части центр импринтинга (IC) в пределах 15q11-q13 (Ohta et al., 1999), являются причиной



того, что хромосома, принадлежащая по происхождению одному из родителей, имеет измененный эпигенотип, как правило, эпигенотип хромосомы, происходящей от другого родителя. Дефекты импринтинга часто включают в себя делецию 1С, но есть случаи, когда такие дефекты оказываются имеющими место благодаря эпигенетической мутации, не затрагивающей последовательность нуклеотидов ДНК. Итог таких разнообразных нарушений импринтинга один и тот же, и он включает в себя изменения в метилировании ДНК, структуре хроматина и, в конечном счете, паттерны экспрессии генов. Дефекты импринтинга объясняют 2-5% случаев PWS и AS, а делеции в 1С обычно ассоциируются с 50%-ным риском рецидива, в зависимости от пола родителя, передающего аномалию, тогда как риск рецидива в семьях без делеции в 1С невысок. Идентификация дефектов импринтинга у небольшого количества пациентов с AS, которые были зачаты после инъекции спермы в цитоплазму яйцеклетки (ICSI, intracytoplasmic sperm injection), поставила вопрос о том, что, возможно, этот способ оплодотворения *in vitro* вызывает дефекты импринтинга (Cox et al., 2002; Orstavik et al., 2003). Обнаружение дефектов импринтинга среди случаев AS у пациентов, родившихся у субфертильных родительских пар, не прошедших процедуру ICSI (но подвергнутых гормональной стимуляции), порождает дальнейшие вопросы относительно того, имеют ли бесплодие и дефекты импринтинга общие механизмы, или действительно вспомогательные репродуктивные технологии [гормоны и (или) ICSI] имеют эпигенетические последствия (Ludwig et al, 2005).

Какой конкретно ген (гены) затрагивается геномным импринтингом в 15q11-q13, известно лишь для AS, но не для PWS. Около 10-15% случаев AS вызываются мутациями потери функции в гене лигазы E3 убиквитина (UBE3A), кодирующем белок, связанный с E6 (E6-AP, E6-associated protein) (Kishino et al., 1997; Matsuura et al., 1997). Изучение экспрессии показало, что Ube3a экспрессируется исключительно с материнской аллели в мозжечковых клетках Пуркинье и в нейронах гиппокампа. Более того, мыши Ube3a(+/-), лишённые материнской аллели, воспроизводят черты AS (Jiang et al., 1998). Эти результаты, так же как и данные по человеку, указывают на ген UBE3A, как на первопричину AS. Отцовская UPD или материнские делеции в 15q11-q13, ведут к потере экспрессии UBE3A в клетках Пуркинье. В случае дефектов импринтинга в 1С оказывается, что потеря сайленсинга антисмыслового транскрипта ведет к подавлению экспрессии гена UBE3A (Rougeulle et al., 1998). Интересно, что около 10% случаев AS остаются без молекулярного диагноза. Оказывается, что у ряда пациентов имеются мутации в белке ремоделинга хроматина – белке 2, связывающемся с метил- CpG, – что обсуждается ниже.

В случае PWS есть несколько кандидатов на роль импринтирующих генов, которые экспрессируются только с отцовской аллели, однако неясно, которые из этих генов ответственны за фенотип PWS. Наиболее подходящими кандидатурами до сих пор являются гены в кластере некодирующих малых ядрышковых РНК (snoRNAs). Из белок-кодирующих генов наилучшими кандидатами являются SNURF – SNRPN и Necdin (NDN). Главный сайт старта транскрипции SNURF-SNRPN расположен в 1С и он кодирует малый ядерный рибонуклеопротеин (SN-RPN), который функционирует в регуляции сплайсинга. Считается, что главным сайтом дефектов импринтинга является еще

один ген «рамка считывания вверх по течению от SNRPN « (или SNURF), наряду с не кодирующими экзонами, расположенными «вверх по течению», потому что разрушение (дизрупция) этого гена ведет к изменению импринтинга SNRPN и других импринтированных генов 15q11-q13. Мыши с отсутствием Snrpn выглядят нормальными, а мыши с делециями, захватывающими Snrpn и другие гены, гомологичные генам в 15q11-q13, характеризуются гипотонией, задержкой роста, и погибают еще до окончания вскармливания [Tsai et al., 1999]. Несколько генов малых ядрышковых РНК (snoRNA) экспрессируются с отцовской аллели и, возможно, вносят свой вклад в фенотип PWS (Meguro et al., 2001). Недавние исследования показали, что потеря отцовской аллели из одного кластера этих генов (HBI-52) не вызывает PWS (Runte et al., 2005). Однако исследования на мышах заставляют предполагать, что утрата малой ядрышковой РНК Pwcr1/MBII-85, вероятно, отвечает за неонатальную смертность в моделях PWS, разработанной на мышах [Ding et al., 2005]. Следовательно, PWS может вызываться потерей одного и более генов малых ядрышковых РНК, возможно, в сочетании с потерей других генов, экспрессирующихся в 15q11-q13 по отцовской линии. Тщательное исследование редких семей с транслокациями и делециями поддерживает мнение, что недостаточность по малым ядрышковым РНК Pwcr1/HBI-85 вызывает PWS [Schule et al., 2005].

#### 14.8. Эпигенетика и BWS (синдром Беквита-Видемана)

История синдрома Беквита-Видемана (BWS; OMTM 130650) представляет собой блестящий пример того, как заболевание человека вскрыло значение эпигенетики не только в нормальном развитии, но и при регуляции роста клеток и при опухолеобразовании. Синдром Беквита-Видемана характеризуется быстрым и гипертрофическим соматическим ростом, врожденными аномалиями и предрасположенностью к эмбриональным злокачественным перерождениям в детском возрасте [Weksberg et al., 2003]. У пациентов с BWS в типичных случаях проявляется гигантизм, макрогlossия (увеличенный язык), гемигипертрофия, разнообразные степени аномалии ушей и других органов и пупочная грыжа (выпячивание органов брюшной полости через пупок). Кроме того, многие пациенты страдают увеличенным размером внутренних органов; эмбриональными опухолями, такими как опухоль Уилмса (Wilms' tumor), гепатобластома или рабдомиосаркома, а также гиперплазией островков поджелудочной железы, гипертрофией островков поджелудочной железы, часто приводящей к неонатальной гипогликемии.

Большинство случаев BWS носят спорадический характер, но наличие небольшого числа семей с паттерном аутосомно-доминантного наследования (в ретроспективе, после модификации геномным импринтингом) наводит на мысль о его генетической этиологии и связи синдрома с 11p15 [Ping et al., 1989]. Преимущественная потеря материнских аллелей в опухолях, связанных с BWS, избыток женщин, передающих данное заболевание при его доминантной форме, и отцовская UPD по 11p15.5 в некоторых случаях BWS, свидетельствуют в пользу того, что эпигенетика и импринтинг должны играть важную роль в этиологии BWS, и что это заболевание может быть результатом смеси генетических и эпигенетических аномалий, либо возникших *de novo*, либо унаследованных. Кластер импринтированных генов, связанных с BWS, картируется в 11p15.5

в участке размером приблизительно 1 млн о. и включает в себя по меньшей мере 12 импринтированных генов. Считается, что эти гены регулируются двумя центрами импринтинга, разделенными неимпринтированным участком [Weksberg et al., 2003]. Предполагается, что реципрокно импринтированный H19 и инсулиноподобный фактор роста (IGF2) и дифференциально метилированный район представляют собой один участок контроля импринтинга (ICR1-imprinting control region) (Joyce et al., 1997; Weksberg et al., 2003). H19 кодирует экспрессируемую по материнской линии некодирующую РНК pol II, а IGF2 кодирует экспрессируемый по отцовской линии фактор роста. У этих двух генов общий стандартный набор энхансеров, на доступ к которым влияют статус метилирования ICR1 и связывание с белком CTCF (белком типа «цинкового пальца») [Hark et al., 2000]. Второй участок контроля импринтинга (ICR2) содержит несколько генов, экспрессирующихся по материнской линии, в том числе: ингибитор циклин-зависимой киназы (CDKN1C, кодирующий p57(kip2)), компонент калиевого канала (KCNQ1) и предполагаемый переносчик катионов (SLC22A1L). Дифференциально метилированный район в ICR2 картируется в интроне KCNQ1 и на отцовских аллелях он не метилирован, что ведет к экспрессии KCNQ1OT1 в антисмысловом направлении KCNQ1. Предполагается, что метилирование ICR2 на материнской аллели сайленсирует материнскую экспрессию KCNQ1OT1, делая возможной экспрессию KCNQ1 и CDKN1C, экспрессирующихся по материнской линии [Lee et al., 1999; Smilnich et al., 1999].

**Транскрипционный репрессор CTCF** также известный как белок с **11-цинковыми пальцами** или **СССТС-связывающий фактор** является фактором транскрипции, который в организме человека кодируется *CTCF* геном [Filippova GN, et al., 1996; Rubio ED, et al., 2008]. CTCF участвует во многих клеточных процессах, в том числе регуляции транскрипции, инсуляторной (изолирующей) активности, V (D) J рекомбинации [Chaumeil J., Skok J.A. (April 2012)] и регуляции архитектуры хроматина [Phillips J.E., Corces V.G. (June 2009)].

Различные эпигенетические, а также генетические молекулярные дефекты дают некоторое понимание относительно того, какие гены вносят вклад в фенотип BWS. На неметилированных материнских аллелях CTCF связывается с ICR1 и устанавливает границу, посредством чего промотор IGF2 изолируется от энхансеров. Эти энхансеры могут потом получить доступ к промотору H19 (более проксимальное положение относительно границы), разрешая транскрипцию H19. Метилирование ICR1 на отцовских аллелях аннулирует связывание с CTCF, разрешая экспрессию IGF2 и сайленсинг H19. Обнаружение того, что либо дупликации в 11p15.5, распространяющиеся на локус IGF, либо отцовская UPD данного участка (ожидается, что она приводит к сверхэкспрессии IGF2), в сочетании с данными, показывающими, что у трансгенных мышей со сверхэкспрессией IGF2 развиваются чрезмерно быстрый рост и увеличенный язык, подразумевает, что сверхэкспрессия IGF2 является одной из возможных причин гипертрофированного роста при BWS [Henry et al., 1991; Weksberg et al., 1993; Sun et al., 1997]. Любопытно, что мутации типа потери функции в гене CDKN1C дают начало BWS, аналогично мутациям, вызываемым сверхэкспрессией IGF2. У мышей, не имеющих *Cdkn1c*, развиваются пупочные грыжи, но не усиленный рост. Однако, когда утрата

Cdkn1c сочетается с повышенной экспрессией Igf2, животные воспроизводят многие черты BWS [Caspari et al., 1999]. К настоящему времени к молекулярным нарушениям, которые вызывают BWS, относятся:

- 1) отцовские дупликации, включающие IGF2,
- 2) отцовскую UPD по 11p 15.5,
- 3) мутации типа потери функции в материнской аллели CDKN1C,
- 4) трансляции на материнской хромосоме, нарушающие KCNQ1, влияющие на импринтинг IGF2, но, как ни странно, не на ICR2, и
- 5) чаще всего – потеря импринтинга ICR2/KCNQ1OT1, что, опять-таки, изменяет импринтинг IGF2 и предполагает некоторые регуляторные взаимодействия между ICR1 и ICR2 [Cooper et al., 2005].

Некоторые эпигенетические изменения, идентифицированные при BWS, такие как дефекты метилирования в ICR1 гена H19, также были подтверждены у пациентов с опухолью Уилмса, но не с BWS; это предполагает, что хронометраж эпигенетического дефекта может диктовать, будет ли аномальная регуляция роста затрагивать весь организм или только какой-то специфический орган. Тот факт, что aberrантное метилирование в ICR1 часто приводит к опухоли Уилмса, а в ICR2 – часто приводит к рабдомиосаркоме и гепатобластоме при BWS, предполагает, что в 11p15.5 имеется более чем один локус, обуславливающий предрасположенность к канцерогенезу [Weksberg et al., 2001; DeBaun et al., 2003; Prawitt et al., 2005].

#### 14.9. Эпигенетика и SRS (синдром Силвера-Рассела)

Синдром Силвера-Рассела (SRS, Silver-Russell syndrome; OMIM 180860) – это нарушение развития, характеризующееся замедлением роста, невысокой фигурой, часто ассиметричной, и несколько бесформенными чертами лица и черепа, а также аномалиями пальцев. Наиболее заметная характеристика – это аномалии соматического роста, другие характеристики сильно варьируют. Генетически SRS гетерогенен, но подсчитано, что около 10% случаев являются результатом материнской UPD по хромосоме 7 [Eggermann et al., 1997]. Предполагается, что SRS вызывается потерей функции гена, экспрессированного у отца (возможно, того, который способствует росту); но нельзя исключить альтернативную модель, а именно, сверхэкспрессию гена, подавляющего рост и экспрессированного у матери. Интересно, что у некоторых индивидуумов с SRS была обнаружена эпигенетическая мутация, вызывающая деметилирование ICR1 на хромосоме 11p15. Этот эпигенетический дефект вызывает биаллельную экспрессию H19 и пониженную экспрессию IGF2 [Gicquel et al., 2005]. <http://humbio.ru/humbio/epihumblu/00038b3c.htm>

#### 14.10. Эпигенетика и PHP (псевдогипопаратирозидизм)

Псевдогипопаратирозидизм (PHP, pseudohypoparathyroidism) представляет собой группу фенотипов, являющихся результатом функционального гипопаратирозидизма, несмотря на нормальный уровень паратирозидного гормона (PTH, parathyroid hormone). Такие пациенты устойчивы к PTH (паратирозидному гормону). Существует несколько

клинических подтипов – Ia, Ib, Ic, II и наследуемая остеодистрофия Олбрайта (ОММ 103580). Кроме функционального псевдогипопаратироза и остеодистрофии эти клинические варианты могут проявлять ряд соматических дефектов и дефектов развития. Гетерогенные с клинической точки зрения фенотипы являются результатом мутаций в гене GNAS1, кодирующем полипептид 1 (Gsальфа)– белок, обладающий альфа-стимулирующей активностью и связывающийся с гуанином. GNAS1 картируется в хромосоме 20q13.2. Лocus GNAS1 имеет три альтернативных первых экзона, расположенных «вверх по течению» (экзоны 1A, XL, и NESP55), которые сплайсированы с экзонами 2-13 и производят разные транскрипты, и в случае с NESP55 и XL этот альтернативный сплайсинг продуцирует уникальные белки. Около этих экзонов имеются дифференциально метилированные участки, принуждающие NESP55 экспрессироваться исключительно с материнских аллелей, тогда как XL, экзон 1A и антисмысловый транскрипт для NESP55 экспрессируются у отца. Хотя транскрипт, кодирующий белок Gсальфа, экспрессирован биаллельно, в некоторых тканях, таких как проксимальные почечные канальцы, преимущественно экспрессирована материнская аллель. Сочетание геномных и тканеспецифичных импринтингов объясняет изменчивые фенотипы и эффект происхождения от одного или другого родителя даже для тех мутаций, которые имеют ясный аутосомный доминантный паттерн наследования [Hayward et al., 1998]. Следует отметить, что у одного пациента с отцовской UPD участка GNAS1 развилось заболевание по типу Iбета [Bastepe et al., 2003].

#### **Болезни, вызванные нарушениями геномного импринтинга: замечания**

Изучение генотипов и фенотипов клинических нарушений, вызванных нарушениями геномного импринтинга, показало, что за исключением SRS все остальные геномные нарушения импринтинга (PWS, AS, BWS, и PHP) могут быть вызваны смесью генетических или эпигенетических аномалий, либо возникших de novo, либо унаследованных. Трудно поверить, что такая смешанная генетическая модель заболевания будет оставаться уникальной для этого небольшого набора нарушений. Немногим более десятилетия назад UPD была лишь теоретической возможностью, но сейчас установлено, что она имеет место на многих участках хромосом и приводит к разнообразным заболеваниям и фенотипам, касающимся развития. Одна из задач исследований генетики человека – выявить, какие гены отвечают за те или иные из ассоциированных с UPD фенотипов с целью установить список болезней, которые, вероятно, являются результатом смешанных генетико-эпигенетических механизмов.

Резюме. Геномный импринтинг – это феномен нетрадиционного типа наследования, который имеет место в клетках зародышевой линии и приводит к тому, что некоторые области генома наследуются разным образом в зависимости от пола родителя (гены несут специфический «отпечаток» пола родителя, т.е. отцовские и материнские гены маркированы по-разному). Характерно, что гены в релевантной области функционально инактивируются в процессе формирования гамет и остаются в неактивном состоянии в зиготе.

Наследование обеих гомологичных хромосом от одного родителя названо унипарентным. Этот феномен, проявляющийся в отдельных областях хромосом, наблюдается

у значительной части пациентов с аномальным фенотипом. Таким образом, по крайней мере для некоторых областей генома, необходимо наличие генов, полученных от каждого из родителей, чтобы обеспечить условия для экспрессии по крайней мере одной копии данного гена.

В широком эволюционном плане переходы от прокариот к эукариотам и от беспозвоночных к позвоночным сопровождались, по-видимому, резким увеличением числа генов [Bird, ea 1995]. Эти драматические изменения вызвали к жизни, видимо, и новые способы ограничения нежелательной активности «лишних» генов – формирование ядерной мембраны и нуклеосомную организацию хроматина в первом случае, функциональную переориентацию системы метилирования – во втором. Если у беспозвоночных она сводилась к подавлению активности потенциально опасных последовательностей ДНК (таких как вирусы и транспозоны), то у позвоночных ее назначение – еще и стабильная репрессия эндогенных генов (гены инактивированной хромосомы X, импринтированные гены, часть тканеспецифичных генов). Профиль метилирования, сильно влияющий на функциональное состояние гена, стабильно передается в ряду клеточных поколений. С этой точки зрения, для организмов с большой продолжительностью жизни и интенсивной тканевой регенерацией (позвоночные, растения) надежная система эпигенетической наследственности (типа метилирования ДНК) жизненно необходима. В противоположность этому у маленьких животных и животных с малой продолжительностью жизни, т.е. в ситуациях, когда значительное новообразование клеток отсутствует, такой необходимости нет. Предполагают, что именно этим обстоятельством объясняется отсутствие системы метилирования ДНК у нематод и дрозофилы [Jablonka. ea 1995].

### **Мейотический дрейф (драйв)**

Мейотический дрейф (или смещение передаваемого соотношения) возникает, если потомство наследует преимущественно один из аллелей гетерозиготного родителя. Это явление хорошо изучено для разных аллелей в локусе T у мышей и может иметь место у человека.

При этом происходит нарушение равновероятной сегрегации гомологичных хромосом. Примерами МД может служить система Segregation distortion у дрозофилы и T-локусы у домового мыши.

### **Литература**

1. Rao A.B., Koeller K.K., Adair C.F. Paragangliomas of the head and neck: radiologic-pathologic correlation // Radiographics. 1999. Vol. 19. P. 1605–1632.
2. Soffer D., Scheithauer B.W. Paraganglioma. In: World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Nervous System. [http://www.oncology.tomsk.ru/nii/journal/2009/6/files/soj\\_2009\\_6\\_78-82.p](http://www.oncology.tomsk.ru/nii/journal/2009/6/files/soj_2009_6_78-82.p) Geneva: IARC Press, 2000. P. 112–114.
3. Scriver C. R. et al., 1995.
4. Ledbetter D.H., Riccardi V.M., Airhart S.D., Strobel R.J., Keenan B.S., and Crawford J. D., 1981. Deletions of chromosome 15 as a cause of the Prader-Willi syndrome. N. Engl. J. Med. 304: 325–329.

5. Magenis R.E., Brown M.G., Lacy D.A., Budden S., and LaFranchi S., 1987. Is Angelman syndrome an alternate result of del(15) (q11q13)? *Am J. Med. Genet.* 28: 829-838.
6. Ohta T., Gray T.A., Rogan P.K., Buiting I.C., Gabriel J.M., Saitoh S., Muralidhar B., Bilienska B., Krajewska-Walasek M., Driscoll D.J., et al., 1999. Imprinting-mutation mechanisms in Prader-Willi syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 64: 397-413.
7. Kishino T., Lalonde M., and Wagstaff J., 1997. UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat. Genet.* 15: 70-73.
8. Matsuura T., Sutcliffe J.S., Fang P., Galjaard R.J., Jiang Y.H., Benton C.S., Rommens J.M., and Beaudet A.L., 1997. De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome. *Nat. Genet.* 15: 74-77.
9. Meguro M., Mitsuya K., Nomura N., Kohda M., Kashiwagi A., Nishigaki R., Yoshioka H., Nakao M., Oishi M., and Oshimura M., 2001. Large-scale evaluation of imprinting status in the Prader-Willi syndrome region: An imprinted direct repeat cluster resembling small nucleolar RNA genes. *Hum. Mol. Genet.* 10: 383-394.
10. Runte M., Varon R., Horn D., Horsthemke B., and Buiting K., 2005. Exclusion of the C/D box snoRNA gene cluster HBII-52 from a major role in Prader-Willi syndrome. *Hum. Genet.* 116: 228-230.
11. Ding E., Prints Y., Dhar M.S., Johnson D.K., Garnacho-Montero C., Nicholls R.D., and Francke U., 2005. Lack of Pwcr1/MBII-85 snoRNA is critical for neonatal lethality in Prader-Willi syndrome mouse models. *Mamm. Genome* 16: 424-431.
12. Schule B., Albalwi M., Northrop E., Francis D.L., Rowell M., Slater H.R., Gardner R.J., and Francke U., 2005. Molecular breakpoint cloning and gene expression studies of a novel translocation t(4;15)(q27;q11.2) associated with Prader-Willi syndrome. *BMC Med. Genet.* 6:18.
13. *Filippova GN, Fagerlie S, Klenova EM, Myers C, Dehner Y, Goodwin G, Neiman PE, Collins SJ, Lobanenkov VV (June 1996).* «An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes». *Mol. Cell. Biol.* **16** (6): 2802–13 *PMC231272. PMID 8649389.*
14. *Rubio ED, Reiss DJ, Welsh PL, Distèche CM, Filippova GN, Baliga NS, Aebersold R, Ranish JA, Krumm A (June 2008).* «CTCF physically links cohesin to chromatin». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105** (24): 8309–14..
15. Chaumeil J, Skok JA (April 2012). “The role of CTCF in regulating V(D)J recombination”. *Curr. Opin. Immunol.* **24** (2): 153–9.
16. Phillips JE, Corces VG (June 2009). “CTCF: master weaver of the genome”. *Cell.* **137** (7): 1194–211.
17. Weksberg R., Smith A.C., Squire J., and Sadowski P., 2003. Beckwith- Wiedemann syndrome demonstrates a role for epigenetic control of normal development. *Hum. Mol. Genet.* 12: R61-R68.
18. Ping A.J., Reeve A.E., Law D.J., Young M.R., Boehnke M., and Feinberg A.P., 1989. Genetic linkage of Beckwith-Wiedemann syndrome to 11p15. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 720-773.
19. Joyce J.A., Lam W.K., Catchpoole D.J., Jenks P., Reik W, Maher E.R., and Schofield P.N., 1997. Imprinting of IGF2 and H19: Lack of reciprocity in sporadic Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 6: 1543-1548.
20. Hark A.T., Schoenherr C.J., Katz D.J., Ingram R.S., Levorse J.M., and Tilghman S.M., 2000. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer- blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* 405: 486-489.
21. Cooper W.N., Luharia A., Evans G.A., Raza H., Haire A.C., Grundy R., Bowdin S.C., Riccio A., Sebastio G., Blik J., et al., 2005. Molecular subtypes and phenotypic expression of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* 13: 1025-1032.
22. Weksberg R., Nishikawa J., Caluseriu O., Fei Y.L., Shuman C., Wei C., Steele L., Cameron

J., Smith A., Ambus I., et al., 2001. Tumor development in the Beckwith-Wiedemann syndrome is associated with a variety of constitutional molecular 11p15 alterations including imprinting defects of KCNQ1OT1. *Hum. Mol. Genet.* 10: 2989-3000.

23. DeBaun M.R., Niemitz E.L., and Feinberg A.P., 2003. Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am. J. Hum. Genet.* 72: 156-160.

24. Prawitt D., Enklaar T., Gartner-Rupprecht B., Spangenberg C., Oswald M., Lausch E., Schmidke P., Reutzel D., Fees S., Lucito R., et al., 2005. Microdeletion of target sites for insulator protein CTCF in a chromosome 11p15 imprinting center in Beckwith-Wiedemann syndrome and Wilms' tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 4085-4090.

25. Hayward B.E., Kamiya M., Strain L., Moran V., Campbell R., Hayashizaki Y., and Bonthron D.T., 1998. The human GNAS1 gene is imprinted and encodes distinct paternally and biallelically expressed G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 10038-10043.

26. Bastepe M., Frohlich L.E., Hendy G.N., Indridason O.S., Josse R.G., Koshiyama H., Korkko J., Nakamoto J.M., Rosenbloom A.L., Slyper A.H., et al., 2003. Autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type 1b is associated with a heterozygous microdeletion that likely disrupts a putative imprinting control element of GNAS. *J. Clin. Invest.* 112: 1255- 1263.

27. Eggermann T., Wollmann H.A., Kuner R., Eggermann K., Enders H., Kaiser P., and Ranke M.B., 1997. Molecular studies in 37 Silver-Russell syndrome patients: Frequency and etiology of uniparental disomy. *Hum. Genet.* 100: 415-419.

28. Gicquel C., Rossignol S., Cabrol S., Houang M., Steunou V., Barbu V., Danton R., Thibaud N., Le Merrer M., Burglen L., et al., 2005. Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome. *Nat. Genet.* 37:1003-1007.

### **Контрольные вопросы**

1. Какие типы наследования моногенных болезни человека существуют?
2. Какие заболевания человека обусловлены динамическими мутациями?
3. Что означает геномный импринтинг и какие болезни человека связаны с импринтигом?
4. Как возникают одноподительские дисомии и какие патологии человека с ними связаны?



## ГЛАВА 15

**НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ ЧЕЛОВЕКА: ГРУППЫ РИСКА,  
МЕТОДЫ ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКА  
НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ****15.1. Группы риска: обнаружение**

Точная диагностика в сочетании с детальным анализом типа наследования того или иного заболевания имеет определяющее значение для формирования групп риска, т.е. отбора семей, в которых вероятность рождения больных детей повышена. Прежде всего, это те семьи, где уже есть или был ребенок, страдающий каким-либо моногенным наследственным заболеванием. Для аутосомно-рецессивных болезней с большой долей вероятности можно считать, что оба родителя этого ребенка являются гетерозиготными носителями мутантных аллелей соответствующего гена, и риск повторного рождения больного ребенка в такой семье составляет 25%, независимо от исхода предыдущих родов. Поэтому в таких случаях рекомендуется обязательная пренатальная диагностика плода при каждой последующей беременности.

Для сцепленных с полом заболеваний важной практической задачей является выявление случаев спонтанного возникновения мутаций в родительском поколении. Для таких распространенных заболеваний, как миодистрофия Дюшенна и гемофилия А, почти треть всех случаев имеет спонтанное происхождение. При этом мутации гена дистрофина, как правило, возникают в оогенезе, т.е. у матери, а мутации гена фактора VIII, обычно появляются во время сперматогенеза у деда больного ребенка. В отличие от тех семей, в которых мать гетерозиготна, вероятность повторного рождения больного ребенка в семьях со спонтанной мутацией не превышает среднепопуляционную частоты, и потому нет необходимости проводить пренатальную диагностику плода при последующих беременностях.

Специального рассмотрения в этой связи заслуживает вопрос гонадного мозаицизма, т.е. наличия в гонадах матери генетически нормальных и мутантных ооцитов. Особенно велик риск такого состояния в случае миодистрофии Дюшенна. Гонадный мозаицизм в силу своей органной специфики достаточно трудно доказать или опровергнуть. Между тем считается, что 6,7% спорадических случаев миодистрофии Дюшенна обусловлены гонадным мозаицизмом у матери.

Подробное медико-генетическое консультирование семей, в которых зарегистрированы спонтанные случаи рождения детей с X-сцепленными заболеваниями, в сочетании с соответствующими лабораторными, в том числе и молекулярными исследованиями, как правило, позволяют ответить на вопрос о происхождении мутации. Так, гетерозиготное носительство у матери может быть заподозрено, в частности, по содержанию соответствующих белковых продуктов (например, фактора VIII свертывания крови при гемофилии А; дистрофина в мышцах и креатинкиназы в сыворотке крови при миодистрофии Дюшенна) либо при помощи специальных ДНК-методов, позволяющих

идентифицировать мутантный аллель у матери. Если дифференцировка этих случаев невозможна или доказано, что мутация у больного ребенка не является спонтанной, следует предполагать, что мать является гетерозиготной носительницей и с 50% вероятностью будет передавать болезнь своим сыновьям. В этом случае пренатальная диагностика обязательна и должна сопровождаться определением пола плода. Следует, однако, подчеркнуть, что установление мужского пола плода на сегодняшний день отнюдь не является показанием для прерывания беременности, поскольку в 50% случаев мальчики получают от матери X-хромосому с нормальным аллелем гена и являются вполне здоровыми. Определить, какую именно X-хромосому (с нормальными или мутантным аллелем) получил плод мужского пола, и является задачей молекулярной диагностики. С помощью прямых и непрямых методов ДНК-диагностики эта задача уже практически решается для очень многих сцепленных с полом заболеваний.

## 15.2. Профилактика наследственных заболеваний

Ограниченные возможности лечения наследственных болезней и предсказуемый характер передачи генов от поколения к поколению заставили сосредоточить внимание на профилактике как наиболее надежном и эффективном способе предотвращения этих болезней. Профилактические методы включают генетическое обследование, медико-генетическое консультирование и пренатальную диагностику.

Наиболее эффективной мерой профилактики наследственных заболеваний является выявление гетерозиготных носителей мутаций, так как при этом удается предотвратить рождение первого больного ребенка в семьях высокого риска. Родственники больного с большой вероятностью могут быть гетерозиготными носителями мутантных аллелей, поэтому в тех случаях, когда это возможно, они подлежат обследованию в первую очередь. Для болезней, сцепленных с полом, это касается родственников по женской линии – сестер, дочерей и теток пробанда. Их диагностика особенно важна, так как вероятность рождения больных сыновей в потомстве носительниц мутаций очень высока и не зависит от генотипа супруга. При аутосомно-рецессивных заболеваниях половина sibсов родителей и две трети здоровых sibсов больного будут гетерозиготными носителями мутации. Поэтому в тех семьях, где принципиально возможна молекулярная идентификация мутантных аллелей, необходимо обследовать максимальное число родственников больного пробанда для выявления гетерозиготных носителей. Иногда в больших семьях с разветвленными родословными удается проследить наследование неидентифицируемых мутаций с помощью косвенных методов молекулярной диагностики.

Для заболеваний, распространенных в определенных популяциях или в каких-то этнических группах и обусловленных присутствием одного или нескольких преобладающих и легко идентифицируемых мутантных аллелей, возможно проведение тотального скрининга на гетерозиготное носительство этих мутаций среди определенных групп населения, например, среди беременных женщин или среди новорожденных. Считается, что подобный скрининг экономически оправдан в том случае, если при проведении процедуры выявляются аллели, составляющие не менее 90-95% всех мутаций данного

гена в исследуемой популяции. Выявленные при подобных обследованиях носители мутаций также составляют группу риска, и в последующем должны быть аналогичным образом протестированы их супруги. Однако, даже в том случае, если мутация найдена только у одного из родителей, вероятность рождения больного ребенка несколько выше популяционной частоты, но, конечно, значительно меньше 25%. Конкретное значение этого риска зависит от общей частоты мутаций соответствующего гена в популяции. В таких семьях (по желанию родителей) также может быть проведена пренатальная диагностика и прослежено наследование мутантного аллеля. При отсутствии этой мутации у плода прогноз считается благоприятным, независимо от того, какие аллели ребенок получит от второго супруга.

С профилактической точки зрения всю наследственную патологию целесообразно подразделить на три категории:

- 1) вновь возникающие мутации (в первую очередь это анеуплоидии и тяжелые формы доминантных мутаций);
- 2) унаследованные от предыдущих поколений (как генные, так и хромосомные);
- 3) болезни с наследственной предрасположенностью.

Различают **первичную профилактику** наследственной патологии и **вторичную профилактику** наследственной патологии.

Под **первичной профилактикой** понимают такие меры, которые должны предупредить зачатие или рождение больного ребенка.

Профилактика вновь возникающих мутаций должна сводиться к уменьшению темпа мутационного процесса. Последний же протекает интенсивно.

Современной основой профилактики наследственной патологии являются теоретические разработки в области генетики человека и медицины, которые позволили понять:

- 1) молекулярную природу наследственных болезней, механизмы и процессы их развития в пре- и постнатальном периоде;
- 2) закономерности сохранения мутаций (а иногда и распространения) в семьях и популяции;
- 3) процессы возникновения и становления мутаций в зародышевых и соматических клетках.

Профилактика наследственных болезней может быть наиболее полной и эффективной, если в зиготу будет встроен ген, по функции заменяющий мутантный ген. Устранение причины наследственной болезни (а именно это и есть наиболее глубокий подход к профилактике) означает достаточно серьезное манипулирование с генетической информацией в зиготе. Это могут быть введение нормального аллеля в геном путем трансфекции, обратная мутация патологического аллеля, включение нормального гена в работу, если он блокирован, выключение мутантного гена.

Сложности этих задач очевидны, но экспериментальные разработки в области *генной инженерии* свидетельствуют о принципиальной возможности решения таких задач. Постановка вопроса о генноинженерной профилактике наследственных болезней является уже не утопией, а перспективой, хотя не близкой. Несколько принципиальных открытий создают предпосылки для генной инженерии на уровне зародышевых клеток.

1. Интенсивная расшифровка генома человека, особенно на уровне секвенирования нормальных и патологических аллелей. Можно надеяться, что для большинства наследственных болезней мутации будут секвенированы в ближайшие годы.

2. Получение генов человека в чистом виде на основе химического или биологического синтеза. Интересно отметить, что ген глобина человека был одним из первых искусственно полученных генов.

3. Включение генов в геном человека с разными векторами или путем трансфекции.

4. Возможность направленного химического мутагенеза, позволяющего индуцировать специфические мутации в строго определенном локусе (получение обратных мутаций – от патологического аллеля к нормальному).

5. Доказательства, полученные в экспериментах на разных животных, трансфекции отдельных генов на стадии зигот. Введенные гены функционируют в организме-реципиенте и передаются по наследству, хотя и не всегда по законам Менделя. Например, ген гормона роста крыс, введенный в геном зигот мышей, функционирует у родившихся мышей.

### **Мультифакториальные Заболевания**

Мультифакториальные болезни, или болезни с наследственной склонностью, обусловленные комбинацией генетических и негенетических факторов (внешняя среда).

Для реализации мультифакториальных болезней необходима не только соответствующая генетическая конституция индивида, но и фактор или комплекс факторов среды, которые сыграют роль пусковых моментов в формировании патологии. К таким заболеваниям относятся: *атеросклероз, подагра, ревматизм, ишемическая болезнь сердца, гипертоническая болезнь, эпилепсия, язвенная болезнь желудка и 12-перстной кишки, цирроз печени, сахарный диабет, бронхиальная астма, туберкулез, псориаз, шизофрения.*

#### ***Характерные признаки мультифакториальных болезней:***

1. большой полиморфизм клинических форм и индивидуальных проявлений; существование переходных форм от здоровых людей к больным, от субклинических форм к тяжелому протеканию болезни;

2. высокая частота в популяции (сахарным диабетом страдает 5 % людей земного шара, аллергическими заболеваниями – свыше 10 %, шизофренией – 1 %, гипертонией – около 30 %);

3. несоответствие наследования законам Менделя;

4. разный возраст больных.

По наследству передается склонность к определенному заболеванию. Для некоторых клинических форм роль наследственного (семейного) фактора является решающей. Степень риска для родственников больного зависит от частоты болезни в популяции. Чем ближе степень родства с больным у родственников, тем большая вероятность рождения у них больного ребенка. В ряде случаев наблюдается неодинаковая частота патологии в зависимости от пола. Например, врожденная дисплазия тазобедренного сустава (врожденная неполноценность сустава, обусловленная его неправильным развитием, которая может привести (или привела) к подвывиху или вывиху головки бедра-

ной кости – к «врождённому вывиху бедра» (англ. congenital dislocation of the hip). чаще встречается у девочек, а пилоростеноз – у мальчиков.

Болезни с наследственной предрасположенностью могут быть моногенными и полигенными. Основу составляет полигенное наследование и часто гетерозиготность. При полигенном наследовании признак обуславливают несколько неаллельных генов, но проявляются они в зависимости от условий среды. При гетерозиготном носительстве патологический рецессивный ген в гетерозиготном состоянии не проявляется, но может проявиться при неблагоприятных условиях жизни. Поскольку болезни с наследственной склонностью определяются объединением наследственных и внешних факторов, их относят к заболеваниям с пенетрантностью, которая в значительной мере зависит от условий среды. Изменяя условия среды, можно значительно изменить проявление таких болезней и даже предупредить их.

### **Митохондриальные болезни**

Каждая митохондрия имеет собственную ДНК кольцевой формы. В этой хромосоме (М-хромосома) содержится 16569 пар нуклеотидов. Генетический код митохондриальных ДНК отличается от универсального: отдельные триплеты кодируют другие аминокислоты, неодинаковые нуклеотидные последовательности формируют стоп-кодона, чаще в третьей позиции встречается аденин или цитозин. В отличие от ядерного генома, нуклеотидная последовательность характеризуется экономной организацией: в ней нет или содержится незначительное количество некодирующих участков.

Описаны мутации разных генов митохондрий. Генные мутации в митохондриальной ДНК наблюдаются при наследственной атрофии зрительного нерва Лебера, митохондриальных миопатиях, при прогрессирующих офтальмоплегиях, миокардиопатиях, атаксии-слепоте. Митохондрии передаются с цитоплазмой яйцеклеток, сперматозоиды цитоплазмы почти не содержат.

Для митохондриального наследования характерные следующие признаки: 1) болезнь передается только от матери детям;

2) болеют и девочки, и мальчики;

3) больной отец не передает заболевания ни дочерям, ни сыновьям.

### **Факторы, повышающие риск рождения детей с хромосомными болезнями**

Имеются экспериментальные данные о влиянии на мутационный процесс таких факторов, как: действие ионизирующих излучений, химических веществ, вирусов.

Другими причинами нерасхождения хромосом могут быть: сезонность, возраст отца и матери, порядок рождения детей, прием лекарств вовремя беременности, гормональные нарушения, алкоголизм. Не исключается до определенной степени и генетическое детерминирование нерасхождения хромосом. Повторим, однако, что причины образования геномных и хромосомных мутаций на ранних стадиях развития зародыша до сих пор окончательно не раскрыты.

К биологическим факторам повышения риска рождения детей с хромосомными аномалиями может быть отнесен возраст матери. Риск рождения больного ребенка особенно резко возрастает после 35 лет. Это характерно для любых хромосомных болезней, но наиболее четко наблюдается для болезни Дауна. В медико-генетическом

планировании беременности особое значение уделяется двум факторам – наличию анеуплоидии по аутосомам у ребенка и возрасту матери старше 35 лет. К кариотипическим факторам риска у супружеских пар относятся: анеуплоидия (чаще в мозаичной форме), робертсоновские транслокации (слияние двух телоцентрических хромосом в области деления), кольцевые хромосомы, инверсии. Степень повышения риска зависит от типа хромосомных нарушений. В настоящее время оценка степени риска уступает более точной пренатальной цитогенетической диагностике эмбриона или плода.

### 15.3. Методы определения наследственных болезней

**Современная генетика позволяет диагностировать большинство наследственных болезней человека при помощи методов, основанных на изучении генотипа и наследственности.**

Наследственные болезни человека – заболевания, вызванные хромосомными и генными дефектами. Основой наследственных заболеваний являются генные, хромосомные и митохондриальные нарушения наследственной информации.

Не стоит путать наследственные и врожденные заболевания. Врожденные заболевания обусловлены не только наследственными, но и внешними факторами, например негативным воздействием на эмбрион химических веществ, лекарств или облучения.

Наследственные заболевания человека могут быть выявлены сразу после рождения, а могут проявиться спустя долгое время.

Около 10% всех заболеваний человека обусловлено патологическими генами или генами, отвечающими за предрасположенность к болезни.

#### ***Классификация наследственных болезней человека***

1. Генетические заболевания. Возникают как результат повреждения ДНК на уровне гена.

2. Хромосомные заболевания. Болезни, связанные с аномалией количества хромосом или абберациями хромосом.

3. Заболевания с наследственной предрасположенностью.

Генетика человека изучает особенности наследования генетических признаков в зависимости от генотипа человека и факторов внешней среды. Несмотря на трудности в исследованиях, генетика человека сегодня изучена гораздо лучше генетики других организмов.

Ученые выделяют следующие методы определения наследственности и генетических заболеваний.

1. Генеалогический (генетический) метод основывается на изучении родословной человека. Данный метод помогает выявить особенности наследования нормальных и патологических признаков организма человека.

2. Близнецовый метод – изучение близнецов для выявления влияния наследственности и внешней среды на развитие болезней. Основа данного метода – различия между однойцевыми и разнойцевыми близнецами, обусловленные разными факторами.

3. Цитогенетический метод. Основой данного метода является исследование структуры хромосом у здоровых и больных людей.

4. Биохимический метод. При помощи этого метода ученые исследуют особенности обмена веществ человека (множество наследственных заболеваний непосредственно связаны с нарушением обмена веществ).

5. Иммуногенетический метод. Данный метод позволяет ставить диагноз при врожденных иммунодефицитных патологиях.

6. Метод дерматоглифики – изучение папиллярных узоров ладоней и стоп. Дерматоглифические узоры остаются неизменными на протяжении всей жизни человека. Дерматоглифический анализ используется для диагностики некоторых геномных и хромосомных мутаций.

### **Профилактика наследственных болезней**

Наиболее эффективным и распространенным методом профилактики наследственных болезней является медико-генетическое консультирование, которое позволяет предупредить появление в семье больного ребенка. Прежде всего это касается тяжелых пороков развития и наследственных болезней.

Наследственные заболевания – трагедия не только для больного, но и для всей его семьи. Ранняя постановка диагноза при наследственной патологии поможет не только подготовиться к болезни морально, но и определить возможные методы лечения.

## **15.4. Методы изучения генетики человека**

К методам, широко используемым при изучении генетики человека, относятся генеалогический, популяционно-статистический, близнецовый, метод дерматоглифики, цитогенетический, биохимический, методы генетики соматических клеток.

### **Генеалогический метод**

В основе этого метода лежит составление и анализ родословных. Родословные человека составлялись на протяжении многих столетий в отношении царствующих семейств в Европе и Азии.

При составлении родословных таблиц используют условные обозначения, предложенные Г. Юстом в 1931 г. (рисунок 15.1). Поколения обозначают римскими цифрами, индивидов в данном поколении – арабскими.

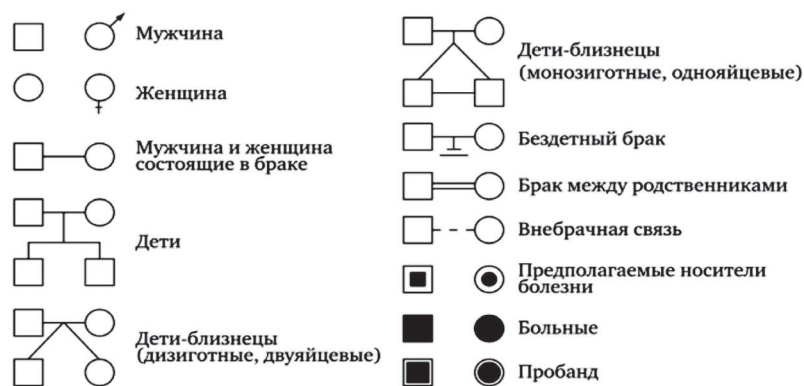


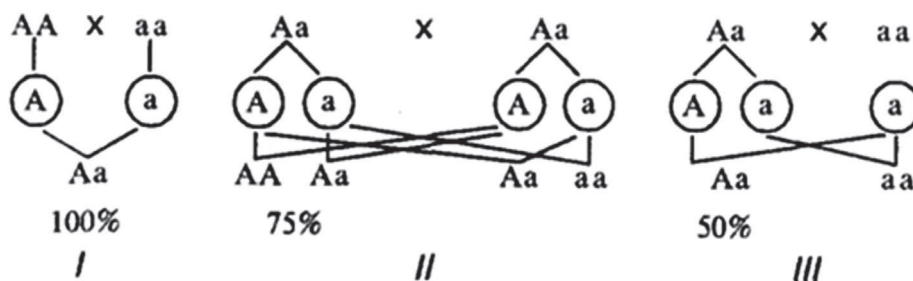
Рисунок 15.1. Условные обозначения при составлении родословных (по Г. Юсту)

При составлении родословных исходным является человек – пробанд, родословную которого изучают. Обычно это или больной, или носитель определенного признака, наследование которого необходимо изучить.

С помощью генеалогического метода может быть установлена наследственная обусловленность изучаемого признака, а также тип его наследования (аутосомно-доминантный, аутосомно-рецессивный, X-сцепленный доминантный или рецессивный, Y-сцепленный). При анализе родословных по нескольким признакам может быть выявлен сцепленный характер их наследования, что используют при составлении хромосомных карт. Этот метод позволяет изучать интенсивность мутационного процесса, оценить экспрессивность и пенетрантность аллеля. Он широко используется в медико-генетическом консультировании для прогнозирования потомства. Однако необходимо отметить, что генеалогический анализ существенно осложняется при малодетности семей.

**Родословные при аутосомно-доминантном наследовании.** Для аутосомного типа наследования в целом характерна равная вероятность встречаемости данного признака как у мужчин, так и у женщин. Это обусловлено одинаковой двойной дозой генов, расположенных в аутосомах у всех представителей вида и получаемых от обоих родителей, и зависимостью развивающегося признака от характера взаимодействия аллельных генов.

При доминировании признака в потомстве родительской пары, где хотя бы один родитель является его носителем, он проявляется с большей или меньшей вероятностью в зависимости от генетической конституции родителей (рисунок 15.2).



**Рисунок. 15.2.** Вероятность появления потомков с доминантным признаком от различных супружеских пар (I–III)

Если анализируется признак, не влияющий на жизнеспособность организма, то носители доминантного признака могут быть как гомо-, так и гетерозиготами. В случае доминантного наследования какого-то патологического признака (заболевания) гомозиготы, как правило, нежизнеспособны, а носители этого признака – гетерозиготы.

Таким образом, при аутосомно-доминантном наследовании признак может встречаться в равной мере у мужчин и у женщин и прослеживается при достаточном по численности потомстве в каждом поколении по вертикали. Анализируя родословные, необходимо помнить о возможности неполного пенетрирования доминантного аллеля, обусловленной взаимодействием генов или факторами среды. Показатель пенетрант-



ности может быть вычислен как отношение фактического числа носителей признака к числу ожидаемых носителей этого признака в данной семье. Необходимо также помнить, что некоторые заболевания проявляются не сразу с момента рождения ребенка. Многие болезни, наследуемые по доминантному типу, развиваются лишь в определенном возрасте. Так, хорея Гентингтона клинически проявляется к 35–40 годам, поздно проявляется и поликистоз почек. Поэтому при прогнозировании подобных заболеваний в расчет не принимаются братья и сестры, не достигшие критического возраста.

Первое описание родословной с аутосомно-доминантным типом наследования аномалии у человека было дано в 1905 г. В ней прослеживается передача в ряду поколений брахидактилии (короткопалости). На рисунке 15.3 приведена родословная с этой аномалией. На Рисунок 15.4 изображена родословная с ретинобластомой в случае неполной пенетрантности.



Рисунок 15.3. Родословная (А) при аутосомно-доминантном типе наследования (брахидактилия – Б)



Рисунок 15.4. Родословная с ретинобластомой в случае неполной пенетрантности

**Родословные при аутосомно-рецессивном наследовании.** Рecessive признаки проявляются фенотипически лишь у гомозигот по рецессивным аллелям. Эти признаки, как правило, обнаруживаются у потомков фенотипически нормальных родителей – носителей рецессивных аллелей. Вероятность появления рецессивного потомства в этом случае равна 25%. Если один из родителей имеет рецессивный признак, то вероятность проявления его в потомстве будет зависеть от генотипа другого родителя. У рецессивных родителей все потомство унаследует соответствующий рецессивный признак (Рисунок 15.5).

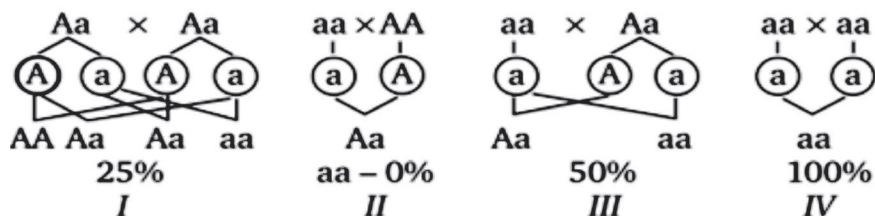


Рисунок 15.5. Вероятность появления потомков с рецессивным признаком от различных супружеских пар (I–IV).

Примером аутосомно-рецессивного наследования является родословная семьи с *псевдогипертрофической прогрессирующей миопатией*, в которой часты близкородственные браки (рисунок 15.6.).

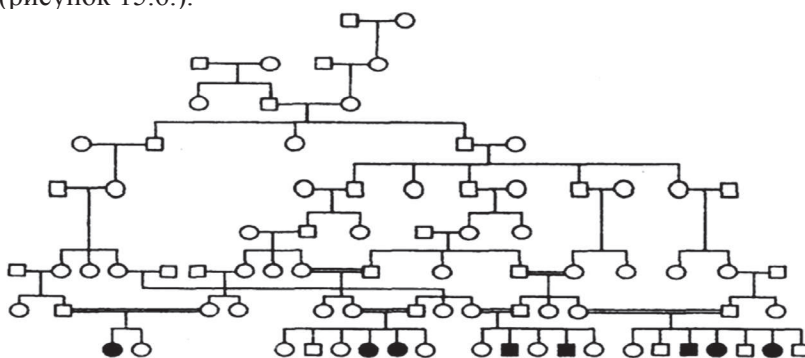


Рисунок 15.6. Родословная при аутосомно-рецессивном типе наследования (псевдогипертрофическая прогрессирующая миопатия)

Для родословных при аутосомно-рецессивном типе наследования характерно, что признак проявляется далеко не в каждом поколении. Чаще всего рецессивное потомство появляется у родителей с доминантным признаком, причем вероятность появления такого потомства возрастает в близкородственных браках, где оба родителя могут являться носителями одного и того же рецессивного аллеля, полученного от общего предка. Обращает внимание распространение заболевания в последнем поколении по горизонтали.

**Родословные при доминантном X-сцепленном наследовании признака.** Гены, расположенные в X-хромосоме и не имеющие аллелей в Y-хромосоме, представлены в генотипах мужчин и женщин в разных дозах. Женщина получает две свои X-хромосомы и соответствующие гены как от отца, так и от матери, а мужчина наследует свою единственную X-хромосому только от матери. Развитие соответствующего признака у мужчин определяется единственным аллелем, присутствующим в его генотипе, а у женщин он является результатом взаимодействия двух аллельных генов. В связи с этим признаки, наследуемые по X-сцепленному типу, встречаются в популяции с разной вероятностью у мужского и женского пола.

При доминантном X-сцепленном наследовании признак чаще встречается у женщин в связи с большей возможностью получения ими соответствующего аллеля либо от отца, либо от матери. Мужчины могут наследовать этот признак только от матери. Женщины с доминантным признаком передают его в равной степени дочерям и сыновьям, а мужчины – только дочерям. Сыновья никогда не наследуют от отцов доминантного X-сцепленного признака. Примером такого типа наследования служит описанная в 1925 г. родословная с *фолликулярным кератозом* – кожным заболеванием, сопровождающимся потерей ресниц, бровей, волос на голове (рисунок 15.7). Характерным является более тяжелое течение заболевания у гемизиготных мужчин, чем у женщин, которые чаще всего являются гетерозиготами.

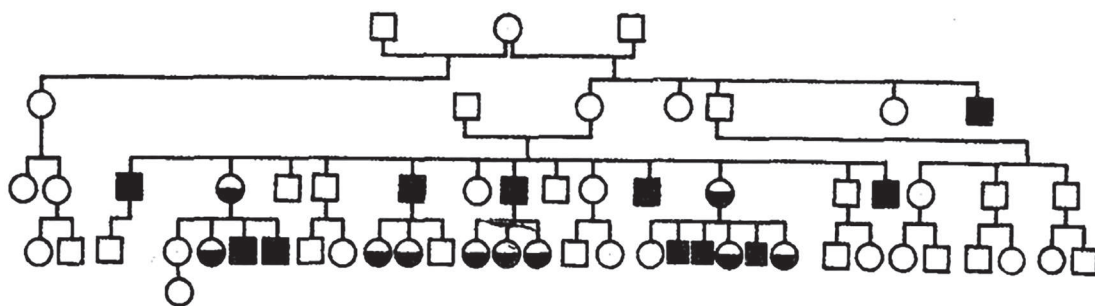


Рисунок 15.7. Родословная при X-сцепленном доминантном типе наследования (фолликулярный кератоз)

При некоторых заболеваниях наблюдается гибель мужчин-гемизигот на ранних стадиях онтогенеза. Тогда в родословных среди пораженных должны быть только женщины, в потомстве которых отношение пораженных дочерей, здоровых дочерей и здоровых сыновей равно 1:1:1. Мужские доминантные гемизиготы, не погибающие на очень ранних стадиях развития, обнаруживаются в самопроизвольных абортах или среди мертворожденных. Такими особенностями наследования у человека характеризуется пигментный дерматоз.

### Родословные при рецессивном X-сцепленном наследовании признаков.

Характерной особенностью родословных при данном типе наследования является преимущественное проявление признака у гемизиготных мужчин, которые наследуют его от матерей с доминантным фенотипом, являющихся носительницами рецессивного аллеля. Как правило, признак наследуется мужчинами через поколение от деда по материнской линии к внуку. У женщин он проявляется лишь в гомозиготном состоянии, вероятность чего возрастает при близкородственных браках.

Наиболее известным примером рецессивного X-сцепленного наследования является *гемофилия*. Наследование гемофилии типа А представлено в родословной потомков английской королевы Виктории (Рисунок 15.8).

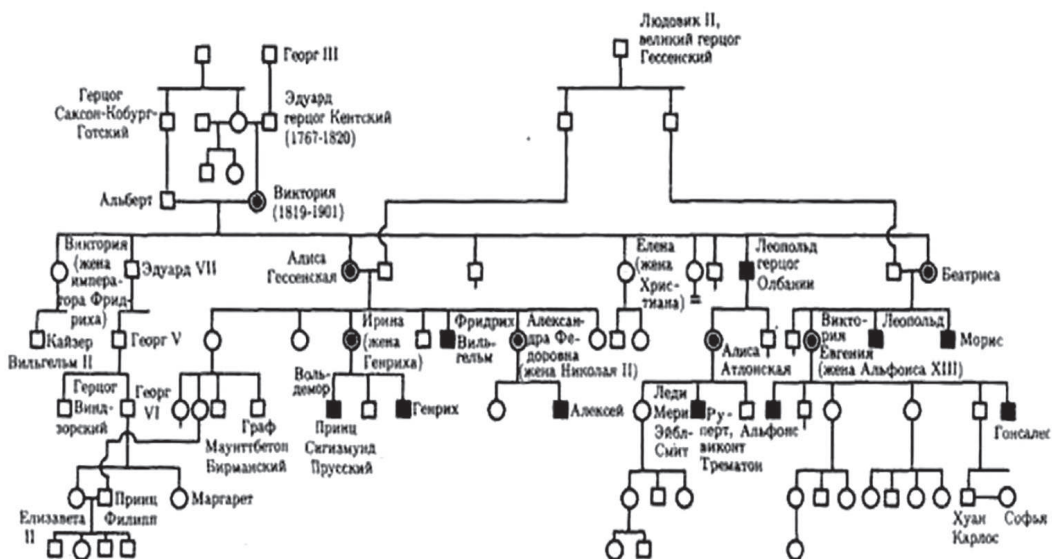


Рисунок 15.8. Родословная при X-сцепленном рецессивном типе наследования (гемофилия типа А)

Другим примером наследования по данному типу является *дальтонизм* – определенная форма нарушения цветоощущения.

### Родословные при Y-сцепленном наследовании.

Наличие Y-хромосомы только у представителей мужского пола объясняет особенности Y-сцепленного, или голландрического, наследования признака, который обнаруживается лишь у мужчин и передается по мужской линии из поколения в поколение от отца к сыну.

Одним из признаков, Y-сцепленное наследование которого у человека все еще обсуждается, является *гипертрихоз ушной раковины*, или наличие волос на внешнем крае ушной раковины. Предполагают, что в коротком плече Y-хромосомы кроме этого гена находятся гены, определяющие мужской пол. В 1955 г. у мыши описан определяемый Y-хромосомой трансплантационный антиген, названный NY. Возможно, он является одним из факторов половой дифференцировки мужских гонад, клетки которых имеют рецепторы, связывающие этот антиген. Связанный с рецептором антиген активизирует

развитие гонады по мужскому типу. Этот антиген в процессе эволюции остался почти неизменным и встречается в организме многих видов животных, в том числе и человека. Таким образом, наследование способности к развитию гонад по мужскому типу определяется голландрическим геном, расположенным в Y-хромосоме (Рисунок 15.9).

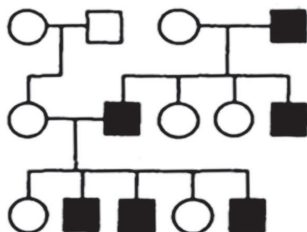


Рисунок 15.9. Родословная при Y-сцепленном (голандрическом) типе наследования

### Близнецовый метод

Этот метод заключается в изучении закономерностей наследования признаков в парах одно- и двуйцевых близнецов. Он предложен в 1875 г. Гальтоном первоначально для оценки роли наследственности и среды в развитии психических свойств человека. В настоящее время этот метод широко применяют в изучении наследственности и изменчивости у человека для определения соотносительной роли наследственности и среды в формировании различных признаков, как нормальных, так и патологических. Он позволяет выявить наследственный характер признака, определить пенетрантность аллеля, оценить эффективность действия на организм некоторых внешних факторов (лекарственных препаратов, обучения, воспитания).

Суть метода заключается в сравнении проявления признака в разных группах близнецов при учете сходства или различия их генотипов. *Монозиготные близнецы*, развивающиеся из одной оплодотворенной яйцеклетки, генетически идентичны, так как имеют 100% общих генов. Поэтому среди монозиготных близнецов наблюдается высокий процент *конкордантных пар*, в которых признак развивается у обоих близнецов. Сравнение монозиготных близнецов, воспитывающихся в разных условиях постэмбрионального периода, позволяет выявить признаки, в формировании которых существенная роль принадлежит факторам среды. По этим признакам между близнецами наблюдается *дискордантность*, т.е. различия. Напротив, сохранение сходства между близнецами, несмотря на различия условий их существования, свидетельствует о наследственной обусловленности признака.

Сопоставление парной конкордантности по данному признаку у генетически идентичных монозиготных и дизиготных близнецов, которые имеют в среднем около 50% общих генов, дает возможность более объективно судить о роли генотипа в формировании признака. Высокая конкордантность в парах монозиготных близнецов и существенно более низкая конкордантность в парах дизиготных близнецов свидетельствуют о значении наследственных различий в этих парах для определения признака. Сходство показателя конкордантности у моно- и дизиготных близнецов свидетельствует о незначительной роли генетических различий и определяющей роли среды в формировании

признака или развития заболевания. Достоверно различающиеся, но достаточно низкие показатели конкордантности в обеих группах близнецов дают возможность судить о наследственной предрасположенности к формированию признака, развивающегося под действием факторов среды.

Установление соотносительной роли наследственности и среды в развитии различных патологических состояний позволяет врачу правильно оценить ситуацию и проводить профилактические мероприятия при наследственной предрасположенности к заболеванию или осуществлять вспомогательную терапию при его наследственной обусловленности.

Трудности близнецового метода связаны, во-первых, с относительно низкой частотой рождения близнецов в популяции (1:86–1:88), что осложняет подбор достаточного количества пар с данным признаком; во-вторых, с идентификацией монозиготности близнецов, что имеет большое значение для получения достоверных выводов.

Для идентификации монозиготности близнецов применяют ряд методов:

1. Полисимптомный метод сравнения близнецов по многим морфологическим признакам (пигментации глаз, волос, кожи, форме волос и особенностям волосяного покрова на голове и теле, форме ушей, носа, губ, ногтей, тела, пальцевым узорам).

2. Методы, основанные на иммунологической идентичности близнецов по эритроцитарным антигенам (системы ABO, MN, резусу), по сывороточным белкам ( $\gamma$ -глобулину).

3. Наиболее достоверный критерий монозиготности предоставляет трансплантационный тест с применением перекрестной пересадки кожи близнецов.

Несмотря на трудоемкость близнецового метода и возможность ошибок при определении монозиготности близнецов, высокая объективность выводов делает его одним из широко применяемых методов генетических исследований у человека

### **Популяционно-статистический метод**

С помощью популяционно-статистического метода изучают наследственные признаки в больших группах населения, в одном или нескольких поколениях. Существенным моментом при использовании этого метода является статистическая обработка получаемых данных. Этим методом можно рассчитать частоту встречаемости в популяции различных аллелей гена и разных генотипов по этим аллелям, выяснить распространение в ней различных наследственных признаков, в том числе заболеваний. Он позволяет изучать мутационный процесс, роль наследственности и среды в формировании фенотипического полиморфизма человека по нормальным признакам, а также в возникновении болезней, особенно с наследственной предрасположенностью. Этот метод используют и для выяснения значения генетических факторов в антропогенезе, в частности в расообразовании.

При статистической обработке материала, получаемого при обследовании группы населения по интересующему исследователя признаку, основой для выяснения генетической структуры популяции является закон *генетического равновесия Харди – Вайнберга*. Он отражает закономерность, в соответствии с которой при определенных условиях соотношение аллелей генов и генотипов в генофонде популяции сохраняется не-

изменным в ряду поколений этой популяции. На основании этого закона, имея данные о частоте встречаемости в популяции рецессивного фенотипа, обладающего гомозиготным генотипом (aa), можно рассчитать частоту встречаемости указанного аллеля (a) в генофонде данного поколения. Распространив эти сведения на ближайшие поколения, можно предсказать частоту появления в них людей с рецессивным признаком, а также гетерозиготных носителей рецессивного аллеля.

Математическим выражением закона Харди – Вайнберга служит формула  $(pA + qa)^2$ , где  $p$  и  $q$  – частоты встречаемости аллелей A и a соответствующего гена. Раскрытие этой формулы дает возможность рассчитать частоту встречаемости людей с разным генотипом и в первую очередь гетерозигот – носителей скрытого рецессивного аллеля:  $p^2AA + 2pqAa + q^2aa$ . Например, альбинизм обусловлен отсутствием фермента, участвующего в образовании пигмента меланина и является наследственным рецессивным признаком. Частота встречаемости в популяции альбиносов (aa) равна 1:20 000. Следовательно,  $q^2 = 1/20\ 000$ , тогда  $q = 1/141$ , и  $p = 140/141$ . В соответствии с формулой закона Харди – Вайнберга частота встречаемости гетерозигот  $= 2pq$ , т.е. соответствует  $2 \times (1/141) \times (140/141) = 280/20000 = 1/70$ . Это означает, что в данной популяции гетерозиготные носители аллеля альбинизма встречаются с частотой один на 70 человек.

Анализ частот встречаемости разных признаков в популяции в случае их соответствия закону Харди – Вайнберга позволяет утверждать, что признаки обусловлены разными аллелями одного гена. Так, например, установлено, что в США 29,16% белого населения имеют группу крови M, 49,58% – группу MN, 21,26% – группу N. Эти частоты разных фенотипов соответствуют формуле  $p^2M + 2pqMN + q^2N$ . Следовательно, эти три варианта признака обусловлены сочетанием двух аллелей одного гена, взаимодействующих по типу кодоминирования: группа M –  $L^mL^m$ , группа N –  $L^nL^n$ , группа MN –  $L^mL^n$ .

В том случае, если ген в генофонде популяции представлен несколькими аллелями, например ген группы крови системы ABO, соотношение различных генотипов выражается формулой  $(pI^A + qI^B + rI^0)^2$ .

### Методы дерматоглифики и пальмоскопии

В 1892 г. Ф. Гальтоном в качестве одного из методов исследования человека был предложен метод изучения кожных гребешковых узоров пальцев и ладоней, а также сгибательных ладонных борозд. Он установил, что указанные узоры являются индивидуальной характеристикой человека и не изменяются в течение его жизни. Ф. Гальтон уточнил и дополнил классификацию рельефа кожных узоров, основы которой были разработаны Я. Пуркинье еще в 1823 г. Позднее классификацию Гальтона усовершенствовали ряд ученых; она и сейчас широко используется в криминалистике и генетических исследованиях.

В настоящее время установлена наследственная обусловленность кожных узоров, хотя характер наследования окончательно не выяснен. Вероятно, этот признак наследуется по полигенному типу. На характер пальцевых и ладонных узоров организма большее влияние оказывает мать через механизм цитоплазматической наследственности.

Дерматоглифические исследования важны при идентификации зиготности близнецов. Считают, что если из 10 пар гомологичных пальцев не менее 7 имеют сходные

узоры, это указывает на однойцевость. Сходство узоров лишь 4–5 пальцев свидетельствует в пользу разнойцевости близнецов.

Изучение людей с хромосомными болезнями выявило у них специфические изменения не только рисунков пальцев и ладоней, но и характера основных сгибательных борозд на коже ладоней. Характерные изменения этих показателей наблюдаются при болезни Дауна, при синдромах Клайнфельтера, Шерешевского – Тернера, что позволяет использовать методы дерматоглифики и пальмоскопии в диагностике этих заболеваний. Определяются специфические дерматоглифические изменения и при некоторых хромосомных аберрациях, например при синдроме «кошачьего крика». Менее изучены дерматоглифические изменения при генных болезнях. Однако описаны специфические отклонения этих показателей при шизофрении, миастении, лимфоидной лейкемии.

Применяют эти методы и с целью установления отцовства. Подробнее они описаны в специальной литературе.

### **Методы генетики соматических клеток**

С помощью этих методов изучают наследственность и изменчивость соматических клеток, что в значительной мере компенсирует невозможность применения к человеку метода гибридологического анализа.

Методы генетики соматических клеток, основанные на размножении этих клеток в искусственных условиях, позволяют не только анализировать генетические процессы в отдельных клетках организма, но благодаря полноценности наследственного материала, заключенного в них, использовать их для изучения генетических закономерностей целостного организма.

В связи с разработкой в 60-х гг. XX в. методов генетики соматических клеток человек оказался включенным в группу объектов экспериментальной генетики. Благодаря быстрому размножению на питательных средах соматические клетки могут быть получены в количествах, необходимых для анализа. Они успешно клонируются, давая генетически идентичное потомство. Разные клетки могут, сливаясь, образовывать гибридные клоны. Они легко подвергаются селекции на специальных питательных средах и долго сохраняются при глубоком замораживании. Все это позволяет использовать культуры соматических клеток, полученные из материала биопсий (периферическая кровь, кожа, опухолевая ткань, ткань эмбрионов, клетки из околоплодной жидкости), для генетических исследований человека, в которых используют следующие приемы: 1) простое культивирование, 2) клонирование, 3) селекцию, 4) гибридизацию.

*Культивирование* позволяет получить достаточное количество клеточного материала для цитогенетических, биохимических, иммунологических и других исследований.

*Клонирование* – получение потомков одной клетки; дает возможность проводить в генетически идентичных клетках биохимический анализ наследственно обусловленных процессов.

*Селекция* соматических клеток с помощью искусственных сред используется для отбора мутантных клеток с определенными свойствами и других клеток с интересующими исследователя характеристиками.

*Гибридизация* соматических клеток основана на слиянии совместно культивиру-



емых клеток разных типов, образующих гибридные клетки со свойствами обоих родительских видов. Для гибридизации могут использоваться клетки от разных людей, а также от человека и других животных (мыши, крысы, морской свинки, обезьяны, джунгарского хомячка, курицы).

Гибридные клетки, содержащие два полных генома, при делении обычно «теряют» хромосомы предпочтительно одного из видов. Например, в гибридных клетках «человек – мышь» постепенно утрачиваются все хромосомы человека, а в клетках «человек – крыса» – все, кроме одной, хромосомы крысы, с сохранением всех хромосом человека. Таким образом можно получать клетки с желаемым набором хромосом, что дает возможность изучать сцепление генов и их локализацию в определенных хромосомах.

Постепенная потеря хромосом человека из гибридных клеток параллельно с изучением ферментов дает возможность судить о локализации гена, контролирующего синтез данного фермента, в определенной хромосоме.

Благодаря методам генетики соматических клеток можно изучать механизмы первичного действия и взаимодействия генов, регуляцию генной активности. Они позволяют судить о генетической гетерогенности наследственных болезней, изучать их патогенез на биохимическом и клеточном уровнях. Развитие этих методов определило возможность точной диагностики наследственных болезней в пренатальном периоде.

### **Цитогенетический метод**

Цитогенетический метод основан на микроскопическом изучении хромосом в клетках человека. Его стали широко применять в исследованиях генетики человека с 1956 г., когда шведские ученые Дж. Тийо и А. Леван, предложив новую методику изучения хромосом, установили, что в кариотипе человека 46, а не 48 хромосом, как считали ранее.

Современный этап в применении цитогенетического метода связан с разработанным в 1969 г. Т. Касперсоном *методом дифференциального окрашивания хромосом*, который расширил возможности цитогенетического анализа, позволив точно идентифицировать хромосомы по характеру распределения в них окрашиваемых сегментов. Применение цитогенетического метода позволяет не только изучать нормальную морфологию хромосом и кариотипа в целом, определять генетический пол организма, но, главное, диагностировать различные хромосомные болезни, связанные с изменением числа хромосом или с нарушением их структуры. Кроме того, этот метод позволяет изучать процессы мутагенеза на уровне хромосом и кариотипа. Применение его в медико-генетическом консультировании для целей пренатальной диагностики хромосомных болезней дает возможность путем своевременного прерывания беременности предупредить появление потомства с грубыми нарушениями развития.

Материалом для цитогенетических исследований служат клетки человека, получаемые из разных тканей, – лимфоциты периферической крови, клетки костного мозга, фибробласты, клетки опухолей и эмбриональных тканей и др. Непременным требованием для изучения хромосом является наличие делящихся клеток. Непосредственное получение таких клеток из организма затруднено, поэтому чаще используют легкодоступный материал, каковым являются лимфоциты периферической крови.

В норме эти клетки не делятся, однако специальная обработка их культуры фитогемагглютинином возвращает их в митотический цикл. Накопление делящихся клеток в стадии метафазы, когда хромосомы максимально спирализованы и хорошо видны в микроскоп, достигается обработкой культуры колхицином или колцемидом, разрушающим веретено деления и препятствующим расхождению хроматид.

Микроскопирование мазков, приготовленных из культуры таких клеток, позволяет визуально наблюдать хромосомы. Фотографирование метафазных пластинок и последующая обработка фотографий с составлением кариограмм, в которых хромосомы выстроены парами и распределены по группам, позволяют установить общее число хромосом и обнаружить изменения их количества и структуры в отдельных парах (Рисунок 15.10).



Рисунок 15.10. Нормальные кариотипы человека. А – женщины; Б – мужчины. Вверху представлены хромосомные комплексы, внизу – кариограммы.

В качестве экспресс-метода, выявляющего изменение числа половых хромосом, используют *метод определения полового хроматина* в неделящихся клетках слизистой оболочки щеки. Половой хроматин, или тельце Барра, образуется в клетках женского организма одной из двух X-хромосом. Оно выглядит как интенсивно окрашенная глыбка, расположенная у ядерной оболочки. При увеличении количества X-хромосом в кариотипе организма в его клетках образуются тельца Барра в количестве на единицу меньше числа X-хромосом. При уменьшении числа X-хромосом (моносомия X) тельце Барра отсутствует.

В мужском кариотипе Y-хромосома может быть обнаружена по более интенсивной по сравнению с другими хромосомами люминесценции при обработке их акрихиниприотом и изучении в ультрафиолетовом свете.

### Биохимический метод

В отличие от цитогенетического метода, который позволяет изучать структуру хромосом и кариотипа в норме и диагностировать наследственные болезни, связанные с

изменением их числа и нарушением организации, наследственные заболевания, обусловленные генными мутациями, а также полиморфизм по нормальным первичным продуктам генов изучают с помощью биохимических методов.

Впервые эти методы стали применять для диагностики генных болезней еще в начале XX в. В последние 30 лет их широко используют в поиске новых форм мутантных аллелей. С их помощью описано более 1000 врожденных болезней обмена веществ. Для многих из них выявлен дефект первичного генного продукта. Наиболее распространенными среди таких заболеваний являются болезни, связанные с дефектностью ферментов, структурных, транспортных или иных белков.

Дефекты структурных и циркулирующих белков выявляются при изучении их строения. Так, в 60-х гг. XX в. был завершен анализ  $\beta$ -глобиновой цепи гемоглобина, состоящей из 146 аминокислотных остатков. Установлено большое разнообразие гемоглобинов у человека, связанное с изменением структуры его пептидных цепей, что нередко является причиной развития заболеваний.

Дефекты ферментов устанавливают путем определения содержания в крови и моче продуктов метаболизма, являющихся результатом функционирования данного белка. Дефицит конечного продукта, сопровождающийся накоплением промежуточных и побочных продуктов нарушенного метаболизма, свидетельствует о дефекте фермента или его дефиците в организме.

Биохимическую диагностику наследственных нарушений обмена проводят в два этапа. На первом этапе отбирают предположительные случаи заболеваний, на втором – более точными и сложными методами уточняют диагноз заболевания. Применение биохимических исследований для диагностики заболеваний в пренатальном периоде или непосредственно после рождения позволяет своевременно выявить патологию и начать специфические медицинские мероприятия, как, например, в случае фенилкетонурии.

Для определения содержания в крови, моче или амниотической жидкости промежуточных, побочных и конечных продуктов обмена кроме качественных реакций со специфическими реактивами на определенные вещества используют хроматографические методы исследования аминокислот и других соединений.

### **Методы изучения ДНК в генетических исследованиях**

Как было показано выше, нарушения первичных продуктов генов выявляются с помощью биохимических методов. Локализация соответствующих повреждений в самом наследственном материале может быть выявлена методами молекулярной генетики.

Разработка метода *обратной транскрипции* ДНК на молекулах мРНК определенных белков с последующим размножением этих ДНК привела к появлению *ДНК-зондов* для различных мутаций нуклеотидных последовательностей человека. Использование таких ДНК-зондов для гибридизации с ДНК клеток пациента дает возможность выявлять у него соответствующие изменения в наследственном материале, т.е. диагностировать определенные виды генных мутаций (генодиагностика).

Важными достижениями молекулярной генетики последних десятилетий явились работы по *секвенированию* – определению нуклеотидной последовательности ДНК.

Это стало возможным благодаря открытию в 60-х гг. XX в. ферментов – *рестрик-*

*таз*, выделенных из бактериальных клеток, которые разрезают молекулу ДНК на фрагменты в строго определенных местах. В естественных условиях рестриктазы защищают клетку от проникновения в ее генетический аппарат и размножения в нем чужеродной ДНК. Применение этих ферментов в эксперименте дает возможность получать короткие фрагменты ДНК, в которых относительно легко можно определить последовательность нуклеотидов.

В настоящее время полностью установлена последовательность нуклеотидов многих генов человеческого генома, в том числе генов  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых цепей гемоглобина, некоторых полипептидных гормонов (инсулина, гормона роста, хорионического соматотропина, пролактина). Интенсивно изучаются нуклеотидные последовательности генов актинов, тубулинов, интерферонов. Этими исследованиями выявлена высокая степень генетического полиморфизма у человека, который часто не проявляется фенотипически.

Методы молекулярной генетики и генной инженерии позволяют не только диагностировать целый ряд генных мутаций и устанавливать нуклеотидную последовательность отдельных генов человека, но и размножать (клонировать) их и получать в большом количестве белки – продукты соответствующих генов.

Клонирование отдельных фрагментов ДНК осуществляется путем включения их в бактериальные плазмиды, которые, автономно размножаясь в клетке, обеспечивают получение в большом количестве копий соответствующих фрагментов ДНК человека. Последующая экспрессия рекомбинантных ДНК в бактериях позволяет получить белковый продукт соответствующего клонированного человеческого гена.

Таким образом, с помощью методов генной инженерии стало возможно получать на основе человеческих генов некоторые первичные генные продукты (инсулин). Это определяет перспективы терапии наследственных болезней, обусловленных связанным с генными мутациями дефицитом нормальных продуктов генов.

Дальнейшее совершенствование методов молекулярной генетики обеспечит возможность полного определения нуклеотидных последовательностей не только структурных, но и регуляторных локусов генома человека, а разработка методов включения в человеческий геном нормальных нуклеотидных последовательностей в перспективе может стать основой генотерапии.

## **15.5. Пренатальная диагностика наследственных заболеваний**

Разработка методов генетики соматических клеток, молекулярной биологии, цитогенетических и биохимических методов сделала возможным получение, размножение и всестороннее изучение клеточного материала развивающегося плода с целью более ранней диагностики наследственной патологии у человека. В связи с отсутствием в настоящее время действенных методов лечения, тяжелым поражением здоровья при многих наследственных заболеваниях их ранняя диагностика дает возможность предупредить появление потомства с наследственным нарушением путем прерывания беременности, а иногда начать лечение сразу после рождения или даже в пренатальном периоде.

Получение материала развивающегося внутриутробно организма осуществляют

разными способами. Одним из них является *амниоцентез*, с помощью которого на 15–16-й неделе беременности получают амниотическую жидкость, содержащую продукты жизнедеятельности плода и клетки его кожи и слизистых (рисунок 15.11, А).



**Рисунок 15.11.** Методы получения материала для пренатальной диагностики.

А – амниоцентез (пункция околоплодного пузыря через брюшную стенку);

Б–биопсия ворсин хориона (проникновение в матку через влагалище и шейку матки):

1–амниотическая жидкость, 2–плацента, 3–матка, 4–лобковое сращение, 5– влагалище, 6–шейка, 7–крестец, 8–зеркало, 9–канюля, 10–хорион

В настоящее время с помощью амниоцентеза диагностируются все хромосомные аномалии, свыше 60 наследственных болезней обмена веществ, несовместимость матери и плода по эритроцитарным антигенам.

С начала 80-х гг. XX в. стало возможным использование для целей медикогенетического диагностирования материала *биопсии ворсин хориона*. В отличие от амниоцентеза это исследование проводят в первой трети беременности, что позволяет при наличии показаний прерывать ее в более ранние сроки (Рисунок 15.11, Б).

Кроме амниоцентеза и исследования клеток ворсин хориона применяют и другие способы пренатальной диагностики. Для диагностики таких заболеваний, как гемоглобинопатия, используют *пункцию сосудов плода* с получением клеток его крови.

*Методы фетоскопии и ультразвуковых исследований* позволяют определять пол плода и некоторые пороки его развития путем непосредственного наблюдения.

Пренатальная диагностика должна проводиться до 20–22-й недели беременности, когда плод еще нежизнеспособен после ее прерывания. Прерывание беременности в более поздние сроки может привести к рождению живого ребенка и быть опасным для организма матери. Прерывание беременности всегда проводится только с согласия родителей.

Так как многие методы пренатального обследования плода не являются абсолютно безвредными, а кроме того, они трудоемки и дорогостоящи, показания к такому обследованию должны быть обоснованы.

Пренатальное обследование плода проводят в случаях: 1) обнаружения структурных перестроек хромосом (транслокаций) у одного из родителей; 2) при наличии у родителей доминантного наследственного заболевания; 3) при наличии в семье детей с

рецессивным наследственным заболеванием, что свидетельствует о гетерозиготности родителей; 4) при возрасте матери старше 35 лет, что прогрессивно повышает вероятность рождения у нее потомства с наследственной патологией; 5) при привычных выкидышах, вызывающих подозрение на несовместимость матери и плода по эритроцитарным антигенам; 6) при наличии в семье детей с врожденными пороками развития.

Благодаря разработке способов пренатальной диагностики удастся сократить число рождающихся с наследственными заболеваниями.

## 15.6. Наследственные болезни: диагностика и профилактика

Концепция доклинической диагностики и возможности нормокопирования фенотипа родилась из теоретических исследований по изучению экспрессивности генов. Если при одном и том же генотипе фенотипы особей варьируют, то, значит, на проявляемость генов может влиять среда. Именно на такой постановке вопроса настаивал С.Н. Давиденков, выступая с критикой господствовавшей в 20-30-х годах теории о рождении семей с наследственными болезнями и об обреченности таких больных. Выше уже рассматривались теоретические основы профилактики на основе управления действием генов. Следует подчеркнуть, что с таких позиций в 20-х годах особенно активно выступал выдающийся биолог Н.К. Кольцов.

Для нескольких болезней уже разработаны не только теоретические основы диагностики, но и методы профилактического лечения. Поскольку отдельные формы наследственных болезней редки, для их выявления должны быть разработаны простые и дешевые методы скрининга (просеивающей диагностики).

С точки зрения практической медицины важно осознать, что в основе патогенеза многих болезней лежит мутация одного гена. Если врач не владеет основами современной медицинской генетики и не проявляет осторожности, многие моногенные болезни остаются недиагностированными, а их наследственный характер нераспознанным.

Еще чаще наследственные факторы составляют одну из причин полигенных болезней.

Врачи должны учитывать вклад наследственных факторов в патогенез при лечении и консультировании. Во многих случаях рекомендации может дать врач-терапевт, если он овладел относительно простыми принципами медицинской генетики и медико-генетического консультирования. Сложные случаи требуют обращения к специалисту.

В настоящее время существуют большие возможности для диагностики болезней. Даже из приведенного схематического описания нетрудно понять, что существует достаточно много молекулярно-генетических методов диагностики наследственных болезней. Эти методы оказались настолько универсальными, что нашли применение не только в медицинской генетике, но и диагностике инфекционных заболеваний. Одни и те же болезни можно диагностировать разными методами. Отсюда нетрудно заключить, что есть большие возможности для диагностики болезни даже в трудных случаях (невозможность обследования родителей, малое количество биологического материала, отсутствие сведений о гене и т.д.).

На первом этапе исследований в ДНК из клинических образцов пытаются обнаружить уже описанные в литературе мутации, ассоциированные с конкретным наследственным заболеванием. На вероятность такой мутации в геномной ДНК пациента указывает диагноз наследственного заболевания, поставленный на основании симптомов болезни. В то же время необнаружение известных мутаций в его геномной ДНК не может считаться доказательством отсутствия у него соответствующего заболевания, поскольку оно может вызываться новыми мутациями в том же самом или других генах, функционально связанных с первым. Поэтому на втором этапе исследования этиологии заболевания следует воспользоваться методами, позволяющими обнаруживать неизвестные мутации.

### **15.7. Наследственные болезни: диагностика: скрининг популяции**

Трудно предсказать, когда обследования для выявления генотипов, вызывающих предрасположенность к распространенным заболеваниям взрослых (артериальной гипертензии, атеросклерозу, гемохроматозу, различным формам рака) станут обычными. Польза обследования зависит от возможностей методов лечения. Например, выявление фенилкетонурии у новорожденных в развитых странах дало чрезвычайно благоприятные результаты. Вероятно, в будущем роль популяционно-генетических обследований в улучшении здоровья населения возрастет.

Идея просеивания (скрининга) родилась в США в начале XX века. Общими характеристиками просеивающего подхода являются:

- 1) массовый и безотборный характер обследования.
- 2) профилактическая направленность.
- 3) двухэтапность (по меньшей мере) диагностики. Просеивание можно определить как идентификацию нераспознанных болезней с помощью быстро осуществляемых проверок. Такой подход обеспечивает отбор лиц с вероятным заболеванием из тех лиц, у которых это заболевание клинически отсутствует. Группа лиц с высокой вероятностью заболевания должна быть повторно обследована применением уточняющих диагностических методов, позволяющих либо отвергнуть предполагавшийся на первом этапе диагноз, либо уверенно подтвердить его у конкретного лица. Применительно к наследственным болезням идея просеивания новорожденных на наличие унаследованной комбинации аллелей, обуславливающей в последующем развитие наследственной болезни, стала проверяться в 60-х годах. К настоящему времени уже четко сложились основные положения методологии массовой диагностики наследственных болезней на доклинической стадии.

Такая методология учитывает определенные критерии наследственных болезней и диагностических методов.

Массовому просеиванию подлежат те наследственные болезни, которые отвечают следующим критериям:

1. Без своевременного профилактического лечения болезнь существенно снижает жизнеспособность, приводит к инвалидности. Больной нуждается в специальной помощи.

2. Для выявляемой болезни необходимо иметь эффективные методы профилактического лечения.

3. Частота выявляемой болезни должна быть 1:10 000 и выше. Лишь в некоторых странах временно при наличии исследовательской группы просеиванию подлежат болезни, встречающиеся с частотой 1: 20 000 – 1: 40 000.

4. Имеются биохимические и молекулярно- генетические методы для точной диагностики заболевания на доклинической стадии.

Диагностические методы массового просеивания должны отвечать следующим критериям:

1. Экономичность. Методы должны быть технически простыми и дешевыми для исполнителей в массовых исследованиях.

2. Диагностическая значимость. Это означает, что ложноотрицательных результатов практически не должно быть, а соотношение истинно положительных и ложноположительных должно быть не менее чем 1: 5. По другому это можно назвать чувствительностью и специфичностью метода.

3. Надежность и воспроизводимость. Результаты обследования должны одинаково воспроизводиться в работе разных исследователей.

4. Доступность биологического материала. Метод должен быть приспособлен к анализу биологического материала, легко получаемого в малом количестве, хорошо сохраняемого и приемлемого для пересылки в централизованную лабораторию.

## **15.8. Наследственные болезни: диагностика: программы скрининга новорожденных**

Основная цель программ массового просеивания новорожденных на наследственные болезни – это раннее выявление заболевания на доклинической стадии и организации лечения.

Программа обязательно включает в себя следующие этапы:

1) взятие биологического материала для исследования у всех новорожденных и доставка материала в диагностическую лабораторию.

2) лабораторная просеивающая диагностика.

3) уточняющая диагностика всех случаев с положительными результатами.

4) лечение больных и их диспансеризация с контролем за ходом лечения.

5) медико – генетическое консультирование семьи.

Таким образом, программа массового обследования на наследственные болезни могут учреждаться только в рамках федерального или регионального здравоохранения. Они требуют организации специального звена в структуре здравоохранения и немалых экономических затрат, которые в общегосударственном масштабе компенсируются за счет уменьшения числа инвалидов с детства. Многочисленные исследования, проведенные в разных странах, показали, что экономическим затратам на просеивающие программы и экономической эффективности от их применения указанные программы дают государству 5-10 – кратную экономическую выгоду. В результате этого были отработаны критерии массовой диагностики наследственных болезней. В конечном счете



для стран с развитым здравоохранением было принято, что массовое просеивание новорожденных нужно проводить лишь для нескольких болезней, характеристики которых представлены в таблице 15.1.

**Таблица 15.1. (medgen) Наследственные болезни, подлежащие массовому скринингу**

Болезнь.	Частота среди новорожденных (в среднем).	Наличие клинических показаний	Возможность профилактического лечения.	Наличие метода просеивающей диагностики
Фенилкетонурия.	1:10 000	+	+	+
Врожденный гипотиреоз.	1:5000	+	+	+
Врожденная гиперплазия надпочечников.	1:5000	+	+	+
Галактоземия.	1:40 000	+	+	+
Муковисцидоз.	1:2 500	+	+	+

Врожденная гиперплазия надпочечников. 1:5000 +++ Галактоземия. 1:40 000 ++ Муковисцидоз. 1:2 500 -+

Как видно из таблицы, лишь три болезни удовлетворяют всем критериям просеивающей диагностики. Галактоземия встречается редко; ее диагностика весьма дорогостоящая. Что касается муковисцидоза, то для этой болезни еще не разработаны методы профилактического лечения, поэтому раннее выявление патологии не предупреждает развития болезни. Следует отметить, что эти рекомендации справедливы для популяции европейской расы. Для других рас частоты указанных болезней могут быть ниже, и тогда не будет показаний для их просеивающей диагностики.

Первая программа массового просеивания новорожденных была организована в США примерно 25 лет назад. За прошедшее время в разных странах проверялись программы просеивания более чем на 10 наследственных болезней обмена веществ.

### **15.9. Медико-генетическое консультирование: общие положения**

Медико-генетическое консультирование – специализированный вид медицинской помощи – является наиболее распространенным видом профилактики наследственных болезней. Суть его заключается в определении прогноза рождения ребенка с наследственной патологией, объяснении вероятности этого события консультирующимся и помощи семье в принятии решения о дальнейшем деторождении.

Еще в конце 20-х годов С.Н.Давиденков в России, впервые в мире организовал медико-генетическую консультацию при Институте нервно-психиатрической профи-

лактики. Он четко сформулировал задачи и методы медико-генетического консультирования. Однако развитие данной области профилактики и генетики человека в целом затормозилось в 30-х годах практически во всех развитых странах. Это было связано с тем, что в нацистской Германии для обоснования геноцида использовали генетические концепции и ввели насильственную стерилизацию как метод «оздоровления расы». В Москве был закрыт Медико-генетический институт. В США медико-генетические консультации (кабинеты) начали организовываться в 40-х годах, но действительно интенсивное развитие такой помощи в разных странах (в том числе в России и Германии) началось в 60-70-х годах. К этому времени уже отмечался большой прогресс в изучении хромосомной патологии и наследственных болезней обмена веществ. Термин «*медико-генетическая консультация*» определяет два понятия:

- 1) консультация врача-генетика как врачебное заключение;
- 2) структурное подразделение в каком-либо звене здравоохранения (при больнице, при объединении, поликлинике и др.).

***Показаниями для медико-генетического консультирования являются:***

- 1) рождение ребенка с врожденным пороком развития;
- 2) установленная или подозреваемая наследственная болезнь в семье в широком смысле слова;
- 3) задержка физического развития или умственная отсталость у ребенка;
- 4) повторные спонтанные аборт, выкидыши, мертворождения;
- 5) близкородственные браки;
- 6) воздействие подозреваемых на тератогенность или известных тератогенов в первые 3 мес. беременности;
- 7) неблагополучное протекание беременности.

В принципе каждая супружеская пара должна пройти медико-генетическое консультирование до планирования деторождения (проспективно) и безусловно после рождения больного ребенка (ретроспективно).

При выявлении моногенной болезни врач должен предоставить больному или его семье соответствующую генетическую информацию и провести медико-генетическое консультирование. Основа всего – постановка правильного диагноза с обязательным использованием доступных биохимических и молекулярно-генетических методов. Достоверность диагноза играет решающую роль для интерпретации характера передачи наследуемых признаков и расчета риска заболевания у родственников. Важно учитывать возможность новой мутации, неполную пенетрантность, изменчивую экспрессивность и соответствие между генотипом и фенотипом. Членам семьи следует рассказать о возможностях пренатальной и ранней диагностики, а также выявления гетерозигот.

С осознанием роли генов в развитии болезней возросла потребность в медико-генетическом консультировании. Если человека интересует, какова вероятность развития наследственного заболевания у него самого или у его детей, он спрашивает об этом у лечащего врача. Следовательно, всем врачам следует знать принципы медицинской генетики. Первую консультацию часто проводят специалисты в области медицинской генетики, после чего их рекомендации подтверждает и дополняет лечащий врач.

***Риск иметь ребенка с наследственным заболеванием повышен, если:***

- у родителей уже есть больной ребенок или болен один из близких родственников;
- один или оба родителя входят в группу риска, например из-за гетерозиготности по мутантному гену;
- матери 35 или более лет, что повышает риск аутомсомной трисомии.

Медико-генетическое консультирование включает определение вероятности рождения больного ребенка и информирование об этом будущих родителей, чтобы они могли принять обоснованное решение. Если в семье есть больной с наследственным заболеванием, сначала нужно оценить надежность этого диагноза. Обычно это требует критического изучения имеющихся медицинских данных или дополнительного обследования больных членов семьи. Затем информацию представляют в виде родословной, чтобы определить характер наследования в семье и его соответствие данному заболеванию.

В зависимости от типа заболевания (моногенное, полигенное или хромосомное) и достоверности диагноза надежность определения вероятности развития болезни в следующем поколении колеблется от приблизительной до почти точной.

Достоверность диагноза зависит от того, характерна ли для этого заболевания множественная этиология, и разработаны ли для него специфические диагностические методы.

Для некоторых моногенных заболеваний имеются методы генодиагностики, которые прямо и однозначно определяют родительский генотип и позволяют точно предсказать риск болезни в следующем поколении. Эти методы используют и в пренатальной диагностике.

Аутомсомно-рецессивные и X-сцепленные заболевания, для которых выявлено основное биохимическое нарушение, надежно выявляют с помощью анализа функциональной активности соответствующего белка, например определения активности фермента.

Для многих аутомсомно-доминантных заболеваний основное биохимическое нарушение не выявлено, и обследование родителей не дает точных результатов из-за изменчивой экспрессивности.

Надежности и точности консультирования при этих заболеваниях очень способствует наличие сцепленных молекулярных маркеров (например, полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) и выявление генов, ответственных за заболевание.

Консультирование при многих распространенных полигенных болезнях (сахарный диабет, артериальная гипертония, атеросклероз, пороки развития, психические заболевания) далеко от совершенства и улучшится только с углублением наших представлений о взаимодействии генов и средовых факторов в их патогенезе. В некоторых семьях причиной заболевания является один мутантный ген, а в других – совокупность нескольких мутантных генов и средовых факторов. В первом случае вероятность заболевания предсказывают исходя из моногенной модели. Во втором случае простой модели не существует, и консультант должен исходить из эмпирических оценок вероятности, рассчитанных на основании ретроспективной подборки усредненных данных обследования множества разных семей.

При консультации следует обсудить с больным вероятность, прогноз и ле-

чение заболевания и сообщить ему о возможности пренатальной диагностики и обследования на носительство. Консультант должен быть внимателен к эмоциональной реакции, которую эта информация может вызвать у больного.

Восприятие информации зависит от того, насколько доступно консультант излагает суть дела. Часто помогают записи и схемы, которые больной может взять с собой. Конспективные заметки и повторное рассмотрение при последующих визитах помогают исправить ошибочные представления и способствуют запоминанию.

***Основные задачи медико-генетического консультирования:***

- 1) постановка точного диагноза наследственного заболевания;
- 2) установление типа наследования заболевания в данной семье;
- 3) расчет риска повторения наследственного заболевания в семье;
- 4) определение способа профилактики;
- 5) объяснение тем, кто обратился за помощью, содержания собранной информации, медико-генетического прогноза и методов профилактики.

Наконец, важная роль в разъяснении результатов консультации принадлежит лечащему врачу – ведь консультант видит больного всего один или два раза.

Для подавляющего большинства наследственных болезней эффективных способов лечения не существует. Из этого следует, что в борьбе с наследственной патологией основная роль отводится профилактике рождения аномального потомства. Общий профилактический характер носят мероприятия, направленные на оздоровление окружающей среды, способствующие снижению ее мутагенного воздействия на наследственный материал человеческого организма. В последние десятилетия распространенным и эффективным способом профилактики наследственных болезней является *медико-генетическое консультирование*.

Медико-генетическое консультирование – это один из видов специализированной помощи населению, направленной в первую очередь на предупреждение появления в семье детей с наследственной патологией. С этой целью составляют прогноз рождения в данной семье ребенка с наследственной болезнью, родителям объясняют вероятность этого события и оказывают помощь в принятии решения. В случае большой вероятности рождения больного ребенка родителям рекомендуют либо воздержаться от деторождения, либо провести пренатальную диагностику, если она возможна при данном виде патологии.

Консультирование семей, обращающихся к врачу-генетику, включает три основных этапа. Как правило, за консультацией обращаются семьи, где уже имеется ребенок с наследственной патологией, или семьи, в которых имеются больные родственники. На первом этапе консультирования производится уточнение диагноза, что является необходимой предпосылкой любого консультирования. *Уточнение диагноза* в медико-генетической консультации проводят с помощью генетического анализа. Для этой цели используют генеалогический, цитогенетический, биохимический и другие требуемые методы исследований, которым подвергаются пробанд и его родственники. Точный клинический и генетический

диагноз заболевания позволяет установить степень генетического риска и выбор эффективных методов пренатальной диагностики и профилактического лечения.

На втором этапе консультирования делают *прогноз потомства*. *Генетический риск* может быть определен либо путем теоретических расчетов, основанных на генетических закономерностях, либо с помощью эмпирических данных. Сущность генетического прогноза заключается в определении вероятности появления наследственной патологии в семье. Наиболее эффективным является *проспективное консультирование*, когда риск рождения больного ребенка определяют до наступления беременности или в ранние ее сроки. Такие консультации чаще проводят в случае кровного родства супругов, при отягощенной наследственности по линии мужа или жены, при воздействии вредных средовых факторов на супругов незадолго до наступления беременности. *Ретроспективное консультирование* проводят после рождения больного ребенка относительно здоровья будущих детей.

Определение прогноза потомства при разных формах наследственной патологии различно. При моногенных, менделирующих болезнях прогноз основывается на расчете вероятности появления потомства в соответствии с генетическими закономерностями. При этом, если известен тип наследования данного заболевания и по родословной удастся установить генотип родителей, оценка риска сводится к анализу менделевского расщепления. Если у пробанда установлена вновь возникшая мутация, то повторный риск рождения ребенка с такой же патологией незначителен.

Расчет риска при моногенном заболевании может осложниться при пониженной экспрессивности или неполной пенетрантности гена, позднем проявлении генетической аномалии, генетической гетерогенности заболевания и вообще в случае неточного диагноза.

При хромосомных болезнях определение риска повторного рождения потомства с хромосомными аномалиями зависит от того, нормальны ли кариотипы родителей, не обнаружено ли у них мозаицизма, не наблюдается ли семейной формы структурных аномалий хромосом. В случае отсутствия нарушений в кариотипе родителей вероятность повторного рождения второго ребенка с хромосомной аномалией оценивается по эмпирическим данным для каждого вида аномалии с учетом возраста родителей.

При мультифакториальных заболеваниях, т.е. заболеваниях с наследственным предрасположением, основой оценки риска являются эмпирические данные о популяционной и семейной частоте каждого из них.

Специфический генетический риск до 5% принято считать низким, до 10% – повышенным в легкой степени, до 20% – средним, выше 20% – высоким. Генетический риск средней степени расценивают как противопоказание к зачатию или показание к прерыванию уже имеющейся беременности. Возможность проведения пренатальной диагностики является определяющей для принятия положительного решения в отношении завершения беременности.

На третьем этапе консультирования врач-генетик в доступной форме объясняет семье степень генетического риска рождения наследственно аномального потомства, сущность пренатальной диагностики и помогает принять *правильное решение в отношении деторождения*. Однако окончательное решение этого вопроса остается за родителями.

Широкое использование медико-генетического консультирования, разработках способов пренатальной диагностики наследственных заболеваний позволяют существенно уменьшить вероятность появления потомства с наследственной патологией в отдельных семьях.

### **Литература**

1. Баранов В.С. Ранняя диагностика наследственных болезней в России: Современное состояние и перспективы // *Международ. мед. обзоры*. 1994. Т. 2, № 4. С. 236-243.
2. Бочков Н.П. Клиническая генетика. М.: Медицина, 1997. 286 с.
3. Вельтишев Ю.П., Казанцева Л.З. Клиническая генетика: Значение для педиатрии, состояние и перспективы // *Материнство и детство*. 1992. № 8/9. С. 4-11.
4. Горбунова В.Н., Баранов В.С. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. СПб.: Спецлитература, 1997. 286 с.
5. Пузырев, В.П. Геномная медицина настоящее и будущее / Пузырев В.П. // *Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике*. – Новосибирск: Альфа-Виста, 2003. – С. 3-26.
6. Фролова, О.Г. Факторы риска перинатальной патологии / Фролова О.Г., Николаева Е.И., Мурзабекова Г.С. // *Перинатальная охрана плода: сб. трудов*. Алма-Ата, 1989. -С. 19-22.
7. Харпер, П. Практическое медико-генетическое консультирование / Харпер П. М.: Медицина, 1984. -148 с.

### **Контрольные вопросы**

1. Как определить группы риска для профилактики наследственных заболеваний?
2. Какие способы профилактики наследственных заболеваний наиболее эффективны?
3. Какие методы используются для изучения генетики человека?
4. Какие мультифакториальные заболевания наиболее часто встречаются и какие методы диагностики применяются для их выявления?
5. Какие факторы повышают риск рождения детей с хромосомными болезнями?
6. Какие методы применяются для диагностики наследственных болезней?
7. Кому необходимо проводить медико-генетическое консультирование и какие способы выявления наследственных болезней при этом используются?

## ГЛАВА 16

## НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ ОБМЕНА

**16.1. Наследственные болезни обмена: общие сведения**

Среди наследственных заболеваний человека одно из самых значительных мест занимают наследственные болезни обмена. Это довольно большая группа заболеваний, включающая в себя около 700 различных болезней. Для 200 из них в настоящее время установлена непосредственная причина, т.е. генетическая мутация, ее расположение в хромосоме человека. Большая часть обменных расстройств заключается во врожденной недостаточности определенного фермента, причиной чего и является генетическая мутация. При недостаточности фермента он либо не образуется в организме человека вообще, либо образуется, но отличается от нормального низкой активностью, что и приводит к нарушениям обмена. Фермент представляет собой вещество, без которого не могут протекать различные химические реакции, составляющие основу обмена веществ. Выпадение данной функции фермента создает блок в соответствующей химической реакции. В результате этого наблюдается накопление метаболитов, непосредственно предшествующих блоку, и дефицит конечных продуктов реакций; метаболический блок может также приводить к нарушению транспорта отдельных соединений.

Накапливаемые до блока химические вещества довольно часто являются токсичными. Так, при недостаточности определенного фермента в крови и тканях скапливается не только аминокислота фенилаланин, но и фенилпировиноградная кислота, оказывающая токсическое действие на мозг ребенка при таком заболевании, как фенилкетонурия. Наследственные нарушения синтеза мочевины могут привести к накоплению в крови и тканях аммиака, что также сопровождается токсическим поражением центральной нервной системы.

Многие заболевания обусловлены дефицитом конечных продуктов обмена веществ, остановленных в результате определенного блока. Примером могут служить наследственные болезни синтеза гормонов (адреногенитальный синдром, гипотиреоз, гипопаратиреоз).

Целый ряд наследственных болезней обмена обусловлен недостатком в организме витаминов. В некоторых случаях отсутствие или снижение активности соответствующего фермента может быть частично восстановлено путем введения повышенных доз витамина. Подобные нарушения обмена веществ носят название врожденных витаминзависимых. Когда в результате генетической мутации образование фермента полностью нарушается или образуется фермент с нарушенной структурой, лишенный своей активности, то введение повышенных доз витамина не дает какого-либо эффекта. Такие нарушения обмена веществ носят название витаминрезистентных (устойчивых к введению витаминов) врожденных нарушений.

Причиной ряда наследственных болезней обмена может быть дефицит микроэлементов. Более 180 ферментов человеческого организма представляют собой металло-

протеины, т.е. имеют в своем составе молекулы или ионы металлов. Такими металлами являются, к примеру, медь, цинк, марганец, магний, молибден, кобальт, селен. Дефицит микроэлементов может быть обусловлен особенностями среды, в которой живет человек, хотя в большинстве случаев он чаще связан с нарушениями всасывания или транспорта металлов в организме.

Большинство всех наследственных болезней обмена наследуется по рецессивному (аутосомному или сцепленному с X-хромосомой) типу. Доминантное наследование встречается крайне редко.

Существуют разнообразные классификации НБО – по типу наследования, по характеру метаболических нарушений и другие, но ни одна из них не является исчерпывающей и не отражает полностью весь сложный комплекс этой патологии.

Распознавание наследственных болезней обмена по возникающим симптомам представляется довольно затруднительным. Изменение активности ферментов обуславливает различные расстройства обмена, что ведет к появлению большого разнообразия симптомов. В некоторых случаях возникающие у человека признаки заболевания могут быть связаны с очень тяжелой патологией и вести к летальному исходу еще в периоде новорожденности, некоторые приводят к стойкой умственной отсталости и инвалидности. Иногда нарушения обмена сопровождаются менее выраженными симптомами либо протекают с полным их отсутствием.

Несмотря на многообразие симптомов наследственных болезней обмена, можно выделить общие признаки, на основании которых можно делать выводы о наличии нарушения у ребенка. К таким признакам относятся: задержка умственного развития, нарушения со стороны нервной системы, повторные судороги и коматозные состояния, специфический запах мочи и тела (потных ног, кошачьей мочи, мышинный запах, запах кленового сиропа), поражение мышц, аномалии скелета, изменения волос и кожи, катаракта, увеличение размеров печени и селезенки, нарушения пищеварения, необъяснимые случаи смерти братьев (сестер). Многие наследственные болезни обмена проявляются уже в периоде новорожденности, но редко распознаются. Это связано с тем, что отклонения в состоянии здоровья ребенка зачастую рассматриваются врачами как последствия недостатка кислорода в период беременности и внутричерепной родовой травмы. Отличительной особенностью наследственных болезней у новорожденных является наличие бессимптомного периода, который может продолжаться 2–3 дня после рождения. Дети рождаются внешне здоровыми, а их состояние ухудшается внезапно.

Различные болезни обмена редко имеют характерные черты, но по возникающим у человека симптомам могут быть объединены в две основные группы: токсического типа и гипознергетического типа. Поражение головного мозга токсического типа связано с накоплением в организме токсических продуктов обмена веществ. Таковыми могут являться органические кислоты, аммиак и многие другие вещества. Общими проявлениями токсического поражения служат: отказ от груди, рвота, летаргия и кома, судороги, остановки дыхания, мышечная и почечная недостаточность, гипертония и клонусы мышц, потеря большого количества жидкости. Поражение головного мозга гипознергетического типа характеризуется или истощением энергетических запасов, или невозможностью их использования организмом. Такой тип поражения проявляется теми же



признаками (рвота, летаргия, кома), но с выраженным снижением мышечного тонуса, снижением или полным отсутствием рефлексов, поражением сердца, сосудистой недостаточностью, обмороками и даже внезапной смертью.

Ранняя диагностика наследственных болезней обмена до появления характерных симптомов, наличие которых говорит уже о необратимости процессов в организме человека, необходима прежде всего для своевременной коррекции обменных нарушений, а также для предупреждения возможных грозных последствий. С этой целью в последние десятилетия широкое распространение получили программы просеиваний (screening). Они применяются для выявления у населения отдельных видов наследственных болезней обмена. Массово обследуют всех новорожденных детей, а также лиц из особых групп риска, например детей, имеющих различные нарушения в развитии. Скрининг-программы включают в себя два этапа. На первом этапе выявляются предположительные больные или носители отдельных наследственных болезней обмена, на втором – осуществляется более полное обследование и окончательное распознавание болезни. В современных программах массового скрининга используются в основном способы определения патологических продуктов обмена в крови.

1) *Существует ряд критериев для отбора отдельных болезней обмена как объекта просеивания:* заболевание должно быть достаточно распространено в популяции с частотой не менее 1 : 100 000 новорожденных;

2) заболевание без своевременного выявления и лечения приводит к тяжелым нарушениям здоровья;

3) существуют способы лечения болезни;

4) имеются адекватные диагностические тесты для выявления;

5) затраты на осуществление скрининг-программ не превышают средств, необходимых для обслуживания данной категории больных.

С учетом этих критериев было признано, что проведение массового скрининга необходимо для выявления фенилкетонурии, гипотиреоза, адреногенитального синдрома, галактоземии и других видов болезней обмена.

Обследование отдельных групп риска, в первую очередь детей, отстающих в психомоторном и физическом развитии, необходимо для предупреждения тяжелых последствий болезней обмена. Своевременное выявление заболевания способствует, помимо предотвращения инвалидизации детей; эффективному генетическому консультированию семей обследуемого, что предупреждает распространение болезни в семье и обществе.

*В настоящее время разработаны принципы лечения наследственных болезней обмена. Они включают в себя следующие пункты:*

1) соблюдение специфической диеты с целью исключения из рациона продуктов, содержащих вещества, не подвергающиеся полному расщеплению и последующим превращениям, происходящим в здоровом организме. Таким образом исключается накопление токсических веществ;

2) введение недостающих регуляторов обмена (гормоны, витамины В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub>, и т. д.);

3) замещение недостающих ферментов;

4) пересадка органов и тканей (почки, костный мозг, сердце);

5) устранение или ограничение влияния неблагоприятных факторов среды (устранение солнечного облучения при болезнях с повышенной или извращенной кожной чувствительностью, изъятие лекарств, усугубляющих обменные расстройства);

6) специфические методы лечения.

Медикаментозное лечение умственной отсталости при наследственных болезнях обмена включает в себя использование стимуляторов центральной нервной системы. Они улучшают обменные процессы в нервной ткани и играют главную роль в становлении психоречевого и двигательного развития детей. В комплексном лечении большая роль отводится витаминам. При наследственных болезнях обмена эндокринной системы зачастую используются соответствующие гормоны. При нарушении формирования костной ткани высокоэффективным оказывается прием гормональных препаратов в сочетании с препаратами кальция, фосфора, витаминами группы В, цитратами, антиоксидантами.

В профилактике наследственных болезней обмена особая роль принадлежит дородовой диагностике. Объектами исследования при этом служат либо клетки хориона на 7–9 неделе беременности, либо околоплодная жидкость, взятая на исследование на 16–17 неделе беременности. В настоящее время дородовая диагностика возможна более чем при 60 различных наследственных болезнях обмена веществ. Источник: <https://medn.ru/statyi/Nasledstvennyezabolevaniy2.html>

Термин *врожденное нарушение обмена веществ* был предложен в начале XX века британским врачом сэром Арчибальдом Гародом (1857–1936), который известен благодаря разработанной им классической концепции метаболического блока как основы патогенеза наследственных нарушений обмена веществ.

Его труд «Врождённые нарушения обмена веществ» (*Inborn Errors of Metabolism*, 1923), написанный по результатам многолетнего изучения природы и наследования алкаптонурии лёг в основу дальнейших исследований генетически обусловленных врождённых нарушений обмена веществ.

### **Классификация**

Традиционно наследственные болезни обмена веществ разделялись на нарушения обмена углеводов, аминокислот, органических кислот, или лизосомные болезни накопления. Однако в последние десятилетия были открыты сотни новых наследственных нарушений обмена, и эти категории сильно разрослись.

В настоящее время выделяют следующие основные классы наследственных метаболических расстройств. Приведены характерные примеры для каждого класса, однако многие другие не попали в эти категории. Где возможно, приведён шифр по МКБ-10.

- Нарушения углеводного обмена
- болезни накопления гликогена (E74.0)
- Нарушения обмена отдельных аминокислот
- фенилкетонурия (E70.0), лейциноз (E71.0)
- Нарушения обмена органических кислот
- алкаптонурия (E70.2)

- Нарушения окисления жирных кислот и митохондриального обмена
- дефицит ацил-КоА-дегидрогеназы коротких цепей
- Нарушения метаболизма порфиринов
- острая перемежающаяся порфирия (E80.2)
- Нарушения обмена пуринов и пиримидинов
- синдром Лёша – Нихена (E79.1)
- Нарушения стероидного обмена
- врождённая гиперплазия надпочечников (E25.0)
- Нарушения функций митохондрий
- синдром Кирнса – Сэйра (H49.8)
- Нарушения функций пероксисом
- синдром Зольвегера (Q87.8)
- Лизосомные болезни накопления
- болезнь Гоше (75.22)

С развитием метабономики и метаболомики, а также фармакогенетики, всё большее и большее значение приобретает исследование роли отдельных генов в формировании наследственных нарушений обмена, ферментопатий.

**Метаболомика** занимается каталогизацией и количественным определением низкомолекулярных эндогенных соединений, ксенобиотиков и их метаболитов в биологических жидкостях, органеллах, клетках, тканях, органах или организме. В свою очередь **метабономика** изучает изменение метаболического профиля сложных биологических систем в ответ на действие различных физико-химических и биологических факторов.

**Метабономика** определяется как «количественное измерение динамического многопараметрического метаболического ответа живых систем на патофизиологические воздействия или генные модификации».

## 16.2. Наследственные нарушения обмена углеводов

К наследственным нарушениям обмена углеводов относятся различные патологические состояния, обусловленные неспособностью организма усваивать углеводы или катаболизировать их. Эти формы патологии обмена часто проявляются в раннем возрасте. Патогенез поражения нервной системы при наследственных заболеваниях обмена углеводов связан с развитием частых гипер- и гипогликемических состояний, нарушением электролитного и водного баланса, с образованием токсических продуктов метаболизма (кетокислот и др.), вызывающих метаболические и структурные нарушения в ткани мозга, с дегенерацией клеток вследствие накопления в них некатаболизируемых углеводов. Учитывая большие возможности диетотерапии и возрастное становление ферментных систем, профилактика неврологических нарушений тесно связана с вопросами раннего диагноза. Диспансерное наблюдение за больными и успехи в организации специализированной помощи позволили реально решить вопрос о доклинической диагностике, рассматривая каждого ребенка, рожденного в семье, где есть патология углеводного обмена, как потенциального больного. Гетерозиготные носители патологического гена выявляются с помощью нагрузочных тестов и исследования активности

ферментов. Эти данные используются при решении вопросов медико-генетического консультирования. Среди заболеваний, обусловленных нарушением обмена углеводов, выделяют состояния, проявляющиеся непереносимостью того или иного углевода, входящего в состав продуктов питания, и заболевания, обусловленные нарушением метаболизма гликогена (<http://meduniver.com/Medical/Neurology/1021.html> MedUniver).

### 16.2.1. Галактоземия

#### **Галактоземия: общие сведения**

Галактоземия (MIM 230400) – врожденный метаболический дефект, не позволяющий усваивать галактозу; наследственное заболевание, при котором в крови накапливается моносахарид галактоза. Обусловлено отсутствием одного из ферментов, участвующих в превращении галактозы в лучше усвояемую глюкозу. При галактоземии отмечается дефект трех ферментов:

- галактозо-1-фосфат-уридилтрансферазы (GALT)
- галактокиназы (GALK)
- УДФ-Гал-4-эпимеразы (GALE)

Впервые заболевание было описано в 1908 году Reuss. Детальное описание галактоземии представил в 1917 году Goppert F. [Goppert F., 1917]. Первая подробная клинико-биохимическая картина болезни дана Mason [Mason H.H., 1935].

Заболевание выявляется при вскармливании младенца материнским молоком. Первые клинические симптомы галактоземии могут появиться как только ребенок начинает получать молоко: рвота, падение веса, желтуха, обезвоживание, галактозурия, нарастающая гепатомегалия, асцит, диспепсия, катаракта, арефлексия, в дальнейшем слабоумие. Тип наследования – аутосомно-рецессивный. Лечение – главным образом соблюдение диеты, исключающей молоко и молочные продукты.

#### **Галактозо-1-фосфат уридилтрансфераза**

**Галактозо-1-фосфат-уридилтрансфераза** катализирует продукцию глюкозо-1-фосфата и уридилдифосфатгалактозу из галактозо-1-фосфат и уридилдифосфат-глюкозы. Нарушение синтеза галактозо-1-фосфат-уридилтрансферазы (Гал-1-Ф-У-ДФ, galactose-1-phosphate uridylyltransferase, EC 2.7.7.12) приводит к накоплению в крови и тканях галактозы и галактозо-1-фосфата, обладающих токсическим действием – галактоземии.

**Ген GALT** (ген галактозо-1-фосфат-уридилтрансферазы) локализуется на 9 хромосоме в позиции p13-21. Первоначально ген был клонирован и секвенирован у *E.coli* и *Saccharomyces cerevisiae*. кДНК галактозо-1-фосфат-уридилтрансферазы человека клонировали и секвенировали (Flach J.E., 1990a) в 1988-1991 годах. Ген GALT человека был клонирован и секвенирован в 1992 году.

#### **GALT Ген: мутации**

Первая мутация в гене галактозо-1-фосфат-уридилтрансферазы (GALT) человека была определена Flach J.E. в 1990 году. Полный спектр идентифицированных мутаций представлен в Таблице [http://medbiol.ru/medbiol/carbo-dis/таблица GALT m](http://medbiol.ru/medbiol/carbo-dis/таблица%20GALT%20m).

### 16.2.2. Лактацидоз (Лактозный ацидоз)

Лактозный ацидоз (лактацидоз), обусловленный мутационными поражениями гена E1 альфа пируватдегидрогеназы и уменьшением активности пируватдегидрогеназы, относится к наследственным нарушениям обмена веществ, при которых эффективны обычные дозы витамина B1 (Robinson В.Н., 1989; Dahl Н.Н.М., 1995). Наследуется сцеплено с полом (X хромосомой).

Опасность для жизни представляет сам ацидоз, а не накопление в крови лактата. При тяжелом ацидозе или быстром накоплении в крови ионов водорода вводят бикарбонат натрия. Прогноз неблагоприятный.

Лактацидоз также часто развивается при нераспознанной ишемии или инфаркте кишечника на фоне тяжелого атеросклероза, у больных с сердечной недостаточностью, получающих сосудосуживающие средства.

Пируватдегидрогеназа E1 (pyruvate dehydrogenase E1; PDHA1; EC 1.2.4.1) – тетрамер, состоящий из двух альфа субъединиц с молекулярной массой 41000 и двух бета-субъединиц с молекулярной массой 36000. Это митохондриальный фермент, осуществляющий перевод пирувата в ацетил-СоА. Дефицит E1 альфа пируватдегидрогеназы обуславливает наследственное заболевание – лактозный ацидоз (Robinson В.Н., 1989; Dahl Н.Н.М., 1995).

Лактацидоз, обусловленный накоплением в крови L-лактата, делится на два типа:

- **лактацидоз типа А** – при нарушениях доставки или утилизации кислорода тканями (шок, сердечная недостаточность, тяжелая анемия, холера, дефекты митохондриальных ферментов или ингибирование митохондриальных ферментов окисью углерода либо ингибирование митохондриальных ферментов цианидами);

- **лактацидоз типа В** – при избыточном образовании L-лактата или недостаточной утилизации L-лактата (гликогенозы, эпилептические припадки, сахарный диабет, алкогольная интоксикация, печеночная недостаточность, злокачественные новообразования, отравление салицилатами).

#### Лактацидоз обусловленный накоплением в крови D-лактата

Лактацидоз, обусловленный накоплением в крови D-лактата (продукта метаболизма бактерий кишечника), наблюдается при синдроме слепой петли и кишечной непроходимости и может сопровождаться как повышением анионного интервала, так и гиперхлоремией.

#### PDHA1 и PDHA2 Гены (гены E1 альфа пируватдегидрогеназы)

Ген E1 альфа пируватдегидрогеназы человека клонирован в 1989 году. Ген (17 килобаз) состоит из 11 экзонов и 10 интронов. Размер экзонов колеблется от 61 до 174 пар оснований, величина интронов варьирует от 600 нуклеотидов до 5,7 килобаз. Промоторная область гена содержит «TATA-box»- и «CAAT-box»-подобные последовательности.

В гене пируватдегидрогеназы E1 (PDHA1) человека выявлены мутации различного типа: missense, делеции, инсерции, дупликации.

### 16.2.3. Фруктозурия

#### Фруктозурия: основные сведения

Недостаточная активность ферментов, участвующих в метаболизме фруктозы, приводит к такому метаболическому заболеванию, как фруктозурия (МIM 229800) с генетически обусловленной нетолерантностью к фруктозе или недостаточной активностью фруктозо-1,6-дифосфатазы. Заболевание впервые было зарегистрировано в 1976 году (Czapek F.,1976; Gitzelmann R.,1989; Steinmann B.,1981). Доброкачественная врожденная аномалия обмена фруктозы характеризуется отсутствием клинических симптомов. Возможна индуцируемая фруктозой гипогликемия, возникающая несмотря на наличие больших запасов гликогена. Тип наследования – аутосомно-рецессивный.

#### КНК Ген (ген фруктокиназы, кетокиназы)

Gene: [02p23/КНК] ketohexokinase (fructokinase); fructosuria (hepatic fructokinase deficiency)

Ген фруктокиназы локализуется на 2 хромосоме в позиции p23.3-p23.2 (Hayward В.Е.,1996).

Полноразмерная кДНК фруктокиназы человека была клонирована и секвенирована в 1994 году (Bonthron D.Т.,1994)..

Идентифицированные в гене фруктокиназы мутации представлены в <http://medbiol.ru/medbiol/carbo-dis/0003c136.htm> Таблице КН m.

#### Таблица КН m Идентифицированные мутации в гене фруктокиназы

Кодон	: Замена нук-	: Замена аминокислот	Литература
40 GGA-AGA	gly	arg	Bonthron D.Т.,1994
43 GCG-ACG	ala	thr	Bonthron D.Т.,1994
49 GTT-ATT	val	ile	Bonthron D.Т.,1994

### 16.2.4. Гликогенозы: общие сведения

Под названием гликогенозы объединяют синдромы, обусловленные наследственными дефектами ферментов, участвующих в синтезе или расщеплении гликогена. Все эти дефекты приводят к нарушениям накопления гликогена в разных тканях, особенно в печени и мышцах.

Гликогенозы (болезни накопления гликогена) – группа наследственных заболеваний, обусловленная недостаточностью одного или нескольких ферментов, участвующих в синтезе или распаде гликогена.

В клетках печени и мышц накапливаются полимеры гликогена, которые не подвергаются деградации даже тогда, когда организму необходима глюкоза в крови. Принци-

пиально патогенез гликогенозов такой же, как и мукополисахаридозов. В клетках печени и мышц отсутствует определенный фермент (их уже известно много), который участвует в цикле расщепления гликогена до глюкозы.

### Гликогенозы: классификация и характеристики гликогенозов

Общепринятая номенклатура гликогенозов пока не разработана. Обычно используется классификация, построенная по хронологическому принципу: типы гликогенозов обозначаются римскими цифрами и располагаются в порядке открытия синдромов и соответствующих ферментных дефектов.

Названия типов гликогенозов, их синонимы и важнейшие характеристики (ферментные дефекты, способы наследования, особенности структуры и накопления гликогена) приведены в таблице 16.1 (табл.37.1 (Lvn) <http://medbiol.ru/medbiol/eclin/0020244f.htm>). В этой же таблице перечислены ткани и клетки, в которых легче всего выявляются ферментные дефекты.

**Таблица 16. 1 (37.1(Lvn) Классификация, биохимическая и генетическая характеристика гликогенозов**

Тип и синонимы	Дефектный фермент	Наследование	Ткани или клетки, в которых выявляется дефект					Структура и особенности накопления гликогена
			Печень	Мышцы	Эритроциты	Лейкоциты	Фибробласты	
0 (недостаточность гликосинтетазы)	Гликосинтетаза	Ауто-сомно-рецессивное	+					Нормальная структура, пониженное содержание
I (болезнь Гирке)	Ферментная система печени, превращающая глюкозо-6-фосфат в глюкозу; тип Ia: глюкозо-6-фосфатаза, тип Ib: глюкозо-6-фосфат-транслоказа	Ауто-сомно-рецессивное	+					Нормальная структура, повышенное содержание
II (болезнь Помпе)	Лизосомальная α-D-глюкозидаза	Ауто-сомно-рецессивное	+	+		+	+	Нормальная структура, повышенное содержание, гликоген накапливается в лизосомах

III (болезнь Форбса, болезнь Кори, болезнь остаточного декстрина)	Амило-1,6-глюкозидаза, 4- а-D- глюканотрансфераза	Ауто-сомно-рецессивное	+	+	+	+	+	Короткие боковые цепи, повышенное содержание
IV (болезнь Андерсен, амилопектиноз)	1,4-а-глюкан-ветвящий фермент	Ауто-сомно-рецессивное	+	+	+	+	+	Удлиненные боковые цепи, нормальное содержание
V (болезнь МакАрдля, недостаточность мышечной фосфоорилазы)	Фосфоорилаза в мышцах	Ауто-сомно-рецессивное		+				Нормальная структура, умеренно повышенное содержание
VI (болезнь Герса)	Фосфоорилаза в печени	Ауто-сомно-рецессивное	+		+	+		Нормальная структура, повышенное содержание
VII (болезнь Таруи)	Мышечная фосфофруктокиназа	Ауто-сомно-рецессивное		+	+	+	=	Нормальная структура, повышенное содержание
IXa	Киназа фосфоорилазы	Ауто-сомно-рецессивное	+	+	+	+		Нормальная структура, повышенное содержание
IXb	Альфа-субъединица киназы фосфоорилазы	Сцепленное с полом	+		+	+	+	Нормальная структура, повышенное содержание

Термин « гликогеноз » является общим для группы наследственных заболеваний, характеризующихся отложением в тканях либо ненормально больших количеств гликогена, либо необычных его видов (Таблица 16.1 (37.1).

Описаны гликогенозы, связанные с недостаточностью фосфоорилазы в печени (гликогеноз VI типа), недостаточностью фосфофруктокиназы в мышцах и эритроцитах (гликогеноз VII типа (болезнь Таруи), а также гликогеноз, обусловленный недостаточностью киназы фосфоорилазы. Сообщалось также о случаях недостаточности аденилаткиназы и сАМР-зависимой протеинкиназы.

Некоторые типы гликогенозов (0, I, III, VI, IX)сопровождаются тяжелой гипогликемией голодания. Поэтому эндокринологи чаще всего сталкиваются именно с этими типами гликогенозов.



Клинические проявления и биохимические нарушения при гликоgenoзах, сопровождающихся гипогликемией голодания, перечислены в таблице 16.2 (табл. 37.2 <http://medbiol.ru/medbiol/eclin/0020249b.htm>)

**Таблица 16.2 (Табл. 37.2(Lvn)). Гликоgenoзы и гипогликемия голодания**

Тип	Клинические проявления	Биохимические признаки	Реакция на глюкагон
0	Задержка роста, гепатомегалии нет	Тяжелая гипогликемия и кетоацидоз натощак, гипергликемия и лактацидоз после еды	Во время голодания глюкагон не повышает уровень глюкозы и снижает уровень лактата
Ia и Ib	Гепатомегалия, ацидоз, гипервентиляция, увеличение почек, задержка роста, кровоточивость, ксантоматоз, задержка полового развития, подагра, аденома печени и печеночно-клеточный рак, у взрослых больных - гломерулосклероз, почечная недостаточность и хроническая железодефицитная анемия, при гликоgenoзе типа Ib – нейтропения, рецидивирующие инфекции, воспалительные заболевания кишечника	Тяжелая гипогликемия голодания, особенно у грудных детей, лактацидоз, гиперурикемия, выраженная гипертриглицеринемия, умеренная гиперхолестеринемия, небольшое повышение активности печеночных аминотрансфераз, нарушение функции тромбоцитов.	Уровень глюкозы не повышается или повышается незначительно, лактацидоз усиливается
III	Гепатомегалия, гипервентиляция, кетоацидоз, иногда спленомегалия, задержка роста и полового развития, миопатия, почки не увеличены, у некоторых больных кардиомегалия	После длительного голодания – умеренная или тяжелая гипогликемия с кетоацидозом, нормальный уровень лактата и мочевой кислоты натощак, легкая или умеренная гиперпротеидемия, повышение печеночных аминотрансфераз	Через 2 ч после приема богатой углеводами пищи глюкагон вызывает повышение уровня глюкозы. Если голодание продолжается больше 2 ч, уровень глюкозы после введения глюкагона не повышается или повышается незначительно, уровень лактата не повышается

VI, IXa, IXb	Гепатомегалия, иногда задержка роста и физического развития, с возрастом клинические проявления постепенно исчезают, у подростков размеры печени нормализуются. У взрослых симптомы отсутствуют.	Гипогликемия голодания отсутствует или слабо выражена, нормальные уровни лактата и мочево́й кислоты, иногда легкая гиперхолистеринемия, гипертриглицеринемия и повышение активности аминотрансфераз	Повышение уровня глюкозы и снижение уровня лактата
--------------------	--	---	--

Характеристика гликогенозов, сопровождающихся гипогликемией голодания

**Гликогенозы** – общее название синдромов, обусловленных наследственными дефектами ферментов, участвующих в синтезе или расщеплении гликогена.

### Классификация

Принято выделение нескольких типов гликогенозов на основании биохимической природы дефекта:

- I тип, дефект глюкозо-6-фосфатазы (болезнь Гирке)
- II тип, дефект мальтазы (болезнь Помпе)
- III тип (болезнь Форбса)
- IV тип (болезнь Андерсена)
- V тип, нарушение мышечной фосфорилазы гликогена (болезнь Мак-Ардля)
- VI тип, дефект фосфорилазы печени (болезнь Герса)
- VII тип, дефект фосфофруктокиназы мышц (болезнь Таруи)
- IX тип, нарушение транспорта глюкозы

#### 16.2.4.1. Гликогеноз Ia типа; GSD1A (232200 ICD +)

*Альтернативные названия; символы*

#### **Болезнь Гирке**

Болезнь дефицита глюкозо-6-фосфатазы гепаторенального гликогеноза.

Гликогеноз Ia (GSD1A) вызывается гомозиготными или соединением гетерозиготных мутаций в гене G6PC (G6PC1 – GLUCOSE-6-PHOSPHATASE, CATALYTIC,1), который прежде назывался G6PT)

Ген, который кодирует глюкозо-6-фосфатазу (G6Pase), локализуется на хромосоме 17q21. Мутации R83C (+613742,0002) и Q347X (613742,0004) наиболее распространены у кавказцев; 130X (+613742,0001) и R83C были наиболее распространены у испаноязычных; R83H наиболее распространены у китайцев.

Гликогеноз Ia является аутосомно-рецессивным заболеванием (Lei и др., 1993), проявляется в течение первого года жизни тяжелой гипогликемией и гепатомегалией,

вызванной накоплением гликогена, задержкой роста и полового созревания, молочно-кислой ацидемией, гиперлипидемией, гиперурикемией, и у взрослых высокой частотой печеночных аденом (резюме Lei et., 1993).

Метаболические нарушения при гликогенозе типа I, обусловленные недостаточной продукцией глюкозы, возникают уже через несколько часов после еды, а при длительном голодании значительно усиливаются. Поэтому лечение гликогеноза типа I сводится к частому кормлению ребенка. Цель лечения – предупредить падение концентрации глюкозы в крови ниже 4,2 ммоль/л – порогового уровня, при котором происходит стимуляция секреции контринсулярных гормонов.

Если ребенок своевременно получает достаточное количество глюкозы размеры печени уменьшаются, лабораторные показатели приближаются к норме, кровоточивость исчезает, рост и психомоторное развитие нормализуются.

#### **16.2.4.2. Гликогеноз II типа; GSD2; Болезнь Помпе (232300МКБ +)**

Гликогеноз II (GSD2) обусловлен гомозиготной или составного гетерозиготной мутацией в гене GAA (606800), который кодирует кислую альфа-1,4-глюкозидазу также известную как кислая мальтаза. Ген альфа-D-глюкозидазы расположен в сегменте 17q25.2-q25.3.

Болезнь накопления гликогена II, аутосомно-рецессивное расстройство, является прототипом лизосомных болезней накопления. Основными проявлениями классической инфантильной формы (болезнь Помпе) являются кардиомиопатия и мышечная гипотония; тогда как в клинической картине ювенильной и взрослой формы заболевания доминируют повреждения скелетных мышц Matsuishi др. (1984).

Существуют три клинических формы гликогеноза типа II (недостаточности альфа-D-глюкозидазы, болезни Помпе), все наследуются аутосомно-рецессивно. Самая частая – инфантильная форма, проявляющаяся в первые 3 мес жизни. Она характеризуется резкой слабостью, кардиомегалией, гепатомегалией и дыхательной недостаточностью. Гликоген откладывается не только в мышцах, но и в спинальных и стволовых мотонейронах, что утяжеляет клиническую картину. Больные обычно умирают в возрасте до 1 года.

Ювенильная форма сходна с миопатиями. Слабость проксимальных мышц вызывает задержку двигательного развития, в процесс вовлечены также дыхательные мышцы, иногда сердце; печень и головной мозг не страдают.

Для взрослой формы характерно начало в 20-40 лет. Нередко сначала появляется слабость дыхательных мышц и развивается дыхательная недостаточность, и лишь затем присоединяется нарастающая слабость проксимальных мышц. Сердце и печень не затрагиваются.

При всех трех формах в 2-10 раз повышена активность КФК. При ЭМГ выявляется миопатическая триада, но особенно характерны миотонические разряды, вспышки потенциалов фибрилляций и положительных волн и сложные повторные разряды, особенно выраженные в глубоких мышцах спины на пояснично-крестцовом уровне. При

биопсии мышц видны вакуоли с гликогеном и повышенной активностью лизосомной кислой фосфатазы. При электронной микроскопии выявляется связанный с мембраной и свободный гликоген. Самый надежный диагностический метод – определение активности альфа-D-гликозидазы в мышце.

Лечения нет. Целесообразность белковой диеты не подтверждена. Попытки заместительной терапии в/в введением альфа-D-гликозидазы не увенчались успехом.

### **Молекулярная генетика**

Ван дер Плуг и др. (1989) продемонстрировали, гетерогенность этого заболевания на молекулярном уровне. Наиболее распространенной была мутация в сайте сплайсинга в интроне 1 (606800.0006), присутствовала в гетерозиготном состоянии у 34 (85%) из 40 пациентов (частота аллеля 42,3%). Gort соавт. (2007) выявил 23 GAA мутации, 9 из которых были новыми, среди 22 испанских пациентов с GSD II. 2 самые распространенные мутации были сплайсинговые мутации (606800.0006 и 606800.0018) с частотой 25% и 14%, соответственно.

### **Животная модель**

Douillard-Guilloux др. (2010) проанализировали воздействие полного генетического устранения синтеза гликогена в мышечной модели GSDII. На мышцах GAA / Gys1 (138570)с двойным нокаутом продемонстрировали глубокое снижение количества гликогена в сердце и скелетных мышцах, значительное снижение набухания лизосом и аутофагию, а также полную коррекцию кардиомегалии. Douillard-Guilloux др. (2010) пришли к выводу, что долгосрочное устранение синтеза мышечного гликогена приводит к значительному улучшению структурных, метаболических и функциональных нарушений на мышечной модели GSDII и предполагает новые перспективы для лечения болезни Помпе.

## **16.2.4.3. Гликогеноз III типа; GSD3 (# 232400)**

*Альтернативные названия; символы*

FORBES БОЛЕЗНЬ

CORI БОЛЕЗНЬ

Причина заболевания гликогенозом типа III – дефект амило-1,6-гликозидазы (AGL) (см. « Гликоген: метаболизм гликогена »). Поскольку боковые цепи гликогена полностью не отщепляются, главные цепи оказываются недоступными для фосфорилазы. В результате продукция глюкозы резко снижается, в печени и других органах накапливается остаточный декстрин.

Предполагают, что гликогеноз типа III может быть обусловлен дефектом 4-альфа-D-гликоанотрансферазы либо сочетанием дефектов амило-1,6-гликозидазы и 4-альфа-D-гликоанотрансферазы.

### **Гликогенозы типа III: клиническая картина**

У новорожденных, грудных детей и у детей младшего возраста продукция глюкозы при гликогенозе типа III нарушена не полностью, поскольку глюкоза образуется под действием фосфорилазы из боковых цепей гликогена, а также путем глюконеогенеза.

Поэтому клинические проявления гликогенозов типа III и типа I существенно различаются.

Тяжелая миопатия и кардиомиопатия наблюдаются между 20 и 40 годами. Размеры печени уменьшаются и в пубертатном периоде нормализуются, однако в большей части случаев при биопсии обнаруживают фиброз печени, а у некоторых больных развивается цирроз. Без лечения задерживаются рост и половое развитие.

Shen et al. (1996) идентифицировали гомозиготные или сложные гетерозиготные мутации в гене AGL (см., Например, 610860.0002 – 610860.0004).

Aoyama et al. (2009) определили 10 различных мутаций AGL, включая 8 новых мутаций (см., Например, 610860.0014 и 610860.0015) у 23 турецких пациентов с GSD III. Не наблюдалось корреляции генотипа / фенотипа.

Лечение проводится следующим образом:

- прием необходимого количества глюкозы в виде сырого кукурузного крахмала в сочетании с диетой, содержащей достаточное количество белков и других питательных веществ, устраняет метаболические нарушения и задержку роста;

- больным с выраженной задержкой роста и тяжелой миопатией показано непрерывное ночное зондовое питание смесью, содержащей глюкозу, олигосахариды и аминокислоты, и частый прием богатой белком пищи в дневное время.

#### 16.2.4.4. Гликогеноз IV типа; GSD4; Болезнь Андерсена (# 232500)

**Болезнь Андерсена** возникает в результате мутаций гена микросомной амило-1,4:1,6-глюкантрансферазы, приводящих к ее недостаточности в печени, мышцах, лейкоцитах, эритроцитах и фибробластах. Ген картирован на хромосоме 3p 12. Тип наследования – аутосомно-рецессивный.

Амило-1,4:1,6-глюкантрансфераза участвует в синтезе гликогена в точках ветвления гликогенового дерева. Фермент соединяет ветвь из, по крайней мере, шести α-1,4-сцепленных глюкозидных остатков наружных цепей гликогена с гликогеновым «деревом» α-1,6-гликозидной связью. При недостаточности фермента в клетках печени и мышц откладывается амилопектин, что приводит к повреждению клеток. Концентрация гликогена в печени не превышает 5%.

**Заболевание** манифестирует на первом году жизни неспецифическими гастроинтестинальными симптомами: рвотой, диареей. По мере прогрессирования заболевания возникает гепатоспленомегалия, прогрессирующая печеночная недостаточность, генерализованная мышечная гипотония и атрофия, а также тяжелая кардиомиопатия. Смерть больных обычно наступает до 3-5 лет вследствие хронической печеночной недостаточности, редко – в старшем детском возрасте (до 8 лет).

Лечение направлено на борьбу с обменными нарушениями, в т.ч. с ацидозом. В некоторых случаях эффективно применение глюкагона, анаболических гормонов и глюкокортикоидов. Частые приемы пищи с высоким содержанием легкоусвояемых углеводов необходимы при гипогликемии. При мышечных формах гликогеноза улучшение отмечается при соблюдении диеты с высоким содержанием белка, назначении фруктозы

(внутри по 50-100 г в день), поливитаминов, АТФ. Предпринимаются попытки введения больным недостающих ферментов.

### **Молекулярная генетика**

Bao et al. (1996) обнаружили 2 мутации missense (607839.0004, 607839.0005) и 1 нонсенс мутацию (607839.0006) в гене GBE у 2 пациентов с классической печеночной формой GSD IV. Эксперименты с транзientной экспрессией показали, что эти мутации инактивировали активность разветвляющего фермента гликогена. У пациента с неспецифической печеночной формой GSD IV они идентифицировали сложную гетерозиготность для 2 GBE1 мутаций, одна из которых приводила к полной потере активности GBE (607839.0003), тогда как другая приводила к потере приблизительно 50% активности GBE (607839.0002). У пациента с фатальной врожденной нервно-мышечной формой идентифицировали делецию 210 п.н. в кДНК GBE (607839.0001). У пациента с фатальным перинатальным GSD IV, описанным Alegria et al. (1999), Bruno et al. (2004) идентифицировали гомозиготную вставку 274-bp в ген GBE1 (607839.0009).

## **16.2.4.5. Гликогеноз V типа; GSD5; Болезнь МакАрдля; (# 232600)**

**Болезнь Мак-Ардля (недостаточность мышечной фосфоорилазы, гликогеноз V типа).**

Болезнь Мак-Ардля (метаболическая миопатия) – наследственное заболевание, разновидность гликогеноза типа V. Связана с недостаточностью фермента фосфоорилазы в мышцах, что вызывает накопление в них гликогена. Вследствие накопления гликогена в миокарде возможна сердечная недостаточность.

Болезнь Мак-Ардля или гликогеноз типа V (GSD5) вызван гомозиготной или сложной гетерозиготной мутацией в гене PYGM (608455), который кодирует мышечную гликогенфосфоорилазу на хромосоме 11q13.

Болезнь Мак-Ардля является аутосомно-рецессивным метаболическим расстройством, характеризующимся резкой мышечной слабостью при выполнении физических упражнений и мышечными судорогами в детстве или подростковом возрасте. Болезнь МакАрдля является относительно мягким расстройством, за исключением возможной почечной недостаточности как осложнения миоглобинурии (резюме Chen, 2001).

Диагноз следует подтвердить результатами определения активности фермента в мышцах. Dawson et al. (1968) предложил тест для выявления бессимптомных гетерозигот, основанный на развитии коротких болезненных судорог во время физических нагрузок.

### **Молекулярная генетика**

Гликогеноз типа V наследуется как аутосомно-рецессивный признак. Ген мышечной фосфоорилазы расположен на хромосоме 11 (11q13). Среди больных белой расы превалирует нонсенс-мутация этого гена (R50X), в результате которой кодон аргинина в положении 50 превращается в стоп-кодон, тогда как у японцев чаще встречается делеция одного из кодонов (F708). Таким образом, для установления окончательного

диагноза и выявления носительства болезни в этих популяциях можно использовать анализ ДНК.

**Лечение симптоматическое.** Клинические симптомы можно предотвратить, исключив чрезмерные физические нагрузки. Однако регулярные умеренные нагрузки улучшают работоспособность. Прием глюкозы или фруктозы внутрь или введение глюкагона также увеличивают переносимость нагрузок. Физическая выносливость возрастает и при потреблении диеты с высоким содержанием белка. В некоторых случаях помогают добавки креатина. На продолжительность жизни заболевание обычно не влияет.

#### 16.2.4.6. Гликогеноз VI типа; GSD6; Hers Болезнь (Болезнь Герса) (# 232700)

Болезнь накопления гликогена VI типа (GSD6) (232700) вызвано гомозиготной или сложной гетерозиготной мутацией в гене PYGL (613741), который кодирует гликогенфосфорилазу печени на хромосоме 14. Гликогеноз VI типа (болезнь Герса) – гликогеноз, связанный с недостаточностью фосфорилазы в печени.

Фосфорилаза печени катализирует фосфорилирование (расщепление) гликогена с образованием глюкозо-1-фосфата. Нарушение этого механизма приводит к избыточному отложению гликогена в печени

Первые признаки заболевания обычно проявляются на первом году жизни. Характерно значительное увеличение печени в результате гликогенной инфильтрации гепатоцитов, задержка роста, кукольное лицо, гипогликемия, гипергликемия после внутривенного введения галактозы, повышенное содержание гликогена в эритроцитах.

#### 16.2.4.7. Гликогеноз VII типа; GSD7; Болезнь Таруи (# 23280)

*Альтернативные названия; символы*

GSD VII; Дефицитность Мышечной Фосфофруктокиназы; Дефицитность PFKM; Болезнь TARUI

**Болезнь Таруи**, также **гликогеноз VII типа** – наследственное метаболическое заболевание типа гликогенозов, выражающееся в дефиците фермента фосфофруктокиназы в мышечной ткани. Болезнь названа в честь японского врача Сэйитиро Таруи, который впервые описал заболевание в 1965 году [Tarui S., et al (1965); Drouet A. et al. (2013)].

Болезнь наследуется по аутосомно-рецессивному типу; может поражать человека, а также других млекопитающих (особенно собак) [Smith B. F., et al(1996)4].

Гликогеноз VII (GSD7) связан с гомозиготной или сложной гетерозиготной мутацией в гене PFKM (610681), который кодирует мышечную фосфофруктокиназу (ФФКМ) на хромосоме 12q13

Гликогеноз VII клинически характеризуется непереносимостью физических нагрузок, судорогами мышц, миопатией напряжения и компенсированным гемолизом. Также может возникать миоглобинурия. Дефицит мышечной изоформы ФФК приводит к полной и частичной потере активности ФФК мышц и ФФК эритроцитов, соответственно. Рабен и Шерман (Raben and Sherman, 1995) отметили, что не все пациенты с

GSD VII обращаются за медицинской помощью, потому что в некоторых случаях это относительно мягкое расстройство.

### **Диагностика и лечение**

Диагноз может быть поставлен с помощью биопсии мышечной ткани, для оценки избыточного накопления гликогена, которое вызывается нарушением гликолиза. Активность фосфофруктокиназы может быть измерена с помощью анализа крови, у больных активность фермента понижена. Также у пациентов может быть повышен уровень креатинкиназы [Toscano A., Musumeci O. (2007).].

Лечение обычно основывается на ограничении физических нагрузок во избежание мышечных спазмов и болей. Также рекомендуется избегать употребления углеводов.

Согласно одному из исследований, кетогенная диета улучшила состояние младенца с данным заболеванием. Логика подхода состоит в том, что диета с низким содержанием углеводов и высоким содержанием жиров заставляет организм использовать жирные кислоты в качестве основного источника энергии вместо глюкозы. Это позволяет обойти дефект фермента в гликолизе, что снижает воздействие на энергетический обмен [Swoboda Kathryn J., et al.(1997)].

Также доступно генетическое исследование на наличие мутаций в соответствующих генах.

## **16.2.4.8. Гликогенозы типа 0 (недостаточность гликогенсинтетазы)**

Недостаточность гликогенсинтетазы (гликогеноз типа 0) – очень редкое заболевание, обусловлено отсутствием активности гликогенсинтетазы в печени.

У больных с гликогенозом типа 0 содержание гликогена в печени через 4- 6 ч. после еды в 10 раз ниже, чем у здоровых людей. Наследование аутосомно-рецессивное. Из-за нарушения синтеза гликогена основное количество глюкозы превращается в лактат в ходе гликолиза.

Глюкагон стимулирует глюконеогенез и приводит к превращению лактата в глюкозу. Клиническая картина выглядит следующим образом.

Если больной не поел перед сном, вскоре после пробуждения возникает гипогликемия.

Для гликогеноза типа 0 характерно своеобразное нарушение метаболизма – тяжелая гипогликемия с кетоацидозом утром натощак и гипергликемия с лактацидозом днем после еды. Печень не увеличена. Гликогеноз типа 0 следует заподозрить у любого ребенка с гипогликемией голодания.

При лечении недостаточности гликогенсинтетазы (гликогеноза типа 0) целью лечения является предупреждение тяжелой гипогликемии. Назначают диету, богатую белками и углеводами. Питание должно быть частым (каждые 4 ч). Белки служат источником аминокислот – субстратов глюконеогенеза; они уменьшают углеводную нагрузку, приводящую к гипергликемии и лактацидозу. Такая диета предотвращает гипогликемию и кетоацидоз натощак, уменьшает гипергликемию и лактацидоз после еды и способствует ускорению роста.



### 16.2.4.9. Гликогеноз типа IXa (GSD9A1) и типа IXa2 GSD9A2)

Гликогеноз типа IXa (GLYCOGEN STORAGE DISEASE IXa1; GSD9A1) и типа IXa2 (GSD9A2) вызван мутацией в гене PHKA2 (alpha subunit of hepatic phosphorylase kinase (PHK; EC 2.7.11.19) (300798), который кодирует субъединицу альфа-2 печеночной киназы фосфорилазы, на хромосоме Xp22.

Гликогеноз типа IX является метаболическим расстройством, являющимся результатом дефицита печеночной киназы фосфорилазы, гексадекамерного фермента, включающего 4 копии каждой из 4 уникальных субъединиц, кодируемых 4 различными генами: альфа (PHKA2), бета (PHKB, 172490), гамма (PHKG2, 172471) и дельта (CALM1, 114180). Мутации в генах PHKA2, PHKB и PHKG2 приводят к GSD9A, GSD9B (261750) и GSD9C (613027) соответственно. GSD IXa представляет собой X-связанное рецессивное расстройство, тогда как другие являются аутосомно-рецессивными.

GSD IXa был далее разделен на типы IXa1 (GSD9A1) без активности фермента киназы фосфорилазы (PHK) в печени или эритроцитах и IXa2 (GSD9A2), без киназы фосфорилазы в печени, но с нормальной активностью в эритроцитах. Клиническое проявление обоих подтипов одинаковое, и оба они вызваны мутациями в гене PHKA2. Однако мутации, которые приводят к IXa2, представляют собой либо missense, либо небольшие внутрирамочные делеции или вставки, позволяющие экспрессию остаточного фермента в эритроцитах (Keating et al., 1985; Hendrickx et al., 1994; Beauchamp et al., 2007).

#### Клинические особенности

Гликогеноз IXa является одним из самых мягких гликогенозов человека. Клинические симптомы включают гепатомегалию, замедление роста, повышение глутамат-пирувата трансминазы и глутамат-оксалоацетатной трансминазы, гиперхолестеринемию, гипертриглицеридемию и гиперкетоз натошак. Эти клинические и биохимические аномалии постепенно исчезают с возрастом, и у большинства взрослых пациентов болезнь протекает бессимптомно (Schimke et al., 1973, Willems et al., 1990).

#### Молекулярная генетика

У пострадавших членов 4 несвязанных семей с GSD IXa1 Hendrickx et al. (1995) идентифицировали 4 различных мутации в гене PHKA2 (300798.0001 – 300798.0004). Клинические черты были переменными, но включали замедление роста, гепатомегалию, повышение ферментов печени и нормализацию симптомов с возрастом. Активность киназы фосфорилазы (PHK) была менее 20% от контрольных значений в эритроцитах и в печени при измерении.

Классификация, особенно нумерация гликогенозов, уже давно является предметом спора. Например, Huijing (1970) ссылаясь на это расстройство как на болезнь гликогена типа VIA; Hug (1974) присвоил номер VIII предположительно рецессивной форме дефицита фосфорилазы с вовлечением головного мозга и номер IX дефициту киназы фосфорилазы (см. Schimke et al., 1973). McAdams et al. (1974) представил информацию о классификации и морфологии гликогенозов.

### **Животная модель**

Schneider et al. (1993) рассмотрели животных с мутациями, которые приводят к связанному с киназами фосфорилаз РНК- гликогенозам. Известны два разных X-сцепленных расстройства, а также аутосомно-рецессивный дефицит киназ фосфорилаз (РНК), поражающий печень и большинство других тканей, но не мышечную ткань, у крысы.

### **16.2.4.10. Заболевание накопления гликогена IXb типа; GSD9 (# 26175)**

Аутосомно-рецессивный дефицит киназы фосфорилазы печени и мышц, Гликогеноз типа IXb (GSD9B) вызван соединением гетерозиготных мутаций в гене РНКВ (172490), который кодирует бета-субъединицу киназы фосфорилазы на хромосоме 16q12.

### **Молекулярная генетика**

У 1 женщин и 4 мужчин-пациентов с гликогенозом IXb Burwinkel et al. (1997) идентифицировали мутации в гене РНКВ. Было обнаружено 5 различных нонсенс мутаций (см., Например, 172490.0002), вставку 1-п.о. (bp) (172490,0001), мутацию сайта сплайсинга и большую делецию с потерей 8 экзона. Хотя мутации сильно нарушили трансляцию и приводили к конститутивной экспрессии последовательности только бета-субъединицы киназы фосфорилазы, наблюдался неожиданно мягкий клинический фенотип, затрагивающим практически только печень, и с относительно высокой остаточной ферментативной активностью приблизительно 10%. Наследование было аутосомно-рецессивным.

### **Номенклатура**

Lederer et al. (1975) что гликогеноз VI, включает по меньшей мере 3 различных генетических дефекта: дефицит X-сцепленной бета-киназы фосфорилазы, при котором мышечный фермент не повреждается (называемый гликогенозом VIII, 306000); обсуждаемый здесь дефицит аутосомной киназы; и дефицит фосфорилазы печени (называется гликогенозом VI, 232700).

### **Литература**

1. Tedesco T.A. Human galactose-1-phosphate uridylyltransferase. – J.Biol.Chem., 1972, v. 247, p. 6631-6635.
2. Tedesco T.A., Miller K.L. Galactosemia: alterations in sulfate metabolism secondary to galactose-1-phosphate uridylyltransferase deficiency. – Science, 1979, v. 205, p. 1395-1397.
3. Segal S. Disorders of galactose metabolism. – The Metabolic Basis of Inherited Disease. Ed. Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D. New York: McGraw-Hill (pub.), 1989, p. 453-480.
4. Banroques J., Shapira F., Gregori C., Dreyfus J.C. Molecular studies on galactose-1-phosphate uridylyltransferase from normal and mutant subject. – Ann.Hum.Genet., 1983, v. 47, p. 151-155.
5. Flach J.E., Dembure P., Elsas L.J. Transferase deficiency galactosemia: A molecular analysis. – Am.J.Hum.Genet., 1990, v. 47, p. A607.
6. Розенфельд Е. Л., Попова И. А. Гликогеновая болезнь. – М.: Медицина, 1979. – 288 с.

7. Розенфельд Е. Л., Попова И. А. Врождённые нарушения обмена гликогена / Акад. мед. наук СССР. – М.: Медицина, 1989. – 240 с. – Библиогр.: с. 217-238
8. Lei K.-J., Shelly L. L., Pan, C.-J., Sidbury J. B., Chou J. Y. Mutations in the glucose-6-phosphatase gene that cause glycogen storage disease type Ia. *Science* 262: 580-583, 1993.
9. Gort L., Coll M.J., Chabas A. Glycogen storage disease type II in Spanish patients: high frequency of c.1076-1G>C mutation. *Mol Genet Metab* 2007;92:183-187.
10. Chen Y.-T., He J.-K., Ding J.-H., Brown B. I. Glycogen debranching enzyme: purification, antibody characterization, and immunoblot analyses of type III glycogen storage disease. *Am. J. Hum. Genet.* 41: 1002-1015, 1987.
11. Alegria A., Martins E., Dias M., Cunha A., Cardoso M. L., Maire I. Glycogen storage disease type IV presenting as hydrops fetalis. *J. Inherit. Metab. Dis.* 22: 330-332, 1999.
12. Andersen S. T., Duno, M., Schwartz M., Vissing J. Do carriers of PYGM mutations have symptoms of McArdle disease? *Neurology* 67: 716-718, 2006
13. Burwinkel B., Bakker H. D., Herschkovitz E., Moses S. W., Shin Y. S., Kilimann M. W. Mutations in the liver glycogen phosphorylase gene (PYGL) underlying glycogenosis type VI (Hers disease). *Am. J. Hum. Genet.* 62: 785-791, 1998.
14. Layzer R. B., Rowland L. P., Ranney H. M. Muscle phosphofructokinase deficiency. *Arch. Neurol.* 17: 512-523, 1967.
15. Raben N., Sherman, J. B. Mutations in muscle phosphofructokinase gene. *Hum. Mutat.* 6: 1-6, 1995.
16. Beauchamp N. J., Dalton A., Ramaswami U., Niinikoski H., Mention K., Kenny, P., Kolho K.-L., Raiman J., Walter J., Treacy E., Tanner S., Sharrard M. Glycogen storage disease type IX: high variability in clinical phenotype. *Molec. Genet. Metab.* 92: 88-99, 2007.
17. Davidson M., Miranda A. F., Bender A. N., DiMauro S., Vora S. Muscle phosphofructokinase deficiency: biochemical and immunological studies of phosphofructokinase isozymes in muscle culture. *J. Clin. Invest.* 72: 545-550, 1983. [PubMed: 6223943, related citations] [Full Text]

### Контрольные вопросы

1. Какие болезни нарушений углеводного обмена описаны?
2. Какие ферменты, участвуют в метаболизме галактозы и недостаточность какого фермента приводит к галактоземии?
3. Какие ферменты участвуют в синтезе и распаде гликогена?
4. Какие типы гликогенозов возникают при нарушениях активности ферментов распада гликогена в печени и мышцах?
5. Недостаточность каких ферментов вызывают различные типы гликогенозов?

---

## ГЛАВА 17

---

### МУКОПОЛИСАХАРИДОЗЫ (ЛИЗОСОМНЫЕ БОЛЕЗНИ)

Ферменты и ферментные системы обычно локализованы в определенных клеточных структурах (лизосомах, пероксисомах, митохондриях). Нарушение в работе таких ферментов приводит к неспособности органелл выполнять свойственные им функции. В связи с этим принято выделять лизосомные, пероксисомные и митохондриальные болезни.

Лизосомы представляют собой специализированные цитоплазматические мембранные структуры, основная функция которых – ферментативное расщепление различных макромолекул. Гидролитическая активность лизосомных ферментов столь высока, что если бы мембрана лизосом разрушилась, то клетка тотчас бы подверглась самоперевариванию.

Наибольшее распространение среди лизосомных болезней имеют мукополисахаридозы, обусловленные нарушением катаболизма гликозамингликанов в различных тканях больного, и сфинголипидозы, возникающие при нарушении обмена сфинголипидов.

#### 17. Мукополисахаридозы: общие сведения.

Мукополисахаридозы (МПС) – большая группа моногенных наследственных заболеваний, обусловленных нарушением многоступенчатого процесса ферментативного катализа гликозамингликанов (ГАГ) в лизосомах. ГАГ представляют собой сложные гетеросахара, состоящие из длинных полисахаридных цепей, построенных из остатков глюкуроновой кислоты и сульфатированного гексозамина. К гликозамингликанам относятся дерматансульфат (ДС), гепарансульфат (ГС), кератансульфат (КС), а также хондроитин-4-сульфат (Х4С) и хондроитин-6-сульфат (Х6С). Впервые заболевание этой группы было описано Гурлером в 1917 году. К настоящему времени идентифицировано 10 генетических вариантов МПС. Пять из них обусловлены нарушением активности сульфатаз, четыре – гликозидаз и один вариант возникает при дефиците трансферазы. Нарушение активности различных ферментов приводит к увеличению экскреции с мочой различных типов ГАГ. Повышение их концентрации дает основание для предварительного диагноза МПС и позволяет спланировать последовательность проведения энзимодиагностики. В таблице 17.1. представлены сводные данные о генетических и биохимических характеристиках при различных вариантах МПС. Появление клинических симптомов после периода нормального развития свойственно большинству болезней накопления. Это связано с достижением критического уровня нерасщепленного субстрата в лизосомах. При исследовании биоптатов различных тканей обнаруживаются увеличенные в размере лизосомы, представляющие собой раздутые вакуоли. Все мукополисахаридозы наследуются аутосомно-рецессивно и лишь болезнь Хантера (МПС второго типа) наследуется Х-сцепленно рецессивно. Клинические признаки при

различных вариантах мукополисахаридозов имеют значительное сходство и становятся заметными к 2–3 летнему возрасту. Среди них: 1) грубые черты лица (гаргоилизм); 2) задержка роста (нанизм); 3) диспропорциональное строение скелета, деформации позвоночника (кифозы, сколиозы); 4) контрактуры суставов; 5) гепатоспленомегалия, 6) пахово-мошоночные грыжи; 7) снижение слуха (кондуктивная тугоухость); 8) помутнение роговицы. Некоторые генетические варианты мукополисахаридозов сопровождаются снижением интеллекта. Сочетание отмеченных клинических признаков при разных нозологических формах этой группы заболеваний варьирует.

**Таблица 17.1. Характеристика биохимических маркеров различных типов мукополисахаридозов**

тип	OMIM	Фермент	Ген	ГАГ
1Н Гурлера	252800	$\alpha$ - L- идуронидаза	4p16.3	ДС, ГС
1S Шейе	–			ДС, ГС
2 Хантера	309900	Идуронатсульфатаза	Xq28	ДС, ГС
3А Санфилиппо	252900	Гепаран-N-сульфатаза	17q25.3	ГС
3В Санфилиппо	252920	$\alpha$ - N- ацетилглюкозаминидаза	17q21	ГС
3С Санфилиппо	252930	$\alpha$ -ацетил-СоА:глюкозамин-ацетил трансфераза	-	ГС
3Д Санфилиппо	252940	N- ацетилглюкозамин-6-сульфатаза	12q14	ГС
4А Моркио	253000	Галактозамин-6- сульфатаза	16q24.3	КС, Х6С
4В Моркио	230500	$\beta$ -галактозидаза I	22q13-qter	ГАГ в норме
6 Марото-Лами	253200	Арилсульфатаза В	5q13-q14	ДС
7 Слая	253220	$\beta$ -глюкуронидаза	7q21.1-q22	ДС, ГС, Х6С, Х4С
I-клеточная болезнь (муколипидоз 2 типа)	252500	N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансфераза	4q21-23	Умеренное повышение всех ГАГ

Первый тип МПС характеризуется наличием двух аллельных вариантов -болезни Гурлера и болезни Шейе. Они обусловлены разными мутациями в одном и том же гене. Клинические проявления этих двух вариантов значительно отличаются друг от друга. Так, при МПС Гурлера у больного есть все вышеперечисленные симптомы, характерные для мукополисахаридозов в целом (см. рисунок 17.1).

Течение заболевания тяжелое, прогрессирующее; продолжительность жизни больных снижена. При синдроме Шейе симптомы, характерные для мукополисахаридозов, выражены незначительно; заболевание имеет доброкачественное течение. Мукополисахаридоз 2-го типа (болеть Хантера) по клинической картине и тяжести течения напоминает МПС 1-го типа. Фенотипические проявления мукополисахаридоза 3-го типа (болезни Санфилиппо) обусловлены снижением активности четырех ферментов, участву-

ющих в процессе деградации гепарансульфата, В соответствии с этим выделяют четыре генетических формы, которые практически невозможно отличить при клиническом обследовании больного. Для этого типа МПС наиболее характерны симптомы, связанные с поражением нервной системы: снижение интеллекта, повышенная возбудимость, нарушение сна и спастическая диплегия. Как правило, у больных снижен слух. Гаргоизм для этой формы заболевания не типичен, однако, отмечается гепатоспленомегалия и не резко выраженные изменения скелета. Особенностью клинических проявлений мукополисахаридоза 4-го типа (болезни Моркио) являются выраженные скелетные деформации: резкое укорочение туловища, приводящее к значительному снижению роста больного, деформация позвоночника и грудной клетки, укорочение шеи, контрактуры и деформации суставов. Такие значительные деформации позвоночника нередко вызывают симптомы сдавления спинного мозга в спинно-мозговом канале. Интеллект больных, как правило, не страдает. Клинические проявления мукополисахаридоза 6-го типа (болезни Марото-Лами) в значительной степени сходны с таковыми при МПС 1-го типа, однако, клинические симптомы появляются позднее и темп прогрессирования заболевания более медленный. Кроме того, для этого варианта МПС не характерно снижение интеллекта.

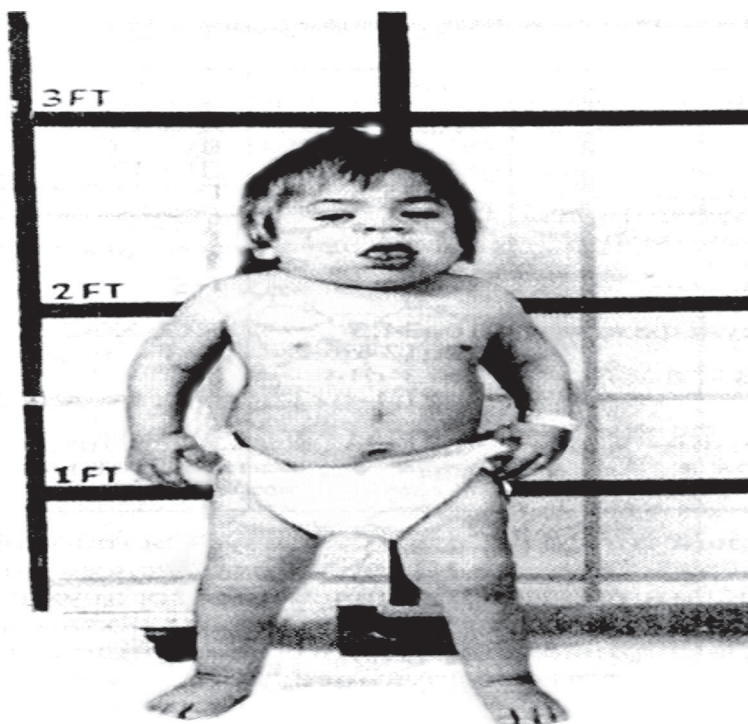


Рисунок 17.1. МПС Гурлера (из Ch. R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle, 2001)

## 17.1. Синдром Гурлера (607014ICD +)

### Описание

Синдром Hurler является аутосомно-рецессивным заболеванием (Бунге и др., 1995; Yamagishi и др., 1996)

### Клинические особенности

Клинические признаки синдрома Hurler включают грубые черты лица, большая голова с выпячиванием лобных костей. Спинка носа сглажена с широким кончиком и ноздрями. Щеки полные. Губы растянутые и рот обычно открыт, особенно после 3 лет (Горлин и др., 2001). Шея короткая и может произойти подвывих позвонков со сдавлением спинного мозга (Thomas и др., 1985), умственную отсталость, грыжи, множественные дизостозы и гепатоспленомегалия. Дети с синдромом Hurler кажутся нормальными при рождении и характерный внешний вид развивается в течение первых лет жизни (Wraith и др., 1987).

Диагноз обычно устанавливается, в среднем, в возрасте 21 месяца (в диапазоне 5-63 месяцев).

Альфа-L-идуронидаза (iduronidase) (IDUA; EC 3.2.1.76) гидролизует концевой остаток альфа-L-идуроновой кислоты гликозаминогликанов дерматансульфата и гепарансульфата (Нейфельд и Мюнцера, 2001), дефицит фермента приводит к мукополисахаридозу I (MPS I), (см 607014, 607015 и 607016). Фермент был первоначально определен как «Hurler корректирующий фактор» (Barton и Нейфельд, 1971).

### Структура гена

Скотт и др. (1992) показали, что ген IDUA длиной примерно 19 кб содержит 14 экзонов. Первые два экзона разделены интроном длиной 566 п.н.; следующий интрон длиной приблизительно 13 кб, а последние 12 экзонов сгруппированы в кластер длиной 4,5 кб.

### Картирование

По гибридизации *in situ* и блот-анализу гибридов клеток мышь-человек, Скотт и др. (1990) установлено, что ген IDUA находится на коротком плече хромосомы 4p16.3, а не на хромосоме 22, как ранее сообщал Schuchman и др. (1982, 1984). Скотт и др. (1990) подтвердили активность гена IDUA человека в гибридных клетках человека и мыши с помощью моноклональных антител, специфичных к человеческому IDUA.

### Молекулярная генетика

Scott et al. (1990, Скотт и др. (1992), Бунге и др. (1995), Tieu и др. (1995) Бизли и др. (2001) проводили анализ мутаций в различных группах больных с МПС, выявленных Саузерн-блот гибридизацией, химическим расщеплением, а затем прямым ПЦР секвенированием, что позволило обнаружить мутацию с заменой одного основания, которая вводит стоп-кодон в положении 402 (W402X; 252800,0001) белка альфа-L-идуронидазы и связана с очень тяжелым клиническим фенотипом у гомозигот. Пациенты с компаундом гетерозиготных мутаций, имеющие один аллель, несущий мутацию W401X, имеют широкий спектр клинических проявлений болезни.

Скотт и др. (1992) определили две дополнительные мутации, одна, из которых вводит стоп-кодон в положении 70 (Q70X; 252800,0002), а другая приводит к замене пролина в положении 533 на аргинин (P533R; +252800,0003) в альфа-L-идуронидазе. Обе мутации связаны с очень тяжелым клиническим фенотипом у гомозигот. Пациенты гетерозиготные по обеим мутациям могут иметь широкий диапазон клинических фенотипов.

Tieu и др. (1995) сообщили о 4 новых мутациях гена IDUA у 1 пациента с синдромом Scheie и у 3 пациентов с синдромом Hurler / Scheie. Новые мутации имели однонуклеотидные замены R492P ({252800,00011}) (Scheie) и X654G (+252800,0013), P496L и L490P (252800,0012)(Hurler / Scheie). Мутация L490P была гомозиготной, тогда как каждая из других была в гетерозиготном компаунде с мутацией Hurler. Отсутствие ферментативной активности было подтверждено при трансфекции этих мутантных кДНК в клетки COS-1.

### **Популяционная генетика**

Частота синдрома Hurler оценивается 1 на 144274 живорожденных. Второй наиболее частой формой мукополисахаридоз был MPS IIIA (синдром Санфилиппо; 252900) с предполагаемой распространенностью рождения 1,16 на 100000

### **Генная терапия**

Так как аллогенная трансплантация костного мозга не доступна для всех пациентов, Фейрберн и др., (1996) считают возможным альтернативный подход, основанный на передаче и экспрессии нормального гена в аутологичном костном мозге. Они построили ретровирусный вектор, несущий полную длину кДНК альфа-L-идуронидазы, чтобы ввести ген в костный мозг, взятый у пациентов с этим расстройством. Они продемонстрировали успешную пересадку генов в стволовые CD34 + клетки и последующую экспрессию фермента в их зрелых дочерних клетках. Эффективность переноса генов, оцененная с помощью ПЦР-анализа, в колонии гемопоэтических клеток была от 25 до 56%. Фермент секретируется в среду и функциональная локализация его была продемонстрирована реверсией фенотипических эффектов накопления в лизосомах макрофагов.

### **Литература**

1. Keeling, K. M., Brooks, D. A., Hopwood, J. J., Li, P., et al. Gentamicin-mediated suppression of Hurler syndrome stop mutations restores a low level of alpha-L-iduronidase activity and reduces lysosomal glycosaminoglycan accumulation. *Hum. Molec. Genet.* 10: 291-299, 2001.
2. Gorlin, R. J., Cohen, M. M., Jr., Hennekam, R. C. M. *Syndromes of the Head and Neck.* New York: Oxford Univ. Press (pub.) (4th ed.) : 2001.
3. Neufeld, E. F., Muenzer, J. *The mucopolysaccharidoses.*In: Scriver, C. R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D. (eds.) : *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease.* Vol. III. (8th ed.) New York: McGraw-Hill 2001
4. Hanson, M., Lupski, J. R., Hicks, J., Metry, D. Association of dermal melanocytosis with lysosomal storage disease: clinical features and hypotheses regarding pathogenesis. *Arch. Derm.* 139: 916-920, 2003.
5. Kakkis, E. D., Muenzer, J., Tiller, G. E., et al. Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. *New Eng. J. Med.* 344: 182-188, 2001.



6. Wang, R. Y., Cambray-Forker, E. J., Ohanian, K., et al. Treatment reduces or stabilizes brain imaging abnormalities in patients with MPS I and II. *Molec. Genet. Metab.* 98: 406-411, 2009.
7. Nelson, J., Crowhurst, J., Carey, B., Greed, L. Incidence of the mucopolysaccharidoses in western Australia. *Am. J. Med. Genet.* 123A: 310-313, 2003.
8. Lin, H.-Y., Lin, S.-P., Chuang, C.-K., et al. Incidence of the mucopolysaccharidoses in Taiwan, 1984-2004. *Am. J. Med. Genet.* 149A: 960-964, 2009.

## 17.2. Синдром Хантера

Мукополисахаридоз, тип II; МПС2

309900 ICD +SNOMEDCT: 70737009 ICD10CM: E76.1

### Описание

Мукополисахаридоз II является редким сцепленным с X-хромосомой рецессивным заболеванием, вызванным дефицитом лизосомного фермента идуронатсульфатазы, что приводит к прогрессирующему накоплению гликозамингликанов (glycosaminoglycans) почти во всех типах клеток, тканей и органов. Пациенты с MPS II выделяют избыточное количество хондроитинсульфата В (дерматансульфат) и гепаритин (heparitin) сульфата (гепарансульфат) с мочой (McKusick, 1972 Wraith, др, 2008). Идуронат-сульфатазы (EC 3.1.6.13) участвует в деградации лизосомных гликозаминогликанов гепарансульфата и дерматансульфата (Bielicki др., 1990).

DiNatale и Ronsisvalle (1981) выделили 2 формы идуронатсульфатазы из человеческой плаценты и Bielicki и др. (1990) очистили 2 основные формы с молекулярной массой 42 кДа и 14 кДа из печени человека.

Couillin др. (1990) пришли к выводу, что ломкий X-сайт находится проксимально от IDS. Уилсон и др. (1991) использовали клон кДНК IDS для определения локуса гена на X хромосоме, Xq28, дистальнее ломкого X-сайта.

### Псевдоген

Bondeson др. (1995, 1995) определили второй ген IDS (обозначенный ими IDS2), расположенный в пределах 90 кб от теломерного конца гена IDS. Они показали, что эта область участвует в рекомбинации с первичным геном IDS примерно у 13% пациентов с синдромом Хантера.

### Клинические особенности

MPS II является мультисистемным расстройством. Клинические проявления включают тяжелую обструкцию дыхательных путей, деформации скелета, кардиомиопатию, и у большинства пациентов, снижение неврологического статуса. Смерть обычно наступает во второй десятилетии жизни, хотя некоторые пациенты с менее тяжелой формой заболевания могут дожить до 50-60-летнего возраста (Резюме на Wraith и др., 2008).

McKusick (1972) различает 2 клинически различимые формы MPS II: **тяжелая форма** (так называемый MPS МПС) с прогрессирующей умственной отсталостью и инвалидностью и смертью в возрасте до 15 лет, в большинстве случаев, и **легкая форма** (так называемый MPS ИВ, см ниже) совместима с выживанием в зрелом возрасте,

с сохранением репродуктивной функции (DiFerrante и Николс, 1972) и с минимальным нарушением интеллекта, если вообще он нарушается. McKusick (1972) отметил отсутствие помутнения роговицы при X-сцепленном виде MPS в отличие от аутосомной формы (см MPS II, 607014).

### **Популяционная генетика**

Schaar и Бах (1980) сообщили о частоте заболевания приблизительно у 1 из 34 000 мужчин, родившихся в Израиле в период между 1967 и 1975. В Соединенном Королевстве, Янг и Харпер (1982) оценили частоту синдрома Хантера, как примерно 1 : 132 000 новорожденных мальчиков. Тяжелая форма встречалась в 3,38 раза чаще, чем легкая форма. Лин и др. (2009) отметили более высокую частоту MPS II в Тайване в отличие от сообщений о более высокой распространенности МПС I в большинстве западных популяций.

### **Молекулярная генетика**

Уилсон и др. (1991) обнаружили, делеции или перестройки в гене у 7 из 23 пациентов с синдромом Хантера родом из Австралии и Британии. У 2 из 14 несвязанных родством немецких пациентов с МПС II структурное изменение гена IDS выявлено Саузерн-анализом с использованием клона кДНК IDS в качестве зонда.

Бунге и др. (1992) использовали анализ односпирального конформационного полиморфизма для изучения мутаций. Миссенс или нонсенс-мутации и делеции или инсерции небольшого числа пар оснований были обнаружены. Bondeson и др. (1995) определили псевдоген IDS, который они называли IDS2, расположенный на 90 кб теломернее гена IDS. Оказалось, что эта область участвует в рекомбинации с первичным геном IDS примерно у 13% пациентов с синдромом Хантера. IDS2 псевдоген содержит последовательности экзонов 2 и 3, а также интронов 2, 3 и 7 гена IDS.

Бирот и др. (1996) описали пациента с синдромом Хантера, у которого обмен между геном IDS и псевдогеном при межхромосомной рекомбинации, по всей видимости, является причиной внутренней делеции экзонов 4, 5, 6 и 7. В перестроенном гене, в месте стыка интрон содержал родственные последовательности интрона 3 псевдогена и интрона 7 гена.

### **Животная модель**

Вилкерсон др. (1998) описали воспроизведение синдрома Хантера у Лабрадора. Гарсия и др. (2007) отметили у самцов мышей сходство с человеческой формой болезни. Гистологические исследования показали диффузное расположение пенистых, вакуолизованных клеток в различных органах.

### **Литература**

1. Garcia, A. R., Pan, J., Lamsa, J. C., Muenzer, J. The characterization of a murine model of mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *J. Inherit. Metab. Dis.* 30: 924-934, 2007.
2. Lagerstedt, K., Carlberg, B.-M., Karimi-Nejad, R., Kleijer, W. J., Bondeson, M.-L. Analysis of a 43.6 kb deletion in a patient with Hunter syndrome (MPSII): identification of a fusion transcript including sequences from the gene W and the IDS gene. *Hum. Mutat.* 15: 324-331, 2000.
3. Lin, H.-Y., Lin, S.-P., Chuang, C.-K., Niu, D.-M., Chen, M.-R., Tsai, F.-J., Chao, M.-C., Chiu,

P.-C., Lin, S.-J., Tsai, L.-P., Hwu, W.-L., Lin, J.-L. Incidence of the mucopolysaccharidoses in Taiwan, 1984-2004. *Am. J. Med. Genet.* 149A: 960-964, 2009.

4. Muenzer, J., Beck, M., Eng, C. M., et al. Multidisciplinary management of Hunter syndrome. *Pediatrics* 124: e1228-e1239, 2009. Note: Electronic Article.

5. Wang, R. Y., Cambray-Forker, E. J., Ohanian, K., Karlin, D. S., Covault, K. K., Schwartz, P. H., Abdenur, J. E. Treatment reduces or stabilizes brain imaging abnormalities in patients with MPS I and II. *Molec. Genet. Metab.* 98: 406-411, 2009.

6. Young, I. D., Harper, P. S. Incidence of Hunter's syndrome. (Letter) *Hum. Genet.* 60: 391-392, 1982.

7. Bunge, S., Steglich, C., Beck, M., Rosenkranz, W., Schwinger, E., Hopwood, J. J., Gal, A. Mutation analysis of the iduronate-2-sulfatase gene in patients with mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). *Hum. Molec. Genet.* 1: 335-339, 1992.

8. Birot, A.-M., Bouton, O., Froissart, R., Maire, I., Bozon, D. IDS gene-pseudogene exchange responsible for an intragenic deletion in a Hunter patient. *Hum. Mutat.* 8: 44-50, 1996.

### 17.3. Синдром Санфилиппо (252900)

Мукополисахаридоз, ТИП IIIA; MPS3A

#### Описание

Синдром Санфилиппо или мукополисахаридоз III, является аутосомно-рецессивной лизосомальной болезнью накопления вследствие нарушения деградации гепарансульфата (Эспозито и др., 2000). Расстройство характеризуется тяжелой дегенерацией центральной нервной системы, но мягкой формой соматического заболевания. Начало появления клинических признаков обычно наблюдается в возрасте 2 -6 лет; тяжелая неврологическая дегенерация у большинства пациентов происходит в возрасте от 6 до 10 лет, а смерть наступает, как правило, на втором или третьем десятилетии жизни. Тип А (ван де Камп и др., 1981), наиболее тяжелая форма с ранним началом и быстрым прогрессированием симптомов и коротким сроком выживания. Частота заболеваемости при рождении приблизительно составляла 1 на 24 000.

**Генетическая гетерогенность** Мукополисахаридозов типа III (MPS III). MPS III включает четыре типа, каждый из которых возникает из-за дефицита разных ферментов: гепаран N-сульфатазы (тип А); альфа-N-ацетилглюкозаминидазы (acetylglucosaminidase) (тип В; 252920); ацетил-СоА:альфа-глюкозаминидацетилтрансферазы (тип С; 252930); и N-ацетилглюкозамин 6-сульфатазы (тип D; 252940).

#### Структура гена

Karageorgos и др. (1996) определили структуру гена SGSH (N-sulfoglucosamine sulfohydrolase), сульфамидазы и последовательность оснований на границе соединения экзонов с интронами и 5'-промоторной области. Ген содержит 8 экзонов, охватывающих примерно 11 кб.

#### Картирование

Karageorgos и др. (1996) выделили геномный клон, содержащий полный ген сульфамидазы (sulfamidase), из космидной библиотеки хромосомы 17. С помощью флу-

оресцентной *in situ* гибридизации, Скотт и др.(1995) картировали ген сульфамидазы (sulfamidase) в области 17q25, и 17q25.3, место наиболее вероятной локализации.

### **Молекулярная генетика**

Yogalingam и Hopwood (2001) сообщили о 62 мутациях в гене SGSH (N-sulfoglucosamine sulfohydrolase), которые являются причиной MPS IIIA, из них: 46 миссенс / нонсенс-мутации, 15 малых инсерций / делеций, и одна мутация сайта сплайсинга. Большинство мутаций идентифицированы в SGSH, и в NAGLU (alpha-N-acetylglucosaminidase) (609701) в MPS IIIB (252920) и связаны с тяжелыми клиническими фенотипами.

### **Генотип / Фенотип корреляция**

Valstar и др. (2010) ретроспективно проанализировали клинические особенности 92 пациентов с МПС IIIA, в том числе 32 живых и 60 умерших лиц. Была выявлена большая вариабельность фенотипов, которая коррелирует с генотипом. В частности, со значительно продолжительным сохранением психомоторных функций, те у кого был найден 1 или более S298P (605270,0013) мутантных аллелей имели мягкий фенотип и длительную выживаемость. Наиболее часто встречались патогенные мутации R245H (605270,0001), Q380R, S66W (605270,0003), и 1080delC, все были связаны с классическим тяжелым фенотипом.

### **Животная модель**

Фишер и др. (1998) определили дефицит сульфамидаз (sulfamidase) у 2 взрослых жесткошерстный такс одного помета. Клинические и патологические особенности соответствовали расстройствам у человека. У собак отмечено прогрессирование неврологического заболевания без видимых соматических нарушений. Наблюдалась атаксия тазового пояса и задних конечностей у собак в возрасте 3 лет, которая постепенно прогрессировала в течение 1 года до 2 лет до тяжелой генерализованной спиноцеребеллярной атаксии. Способности мышления оставались нормальными на протяжении всей болезни. Позитивный тест пятна мочи с толуидиновым голубым указывает на болезнь накопления мукополисахаридов у обеих собак; Диагноз MPS IIIA был подтвержден анализом экскреции и накопления в тканях гепарансульфата и по снижению активности сульфамидазы в фибробластах и печеночной ткани. Чтобы определить молекулярный дефект типа синдрома Санфилиппо, Фишер и др. (1998), Аронович др.(2000) определили нормальную нуклеотидную последовательность собачьего гена гепарансульфат сульфамидазы и кДНК, используя подходы, основанные на ПЦР. Кодирующая область на 89% оказалась гомологичной аминокислотной последовательности HSS человека. Все последовательности на границе экзон-интроновых сочленений были консервативны. Авторы определили делецию трех пар нуклетидов 737-739delCCA, которая приводит к потере треонина в положении 246 в аллелях больного животного. Та же мутация была найдена в 1 аллеле у здорового щенка из этого помета. Собачьи модели могут быть полезными при оценке генной терапии этого расстройства. Bhattacharyya и др. (2001) описал мышь со спонтанно возникшим синдромом MPS IIIA в результате гомозиготной asp31asn (D31N) мутации в мышинном гене сульфатазы. Пострадавшая мышь погибла

в возрасте около 10-месяцев, у нее был растянутый мочевой пузырь и гепатоспленомегалия. Срезы мозга показывают расширенные лизосомы, некоторые с типичной морфологией тела с исчерченностью зебры, и многие содержали периодически накапливающийся кислотно-Шифф-положительный материал. Анализ мочи показал накопление гепарансульфата. Анализы различных лизосомальных гидролаз в мозге, экстракты печени и почек обнаружили конкретный дефект сульфамидазной (sulfamidase) активности, которая была снижена на 97%.

Hassiotis и др. (2014) изучали развитие патологии мозжечка у собак на модели MPS3A (Huntaway модели собака) и заметили, что клетки Пуркинье присутствуют у пострадавших собак до 30,9 месяцев включительно; Однако, в 40,9 месяцев остается только около 12% клеток, что совпадает с началом клинических признаков. Начальное и среднее накопление субстрата и воспаление были обнаружены еще в 2,2 месяцев, и аксональные сфероиды наблюдались с 4,3 месяцев в глубоких ядрах мозжечка и позже (11,6 месяцев) в белом веществе трактов мозжечка. Дегенерация нейронов и апоптотические клетки не были обнаружены в любой момент исследования. Hassiotis др. (2014) предположили, что клеточные автономные механизмы могут способствовать гибели клеток Пуркинье у собак с MPS3A.

#### Литература

1. Karageorgos, L. E., Guo, X.-H., Blanch, L., Weber, B., Anson, D. S., Scott, H. S., Hopwood, J. J. Structure and sequence of the human sulphamidase gene. *DNA Res.* 3: 269-271, 1996.
2. Scott, H. S., Blanch, L., Guo, X.-H., Freeman, C., Orsborn, A., Baker, E., Sutherland, G. R., Morris, C. P., Hopwood, J. J. Cloning of the sulphamidase gene and identification of mutations in Sanfilippo A syndrome. *Nature Genet.* 11: 465-467, 1995.
3. Yogalingam, G., Hopwood, J. J. Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type IIIA and IIIB: diagnostic, clinical, and biological implications. *Hum. Mutat.* 18: 264-281, 2001.
4. Valstar, M. J., Neijls, S., Bruggenwirth, H. T., Olmer, R., Ruijter, G. J. G., Wevers, R. A., van Diggelen, O. P., Poorthuis, B. J., Halley, D. J., Wijburg, F. A. Mucopolysaccharidosis type IIIA: clinical spectrum and genotype-phenotype correlations. *Ann. Neurol.* 68: 876-887, 2010.
5. Gabrielli, O., Coppa, G. V., Bruni, S., Villani, G. R. D., Pontarelli, G., Di Natale, P. An adult Sanfilippo type A patient with homozygous mutation R206P in the sulfamidase gene. *Am. J. Med. Genet.* 133A: 85-89, 2005.
6. Hassiotis, S., Jolly, R. D., Hemsley, K. M. Development of cerebellar pathology in the canine model of mucopolysaccharidosis type IIIA (MPS IIIA). *Molec. Genet. Metab.* 113: 283-293, 2014.
7. Hemsley, K. M., Hopwood, J. J. Development of motor deficits in a murine model of mucopolysaccharidosis type IIIA (MPS-III A). *Behav. Brain Res.* 158: 191-199, 2005.
8. Fischer, A., Carmichael, K. P., Munnell, J. F., Jhabvala, P., Thompson, J. N., Matalon, R., Jezyk, P. F., Wang, P., Giger, U. Sulfamidase deficiency in a family of dachshunds: a canine model of mucopolysaccharidosis IIIA (Sanfilippo A). *Pediatr. Res.* 44: 74-82, 1998.
9. Aronovich, E. L., Carmichael, K. P., Morizono, H., Koutlas, I. G., Deanching, M., Hoganson, G., Fischer, A., Whitley, C. B. Canine heparan sulfate sulfamidase and the molecular pathology underlying Sanfilippo syndrome type A in Dachshunds. *Genomics* 68: 80-84, 2000
10. Bhattacharyya, R., Gliddon, B., Beccari, T., Hopwood, J. J., Stanley, P. A novel missense mutation in lysosomal sulfamidase is the basis of MPS III A in a spontaneous mouse mutant. *Glycobiology* 11: 99-103, 2001

## 17.4. Мукополисахаридоз, тип IVA; MPS4A (# 253000ICD +)

*Альтернативные названия; символы* синдром MORQUIO

Мукополисахаридоз типа IVA является аутосомно-рецессивным заболеванием лизосомного накопления, с внутриклеточным накоплением кератансульфата и хондроитин-6-сульфата. Основные клинические признаки включают: низкий рост, скелетную дисплазию, зубные аномалии и помутнение роговицы. Интеллект в норме и нет прямого вовлечения центральной нервной системы, хотя скелетные изменения могут привести к неврологическим осложнениям. Ген кодирует GALNS N-ацетилгалактозамин-сульфат-сульфатазу (ЕС 3.1.6.4), лизосомный фермент, участвующий в катаболизме кератан- и хондроитин-сульфата.

### **Картирование**

Томацу и др. (1992) показали, что ген GALNS расположен на хромосоме 16q24 с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации. Бейкер и др. (1993) также с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации картировали ген в локусе 16q24.3. Авторы также подтвердили локализацию гена в этой полосе с помощью ПЦР анализа, используя панель гибридных соматических клеток для высокоточного картирования хромосомы 16.

### **Биохимические особенности**

Matalon и др. (1974) пришли к выводу, что при болезни Morquio наблюдается недостаточность 6-сульфатазы, которая вовлекается в катализ кератансульфата и хондроитинсульфата.

**Пренатальная диагностика.** Бек и др. (1992) был поставлен диагноз MPS IVA у плода на 23 неделе беременности. Ранее родился больной ребенок. УЗИ показало умеренный асцит, и кератансульфат был найден в амниотической жидкости. Диагноз был подтвержден после прерывания беременности

### **Молекулярная генетика**

Томацу и др. (2005) приведены сведения о 148 уникальных мутациях в гене GALNS, в том числе 26 новых мутаций. Гетерогенность GALNS мутаций объясняет широкую клиническую вариабельность MPS IVA. Из проанализированных мутантных аллелей, миссенс мутации составила 78,4%; небольшие делеции, 9,2%; нонсенс-мутации, 5,0%; крупные делеции, 2,4%; и вставки, 1.6%. На транзиции CpG динуклеотидов приходилось 26,4% от всех описанных мутаций. На три миссенс мутации приходится более 5% всех мутаций: R386C (612222,0003), G301C (612222,0010), и I113F (+612222,0005).

### **Животная модель**

Томацу и др. (2008) обнаружили, что еженедельное лечение мышей с MPS IVA в течение 12 недель с заменой фермента натуральным GALNS или SUMF1 модифицированным GALNS привело к клиническому улучшению с заметным сокращением накопления в висцеральных органах, костном мозге, сердечных клапанах, связках, и соединительной ткани. Фармакокинетика и биораспределение были оценены и оказались близкими для 2 использованных GALNS ферментов. Дозозависимый клиранс накопления субстрата наблюдался в мозге, и содержание кератинсульфата в крови было сни-

жено почти до нормальных уровней. Это исследование предоставило доказательства концепции фермент-заместительной терапии при MPS IVA.

Томацу и др. (2008) отметили, отсутствие улучшения в костной патологии у MPS IVA мышей, получавших долгосрочную фермент-заместительную терапию (ERT). Раннее лечение с рождения приводит к частичной ремиссии костной патологии у мышей с MPS4A. Томацу и др. (2015) вводили рекомбинантные ферменты новорожденным мышам: первую инъекцию вводили внутривенно, со второй по четвертую еженедельную инъекцию делали внутривенно, а остальные инъекции с пятой по четырнадцатую недели вводили внутривенно в хвостовую вену. Мыши с MPS4A, получавшие GALNS показали клиренс накопления в лизосомах печени, селезенки и синусах клеток костного мозга. Структура колонок пластинок роста была лучше организована, чем у взрослых мышей, получавших ERT; Однако, гиалиновые и фиброзные клетки хрящей бедренной кости, позвоночника, связок, дисков, синовиальной оболочки, и надкостницы еще накапливали до некоторой степени субстрат. Сердечные клапаны не поддавались лечению. Уровни кератансульфата в сыворотке были в норме у новорожденных ERT-мышей. Томацу и др. (2015) пришли к выводу, что фермент, который входит в хрящ до зрелого хрящевого слоя клеток, предотвращает дезорганизацию структуры колонок. Раннее лечение с рождения приводит к частичной ремиссии костной патологии у мышей с MPS4A.

### Литература

1. Tomatsu, S., Fukuda, S., Masue, M., Sukegawa, K., Masuno, M., Orii, T. Mucopolysaccharidosis type IVA: characterization and chromosomal localization of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase gene and genetic heterogeneity. (Abstract) *Am. J. Hum. Genet.* 51 (suppl.): A178, 1992.
2. Baker, E., Guo, X.-H., Orsborn, A. M., Sutherland, G. R., Callen, D. F., Hopwood, J. J., Morris, C. P. The Morquio A syndrome (mucopolysaccharidosis IVA) gene maps to 16q24.3. *Am. J. Hum. Genet.* 52: 96-98, 1993.
- Matalon, R., Arbogast, B., Dorfman, A. Morquio's syndrome: a deficiency of chondroitin sulfate N-acetylhexosamine sulfate sulfatase. (Abstract) *Pediat. Res.* 8: 436, 1974
- Beck, M., Braun, S., Coerdт, W., Merz, E., Young, E., Sewell, A. C. Fetal presentation of Morquio disease type A. *Prenatal Diag.* 12: 1019-1029, 1992
- Tomatsu, S., Montano, A. M., Nishioka, T., Gutierrez, M. A., Pena, O. M., Trandafirescu, G. G., Lopez, P., Yamaguchi, S., Noguchi, A., Orii, T. Mutation and polymorphism spectrum of the GALNS gene in mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A). *Hum. Mutat.* 26: 500-512, 2005.
- Tomatsu, S., Montano, A. M., Ohashi, A., Gutierrez, M. A., Oikawa, H., Oguma, T., Dung, V. C., Nishioka, T., Orii, T., Sly, W. S. Enzyme replacement therapy in a murine model of Morquio A syndrome. *Hum. Molec. Genet.* 17: 815-824, 2008.
- Tomatsu, S., Montano, A. M., Oikawa, H., Dung, V. C., Hashimoto, A., Oguma, T., Gutierrez, M. L., Takahashi, T., Shimada, T., Orii, T., Sly, W. S. Enzyme replacement therapy in newborn mucopolysaccharidosis IVA mice: early treatment rescues bone lesions? *Molec. Genet. Metab.* 114: 195-202, 2015.

## 17.5. Мукополисахаридоз VI типа (MPS VI типа; Синдром Марото-Лами)

### Мукополисахаридоз VI В типа

Мукополисахаридоз VI В типа (MPS VI; синдром Марото-Лами; MIM 253200) впервые описали в 1963 году (Maroteaux P., 1963; Maroteaux P., 1965). При этом заболевании больные карликового роста с выраженными костными изменениями и помутнением роговицы, но интеллект существенно не изменен (DiFerrante N.M., 1974; Goldberg M.F., 1970; Paterson D.E., 1982).

Мукополисахаридоз VI типа В обусловлен мутационными поражениями гена N-ацетилгалактозаминсульфатазы В (арилсульфатазы В; Litjens T., 2001).

Арилсульфатаза В (ARSB); EC 3.1.6.1) осуществляет гидролиз сульфатной группы N-ацетилгалактозамин-4-сульфата дерматансульфата и хондроитин-4-сульфата (Matalon R., 1974; O'Brien J.S., 1974; Fluharty A.L., 1975; Neufeld E.F., 1989). Дефицит лизосомальной сульфатазы – арилсульфатазы В – обуславливает внутрилизосомальное накопление и уринальную секрецию больших количеств частично деградированных гликозамингликанов – дерматансульфата и хондроитин-4-сульфата (Barton R.W., 1972; Black S.H., 1986; Brooks D.A., 1990).

Тип наследования – аутосомно-рецессивный.

Ген N-ацетилгалактозаминсульфатазы В (ген арилсульфатазы В, ARS В)

Gene: [05q133/ARSB] arylsulfatase В

### I. Арилсульфатаза В

Ген N-ацетилгалактозаминсульфатазы (арилсульфатазы В) локализуется на 5 хромосоме человека в позиции q11-q13 (Fidzianska E., 1984).

Клонировали полноразмерную кДНК N-ацетилгалактозаминсульфатазы (арилсульфатазы В) в 1990 году (Peters C., 1990; Schuchman E.H., 1990; Litjens T., 1991). Ген арилсульфатазы В содержит 8 экзонов и 7 интронов (Modaressi S., 1993).

Арилсульфатаза В синтезируется и секретируется в форме пропептида из 533 аминокислотных остатков с молекулярным весом 64 kDa, который впоследствии процессируется, образуя зрелый белок из 492 аминокислот с молекулярным весом 47 kDa.

### II. Арилсульфатаза А

Ген арилсульфатазы А локализован на хромосоме 22. Три мутации описаны в аллеле I этого гена: две из них, расположенные в кодирующей части, приводят к замене Тур-193->Ser, а третья нарушает донорный сайт сплайсинга на границе экзона 2. Дефицит арилсульфатазы А приводит к метахроматической лейкоцистозии; заболевание наследуется по аутосомно-рецессивному типу.

### Ген N-ацетилгалактозаминсульфатазы В (арилсульфатазы В): мутации

Первая мутация в гене N-ацетилгалактозаминсульфатазы В (арилсульфатазы В) была выявлена в 1991 году Wicker G. (Wicker G., 1991). Полный реестр идентифицированных мутаций в гене арилсульфатазы В (ARSB), обуславливающих мукополисахаридоз



VI В типа (MPS VI; синдром Марото-Лами) представлен в Таблице MPS VI m. <http://medbiol.ru/medbiol/carbo-dis/00032>

### Литература

1. Maroteaux P., Leveque B., Marie J., Lamy M. Une nouvelle dysostose avec elimination urinaire de chondroitine-sulfate B. – *Presse Med.*, 1963, v. 71, p. 1849-1852.
2. Maroteaux P., Lamy M. Hurler's disease, Morquio's disease, and related mucopolysaccharidoses. – *J. Pediat.*, 1965, v. 67, p. 312-323.
3. DiFerrante N.M., Hyman B.H., Kish W., Donnelly P.V., Nichols B.L., Dutton R.V. Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy disease) clinical and biochemical study of a mild variant case. – *Johns Hopkins Med.J.*, 1974, v. 135, p. 42-53.
4. Goldberg M.F., Scott C.I., McKusick V.A. Hydrocephalus and papilledema in the Maroteaux-Lamy syndrome (mucopolysaccharidosis type VI). – *Am.J.Ophthalm.*, 1970, v. 69, p. 969-975.
5. Paterson D.E., Rad M., Harper G., Weston H.J., Mattingley J. Maroteaux-Lamy syndrome, mild form-MPS VIb. – *Brit.J.Radiol.*, 1982, v. 55, p. 805-812.
6. Litjens T., Hopwood J.J. Mucopolysaccharidosis type VI: structure and clinical implications of mutations in N-acetylgalactosamine-4-sulfatase. – *Hum.Mut.*, 2001, v. 18, p. 282-295.
7. Matalon R., Dorfman A. Sanfilippo A syndrome. Sulfamidase deficiency in cultured skin fibroblasts and liver. – *J.Clin.Invest.*, 1974, v. 54, p. 907-912.
8. O'Brien J.S., Cantz M., Spranger J. Maroteaux-Lamy disease (mucopolysaccharidosis VI), sybtype A: deficiency of a N-acetylgalactosamine-4-sulfatase. – *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 1974, v. 60, p. 1170-1177.
9. Fluharty A.L., Stevens R.L., Fung D., Peak S., Kihara H. Uridine diphospho-N-acetylgalactosamine-4-sulfate sulfohydrolase activity of human arylsulfatase b and its deficiency in the Maroteaux-Lamy syndrome. – *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 1975, v. 64, p. 955-962.
10. Neufeld E.F., Muenzer J. The mucopolysaccharidoses. The Metabolic Basis of Inherited Disease. Ed. – *Scriver C.R., Beadet A.L., Sly W. S., Valle D.*, 1989, p. 1565-1588.
11. Barton R.W., Neufeld E.F. A distinct biochemical deficit in the Maroteaux-Lamy syndrome (mucopolysaccharidosis VI). – *J.Pediat.*, 1972, v. 80, p. 114-116.
12. Black S.H., Pelias M.Z., Miller J.B., Blitzer M.G., Shapira E. Maroteaux-Lamy syndrome in a large consanguineous kindred: biochemical and immunological studies. – *Am.J.Med.Genet.*, 1986, v. 25, p. 273-279.
13. Brooks D.A., McCourt P.A.G., Gibson G.J., Hopwood J.J. Immunoquantification of the low abundance lysosomal enzyme N-acetylgalactosamine 4-sulphatase. – *J.Inherit.Metab.Dis.*, 1990, v. 13, p. 108-120.
14. Fidzińska E., Abramowicz T., Czartoryska B., Glogowska I., Gorska D., Rodo M. Assignment of the gene for human arylsulfatase B, ARSB, to chromosome region 5p11-5qter. – *Cytogenet.Cell Genet.*, 1984, v. 38, p. 150-151.
15. Peters C., Schmidt B., Rommerskirch W., Rupp K., Zuhlsdorf M., Vingron M., Meyer H.E., Pohlmann R., von Figura K. Phylogenetic conservation of arylsulfatases: cDNA cloning and expression of human arylsulfatase B. – *J.Biol.Chem.*, 1990, v. 265, p. 3374-3381.
16. Schuchman E.H., Jackson C.E., Desnick R.J. Human arylsulfatase B: MOPAC cloning, nucleotide sequence of a full-length cDNA and regions of amino acid identity with arylsulfatase A and C // *Genomics*. – 1990. – Vol.6. – P. 149-158.
17. Litjens T., Morris C.P., Gibson G.J., Beckmann K.R., Hopwood J.J. Human N-acetylgalactosamine-4-sulfatase. Protein maturation and isolation of genomic clones. – *Biochem. Int.*, 1991, v. 24, p. 209-215.

18. Modaressi S., Rupp K., von Figura K., Peters C. Structure of the human arylsulfatase B. – *Biol.Chem. Hoppe Seyler*, 1993, v. 374, p. 327-335.

19. Wicker G., Prill V., Brooks D., Gibson G., Hopwood J., von Figura K., Peters C. Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome): an intermediate clinical phenotype caused by substitution of valine for glycine at position 137 of arylsulfatase B. – *J.Biol.Chem.*, 1991, v. 266, p. 21386-21391.

## 17.6. Мукополисахаридоз VII типа (Синдром Слая, MPS VII)

### Мукополисахаридоз VII типа: общие сведения

Мукополисахаридоз VII типа (синдром Слая; MIM 253220) впервые был описан в 1973 году (Sly W.S., 1973). Мукополисахаридоз VII типа (MPS7) вызывается гомозиготной или гетерозиготными мутациями в гене, кодирующем бета-глюкуронидазу, (GUSB; 611499) локализованом на хромосоме 7q11. Мукополисахаридоз VII типа является ауто-сомно-рецессивным заболеванием лизосомального накопления гликозаминогликанов, содержащих глюкуроновую кислоту, связанное с дефицитом бета-глюкуронидазы. Фенотип сильно варьирует, начиная от тяжелой смертельной водянки у плода, до мягких форм с выживанием в зрелом возрасте. У большинства пациентов с промежуточным фенотипом наблюдают гепатомегалию, скелетные аномалии, грубые черты лица и различную степень умственной отсталости ((Shibley et al., 1993). MPS VII типа были первыми аутосомными мукополисахаридозами, для которых была установлена хромосомная принадлежность.

Мукополисахаридоз VII типа обусловлен мутационными поражениями гена бета-D-глюкуронидазы (GUSB; EC 3.2.1.31; Beaudet A.L., 1974; Bell C.E., 1977; Gehler J., 1974; Sly W.S., 1973; Sly W.S., 1974). Лизосомный фермент бета-D-глюкуронидаза осуществляет гидролиз глюкуроновой кислоты при катаболизме гликозамингликанов – дерматансульфата и гепарансульфата. Бета-D-глюкуронидаза – тетрамерный гликопротеин, состоящий из 4 идентичных субъединиц (Paigen K., 1989). Субъединица представляет собой пептид из 651 аминокислотного остатка с молекулярным весом 75 kDa. Дефицит бета-D-глюкуронидазы приводит к аккумуляции недеградированных или частично деградированных гликозамингликанов (дерматансульфата и гепарансульфата) в лизосомах различных органов.

Ген бета-D-глюкуронидазы человека (GUSB) локализован на 7 хромосоме в позиции q21.11 (Schwartz C.E., 1991).

Полноразмерная кДНК бета-D-глюкуронидазы (GUSB) человека клонирована и секвенирована в 1987 году (Oshima A., 1987; Guise K.S., 1985). 5' фланкирующая область GUSB размером в 4,2 kb просеквенирована в 1991 (Shibley J.M., 1991). Ген бета-D-глюкуронидазы человека размером около 21 kb состоит из 11 интронов и 12 экзонов (Miller R.D., 1990). Размер экзонов колеблется от 85 до 376 нуклеотидов, размер интронов варьирует от 210 до 3290 пар нуклеотидов.

Несколько непроцессируемых псевдогенов бета-глюкуронидазы человека были выявлены на 5, 6, 7, 20, 22 и Y-хромосомах (Shibley J.M., 1993).

## MPS VII. Мутации гена GUSB

Первая мутация в гене бета-D-глюкуронидазы человека (GUSB) была выявлена в 1990 году (Tomatsu S., 1990). Полный перечень идентифицированных мутаций в GUSB-гене представлен в <http://medbiol.ru/medbiol/carbo-dis/00038ed0.htm> Таблице MPS VII m.

### Литература

1. Sly W.S., Quinton B.A., McAlister W.H., Rimoin D.L. Beta-glucuronidase deficiency: report of clinical, radiologic and biochemical features of a new mucopolysaccharidosis. – *J.Pediat.*, 1973, v. 82, p. 249-257.
2. Beaudet A.L., DiFerrante N.M., Ferry G.D., Nichols B.L. Beta-glucuronidase deficiency (mucopolysaccharidosis type VII). In: Bergsma D. – *Skeletal Dysplasias*. Amsterdam, Excerpta Medica (pub.), 1974, p. 246-250.
3. Gehler J., Cantz M., Tolksdorf M., Spranger J.W. Mucopolysaccharidosis VII: beta-glucuronidase deficiency. – *Humangenetik*, 1974, v. 23, p. 149-158.
4. Shipley J.M., Miller R.D., Wu B.M., Grubb J.H., Christensen S.G., Kyle J.W., Sly W.S. Analysis of the 5' flanking region of the human beta-glucuronidase gene. – *Genomics*, 1991, v. 10, p. 1009-1018.
5. Sly W.S., Brot F.E., Glaser J.H., Stahl P.D., Quinton B.A., Rimoin D.L., McAlister W.H. Beta-glucuronidase deficiency mucopolysaccharidosis. In: Bergsma D. *Skeletal Dysplasias*. Amsterdam, Excerpta Medica (pub.) 1974, p. 239-245.
6. Bell C.E., Sly W.S., Brot F.E. Human beta-glucuronidase deficiency mucopolysaccharidosis: identification of cross-reactive antigen in cultured fibroblasts of deficient patients by enzyme immunoassay. – *J.Clin.Invest.*, 1977, v. 59, p. 97-105.
7. Paigen K. Mammalian beta-glucuronidase: Genetics, molecular biology and cell biology. – *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.*, 1989, v. 37, p. 155-205.
8. Schwartz C.E., Stanislovitis P., Phelan M.C., Klinger K., Taylor H.A., Stevenson R.E. Deletion mapping of plasminogen activator inhibitor, type I (PLANH1) and beta-glucuronidase (GUSB) in 7q21-q22. – *Cytogenet. Cell Genet.*, 1991, v. 51, p. 152-153.
9. Oshima A., Kyle J.W., Miller R.D., Hoffmann J.W., Powell P.P., Grubb J.H., Sly W.S., Tropak M., Guise K.S., Gravel R.A. Cloning, sequencing, and expression of cDNA for human beta-glucuronidase. – *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 1987, v. 84, p. 685-689.
10. Guise K.S., Korneluk R.G., Wayne J., Lamhonwah A.M., Quan F., Palmer R., Ganschow R.E., Sly W.S., Gravel R.A. Isolation and expression in *Escherichia coli* of a cDNA clone encoding human beta-glucuronidase. – *Gene*, 1985, v. 34, p. 105-110.
11. Miller R.D., Hoffmann J.W., Powell P.P., Kyle J.W., Shipley J.M., Bachinsky D.R., Sly W.S. Cloning and characterization of the human beta- glucuronidase gene. – *Genomics*, 1990, v. 7, p. 280-283.
12. Shipley J.M., Klinkenberg M., Wu B.M., Bachinsky D.R., Grubb J.H., Sly W.S. Mutational analysis of a patient with mucopolysaccharidosis type VII, and identification of pseudogenes. – *Am.J.Hum.Genet.*, 1993, v. 52, p. 517-526.

## 17.7. Аспартилгликозаминурия (AGU)

### Аспартилгликозаминурия: общие сведения

Аспартилгликозаминурия (AGU, MIM 208400) обусловлена мутационными пора-

жениями гена аспартилгликозаминидазы (AGA, Saarela J.,2001). Дефицит аспартилгликозаминидазы сопровождается внутрилизосомным накоплением неполностью катаболизируемых продуктов (главным образом аспартилгликозамина) в разных органах, и особенно в головном мозге (Sandhoff K.,1989; Pollitt R.J.,1968; Pollitt R.J.,1974; Aronson N.N.,1989). Часть катаболитов выводится с мочой.

Клиническими проявлениями аспартилгликозаминурии являются умственная отсталость, психомоторное отставание в развитии, поражение соединительной ткани.

Заболевание наследуется по аутосомно-рецессивному типу.

Аспартилгликозаминидаза (aspartylglucosaminidase, AGA, EC 3.5.1.26) – лизосомная гидролаза, катализирующая последнюю реакцию в распаде гликопротеинов, – осуществляет гидролиз между N-ацетилгликозамином и аспарагином (Pollitt R.J.,1968; Pollitt R.J.,1974; Aronson N.N.,1989).

Нативная аспартилгликозаминидаза представляет собой 88-kD гликопротеин гетеротетрамерной структуры, состоящий из двух 25 kD тяжелых цепей и двух 19 kD легких цепей.

Трехмерная структура аспартилгликозаминидазы человека была построена в 1995-1996 годах (Oinonen C.,1995; Tikanen R.,1996).

**Ген аспартилгликозаминидазы (AGA)** локализуется на 4 хромосоме в позиции q32-33 (Morris C.,1992).

В 1990-1991 годах были клонированы кДНК и ген аспартилгликозаминидазы человека (Fisher K.J.,1990; Park H.,1991; Ikonen E.,1991a).

кДНК человека (в состав которой входят кодирующая область из 1041 пар оснований, 5' нетранслируемая область (UTR) из 274, 3' UTR из 939 пар оснований, предшествующая поли-А концу) кодирует полипептид из 346 аминокислот, включая сигнальный пептид из 23 аминокислот. Пропептид с молекулярным весом 42 kDa в результате посттрансляционной модификации формирует две субъединицы: альфа-субъединицу с молекулярным весом 24 kDa и бета субъединицу с молекулярным весом 17 kDa.

Ген аспартилгликозаминидазы (AGA) по протяженности составляет около 13 kb и содержит 9 экзонов и 8 интронов. В составе промоторной области гена две «CAAT-box» и «TATA-box»-подобные последовательности с двумя AP-2 связывающими сайтами и одним SP-1 сайтом, а также «100 bp CpG island» участки и несколько EFT-связывающих сайта («CCCC» или «GGGG»). AP-2 и SP-1 связывающие сайты локализируются в первом интроне. Первый экзон содержит нетранслируемую область и кодирует первые 42 аминокислоты пептида, включая 23 аминокислоты сигнального пептида. Последний девятый экзон кодирует концевые 33 аминокислоты пептида и содержит 3'нетранслируемую область (939 нуклеотидов), включая три поли-А сигнала в положениях 1152, 1164, 1950.

### **AGA Ген: мутации**

Идентифицированные миссенс-, нонсенс-, слайсинговые мутации, делеции, инсерции и делеции+инсерции в гене аспартилгликозаминидазы представлены на <http://medbiol.ru/medbiol/carbo-dis/00002df5.htm>, в Таблице AGA m.

**Литература**

1. Saarela J., Laine M., Oinonen C., von Schantz C., Jalanko A., Rouvinen J., Peltonen L. Molecular pathogenesis of a disease: structural consequences of aspartylglucosaminuria mutations. – Hum.Mol.Genet., 2001, v. 10, p. 983-995.
2. Sandhoff K., Conzelmann E., Neufeld E.F., Kaback M.M., Suzuki K. The G m3 gangliosidoses. – The metabolic basis of inherited disease. Ed. Scriver C.R., Beauder A.C., Sly W.S., Valle D. 1989, p. 1807-1839.
3. Pollitt R.J., Jenner F.A., Merskey H. Aspartylglucosaminuria. An inborn error of metabolism associated with mental defect. – Lancet., 1968, v. 2, p. 253-255.
4. Pollitt R.J., Pretty K.M. The glycoasparagines in urine in a patient with aspartylglucosaminuria. – Biochem.J., 1974, v. 141, p. 141-146.
5. Aronson N.N., Kuranda J.K. Lysosomal degradation of Asn-linked glycoproteins. – FASEB J., 1989, v. 3, p. 2615-2622.
6. Oinonen C., Tikkanen R., Rouvinen J., Peltonen L. Three- dimensional structure of human lysosomal aspartylglucosaminidase. – Nature Struct.Biol., 1995, v. 2, p. 1102-1108.
7. Morris C., Heisterkamp N., Groffen J., Williams J.C., Manonen T. Chromosomal localization of the human glycoasparaginase gene to 4q32-q33. – Hum.Genet., 1992, v. 88, p. 295-297.
8. Fisher K.J., Tollersrud O.K., Aronson N.N. Cloning and sequencing analysis of a cDNA for human glycosylasparaginase: a single gene encodes the subunits of this lysosomal amidase. – FEBS Lett., 1990, v. 269, p. 440-444.
9. Park H., Fisher K.J., Aronson N.M. Genomic structure of human lysosomal glycosylasparaginase. – FEBS Lett., 1991, v. 288, p. 168-172.
10. Ikonen E., Baumann M., Gron K., Syvanen A.C., Enomaa N., Halila R., Aula P., Peltonen L. Aspartylglucosaminuria: cDNA encoding human aspartylglucosaminidase and the missense mutations causing the disease. – EMBO J., 1991, v. 10, p. 51-58.

**17.8. I-клеточная болезнь****Протеогликаны**

Все глюкозаминогликаны (ГАГ) GAG кроме гиалурона, ковалентно связаны с белком. Такие соединения называются протеогликанами, см рисунок 17.2 (Рисунок12-56 <http://medbiol.ru/medbiol/cytology/0019bc7b.htm>).



**Рисунок 17.2.** (Рисунок12-56) Протеогликан: связь серцевинного белка с олигосахаридом. (<http://medbiol.ru/medbiol/cytology/0019bc7b.htm>)

Они состоят из т.н. белка-сердцевины (core protein) весом около 40 кДа, к которому присоединены одна или несколько глюкозаминогликановых (ГАГ) цепочек. Существует множество различных ГАГ, но – все это крупные (до 50 – 60 кДа) отрицательно заряженные полисахаридные цепочки, состоящие из повторяющихся дисахаридных единиц (рисунок 17.3)

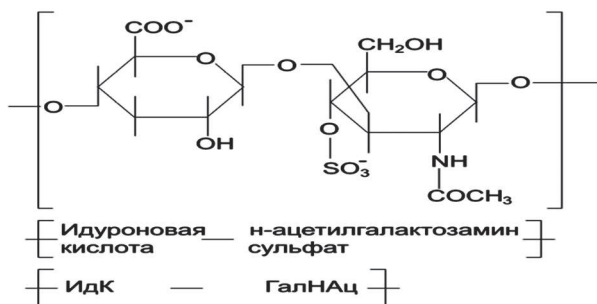


Рисунок 17.3. (Рис bss. 15.13) Повторяющиеся единицы дерматан сульфата (глюкозаминогликана) – <http://medbiol.ru/medbiol/ssb/000fb9ab.htm>

### І-клеточная болезнь

І-клеточная болезнь – это особая форма болезней накопления, обусловленная нарушением обмена гликозамингликанов. Это название заболевание получило в связи с выявлением в биоптатах больных характерных включений (І – от англ. «inclusion» – включение). Лизосомы с избыточной концентрацией нерасщепленных продуктов придают клеткам своеобразный «раздутый» вид. Возникновение клинических проявлений обусловлено мутацией в гене фермента, обеспечивающего присоединение маннозо-6-фосфатной группировки к лизосомным гидролазам для их транспорта. Показано, что именно эта маркерная группировка, находящаяся в составе фермента, узнается рецептором мембран лизосом. Отсутствие этой группировки приводит к увеличению концентрации лизосомных ферментов в жидких средах организма и ее снижению в тканях. Клиническая картина этого варианта болезней накопления сходна с МПС І-го типа.

### Литература

1. McKusick, V. A. Heritable Disorders of Connective Tissue. St. Louis: C. V. Mosby Co. (pub.) (4th ed.): 1972.
2. Beesley, C. E., Meaney, C. A., Greenland, G., et al. Mutational analysis of 85 mucopolysaccharidosis type I families: frequency of known mutations, identification of 17 novel mutations and in vitro expression of missense mutations. Hum. Genet. 109: 503-511, 2001.
3. Scott, H. S., Ashton, L. J., Eyre, H. J., et al. Chromosomal localization of the human alpha-L-iduronidase gene (IDUA) to 4p16.3. Am. J. Hum. Genet. 47: 802-807, 1990.
4. Scott, H. S., Guo, X.-H., Hopwood, J. J., Morris, C. P. Structure and sequence of the human alpha-L-iduronidase gene. Genomics 13: 1311-1313, 1992.
5. Archer, I. M., Young, I. D., Rees, D. W., Oladimeji, A., Wusteman, F. S., Harper, P. S. Carrier detection in Hunter syndrome. Am. J. Med. Genet. 16: 61-69, 1983.
6. DiFerrante N.M., Hyman B.H., Kish W., Donnelly P.V., Nichols B.L., Dutton R.V.

Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy disease) clinical and biochemical study of a mild variant case. – *Johns Hopkins Med.J.*, 1974, v. 135, p. 42-53.

7. Wicker G., Prill V., Brooks D., Gibson G., Hopwood J., von Figura K., Peters C. Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome): an intermediate clinical phenotype caused by substitution of valine for glycine at position 137 of arylsulfatase B. – *J.Biol.Chem.*, 1991, v. 266, p. 21386-21391.

8. Black S.H., Pelias M.Z., Miller J.B., Blitzer M.G., Shapira E. Maroteaux-Lamy syndrome in a large consanguineous kindred: biochemical and immunological studies. – *Am.J.Med.Genet.*, 1986, v. 25, p. 273-279.

9. Fidzińska E., Abramowicz T., Czartoryska B., Glogowska I., Gorska D., Rodo M. Assignment of the gene for human arylsulfatase B, ARSB, to chromosome region 5p11-5qter. – *Cytogenet.Cell Genet.*, 1984, v. 38, p. 150-151.

10. Peters C., Schmidt B., Rommerskirch W., Rupp K., Zuhlsdorf M., Vingron M., Meyer H.E., Pohlmann R., von Figura K. Phylogenetic conservation of arylsulfatases: cDNA cloning and expression of human arylsulfatase B. – *J.Biol.Chem.*, 1990, v. 265, p. 3374-3381.

11. Sly W.S., Quinton B.A., McAlister W.H., Rimoin D.L. Beta-glucuronidase deficiency: report of clinical, radiologic and biochemical features of a new mucopolysaccharidosis. – *J.Pediat.*, 1973, v. 82, p. 249-257.

12. Park H., Fisher K.J., Aronson N.M. Genomic structure of human lysosomal glycosylasparaginase. – *FEBS Lett.*, 1991, v. 288, p. 168-172.

13. Ikonen E., Baumann M., Gron K., Syvanen A.C., Enomaa N., Halila R., Aula P., Peltonen L. Aspartylglucosaminuria: cDNA encoding human aspartylglucosaminidase and the missense mutations causing the disease. – *EMBO J.*, 1991, v. 10, p. 51-58.

14. Oinonen C., Tikkanen R., Rouvinen J., Peltonen L. Three-dimensional structure of human lysosomal aspartylglucosaminidase. – *Nature Struct.Biol.*, 1995, v. 2, p. 1102-1108.

15. Ikonen E., Julkunen I., Tollersrud O.K., Kalkkinen N., Peltonen L. Lysosomal aspartylglucosaminidase is processed to the active subunit complex in the endoplasmic reticulum. – *EMBO J.*, 1993, v. 12, p. 295-302.

### Контрольные вопросы

1. Накопление каких ГАГ и нарушение каких ферментов характерно для различных типах мукополисахаридов ?
2. При каких мукополисахаридозах отмечается тяжелая дегенерация центральной нервной системы с мягкой формой соматического заболевания?
3. Какие фенотипические признаки и биохимические нарушения наиболее характерны для мукополисахаридозов первого, второго и четвертого типов?
4. Какие типы мукополисахаридозов влияют на развитие скелета?
5. Какие признаки характерны и какие мутации аспартилгликозаминидазы вызывают аспартилгликозаминурию?

---

## ГЛАВА 18

---

### НАРУШЕНИЯ ОБМЕНА ОТДЕЛЬНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ И АМИНОКИСЛОТ

#### 18.1. Наследственные нарушения обмена аминокислот: общие сведения

Наследственные нарушения обмена аминокислот представляют собой наиболее изученную группу генетически детерминированных энзимопатий. Они обусловлены рецессивными мутациями генов, локализованных в аутосомах. При большинстве заболеваний известны молекулярные механизмы, приводящие к формированию патологии. В основе патогенеза заболеваний этой группы лежит избирательное снижение активности фермента, участвующего в метаболизме той или иной аминокислоты. В результате энзиматического дефекта аминокислоты не утилизируются в организме, а в тканях и биологических жидкостях накапливаются недоокисленные продукты нарушенного метаболизма, обладающие токсическим действием на ткани и органы, в первую очередь на нервную систему. Большинство нарушений обмена аминокислот проявляется в первые недели и месяцы жизни диспептическим синдромом, неврологическими симптомами и изменениями кожи. Совершенствование методов диагностики позволило установить частоту этой группы заболеваний и определить их значение и удельный вес в структуре патологии раннего возраста. Частота наследственных нарушений обмена аминокислот колеблется от 1 : 10 000 до 1 : 100 000 новорожденных. Частота гетерозиготных носителей патологического гена составляет в общей популяции 1 : 100 – 1 : 400. В настоящее время апробирована и внедряется в практику лечебных учреждений этапная биохимическая система диагностики наследственных нарушений обмена аминокислот. Первый этап обследования с помощью качественных проб и полуколичественных методов ставит своей целью выявление группы детей с повышенным содержанием аминокислот в крови и увеличенной экскрецией их с мочой (тотальный скрининг). Эти дети подлежат динамическому наблюдению. Им проводят количественное биохимическое исследование крови и мочи (второй этап), целью которого является идентификация патологии. Усилия, направленные на раннюю диагностику, оправданы возможностью патогенетической терапии, основным принципом которой является «разгрузка» дефектной ферментной системы посредством исключения из рациона аминокислоты, не метаболизирующейся в организме. В профилактике заболеваний, обусловленных нарушением обмена аминокислот, большое значение имеют медико-генетическое консультирование, выявление гетерозиготных носителей патологического гена и антенатальная диагностика. Гетерозиготные носители определяются с помощью нагрузочных тестов, выявляющих слабость той или иной ферментной системы. При гетерозиготности мутантного гена активность детерминируемого им фермента, хотя и обеспечивает нормальную жизнедеятельность организма, но ниже, чем у гомозигот по нормальному гену.



## 18.2. Врожденные нарушения обмена аминокислот

Все полипептиды и белки представляют собой полимеры 20 различных аминокислот. Восемь из них: триптофан, фенилаланин, метионин, лизин, валин, треонин, изолейцин, лейцин, называемые незаменимыми, не синтезируются в организме человека, поэтому их необходимо вводить с пищевыми продуктами и 2 полузаменимые – аргинин и гистидин. Остальные образуются эндогенно. Несмотря на то что большая часть содержащихся в организме аминокислот связана в белках, все же внутри клетки содержатся небольшие пулы свободных аминокислот, которые находятся в равновесии с их внеклеточными резервуарами в плазме, спинномозговой жидкости и просветах кишечника и почечных канальцев. С физиологической точки зрения, аминокислоты – это нечто большее, чем просто «строительные блоки». Одни из них (глицин, гамма-аминомасляная кислота) выполняют функцию нейромедиаторов, другие (фенилаланин, тирозин, триптофан, глицин) служат предшественниками гормонов, коферментов, пигментов, пуринов и пиримидинов. Каждая аминокислота распадается своим собственным путем, в результате чего ее азотистые и углеродные компоненты используются для синтеза других аминокислот, углеводов и липидов.

Современные представления о врожденных метаболических болезнях в значительной мере основываются на результатах изучения нарушений обмена аминокислот. В настоящее время известно более 70 врожденных аминоацидопатий; число нарушений катаболизма аминокислот (примерно 60) намного превосходит количество нарушений их транспорта (примерно 10). Каждое из этих нарушений встречается редко; их частота колеблется от 1:10000 для фенилкетонурии до 1:200 000 для алкаптонурии. Однако их суммарная частота составляет, вероятно, 1:500-1:1000 живых новорожденных.

Клинические проявления многих состояний можно предотвратить или ослабить при ранней диагностике и своевременном начале адекватного лечения (ограничение белка и аминокислот в диете или добавки витаминов). Именно поэтому среди больших контингентов новорожденных проводится скрининг на аминоацидопатии с использованием разнообразных химических и микробиологических методов анализа крови или мочи. Предположительный диагноз можно подтвердить прямым ферментным методом с использованием экстрактов лейкоцитов, эритроцитов, культуры фибробластов или ткани печени, а также исследованиями по ДНК-ДНК-гибридизации. Последний подход был применен для диагностики и характеристики фенилкетонурии, недостаточности орнитинтранскарбамилазы, цитруллинемии и пропионовой ацидемии. По мере достижения успехов в клонировании других генов анализ, основанный на использовании ДНК, должен будет применяться все чаще (Leon E. Rosenberg)

**Нарушение трансаминирования и окислительного дезаминирования.** Процессы трансаминирования и дезаминирования имеют универсальное значение для всех живых организмов: трансаминирование способствует синтезу аминокислот, дезаминирование – их разрушению.

Суть реакции трансаминирования состоит в обратном переносе аминогруппы с аминокислоты в  $\alpha$ -кетокислоту без промежуточного образования свободного иона аммония. Реакция катализируется специфическими ферментами аминотрансферазами

(трансаминазами), кофакторами которых являются фосфорилированные формы пиридоксина (пиридоксальфосфат и пиридоксаминфосфат).

Нарушения реакций трансаминирования могут возникать по нескольким причинам, прежде всего – в результате дефицита пиридоксина (беременность, угнетение сульфаниламидными препаратами кишечной микрофлоры, торможение синтеза пиридоксальфосфата при лечении фтивазидом). Снижение активности аминотрансфераз происходит также в случае угнетения синтеза белков (голодание, тяжелая патология печени). Если в некоторых органах возникает некроз (инфаркт миокарда или легких, панкреатит, гепатит и др.), то вследствие разрушения клеток тканевые аминотрансферазы поступают в кровь, и повышение их активности в крови при такой патологии является одним из диагностических критериев. В изменении скорости трансаминирования важную роль играют нарушение соотношения субстратов реакции, а также влияние гормонов, особенно глюкокортикоидов и гормонов щитовидной железы, стимулирующих этот процесс.

Угнетение процесса окислительного дезаминирования, в результате которого распадаются неиспользованные аминокислоты, обуславливает повышенную концентрацию их в крови – *гипераминоацидемию*. Последствиями этого являются усиленная экскреция аминокислот почками (*аминоацидурия*) и изменение соотношения отдельных аминокислот в крови, что создает неблагоприятные условия для синтеза белковых молекул. Дезаминирование нарушается при дефиците компонентов, которые прямо или косвенно принимают участие в этой реакции (пиридоксин, рибофлавин, никотиновая кислота), а также при гипоксии, голодании (белковая недостаточность).

**Нарушение декарбоксилирования.** Этот процесс является важным, хотя и не универсальным направлением белкового обмена, и происходит с образованием углекислого газа и биогенных аминов. Декарбоксилированию подвергаются лишь некоторые аминокислоты: гистидин преобразуется в гистамин, тирозин – в тирамин,  $\gamma$ -глутаминовая кислота – в  $\gamma$ -аминомасляную кислоту (ГАМК), 5-гидрокситриптофан – в серотонин, производные тирозина (3,4-диоксифенилаланин) и цистина (L-цистеиновая кислота – соответственно в 3,4-диоксифенилэтиламин (дофамин) и таурин.

Биогенные амины, как известно, имеют специфическую биологическую активность, и увеличение их количества может вызвать определенные патологические изменения в организме. Большое количество биогенных аминов может быть результатом не только усиленного декарбоксилирования соответствующих аминокислот, но и угнетения окисления аминов и нарушения связывания их белками. Например, при гипоксии, ишемии и деструкции тканей (травма, облучение и т. п.) замедляются окислительные процессы, тем самым способствуя усилению декарбоксилирования. Избыток биогенных аминов (особенно гистамина и серотонина) в тканях может обусловить значительное нарушение местного кровообращения, повышение проницаемости сосудистой стенки и повреждение нервного аппарата.

### 18.3. Наследственные нарушения обмена некоторых аминокислот

Метаболизм аминокислот детерминируется определенным количеством и активностью соответствующих ферментов. Наследственные нарушения синтеза ферментов приводят к тому, что необходимая аминокислота не включается в метаболизм, а накапливается в биологических средах организма: крови, моче, кале, поту, спинномозговой жидкости. Клиническая картина в таких случаях обусловлена, во-первых, наличием достаточно большого количества вещества, которое должно было метаболизироваться с помощью заблокированного фермента; во-вторых – дефицитом вещества, которое должно было образоваться.

#### Валинемия у детей

Заболевание наследуется аутосомно-рецессивно.

Оно характеризуется тем, что в результате дефекта фермента – валинтрансаминазы – отмечается увеличение уровня аминокислоты валина в крови и моче.

Болезнь может начать проявляться уже с грудного возраста. Постепенно нарастает умственная отсталость, отмечаются непроизвольные насильственные движения – гиперкинезы, которые сочетаются с мышечной слабостью.

#### Гистидинемия

Заболевание наследуется аутосомно-рецессивно. Болезнь связана с дефектом фермента гистидазы, в результате чего в крови и моче накапливается аминокислота гистидин.

Болезнь начинает проявляться, как правило, во втором полугодии жизни отставанием в физическом и психическом развитии, могут быть судороги. Отмечается слабая пигментация волос, кожи, радужки глаза.

Лечение заключается в диете с ограничением гистидина.

#### Глицинемия у детей

Болезнь наследуется аутосомно-рецессивно. Заболевание связано с различными ферментами, участвующими в расщеплении аминокислоты глицина. Может проявляться двояко в зависимости от пораженного фермента:

В первые часы и дни жизни судорогами, прогрессирующими поражениями центральной нервной системы, рвотой, обезвоживанием. Может быть летальный исход.

С первых месяцев жизни судорогами, параличами, рвотой, обезвоживанием.

Лечение заключается в диете с ограничением белка.

#### Гиперлизинемия у детей

Заболевание наследуется аутосомно-рецессивно, имеется 2 формы: постоянная и периодическая. В первый месяц жизни ребенка появляются судороги и напряженность мышц, рвота. При постоянной форме заболевания дефектным ферментом является лизинкетоглутаратредуктаза. Признаки появляются в возрасте до 3 лет. Отмечается прогрессирующее поражение центральной нервной системы с умственной отсталостью,

сниженным тонусом мышц, нарушениями речи, нарушением физического развития и низким ростом.

При всех формах гиперлизинемии в крови и моче отмечается повышенный уровень лизина. Своевременная диета с ограничением белка способствует благоприятному исходу.

#### **Гиперметионинемия у детей**

Заболевание наследуется аутосомно-рецессивно. Дефектным ферментом является метионин-активирующий фермент.

Заболевание начинает проявляться в период новорожденности и в течение первых 3 лет жизни. Малыши сонливы, отстают в психическом развитии. Имеется характерный запах мочи «прокисшего пива», поражение печени, почек, поджелудочной железы. В крови и моче повышен уровень метионина.

Лечение – диета с ограничением белка и метионина.

**Нарушение обмена триптофана.** Основной путь метаболизма триптофана, как и никотиновой кислоты, обеспечивает синтез никотинамидадениндинуклеотида (НАД) и НАДФ, которые играют важную роль в жизнедеятельности организма, будучи коферментами многих реакций обмена, а значительный дефицит этих веществ служит причиной развития *пеллагры*. Нарушение обмена триптофана также может сопровождаться изменением количества образующегося из него серотонина.

Генетически обусловленных нарушений обмена аминокислот известно довольно много, все они наследуются по аутосомно-рецессивному типу. Некоторые из них приведены в таблице 18.1.

**Таблица 18.1. Наследственные нарушения обмена аминокислот, обусловленные дефицитом или низкой активностью ферментов [http://sunmuseum.ru/uploads/posts/2016-08/1470836263\\_t2.jpeg](http://sunmuseum.ru/uploads/posts/2016-08/1470836263_t2.jpeg)**

Аминокислоты	Фермент	Клинические симптомы
Фенилаланин	Фенилаланингидроксилаза	Фенилкетонурия, фенилпировиноградная олигофрения
Тирозин	Оксидаза гомогентизиновой кислоты Тирозиназа	Алкаптонурия Альбинизм Тирозиноз
Аргинин	Ксантиноксидиза Аргининсукциназа	Ксантинурия Аргининсукцинатурия

## **18.4. Нарушение обмена фенилаланина**

### **Фенилкетонурия**

В норме фенилаланин преобразуется в тирозин. Если в печени нарушается синтез необходимого для этого фермента фенилаланингидроксилазы (рисунок 18.1, схема), то

окисление фенилаланина происходит посредством образования фенилпировиноградной и фенилмолочной кислот – развивается фенилкетонурия.



Рисунок 18.1. (Схема). Блокада путей метаболизма фенилаланина и тирозина [http://sunmuseum.ru/uploads/posts/2016-08/1470836327\\_s4.jpeg](http://sunmuseum.ru/uploads/posts/2016-08/1470836327_s4.jpeg)

Однако этот путь имеет малую “пропускную” способность, поэтому большое количество фенилаланина накапливается в крови, тканях и спинномозговой жидкости, что в первые же месяцы жизни новорожденного проявляется тяжелым поражением ЦНС и неизлечимым слабоумием. Вследствие недостаточного синтеза тирозина угнетается образование меланина, который обуславливает осветление кожи и волос. Кроме того, в результате повышенного образования фенилпировиноградной кислоты тормозится активность фермента дофамингидроксилазы, необходимого для синтеза катехоламинов (адреналина, норадреналина). Тяжесть наследственной патологии определяется комплексом всех этих нарушений. Больные умирают в детстве, если не проводится специальное лечение, заключающееся в постоянном, но осторожном (контроль аминокислотного состава крови) ограничении поступления фенилаланина с пищей. Раннюю диагностику заболевания нужно проводить сразу после рождения ребенка. Для этого применяют различные биохимические тест-системы.

Раннее выявление этого заболевания и своевременное лечение, заключающееся в диетическом питании, – единственный шанс для физического и психического развития малышей.

Основным принципом диетического питания при этой патологии является исключение из питания продуктов с высоким содержанием белка, что ограничивает поступление фенилаланина в организм больного ребенка. Так как фенилаланин является незаменимой аминокислотой, то минимальная потребность в ней должна быть удовлетворена за счет естественных продуктов, обеспечивающих нормальное развитие и рост малыша. Дефицит белка в рационе восполняют за счет специализированных гидролизатов белка с низким содержанием фенилаланина или смесей L-аминокислот без фенилаланина.

В настоящее время для питания больных малышей рекомендуется смесь «Афенилак» («Нутриция»), которую назначают малышам с рождения до 12 месяцев. Белко-

вый компонент смеси не содержит фенилаланина. Жиры представлены растительными маслами (кукурузным, соевым, кокосовым). Углевод представлен декстринмальтозой, которая легко усваивается организмом малыша. Смесь обогащена витаминами и минеральными веществами, количество которых полностью удовлетворяет физиологическую потребность грудничков.

### **Фенилкетонурия: общие сведения**

Фенилкетонурия (ФКУ, ММ 261600) – наследственное нейрометаболическое заболевание – относится к классу аминокислотурий и связано с недостатком фермента фенилаланингидроксилазы. Дефицит фермента нарушает превращение незаменимой аминокислоты фенилаланина в тирозин – предшественник катехоламинов, что приводит к быстрому накоплению фенилаланина и продуктов его метаболизма (кетоновых кислот) в первые недели жизни. В первые месяцы жизни дети могут выглядеть абсолютно здоровыми. Заболевание манифестирует в возрасте 2-6 месяцев. Ранними симптомами являются запах плесени, исходящий из мочи и кожи ребенка («мышинный» запах), рвота, повышенная возбудимость. Характерны гипопигментация кожи, волос, радужки глаз. В дальнейшем нарушения миелинизации нервных волокон приводят к развитию тяжелой умственной отсталости (олигофрении), эпилептическим припадкам, двигательным нарушениям (пирамидный синдром, высокие сухожильные рефлексы, тремор, гипертония мышц, атаксия, гиперкинезы и т.д.) (Kaufman S., 1977, Kaufman S., 1983; Knox W.E., 1972). В тоже время транспорт  $^{14}\text{C}$  глицина в мозг не нарушается под влиянием повышенной концентрации фенилаланина. Обнаружено, что повышенная концентрация фенилаланина блокирует включение  $^{35}\text{S}$  метионина и  $^{14}\text{C}$  лейцина при синтезе белка миелина.

В некоторых (не во всех) случаях наблюдается нарушение миелинизации в головном мозге (Agrawal H.C., 1970; Kaufman S., 1977). Генетически детерминированная гиперфенилаланинемия в уязвимый постнатальный период блокирует формирование миелиновых оболочек головного мозга, что, вероятно, является критическим фактором в формировании интеллектуального развития детей (Agrawal H.C., 1970). Однако, имеются и другие точки зрения относительно биохимических процессов, ведущих к умственной отсталости.

Показано, что повышенная концентрация фенилаланина в плазме крови у фенилкетонуриков приводит к снижению синтеза медиаторов нервных импульсов – серотонина, дофамина, норадреналина, эпинефрина (McKean C.M., 1972; Butler I.J., 1981; Krause W., 1985; Michals K., 1988). По мнению ряда исследователей повышенная концентрация фенилаланина снижает транспорт ароматических аминокислот триптофана и тирозина. Их концентрация в мозге больных составляет 40-50% от нормы (McKean C.M., 1972). Поскольку эти аминокислоты являются предшественниками при синтезе нейротрансмиттеров, это объясняет, по мнению МакКина (McKean C.M., 1972), наблюдаемое им снижение концентрации серотонина, дофамина и норадреналина в мозге больных на 30-40%. При хронической гиперфенилаланинемии концентрация таких нейротрансмиттеров, как глутамата, аспартата и аминокислоты также снижена в головном мозге (Agrawal H.C., 1970).

Существует также мнение о том, что повышенная концентрация фенилаланина

ингибирует активность церебральных гидроксилаз (тирозин-3 гидроксилазы, триптофан-5 гидроксилазы) (McKean С.М.,1972;Butler I.J.,1981; Krause W.,1985).

Имеются данные и о том, что метаболиты фенилаланина – фенилпируват, фенил-лактат – обладают токсическим действием. Так, повышенная концентрация фенилпирувата вызывала конвульсии у животных (Agrawal Н.С.,1970). В этой связи интересно отметить, что у человека при фенилкетонурии концентрация в спинномозговой жидкости фенилпирувата очень мала (Antoshechkin А.Г.,1991). По данным других исследователей метаболиты фенилаланина вызывали микроцефалию у крыс (Michals К.,1988).

Таким образом, имеющиеся данные не позволяют сделать определенного заключения о биохимических механизмах, лежащих в основе нарушения психического развития при ФКУ.

Заболевание обусловлено рецессивной мутацией, так что проявляется только у гомозигот. При этом заболевании дефектен ген, расположенный в 12-й хромосоме и кодирующий фенилаланингидроксилазу. Часть избыточного фенилаланина выводится с мочой, что позволяет обнаружить нарушение обмена буквально с первых часов жизни ребенка. Разработаны специальные бумажные детекторы (пропитанные FeCl<sub>3</sub>), которые становятся зелеными при соприкосновении с мочой больного ребенка. При раннем обнаружении этого тяжелого заболевания оно успешно лечится специальной диетой, содержащей продукты с очень небольшим количеством фенилаланина. Если лечение начато с первых дней жизни, ребенок вырастает нормальным.

Фенилкетонурия наследуется по аутосомно-рецессивному типу, оба пола поражаются с одинаковой частотой. Средняя частота гетерозиготности по фенилкетонурии 1:70.

Заболевание встречается в Европейских странах, странах Восточного полушария, на Американском и Африканском континентах, Австралии. Однако, в ряде регионов Земного Шара, в частности среди коренного населения островов Полинезии, фенилкетонурия не была выявлена (Hertzberg М.,1989).

Частоты встречаемости фенилкетонурии варьируют от 1: 4500 (Ирландия) до 1:100000 (Япония). Столь широкая вариабельность распространения заболевания в различных регионах представляет интерес с точки зрения популяционной генетики.

### **Фенилкетонурия: история открытия**

Классическую форму фенилкетонурии впервые описал молодой норвежский биохимик и психиатр А.Феллинг в 1934 году (Kauffman S.,1977). Наблюдая группу умственно отсталых детей, он обнаружил у них экскрецию фенилпирувата с мочой. Добавив раствор хлорного железа к моче, он заметил появление оливково-зеленого окрашивания. В настоящее время тест с хлорным железом (проба Феллинга) используется для обнаружения в моче фенилпировиноградной кислоты (дериивата фенилаланина). Позднее Феллинг установил, что свойственный больным детям запах мочи, напоминающий запах мочи животных (мыши, волка) обусловлен присутствием фенилацетата.

Ранее эта болезнь была известна под названиями – фенилпировиноградная олигофрения, болезнь Феллинга, фенилкетонурическая болезнь и т.д. Термин фенилкетонурия, который закрепился за этим заболеванием, был введен Пенроузом и Квостелем в 1937 году (Penrose L.,1937).

### **Фенилкетонурия: биохимия**

Лишь спустя 13 лет после описания фенилкетонурии (ФКУ) Феллингом удалось выявить заблокированное звено в цепи последовательных реакций нормального метаболического пути фенилаланина (ФА). Джервис в 1947 году провел серию экспериментов (Jervis G.A., 1947). При нагрузке животных и здоровых людей фенилаланином, наблюдалось повышенное содержание тирозина в крови. При введении же больным фенилкетонурией в тех же дозах фенилаланина, в крови не регистрировалось избыточного количества тирозина (Jervis G.A., 1953). На основе этих результатов Джервис пришел к заключению, что в основе заболевания лежит блокирование гидроксирования фенилаланина и превращения его в тирозин. В 1953 году он подтвердил свое предположение, впервые продемонстрировав, что клетки печени больного фенилкетонурией *in vitro* не способны превращать фенилаланин в тирозин (Jervis G.A., 1953). Этот факт послужил основой для объяснения причины резкого повышения концентрации фенилаланина в плазме больных ФКУ, у которых уровень фенилаланина в плазме превышает 1,5 мМ (при нормальном уровне равном 0,051-0,054 мМ) (Kaufman S., 1977).

В тот период времени было мало известно об энзимологии обмена аминокислот. Около 25 лет ушло на исследование природы энзиматического превращения фенилаланина в тирозин. В настоящее время установлено, что фенилаланингидроксилирующая система млекопитающих представляет собой сложный комплекс, состоящий из нескольких ферментов и коэнзимов:

- 1) фенилаланингидроксилазы (ФАГ; Е.С.1.14.16.1.), phenylalanine hydroxylase,
- 2) дигидроптеридинредуктаза (ДГПР; Е.С.1.16.99.7), dihydropteridine reductase, DHPR
- 3) тетрагидробиоптерин (ВН4), (tetrahydrobiopterin)
- 4) дигидрофолатредуктаза (ДФР; Е.С.1.5.1.3.) dihydrofolate reductase, DHFR (Kaufman S., 1977; Kaufman S., 1983).

Ввиду блокирования основного катаболического пути фенилаланина при ФКУ, происходит трансформация боковой аланиновой цепи фенилаланина путем деаминирования и окислительного декарбоксилирования, сопровождающаяся накоплением в организме фенилпирувата, фениллактата, фенилацетата и манделовой кислоты в биологических жидкостях (Kaufman S., 1977; Kaufman S., 1983). Фенилацетат, соединяясь с глутамином, образует фенилацетилглутамин.

### **Фенилкетонурия: генетика**

Ген фенилаланингидроксилазы

Ген фенилаланингидроксилазы: гаплотипы

Ген фенилаланингидроксилазы: мутации и фенилкетонурия

Ген фенилаланингидроксилазы: взаимосвязь мутаций и гаплотипов

### **Ген фенилаланингидроксилазы**

Gene: 12q241/PAH] phenylalanine hydroxylase; phenylketonuria

Ген фенилаланингидроксилазы (ФАГ) человека локализован на длинном плече 12 хромосомы в сегменте 12q22 – 12q24.1 (Lidsky A.S., 1984).

Ген ФАГ включает в свой состав 13 экзонов, протяженностью 90000 пар оснований



(DiLella A.G., 1986). Протяженность экзонов колеблется от 57 пар нуклеотидов (9-ый экзон) до 892 нуклеотидов (13-ый экзон). Ген высокоинтронирован, размер интронов варьирует от 1000 пар нуклеотидов (7-ой интрон) до 23500 пар нуклеотидов (3-й интрон). Если на долю кодирующей части гена приходится 2400 пар нуклеотидов, то интроны состоят из 85000 нуклеотидов. Отношение кодирующей части к некодирующей части ДНК гена ФАГ самое низкое среди изученных эукариотических генов.

Анализ экзон-интронных пограничных сочленений показывает, что интроны начинаются с канонического динуклеотида GT и заканчиваются каноническим динуклеотидом AG (DiLella A.G., 1986). Три типа экзон-интронных пограничных сочленений прослеживается в гене. Тип «0» – интрон локализуется между двумя кодирующими триплетами (1,2,4,8,9 и 10 интроны), тип I – между первым и вторым нуклеотидами кодирующего триплета (3,6 и 12 интроны), тип «III» – между вторым и третьим нуклеотидами кодирующего триплета (5,7 и 11 интроны). На <http://medbiol.ru/medbiol/pathology/> Рисунок 4 представлены экзон-интронные сочленения в гене ФАГ человека.

Активный центр фермента образован карбоксильным концом пептида, содержащим последние 305 аминокислот, т.е. с 148 по 451 аминокислоту (Ledley F.D., 1985a; Iwaki M., 1986). Данная область кодируется локусом гена, локализованным в 6 – 13 экзонах. N-конец фенилаланингидроксилазы представляет собой домен субстратной специфичности (Ledley F.D., 1985a; Iwaki M., 1986). Особый интерес представляет вопрос о связи структуры гена и ее изменений с активностью молекулы фермента.

#### **Ген фенилаланингидроксилазы: гаплотипы**

Исследование гена фенилаланингидроксилазы (ФАГ) человека с помощью ряда рестриктаз Pvu II, Bgl II, Xmn I, Msp I, Hind III, EcoR V, EcoR I + Bam HI позволило выявить полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ или RFLP).

#### **Ген фенилаланингидроксилазы: мутации и фенилкетонурия**

В 1986 году впервые удалось локализовать точечную мутацию в гене фенилаланингидроксилазы (ФАГ) человека, обуславливающую классическую форму фенилкетонурии (DiLella A.G., 1986). Сиквенс-анализ позволил выявить транзицию G-A, локализованную в каноническом динуклеотиде (GT) донорного участка сплайсинга 12 интрона. Как показали дальнейшие исследования, описываемая сплайсинговая мутация (IVS-12) обуславливает делецию 116 нуклеотидов в мРНК, т.е. ведет к срезанию 12 экзона (Marvit J., 1987). Синтезируемый фермент фенилаланингидроксилазы, кодируемый таким мутантным аллелем, утрачивает 52 терминальных аминокислотных остатка с карбоксильного конца цепи, что приводит к нестабильности белка и потери ферментативной активности.

В следующем 1987 году была идентифицирована вторая точечная мутация в гене ФАГ у больного с классической формой фенилкетонурии также из датской популяции (DiLella A.G., 1987). Сиквенс-анализ позволил определить точечную мутацию, представляющую собой транзицию C-T, локализованную в первом положении 408 кодона, расположенного в 12 экзоне. Ранее было установлено, что больной является гомозиготой по 2 гаплотипу – HP2. Такая нуклеотидная замена ведет к мутационной замене аминокислот (аргинин – триптофан) в 408 положении пептида, что обуславливает потерю ферментативной активности.

Методическим подходом, коренным образом изменившим молекулярный анализ повреждений гена, был, разработанный в 1985 году Карлом Мюллесом, метод полимеразной цепной реакции (PCR или ПЦР). Эта методика произвела революционный переворот в решении многих экспериментальных задач в различных областях биологии и медицины, в том числе в медицинской генетике. Если в 1986-1988 годах в гене фенилаланингидроксилазы человека выявлялось всего лишь по одной мутации в год, то начиная с 1989 года число выявленных новых мутаций в гене ФАГ человека резко возросло. Так в 1989 году было зарегистрировано 6 новых мутаций, в 1990 году – 8 новых мутаций, а в период с 1991 по 1994 годы число вновь выявляемых мутаций в гене ФАГ человека за один год достигало 25-30.

В апреле 1995 года в гене фенилаланингидроксилазы человека зарегистрировано свыше 170 мутаций. В <http://medbiol.ru/medbiol/pathology/> Таблице 4 представлены идентифицированные к настоящему времени точечные мутации, выявленные в гене фенилаланингидроксилазы человека. Молекулярные повреждения гена ФАГ удобно разбить на следующие группы:

- 1) мутации в промоторе;
- 2) мутации, затрагивающие иницирующий кодон;
- 3) missense мутации;
- 4) nonsense (терминирующие) мутации;
- 5) silent (нейтральные или молчащие) мутации;
- 6) сплайсинговые мутации;
- 7) делеционные мутации.

В Консорциум включен ряд мутаций, которые не опубликованы в печати, и вероятно требуют дополнительных подтверждений.

Согласно зарегистрированным мутациям гена ФАГ в различных странах наблюдается различная картина распределения генетических повреждений в гене ФАГ по различным регионам Земного Шара.

Так как первые точечные мутации в гене ФАГ у больных фенилкетонурией были описаны в датской популяции, то наиболее изученной в настоящее время является популяция больных ФКУ этой страны. Проводимые исследования в период 1986-1995 годов выявили в датской популяции 35 мутаций, в том числе 23 missense мутации, 4 nonsense мутации, 5 сплайсинговых мутаций и 3 делеции (Guldborg P., 1993b; Guldborg P., 1994).

Анализ гена фенилаланингидроксилазы у больных фенилкетонурией показал, что все случаи этого наследственного заболевания обусловлены мутациями в различных сайтах данного гена.

Есть данные о том, что различная локализация мутаций по длине гена фенилаланингидроксилазы обуславливает различную степень инактивации фермента фенилаланингидроксилазы (Okano Y., 1991a).

### **Диетическое ограничение при фенилкетонурии**

При фенилкетонурии назначают диету с низким содержанием фенилаланина. Тем самым, несмотря на отсутствие фенилаланингидроксилазы печени, прерывается патогенетическое звено в развитии болезни. Ребенок, находившийся в течение нескольких

лет на искусственной диете, уже не будет страдать тяжелой формой болезни. Спустя несколько лет чувствительность нервной системы к фенилаланину и продуктам его превращений резко снижается и диетическое ограничение может быть уменьшено. Ограничение диеты не обязательно требует составления специального пищевого рациона. Например, новый метод диетического ограничения поступления фенилаланина при фенилкетонурии основан на пероральном ведении желатиновых капсул, содержащих растительный фермент, который освобождает пищевые продукты от фенилаланина. При таком лечении концентрация фенилаланина в крови уменьшается на 25%. Этот метод особенно целесообразно применять для более взрослых пациентов с фенилкетонурией и беременных женщин, не нуждающихся в строгом соблюдении диеты.

### **Фенилкетонурия: генотерапия**

Примеры с тирозинемией и ADA геном показывают достаточно простую ситуацию, когда генная терапия имеет очень высокие шансы на успех и на то, чтобы стать заурядной клинической процедурой. Однако не всегда все так просто. Например, такая распространенная болезнь метаболизма, как фенилкетонурия, чаще всего вызывается дефектом единственного гена фенилаланин гидроксилазы. В результате фенилаланин не может превращаться в тирозин. Биологическим следствием этого дефекта являются многие клинические проявления болезни, в том числе и умственная отсталость, которые можно предотвратить специальной диетой. Поэтому всех детей проверяют при рождении на фенилкетонурию, чтобы вовремя начать диетотерапию. Один ген, но фермент, кодируемый им, требует для своей активности кофакторы, которые синтезируются в печени, и поэтому, хотя на моделях и ведутся исследования потенциалов генной терапии в этом направлении, до практического ее использования еще, по-видимому, далеко.

Группа американских ученых под руководством Woo S. (Бэйлоровский медицинский колледж, Хьюстон, США) еще в 1985 году провела первые работы по встраиванию кДНК фенилаланингидроксилазы человека (клон рhPАН 247) в эукариотический вектор, содержащий промотор и кеп-сайт гена металлотинина человека (МТII) (Ledley F.D., 1985b). Проведение анализа клеток мыши линии NIH 3T3, трансформированных рекомбинантным клоном МPАН(+), с помощью Southern, Northern, Western блот-гибридизаций выявило стабильную интеграцию и экспрессию гена фенилаланингидроксилазы человека в клетках мыши. В клеточном экстракте трансформированных клеток была зарегистрирована птеринзависимая активность фенилаланингидроксилазы. В последующих своих работах авторы использовали для переноса гена ФАГ в качестве векторов ретровирусы.

Проведенная экспериментальная работа явилась важным шагом на пути к генной заместительной терапии. Можно полагать, что кроме диетотерапии возможен альтернативный – генотерапевтический – путь лечения фенилкетонурии. Полученные у больных фенилкетонурией клетки печени (гепатоциты) пункцией с последующим их инфицированием рекомбинантными ретровирусами, содержащими полноценный ген ФАГ, и последующей их реинплантацией будут способствовать устранению дефекта фенилаланингидроксилазной активности клеток печени.

В центре исследовательских работ по генной терапии проводятся работы по соз-

данию прямых систем по доставке ДНК в нужные ткани органов (например, печени), основанные на использовании ДНК-протеиновых комплексов. Для повышения эффективности переноса этих комплексов используют аденовирусы с дефектной системой репликации, осуществляющие эндосомальный лизис. Проведены модельные работы по соматической генотерапии фенилкетонурии на мышах, основанные на комбинации этих методов (Fang B., 1993; Cristiano R.J., 1993). Исследовательские работы выполнены как на гепатоцитах мыши линии РАН- *in vitro* (Cristiano R.J., 1993), так и *in vivo* на мышах линии Rahenu2, имитирующих больных фенилкетонурией (Fang B., 1993). У подопытных мышей через 5 дней полностью восстанавливалась активность фенилаланин-гидроксилазы и нормализовался уровень фенилаланина в сыворотке крови в результате проникновения и экспрессии чужеродной ДНК в гепатоцитах мыши (Fang B., 1993).

На этот метод по корректировке генетических болезней обмена веществ, в частности фенилкетонурии, возлагаются большие надежды, т.к. метод не требует хирургических вмешательств.

### Литература

1. Kaufman S. Phenylketonuria: biochemical mechanisms, in "Advances in Neurochemistry". Agranoff B.W., Aprison M.H., ed.- Plenum Press, New York, 1977, p. 1-132.
2. Kaufman S. Phenylketonuria and its variants. In "Advances in human genetics". Harris H., Hirschhorn K., ed. – Plenum Press, New York, 1983, v.13, p. 217-297.
3. Knox W.E. Phenylketonuria. In "The metabolic basis of inherited disease". Stanbury J.B., Wyngaarden J.B., Fredrickson D.S. ed. – McGraw-Hill, New-York, 1972, p. 266-295.
4. Agrawal H.C., Bone A.H., Davison A.N. Effect of phenylalanine on protein synthesis in the developing rat brain. – *Biochem. J.*, 1970, v. 117, p. 325-331.
5. McKean C.M. The effect of high phenylalanine concentrations on serotonin and catecholamine metabolism in the human brain. – *Brain Res.*, 1972, v. 47, p. 469-476.
6. Butler I.J., O'Flynn M.E., Seifert W.E., Howell R.R. Neuro- transmitter defects and treatment of disorders of hyperphenylalaninemia. – *J.Pediatr.*, 1981, v. 98, p. 729-733.
7. Krause W., Halminski M., McDonald L., Dembure P., Salvo R., Freides D., Elsas L. Biochemical and neuropsychological effects of elevated plasma phenylalanine in patients with treated phenylketonuria. A model for study of phenylalanine and brain function in man. – *J.Clin.Invest.*, 1985, v. 75, p. 10-48.
8. Michals K., Lopus M., Matalon R. Phenylalanine metabolites as indicators of dietary compliance in children with phenylketonuria. – *Biochem.Med.Metab.Biol.*, 1988, v. 39, p. 18-23.
9. Antoshechkin A.G., Chentsova T.V., Tatur U.V., Naritsin D.B., Railian G.P. Content of phenylalanine, tyrosine and their metabolites in CSF in phenylketonuria. – *J.Inherit.Metab.Dis.*, 1992, v. 14, p. 749-754.
10. Hertzberg M., Jahromi K., Ferguson V., Dahl H.H.M., Mercer J., Mickleson K.N.P., Trent R.J. Phenylalanine hydroxylase gene haplotypes in Polynesians: evolutionary origins and absence of alleles associated with severe phenylketonuria. – *Am.J.Hum. Genet.*, 1989, v. 44, p. 382-387.
11. Penrose L., Quastel J.H. Metabolic studies in phenylketonuria. – *Biochem.J.*, 1937, v. 31, p. 266-274.
12. Lidsky A.S., Robson K.J.H., Thirumalachary C., Barker P.E., Ruddle F.H., Woo S.L.C. The PKU locus in man on chromosome 12. – *Am.J.Hum.Genet.*, 1984, v. 36, p. 527-534.
13. DiLella A.G., Kwok S.C.M., Ledley F.D., Marvit J., Woo S.L.C. Molecular structure and

polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene //Biochemistry. – 1986.- Vol.25. -P.743-749.

14. Ledley F.D., DiLella A.G., Kwok S.C.M., Woo S.L.C. Homology between phenylalanine and tyrosine hydroxylases reveals common structural and functional domains. – Biochemistry, 1985, v. 24, p. 3389-3394.

15. Iwaki M., Phillips R.S., Kaufman S. Proteolytic modification of the amino-terminal and carboxy-terminal regions of rat hepatic phenylalanine hydroxylase. – J.Biol.Chem., 1986, v. 261, p. 2051-2056.

16. Marvit J., DiLella A.G., Brayton K., Ledley F.D., Robson K.J.H., Woo S.L.C. GT to AT transition at a splice donor site causes skipping of the preceding exon in phenylketonuria. – Nucleic Acid Res., 1987, v. 15, p. 5613-5628.

17. DiLella A.G., Marvit J., Brayton K., Woo S.L.C. An amino acid substitution involved in phenylketonuria is in linkage disequilibrium with DNA haplotype 2. – Nature, 1987, v. 327, p. 333-338.

18. Guldberg P., Henriksen K.F., Guttler F. Molecular analysis of phenylketonuria in Denmark: 99% of the mutations detected by denaturing gradient gel electrophoresis. – Genomics, 1993, v. 17, p. 141-146.

19. Guldberg P., Henriksen K.F., Thony B., Blau N., Guttler F. Molecular heterogeneity of nonphenylketonuria hyperphenylalaninemia in 25 Danish patients. – Genomics, 1994, v. 21, p. 453-455.

20. Okano Y., Wang T., Eisensmith R.C., Longhi R., Riva E., Giovannini M., Cerone R., Romano C., Woo S.L.C. Phenylketonuria missense mutations in the Mediterranean. – Genomics, 1991, v. 9, p. 96-103.

21. Okano Y., Hase Y., Oura T., Isshiki G. Molecular defects in phenylalanine hydroxylase (PAH) gene detected by PAH mRNA analysis from lymphoblasts in Orientals. – Am.J.Hum.Genet., 1993, v. 53, p. 936.

22. Ledley F.D., Grenett H.E., DiLella A.G., Kwok S.C.M., Woo S.L.C. Gene transfer and expression of human phenylalanine hydroxylase. – Science, 1985, v. 228, p. 77-79.

23. Fang B., Eisensmith R.C., Chen X.H.L., Shedlovsky A., Dove W., Woo S.L.C. Gene therapy for phenylketonuria (PKU). – Am. J.Hum.Genet., 1993, v. 53 (suppl.), p. 106.

24. Cristiano R.J., Smith L.C., Woo S.L.C. Hepatic gene therapy: adenovirus enhancement of receptor-mediated gene delivery and expression in primary hepatocytes. – Proc.Natl.Acad.Sci., 1993, v. 90, p. 2122-2126.

### 18.4.1. Гиперфенилаланинемия, ВН4-дефицитная В; НРАВН4В

#### Гиперфенилаланинемии

Любая из Гиперфенилаланинемий обуславливается снижением активности ферментного комплекса, называемого фенилаланин-гидроксилазой. В заметных количествах этот комплекс обнаружен только в печени и почках. Субстратами фермента служат фенилаланин и молекулярный кислород, а кофактором – восстановленный птеридин (тетрагидробиоптерин). Продукты ферментативной реакции – тирозин и дигидробиоптерин. Последний вновь превращается в тетрагидробиоптерин под действием другого фермента дигидроптеридинредуктазы. При классической фенилкетонурии активность апофермента гидроксилазы снижена почти до нуля, но ген гидроксилазы все же присутствует и не подвергается крупной перестройке или делеции. Доброкачественная гиперфенилаланинемия связана с менее выраженной недостаточностью фермента, а тран-

зиторная гиперфенилаланинемия (иногда называемая транзиторной фенилкетонурией) обуславливается задержкой созревания апофермента гидроксилазы. Однако при двух вариантах фенилкетонурии стойкое нарушение гидроксилирующей активности определяется не дефектом апогидроксилазы, а отсутствием тетрагидробиоптерина. Недостаточность тетрагидробиоптерина может быть вызвана двумя причинами: блокадой синтеза биоптерина из его предшественников и недостаточностью дигидроптеридинредуктазы, восстанавливающей тетрагидробиоптерин из дигидробиоптерина.

Все варианты Гиперфенилаланинемии в целом встречаются с частотой примерно 1:10000 новорожденных.

Иногда нелеченные женщины с фенилкетонурией достигают зрелости и рожают. Более 90 % детей в этом случае отстают в психическом развитии, у многих из них выявляют другие врожденные аномалии, например микроцефалию, задержку роста и пороки сердца. Поскольку эти дети представляют собой гетерозиготы, а не гомозиготы по мутации, обуславливающей фенилкетонурию, клинические проявления у них следует отнести на счет повреждений, связанных с повышенной концентрацией фенилаланина у матери и воздействием избытка этой аминокислоты на протяжении внутриутробного периода.

В Северной Америке и Европе проводится скрининг большинства новорожденных с определением концентрации фенилаланина в крови по методу Гатри (ингибирование роста бактерий). Дети, у которых уровень фенилаланина повышен, подвергаются дальнейшему обследованию с использованием более чувствительных количественных флюорометрических или хроматографических методов. При классической фенилкетонурии и недостаточности тетрагидробиоптерина концентрация фенилаланина, как правило, превышает 200 мг/л. При транзиторной или доброкачественной Гиперфенилаланинемии она обычно ниже, хотя и выше цифр в контроле (менее 10 мг/л). При транзиторной Гиперфенилаланинемии уровень этой аминокислоты нормализуется в течение 3-4 мес. При доброкачественной Гиперфенилаланинемии диетические ограничения сопровождаются более заметным снижением уровня фенилаланина в плазме, чем при классической фенилкетонурии. У каждого ребенка с гиперфенилаланинемией, у которого, несмотря на ранний диагноз и диетическое лечение, прогрессируют неврологические признаки, следует подозревать недостаточность тетрагидробиоптерина. Подтвердить диагноз этих вариантов, на долю которых приходится 1-5 % всех случаев фенилкетонурии, можно с помощью ферментативного метода с использованием культуры фибробластов. В настоящее время классическую фенилкетонурию можно диагностировать пренатально по полиморфизму длины рестрикционных фрагментов, идентифицируемому с помощью ДНК-ДНК-блотгибридизации.

Лечение. Обычно концентрацию фенилаланина поддерживают на уровне между 30-120 мг/л. До тех пор, пока не появится уверенность в безопасности отмены диетического лечения в каком-либо возрасте, ограничения в питании следует продолжать. При транзиторной и доброкачественной формах гиперфенилаланинемии не требуется длительных диетических ограничений. С другой стороны, как уже отмечалось, состояние детей с недостаточностью тетрагидробиоптерина ухудшается, несмотря на ограничения фенилаланина в диете. Эффективность заместительного введения птеридинового кофактора находится в стадии изучения.

Тетрагидробиоптерин (BH4)-дефицитная гиперфенилаланинемия (HPA) В (HPAВ-Н;В) вызывается мутацией в гене, кодирующем ГТФ циклогидролазу I (GCH1). Аутосомнорецессивная форма ДОФА-чувствительной дистонии с или без гиперфенилаланинемии вызывается мутацией в одном и том же гене.

ДОФА-чувствительная дистония-5 (DYT5) является аллельной формой заболевания, возникающей из-за гетерозиготных мутаций в гене GCH1.

### **Клинические особенности**

Niederwieser et al. (1984) сообщили о 4-летней девочке с гиперфенилаланинемией, с тяжелой задержкой развития, тяжелой мышечной гипотонией туловища и ригидностью конечностей, судорогами, и частыми эпизодами гипертермии неинфекционной природы. Экскреция с мочой неоптерина, биоптерина, птерина, изоксантоптерина, дофамина и серотонина была очень низкая, хотя их относительная пропорция в моче была нормальной. Спинномозговая жидкость содержала низкие концентрации гомованилиновой кислоты, 5-гидроксииндолуксусной кислоты, неоптерина и биоптерина. Пероральное введение L-эритро-тетрагидробиоптерина (но не dextroisomer) нормализует уровень сывороточного фенилаланина в течение 4 часов. Не обнаружено повреждений иммунной системы. Родители пациента были двоюродными братом и сестрой, что наводит на мысль об аутосомно-рецессивном типе наследования. Биопсия печени показала дефицит ГТФ-циклогидролазы I. В стимулированных фитогемагглютинином лимфоцитах родителей уровни активности ферментов показывали промежуточные значения между нулем (в лимфоцитах ребенка) и нормой. Naylor et al. (1987), выявили при диагностическом исследовании дефицит по ГТФ-циклогидролазе I у 4-месячного младенца, которому по положительному тесту Гатри на фенилкетонурию (ФКУ; 261600) после рождения проводилась диетотерапия. Птерициновый скрининг вариантов кофактора в моче, однако, обнаружил, крайне низкие уровни неоптерина и биоптерина. Диагноз был подтвержден BH4-нагрузочным тестом и анализом активности ГТФ-циклогидролазы I в печени. Ichinose др. (1995) сообщили о младенце женского пола с BH4-зависимой гиперфенилаланинемии из-за дефицита GCH1. У нее возникли проблемы с кормлением, слабое сосание и слабый мышечный тонус в первую неделю жизни, а затем задержка развития. В возрасте 2-х лет, она была не в состоянии ходить и у нее проявились судороги и хореоатетоз. Анализ мочи на птерины показал глубокий дефицит неоптерина и биоптерина в моче. Она умерла в возрасте 10 лет.

Blau и др. (1995) описал мальчика младенца, у которого дефицит GCH1 не был обнаружен по программе скрининга ФКУ у новорожденных. Характерный клинический фенотип развился в возрасте 5 месяцев: повышенный уровень фенилаланина в плазме, не выявляемый уровень птерина в моче, и отсутствие активности фермента GCH1 в биоптате печени. Задержка развития впервые отмечена у пациента в возрасте 4 месяцев. В это время, проявились неврологические признаки в виде генерализованной гипотонии и клонических движений. Через 4,5 месяца, экспертиза показала задержку общего развития с генерализованной гипотонией и появления дистонических Паркинсоно-подобных движений с широким размахом, тремора, особенно верхних конечностей и головы. Пациенту в 9-месячном возрасте была начата заместительная терапия BH4 и нейромедиаторами и отменена диета с низким уровнем фенилаланина. Через

месяц наблюдалось снижение насильственного тремора и дистонических движений, но персистировала аксиллярная гипотония. В 15-месячном возрасте, после того как пациент подвергся терапии в течение 6 месяцев, слабая аксиллярная (осевая) гипотония персистировала, но насильственный тремор и дистонические движения полностью исчезли. Лечение препаратами L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана использовалось для контроля уровней нейротрансмиттеров в спинномозговой жидкости.

### **Молекулярная генетика**

#### **ВН4 –дефицитная Гиперфенилаланинемия В**

У младенца мальчика НРА с дефицитом активности GCH1, Blau et al. (1995) определили гомозиготную мутацию в гене GCH1 (600225,0017). У девочки младенца с ВН4-дефицитной НРА, Ichinose соавт. (1995) определили гомозиготную мутацию в гене GCH1 (600225,0020).

*Аутосомно-рецессивный Дофа-чувствительные дистонии с или без гиперфенилаланинемии* Furukawa и др. (1998), Hwu соавт. (1999) и Furukawa и др. (1998), Hwu соавт. (1999), и Nardocci др. (2003) определили гомозиготные или составные гетерозиготные мутации у пациентов с дофа-чувствительной дистонией с или без гиперфенилаланинемии (и 600225,0022), и например, (600225,0010, 600225,0016 и 600225,0022).

У hph1 мышей, с проявлениями гиперфенилаланинемии и снижением активности ГТФ-циклогидролаза I, (McDonald и соавт., 1988) Хайленд и др. (2003) обнаружили низкие уровни ВН4, катехоламинов, серотонина и их метаболитов в мозге, вместе с низким уровнем тирозингидроксилазы внутри стриатума. Эти данные схожи с нейрохимическими данными у больных людей с мутациями в гене GCH1, hph1 мыши, по-видимому, является хорошей модельной системой дефицита GCH1.

ГТФ- циклогидролаза I (EC 3.5.4.16) катализирует превращение ГТФ в D-эритро-7,8- дигидронеоптеринтрифосфат, первую и лимитирующую стадию биосинтеза тетрагидробиоптерина (ВН4). Тетрагидробиоптерин является необходимым кофактором для 3 монооксигеназ ароматических аминокислот: гидроксилаз фенилаланина, тирозина и триптофана. Животные могут синтезировать тетрагидробиоптерин *in vivo* из ГТФ в несколько этапов ферментативных реакций.

Ichinose др. (1995) установлено, что оба гена GCH1 мыши и человека содержат 6 экзонов. Bandmann др. (1966) охарактеризовали экзон-интронные границы гена GCH1, которые они обозначили символами (GTPCH). Используя гибриды соматических клеток, Ichinose et al. (1994) картировали ген GCH1 человека на 14 хромосоме. С помощью метода флюоресцентной *in situ* гибридизации они определили местоположения гена в локусе 14q22.1-q22.2. Thony et al. (1995), также картировали ген GCH1 в этом локусе 14q22.1-q22.2 при *in situ* гибридизации.

#### **Аутосомно-рецессивная ДОФА-чувствительная дистония с или без гиперфенилаланинемии**

Furukawa и др.. (1998) описали фенотип, который они назвали «дистония с моторной задержкой», строго промежуточный между тяжелым аутосомно-рецессивным



фенотипом гиперфенилаланинемии с дефицитом неоптерина и мягкой формой Segawa дистонии – паркинсонизмом с суточными колебаниями (DYT5; 128230). В этом промежуточном фенотипе отмечается задержка двигательной активности, но не было задержки умственного развития и только минимальная, если имеется, гиперфенилаланинемия. Фурукава и др. (1998) сообщили о 6-летней девочке с дистонией со снижением моторики, у которой был найден компаунд гетерозиготности для 2 мутаций в гене GCH1 (600225,0010; 600225,0011). Материнская аллель была также найдена у бабушки и прабабушки по материнской линии, все они имели прогрессирующую дистонию с суточными колебаниями. Вторая мутация была унаследована от ее отца, носителя мутации без проявлений каких-либо симптомов. Пробанд оказался чувствительным к лечению тетрагидробиоптеринем и леводопой. Второй, неродственный 17-летний мужчина с дистонией с задержкой моторики также имел соединение гетерозиготных мутаций по гену GCH1 (+600225,0012; 600225,0013). Он не мог ходить до 4 летнего возраста, в то время как речь была нормальной за исключением легкой дизартрии. В возрасте от 4 до 6 лет, предварительно приобретенные, моторные и речевые функции у пациента ухудшились, и впоследствии движения стали ограниченными до необходимости передвижения на инвалидной коляске и наступила немота.

Hwu др. (1999) описал девушку с прогрессирующей дофа-чувствительной дистонией с суточными колебаниями начиная с 2 лет и 8 месяцев. В плазме содержание фенилаланина было нормальным. Генетический анализ выявил гомозиготную мутацию в гене GCH1 (R249S; 600225,0016). Оба здоровых родителя были гетерозиготными носителями по этой мутации. Эти данные позволяют предположить, у пациентов с рецессивной мутацией в гене GCH1 не обязательно выявляется ГФА, хотя у них могут развиваться двигательные расстройства. Nardocci и соавт. (2003) сообщили о монозиготных близнецах – девочках с суточными колебаниями ригидности и тремора в конечностях с первых месяцев жизни, ассоциированные с гомозиготной мутацией в гене GCH1 (P199A; +600225,0022). Одна из девочек также имела пролонгированные генерализованные дистонические спазмы, с опистотонусом, гипервытяжением (hyperextension) нижних конечностей, и гиперраспростертыми (hyperpronation) руками также с суточными колебаниями. Когнитивное (познавательное) развитие было нормальным. В возрасте 6 месяцев, девочки с нормальными когнитивными способностями отставали в развитии моторных функций, наблюдалась ригидность, беспорядочные и аритмические гиперкинезы, вовлекающие конечности, и симметричная гиперрефлексия без ответов подошвенных разгибателей. Результаты лабораторных анализов были в норме, и не было гиперфенилаланинемии. Лечение L-ДОФА привело к заметному клиническому улучшению, и обе девочки имели почти нормальный неврологический статус при обследовании в 15 лет, за исключением незначительной гиперрефлексии и IQ на нижней границе нормы. Никто из родителей не имел никаких признаков или симптомов, предполагающих дефицит GCH1.

Nardocci др., (2003) интерпретируют найденные признаки как более широкий клинический фенотип, ассоциированный с рецессивными мутациями GCH1, включающий пациентов с неонатальной атакой на двигательные функции с расстройствами движения без гиперфенилаланинемии

### **Аутосомно-доминантная ДОФА-чувствительная дистония**

По данным многих исследований семейных случаев аутосомно-доминантных дофа-чувствительных дистоний выявлено множество гетерозиготных мутаций в гене GCH1, которые могут быть миссенс-мутациями, с заменой одной пары нуклеотидов в кодирующей области гена, однонуклеотидные и протяженные делеции, которые приводят к нарушению рамок считывания информации и появлению мутантных усеченных форм с потерей ферментативной функции. У пострадавших членов 4 семей с аутосомно-доминантной дофа-чувствительной дистонией (DRD) (DYSTONIA 5; DYT5; 128230), Ichinose др. (1994) идентифицировали 4 гетерозиготные мутации в гене GCH1 (600225,0001- +600225,0004). Среди 36 случаев дофамин-чувствительных дистоний, в том числе 33 случаев из 9 британских семей и 3 спорадических случаев, Bandmann соавт. (1996) определили 6 новых точечных мутаций в гене GCH1. В 4 семьях и в 2 спорадических случаях, никаких мутаций выявлено не было, что свидетельствует о генетической гетерогенности. Skrygan др.(2001) идентифицировали 4 различные мутации в гене GCH1 (смотри, например, +600225,0019) в 6 из 33 семей с дофа-чувствительной дистониями. Hagenah др. (2005), определили мутации в гене GCH1 у 20 (87%) из 23 неродственных индивидуумов с дофа-чувствительными дистонией. Два пациента имели большие делеции более чем 1 экзон, которые были обнаружены только с помощью количественного ПЦР тестирования. Hagenah др. (2005), сообщили, что 85 различных мутаций в гене GCH1 зарегистрировано.

Steinberger др. (2007) использовали множественные лиганд-зависимые зонды амплификации (MLPA) для исследования экзонов 1, 2, 3, 5 и 6 гена GCH1 у пострадавших членов 3 неродственных семей с DRD, которые не имели одиночных замен пар оснований. Авторы выделили три различные большие гетерозиготные GCH1 делеции, в том числе делецию всего гена (+600225,0021). Результаты показали, что DRD, скорее всего гаплонедостаточность гена GCH1, чем доминантно-негативный эффект мутации. У всех пациентов наблюдали характерные признаки и симптомы DRD.

**Гаплотип** (сокр. от «гаплоидный генотип») – совокупность аллелей на локусах одной хромосомы, обычно наследуемых вместе. Если же при кроссинговере комбинация аллелей меняется (что происходит очень редко), говорят о возникновении нового **гаплотипа**.

### **Генотип / фенотип корреляции**

Дофа-респонсивная дистония доминирует у женщин в соотношении 4:1. Ichinose и соавт. (1994) обнаружили, более высокую активность GTP-циклогидролазы I у мужчин, чем у женщин, как возможное объяснение разницы в частоте заболевания. Суточные колебания, которые характерны для этого заболевания можно объяснить сравнительно коротким периодом полураспада ВН4. Пациенты с гетерозиготными мутациями в гене GCH1 могут синтезировать ВН4 с низкой скоростью, которая недостаточно высока, чтобы компенсировать потребление кофактора в течение дня, что приводит к обострению симптомов к вечеру. Hirano и др. (1997) изучали мутацию в гене GCH1, предполагая, что ненормальный полипептид, кодируемый мутантной РНК, взаимодействует с полипептидом дикого типа,

генерирует нефункциональные гетеромультимеры. Они объясняют более частое проявление DYT5 у женщин, чем у мужчин более высокими исходными уровнями фермента у мужчин.

Мюллер и др. (1998) отразили в таблице 29 разных мутаций в гене GCH1 у пациентов с дофа-чувствительной дистонией. Большинство мутаций приводили к усечению фермента, за счет образования стоп кодона, мутаций со сдвигом рамки, или ненормального сплайсинга. Пациенты, которые были гетерозиготами по GCH1 мутации, страдали дофа-чувствительной дистонией, в то время как у индивидуумов, которые были гомозиготами или компаунд гетерозиготами по GCH1 мутациям, развивалась гиперфенилаланинемия с дефицитом дофамина и серотонина. Авторы пришли к выводу, что аутомно-доминантная дофа-чувствительная дистония, вероятно, является не просто образцом гаплонедостаточности фермента, потому, что пациенты с DYT5 имели содержание фермента примерно 20% от нормы чаще, чем ожидаемые 50%.

Tamaqi и др. (1998) изучили ген GCH1 и клинические особенности течения заболевания у 8 пациентов из 6 семей с наследственной прогрессирующей дистонией, с выраженными суточными колебаниями дофа-чувствительной дистонии. Три независимых GCH1 мутации были найдены у 3 больных. Один из пациентов и его мать, без симптомов заболевания, были гетерозиготами по новой мутации в иницирующем кодоне. Три пациента с разнородными GCH1 мутациями показали сходные клинические особенности, в том числе изолированную дистонию конечностей, прогрессирующую в генерализованную дистонию, суточные колебания симптомов, и благоприятный ответ на леводопу. Остальные 5 пациентов с нормальными последовательностями нуклеотидов в гене GCH1 имели несколько признаков, не проявляющихся у 3 пациентов с мутациями.

У больных членов японской семьи с наследственной прогрессирующей дистонией с суточными колебаниями, но без мутаций в кодирующей области или в сплайсинговых стыках гена GCH1, Inagaki и соавт. (1999) количественно определили уровни мРНК GCH1 в фитогемагглютинин-стимулированных мононуклеарных клетках. Они обнаружили, что количество мРНК GCH1 было снижено до 40% от нормального уровня у больных и носителей. Кроме того, они обнаружили, что GCH1 мРНК транскрибируется только с одного аллеля, что указывает на инактивированное состояние другого аллеля. Эти результаты свидетельствуют о том, что существуют некоторые новые мутации на 1 из аллелей в неизвестном области гена GCH1, и они могут снизить уровень мРНК GCH1, в результате чего проявляются признаки болезни.

Среди 58 пациентов с дофа-чувствительной дистонией, Steinberger (Штейнбергер) др. (2000), идентифицировали мутации в гене GCH1 у 30 индивидуумов из 22 семей. Тринадцать из мутаций были семейные, 3 произошли заново, и наследование не могло быть определено в 6 случаях. Четыре новые мутации были выявлены, в том числе, миссенс мутация, мутация со сдвигом рамки, и 2 интронные мутации, затрагивающие донорный сайт сплайсинга. Так как терапевтические дозы L-DOPA были одинаковые у пациентов с или без мутаций в гене GCH1, авторы предположили, что фенотип может быть вызван другими генами, вовлеченными в синтез дофамина.

Среди 168 кавказского типа взрослых, Tegeder и соавт. (2006) обнаружили, что GCH1 гаплотип (аллельная частота 15%), снижающий содержание фермента, был

в значительной степени связан с уменьшением после дискэктомии персистирующих корешковых болей в пояснице. Здоровые люди, гомозиготные по данному гаплотипу, проявляли сниженную болевую чувствительность, и имели снижение регуляции активности гена GCH1 по сравнению с контрольной группой в стимулированных иммортализованных лейкоцитах носителей гаплотипа. Основываясь на этих выводах и моделях грызунов, Tegeder соавт. (2006) пришли к выводу, что изменения концентрации ВН4 и активности гена GCH1 приводят к изменению болевой чувствительности и ее восприимчивости.

### **Животная модель**

Hph1 мыши являются животной моделью гиперфенилаланинемии (ГФА) и снижения активности ГТФ циклогидролазы I (McDonald и соавт., 1988). Bode и соавт. (1988) показали, что ген Hph1 мыши тесно связан с геном нуклеозид фосфорилазы (PNP; 164050) на хромосоме 14. Этот регион имеет гомологию с участком хромосомы человека 14, содержащей гены GCH1 и PNP. Ichinose др. (1995) картировали GCh ген мыши в области C2-C3 хромосомы 14 с помощью *in situ* гибридизации. Montanez и McDonald (1999) показали связь между мутацией hph1 и Gch локусом на хромосоме 14 мыши и поддерживают использование мутанта hph1 мыши, как модельной системы для человеческого ГТФ циклогидролаза I дефицита. Hyland и др. (2003) обнаружили, что мыши hph1 имеют низкий уровень ВН4, катехоламинов, серотонина и их метаболитов в мозге, а также низкий уровень тирозингидроксилазы в полосатом теле. Эти показатели имеют сходство с нейрхимическими данными у пациентов с мутациями в гене GCH1, и это позволяет предполагать, что hph1 мыши является хорошей модельной системой дефицита GCH1.

В моделях грызунов с нейропатической и воспалительной болью, Tegeder др. (2006) обнаружили увеличение ВН4 в результате позитивной регуляции или повышенной активности фермента Gch1. Торможение синтеза ВН4, путем блокирования активности Gch1, привело к ослаблению боли и предотвращало повреждение нерва избытком оксида азота, в то время как действие ВН4 усиливало боль.

### **Литература**

1. Bandmann, O., Nygaard, T. G., Surtees, R., Marsden, C. D., Wood, N. W., Harding, A. E. Dopa-responsive dystonia in British patients: new mutations of the GTP-cyclohydrolase I gene and evidence for genetic heterogeneity. *Hum. Molec. Genet.* 5: 403-406, 1996. [PubMed: 8852666, related citations] [Full Text: HighWire Press]
2. Blau, N., Ichinose, H., Nagatsu, T., Heizmann, C. W., Zacchello, F., Burlina, A. B. A missense mutation in a patient with guanosine triphosphate cyclohydrolase I deficiency missed in the newborn screening program. *J. Pediat.* 126: 401-405, 1995. [PubMed: 7869202, related citations] [Full Text: Elsevier Science]
3. Bode, V. C., McDonald, J. D., Guenet, J.-L., Simon, D. Hph-1: a mouse mutant with hereditary hyperphenylalaninemia induced by ethylnitrosourea mutagenesis. *Genetics* 118: 299-305, 1988. [PubMed:3360305, related citations] [Full Text: HighWire Press]
4. Furukawa, Y., Kish, S. J., Bebin, E. M., Jacobson, R. D., Fryburg, J. S., Wilson, W. G., Shimadzu, M., Hyland, K., Trugman, J. M. Dystonia with motor delay in compound heterozygotes for GTP-cyclohydrolase I gene mutations. *Ann. Neurol.* 44: 10-16, 1998. [PubMed: 9667588, related citations]

5. Hagenah, J., Saunders-Pullman, R., Hedrich, K., Kabakci, K., Habermann, K., Wiegers, K., Mohrmann, K., Lohnau, T., Raymond, D., Vieregge, P., Nygaard, T., Ozelius, L. J., Bressman, S. B., Klein, C. High mutation rate in dopa-responsive dystonia: detection with comprehensive GCH1 screening. *Neurology* 64: 908-911, 2005. [PubMed:15753436, related citations] [Full Text: HighWire Press]
6. Hirano, M., Imaiso, Y., Ueno, S. Differential splicing of the GTP cyclohydrolase I RNA in dopa-responsive dystonia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234: 316-319, 1997. [PubMed: 9177267, related citations] [Full Text:Elsevier Science]
7. Hwu, W.-L., Wang, P.-J., Hsiao, K.-J., Wang, T.-R., Chiou, Y.-W., Lee, Y.-M. Dopa-responsive dystonia induced by a recessive GTP cyclohydrolase I mutation. *Hum. Genet.* 105: 226-230, 1999. [PubMed: 10987649, related citations] [Full Text: Springer]
8. Hyland, K., Gunasekara, R. S., Munk-Martin, T. L., Arnold, L. A., Engle, T. The hph-1 mouse: a model for dominantly inherited GTP-cyclohydrolase deficiency. *Ann. Neurol.* 54: S46-S48, 2003. [PubMed: 12891653,related citations] [Full Text: John Wiley & Sons, Inc.]
9. Ichinose, H., Ohye, T., Matsuda, Y., Hori, T., Blau, N., Burlina, A., Rouse, B., Matalon, R., Fujita, K., Nagatsu, T. Characterization of mouse and human GTP cyclohydrolase I genes: mutations in patients with GTP cyclohydrolase I deficiency. *J. Biol. Chem.* 270: 10062-10071, 1995. [PubMed: 7730309, related citations] [Full Text: HighWire Press]
10. Ichinose, H., Ohye, T., Takahashi, E., Seki, N., Hori, T., Segawa, M., Nomura, Y., Endo, K., Tanaka, H., Tsuji, S., Fujita, K., Nagatsu, T. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. *Nature Genet.* 8: 236-242, 1994. [PubMed: 7874165, related citations] [Full Text:Nature Publishing Group]
11. Inagaki, H., Ohye, T., Suzuki, T., Segawa, M., Nomura, Y., Nagatsu, T., Ichinose, H. Decrease in GTP cyclohydrolase I gene expression caused by inactivation of one allele in hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260: 747-751, 1999. [PubMed: 10403837,related citations] [Full Text: Elsevier Science]
12. McDonald, J. D., Cotton, R. J. H., Jennings, I., Ledley, F. D., Woo, S. L. C., Bode, V. C. Biochemical defect of hph-1 mouse mutant is a deficiency in GTP-cyclohydrolase activity. *J. Neurochem.* 50: 655-657, 1988. [PubMed: 3335865, related citations]
13. Muller, U., Steinberger, D., Nemeth, A. H. Clinical and molecular genetics of primary dystonias. *Neurogenetics* 1: 165-177, 1998. [PubMed: 10737119, related citations] [Full Text: Springer]
14. Nardocci, N., Zorzi, G., Blau, N., Alvarez, E. F., Sesta, M., Angelini, L., Pannacci, M., Invernizzi, F., Garavaglia, B. Neonatal dopa-responsive extrapyramidal syndrome in twins with recessive GTPCH deficiency. *Neurology* 60: 335-337, 2003. [PubMed:12552057, related citations] [Full Text: HighWire Press]
15. Naylor, E. W., Ennis, D., Davidson, A. G. F., Wong, L. T. K., Applegarth, D. A., Niedewieser, A. Guanosine triphosphate cyclohydrolase I deficiency: early diagnosis by routine urine pteridine screening. *Pediatrics* 79: 374-378, 1987. [PubMed:3822637, related citations]
16. Niedewieser, A., Blau, N., Wang, M., Joller, P., Atares, M., Cardesa-Garcia, J. GTP cyclohydrolase I deficiency, a new enzyme defect causing hyperphenylalaninemia with neopterin, biopterin, dopamine, and serotonin deficiencies and muscular hypotonia. *Europ. J. Pediat.* 141: 208-214, 1984. [PubMed: 6734669, related citations]
17. Niedewieser, A., Ponzzone, A., Curtius, H.-C. Differential diagnosis of tetrahydrobiopterin deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* 8 (suppl. 1): 34-38, 1985.
18. Skrygan, M., Bartholome, B., Bonafe, L., Blau, N., Bartholome, K. A splice mutation in the GTP cyclohydrolase I gene causes dopa-responsive dystonia by exon skipping. *J. Inherit. Metab. Dis.* 24: 345-351, 2001. [PubMed:11486899, related citations] [Full Text: Springer]
19. Steinberger, D., Korinthenberg, R., Topka, H., Berghauser, M., Wedde, R., Muller, U. Dopa-

responsive dystonia: mutation analysis of GCH1 and analysis of therapeutic doses of L-dopa. *Neurology* 55: 1735-1737, 2000. [PubMed: 11113234, related citations] [Full Text: HighWire Press]

20. Steinberger, D., Trubenbach, J., Zirn, B., Leube, B., Wildhardt, G., Muller, U. Utility of MLPA in deletion analysis of GCH1 in dopa-responsive dystonia. *Neurogenetics* 8: 51-55, 2007. Note: Erratum: *Neurogenetics* 8: 69 only, 2007. [PubMed: 17111153, related citations] [Full Text: Springer]

21. Tamaru, Y., Hirano, M., Ito, H., Kawamura, J., Matsumoto, S., Imai, T., Ueno, S. Clinical similarities of hereditary progressive/dopa responsive dystonia caused by different types of mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 64: 469-473, 1998. [PubMed: 9576537, related citations] [Full Text: HighWire Press]

22. Tegeder, I., Costigan, M., Griffin, R. S., Abele, A., Belfer, I., Schmidt, H., Ehnert, C., Nejm, J., Marian, C., Scholz, J., Wu, T., Allchorne, A., and 14 others. GTP cyclohydrolase and tetrahydrobiopterin regulate pain sensitivity and persistence. *Nature Med.* 12: 1269-1277, 2006. [PubMed: 17057711, related citations] [Full Text: Nature Publishing Group]

23. Thony, B., Heizmann, C. W., Mattei, M.-G. Human GTP-cyclohydrolase I gene and sepiapterin reductase gene map to region 14q21-q22 and 2p14-p12, respectively, by in situ hybridization. *Genomics* 26: 168-170, 1995. [PubMed: 7782081, related citations] [Full Text: Elsevier Science]

## 18.5. Нарушение обмена тирозина

Обмен тирозина происходит несколькими путями. В случае недостаточного преобразования тирозина в гомогентизиновую кислоту (см. рисунок 18.1, схема), что может быть обусловлено дефектом различных ферментов, тирозин накапливается в крови и выводится с мочой. Это нарушение называется тирозинозом и сопровождается печеночной и почечной недостаточностью и ранней смертью ребенка или лишь задержкой психомоторного развития. Если нарушение обмена тирозина происходит в момент окисления гомогентизиновой кислоты (см. схему), развивается алкаптонурия. Фермент, окисляющий гомогентизиновую кислоту (гомогентизиноксидаза), образуется в печени. В норме он настолько быстро разрывает ее гидрохиноновое кольцо, что кислота “не успевает” попасть в кровь, а если и попала, то быстро выделяется почками. В случае наследственного дефекта этого фермента гомогентизиновая кислота в большом количестве накапливается в крови и моче. Моча больных алкаптонурией на воздухе или после добавления щелочи становится черной. Это объясняется окислением гомогентизиновой кислоты кислородом воздуха и образованием в ней алкаптона (от лат. *alcapton* – захватывающий щелочь). Гомогентизиновая кислота с током крови поступает в ткани – хрящевую, сухожилия, связки, внутренний слой стенки аорты, вследствие чего образуются темные пятна в области ушей, носа, щек, на склерах. Алкаптон делает хрящи и сухожилия хрупкими, что иногда приводит к тяжелым изменениям в суставах. Также тирозин – это исходный продукт для образования пигмента меланина, содержащегося в коже и волосах. Если преобразование тирозина в меланин замедленно вследствие наследственного дефицита тирозиназы (см. схему), возникает *альбинизм*, который сопровождается повышением чувствительности кожи к солнечному свету и нарушением зрения. И наконец, тирозин является предшественником тироксина. В случае недостаточного синтеза фермента, который катализирует взаимодействие тирозина со свободным йодом, нарушается образование гормонов щитовидной железы.

## Тирозинемия

Тирозинемия была впервые описана дерматологом Г. Рихтером в 1938 году. Другой ученый Е. Хангарт в 1947 году выделил характерную триаду признаков этого заболевания: поражение кожи, глаз и умственную отсталость.

### Тирозинемия I Типа (Тирозиноз): Общие Сведения

Болезнь вызывается дефектом в гене, ответственном за синтез одного из ферментов, вовлеченных в деградацию тирозина – фумарилацетоацетатгидролазы (FAN; fumarylacetoacetate hydrolase, E.C.3.7.1.2.), – осуществляющей гидролиз фумарилацетоацетата (последней реакции в цепи катаболического распада тирозина, [Goldsmith L.A., 1989]) и малеилацетоацетатгидролазы. Ген фумарилацетоацетатгидролазы (FAN) человека локализован на длинном плече хромосомы 15 в позиции 15q23-q25. Ген фумарилацетоацетатгидролазы человека протяженностью около 30 килобаз состоит из 14 экзонов (Awata H., 1994; Labelle Y., 1993b).

Это довольно редкое заболевание, его частота – 1:100000 новорожденных. Однако в северном изоляте Французской Канады (Квебек), а также в Скандинавских странах частота тирозинемии I типа повышена до 1:1846 и 1:50000, соответственно.

При острой форме в первые недели жизни наблюдается нарушение общего состояния, остановка веса, рвота, диарея, увеличение живота, гепатоспленомегалия, дыхательные расстройства, склонность к кровотечениям, отеки, асцит, признаки рахита, мышечная гипотония, задержка психомоторного развития. Отмечается характерный запах мочи («кипящей капусты»). В крови регистрируется альфа-фетопротейн, гипопропротеинемия, гипербилирубинемия, снижение концентрации протромбина. Характерны гипераминоацидемия и гипераминоацидурия с преобладанием тирозина, фенилаланина и метионина. Выявляются нарушения минерального обмена, снижение содержания фосфора в крови и увеличение его выведения с мочой, гиперкальциурия.

Морфологически определяются фиброз и цирроз печени, иногда гепатома со злокачественным перерождением, гипертрофия островков Лангерганса поджелудочной железы, кардиомиопатии. Течение заболевания тяжелое, обычно заканчивающееся летально в детском возрасте.

Хроническая тирозинемия характеризуется сходными, но более умеренно выраженными симптомами; летальный исход наступает в возрасте примерно в 10 лет. Содержание тирозина в плазме повышается до 6-12 мг/100 мл, повышено содержание и некоторых других аминокислот, особенно метионина. Лечение включает диету с пониженным содержанием тирозина и фенилаланина, в ряде случаев и метионина. Назначение диеты несколько улучшает состояние больных. В некоторых случаях возможна трансплантация печени.

В последние годы развивается генная терапия наследственных дефектов человека. В 1995 году была опубликована работа по переносу гена фумарилацетоацетатгидролазы человека в фибробласты больных тирозинемией I типа

В 1996 году в модельных опытах на мышах продемонстрировано эффективное применение генной терапии на печени, которое может быть использовано и в отношении больных тирозинемией I типа. В гепатоциты FAN (-) мышей был трансдуцирован ген FAN путем ретровирусной инфекции. Отобранные рекомбинатные FAN(+) гепатоциты

были инъецированы в печень мышей с тирозинемией. Как показали исследования, у данных мышей полностью восстанавливалась ФАН активность в печени (Overturf K., 1996).

### **Тирозинемия II Типа: Общие Сведения**

Тирозинемия II типа ауtosомно-рецессивное наследственное заболевание, обусловленное недостаточностью или отсутствием фермента тирозинаминотрансферазы.

Тирозинемия типа II (синдром Ричнера-Ханхарта, МIM 276600), наследственная недостаточность тирозинтрансаминазы печени, связана с нарушением обмена ароматической аминокислоты – тирозина вследствие блокирования процесса трансаминирования тирозина и перевода его в парагидроксифенилпировиноградную кислоту. Клинические проявления включают повышенное содержание тирозина в плазме (4-5 мг/100 мл), характерные поражения глаз и кожи. Отмечались также случаи членовредительства, нарушения тонкой координации движений. Тирозинемия типа II проявляется также судорожным синдромом, расстройством дыхания, недостаточной пигментацией кожи, иногда умеренной задержкой умственно-психического развития. У больных отмечаются гиперкератозы ладоней и ступней в первые месяцы жизни, эрозия роговицы, ведущая к ее помутнению. Внутриклеточная кристаллизация тирозина инициирует воспалительные процессы. Улучшение общего состояния больных достигается назначением диеты с ограничением фенилаланина и тирозина.

Ген TAT, кодирующий тирозинаминотрансферазу, локализован на длинном плече 16 хромосомы человека в позиции 16q22.1-22.3 и 8 хромосоме у мыши [Natt E., 1986; Barton D.E., 1986].

К настоящему времени в TAT-гене человека выявлено 10 нуклеотидных замещений, представляющих собой 4 missense мутации, 4 терминирующие мутации и 2 сплайсинговые мутации. Описана тирозинемия II типа, обусловленная делецией обеих аллелей гена тирозинаминотрансферазы [Natt E., 1987].

### **Литература**

1. Goldsmith L.A., Laberge C. Tyrosinemia and related disorders. – The metabolic basis of inherited diseases, 6-th ed. Eds. Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.L., Valle D. McGraw-Hill, New York, 1989, p. 547-562.
2. Awata H., Endo F., Tanoue A., Kitano A., Nakano Y., Matsuda I. Structural organization and analysis of the human fumarylacetoacetate hydrolase gene in tyrosinemia type 1. – Biochim.Biophys. Acta, 1994, v. 1226, p. 168-172.
3. Labelle Y., Phaneuf D., Leclerc B., Tanguay R.M. Characterization of the human fumarylacetoacetate hydrolase gene and identification of a missense mutation abolishing enzymatic activity. – Hum.Mol.Genet., 1993, v. 2, p. 941-946.
4. Overturf K., Al-Dhalimy M., Tanguay R., Brantly M., Ou C.N., Finegold M., Grompe M. Hepatocytes corrected by gene therapy are selected in vivo in a murine model of hereditary ty-rosinemia type 1. – Nat.Genet., 1996, v. 12, p. 266-273.
5. Natt E., Kao F.T., Rettenmeier R., Scherer G. Assignment of the human tyrosine aminotransferase gene to chromosome 16. – Hum.Genet., 1986, v. 72, p. 225 – 228.
6. Barton D.E., Yang-Feng T.L., Franche U. The human tyrosine aminotransferase gene mapped to the long arm of chromosome 16 (region 16 q22 – q24) by somatic cell hybrid analysis and in situ hybridization. – Hum.Genet., 1986, v. 72, p. 221 – 224.



7. Natt E., Westphal E-M., Toth-Fejel S.E., et al. Inherited and de novo deletion of the tyrosine aminotransferase locus at 16 q22.1 – q.22.3 in a patient with tyrosinemia type II. - Hum.Genet., 1987, v. 77, p. 352-358.

## 18.6. Алкаптонурия

Впервые описал заболевание Скрибониус (Scribonius) в 1584 году. В 1859 году Бедкер (С.Н.Boedeker) назвал алкаптоном вещество, содержащееся в моче и обуславливающее потемнение мочи при соприкосновении с воздухом в результате окисления гомогентизиновой кислоты, приводящее к образованию темного пигмента – алкаптона (Vilboux и соавт., 2009). Данное заболевание относится к «врожденным нарушениям обмена веществ». Этот термин впервые употребил Арчибальд Гаррод в начале XX века [Garrod A., 1902, Garrod A., 1908]. Основная концепция патогенеза таких расстройств была развита Гарродом на основании изучения редкого заболевания алкаптонурии. Phornphutkul и др.. (2002) представили обзор естественной истории алкаптонурии в год празднования сотой годовщины описания этой патологии Гарродом, как патологии, соответствующей принципам менделевского аутосомно-рецессивного типа наследования [Гаррод, 1902].

Алкаптонурия наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Диагностических методов выявления гетерозигот в настоящее время нет.

Алкаптонурия (alkaptonuria; MIM 203500)– наследственное метаболическое нарушение, вызванное нарушением обмена тирозина, характеризующееся экскрецией с мочой большого количества (до 4-8 г и более в сутки) гомогентизиновой кислоты (2,5-дигидрофенилуксусной кислоты). Алкаптонурия обусловлена недостаточностью фермента оксидазы гомогентизиновой кислоты (гомогентизиназы, homohentisate 1,2 dioxygenase; E.C.1.13.11.5). Ген оксидазы гомогентизиназы (HGD-ген гомогентизиназы, 54363 пар оснований) локализован на длинном плече 3 хромосомы человека (локус 3q 21-23 или 3q13.33) (Pollak M.R., 1993; Janocha S., 1994; Fernandez-Canon J.M., 1996). HGD-ген кодирует транскрипт из 1715 нуклеотидов; состоит из 14 интронов (от 35 до 360 нуклеотидов) и 13 экзонов (от 605 до 17687 нуклеотидов) (Granadino V., 1997). В норме гомогентизиновая кислота образуется как промежуточный продукт в процессе обмена фенилаланина и тирозина. В дальнейшем гомогентизиновая кислота в тканях печени ферментативно расщепляется до фумаровой и ацетоуксусной кислот.

В 1958 году La Du показал, что в печени больных алкаптонурией отсутствует гомогентизиназа, недостаток которой приводит к тому, что метаболизм тирозина блокируется на уровне гомогентизиновой кислоты. Поздним проявлением алкаптонурии (чаще после 30 лет) является отложение темного пигмента (продукта окисления гомогентизиновой кислоты) в хрящах, почках, надпочечниках, щитовидной, поджелудочной, предстательной железах, придатках яичка. Может наблюдаться темное окрашивание склер и хрящей, близко расположенных к коже (ушных раковин, крыльев носа). Отложение пигмента наблюдается и в сердечной мышце, клапанах сердца, эндотелии сосудов. В связи с поражением хрящей суставов после 20-30 лет жизни и позже развивается их деформация. Чаще поражаются большие суставы – плечевые, коленные, а также позво-

ночник. Прогноз заболевания для жизни благоприятный, специфической терапии нет.

У пациентов с алкаптонурией Фернадес-Canon и др.. (1996), выявили миссенс мутации в гене 1,2-диоксигеназы гомогентизиновой кислоты, которые косегрегировали с болезнью (607474,0001, 607474,0002), и по крайней мере одна из этих миссенс мутаций приводит к потере функции фермента. Vilboux и др.. (2009) представили подробное описание ранее опубликованных HGD мутаций, связанных с АКУ, и вновь выявленных 52 вариантов мутаций гена у 93 дополнительно обследованных пациентов. Двадцать две новые мутации были описаны, в общей сложности 91 мутационных вариантов гена HGD, связанных с нарушениями функций фермента, идентифицировано. Большинство мутаций произошло в экзонах 3, 6, 8 и 13 гена HGD. Зарегистрировано свыше 600 случаев заболевания, частота заболевания оценивается от 2-х до 5-ти случаев на миллион новорожденных, по данным разных авторов колеблется от 1:100000 до 1:10000000. По данным Vilboux др.. (2009) алкаптонурия встречается с частотой 1 случай на 250 000 – 1 миллион человек по всему миру.

#### **Литература**

1. Garrod A. The incidence of alkaptonuria: a study in clinical individuality. – The Lancet, 1902, v. 2, p. 1616-1620.
  2. Garrod A. The Croonian lectures on inborn errors of metabolism. Lecture II. Alkaptonuria. – The Lancet, 1908, v. 2, p. 73-79.
  3. Pollak M.R., Chou Y-H.W., Cerda J.J., Steinmann B., La Du B.N., Seidmann J.G., Seidmann C.E., Homozygosity mapping of the gene for al- kaptonuria to 3q2. – Nature Genet., 1993, v. 5, p. 201-204.
  4. Janocha S., Wolz W., Srsen S., Srsnova K., Montagutelli X., Guenet J-L., Grimm T., Kress W., Muller C.R. The human gene for al- kaptonuria (AKU) maps to chromosome 3q. – Genomics, 1994, v. 19, p. 5-8.
  5. Fernandez-Canon J.M., Grenadino B., Beltran-Valero de Bernabe D., Renedo M., Fernandez-Ruiz E., Penalva M.A., Rodriguez de Cordoba S. The molecular basis of alkaptonuria. – Nature Genet., 1997, v. 14, p. 19-24.
- Fernandez-Canon, J. M., Granadino, B., Beltran-Valero de Bernabe, D., Renedo, M., Fernandez-Ruiz, E., Penalva, M. A., Rodriguez de Cordoba, S. The molecular basis of alkaptonuria. Nature Genet. 14: 19-24, 1996. [PubMed: 8782815, related citations]
- Vilboux, T., Kayser, M., Introne, W., Suwannarat, P., Bernardini, I., Fischer, R., O'Brien, K., Kleta, R., Huizing, M., Gahl, W. A. Mutation spectrum of homogentisic acid oxidase (HGD) in alkaptonuria. Hum. Mutat. 30: 1611-1619, 2009. [PubMed: 19862842, images, related citations]

## **18.7. Альбинизм**

### **Глазо-кожный альбинизм первого типа (ГКА-1 типа)**

Ключевым ферментом в процессе образования меланина является тирозиназа, обеспечивающая гидроксирование тирозина в ДОФА. Дальнейшие превращения ДОФА идут двумя путями, что приводит к образованию двух типов меланина – эумеланина, дающего черное и коричневое окрашивание кожи и феомеланина, окрашивающего кожу в желтый и красный цвет. Важная роль в дифференцировке двух типов меланина принадлежит также нормальному функционированию рецептора меланоцитстимулирующего

гормона, а также процессов транспорта субстратов меланогенеза через мембрану меланосом. В зависимости от наличия или отсутствия тирозиназы в волосах и луковицах различают два основных типа альбинизма – тирозиназа-позитивный и тирозиназа-негативный. Кроме этого, в зависимости от генерализации процесса выделяют глазо-кожный и глазной альбинизм. Описано три типа глазо-кожного альбинизма, возникающих при снижении активности трех основных ферментов, участвующих в меланогенезе.

Тирозиназа (монофенол L-ДОФА; окислительная оксидоредуктаза; E.C.1.14.18.1) играет ключевую роль при синтезе меланина в меланоцитах [Prota G.,1980]. Она катализирует три реакции в цепи биосинтеза меланина:

1. гидроксирование L-тирозина, т.е. превращение тирозина в 3,4-диокси-фенилаланин (ДОФА, dopa)
2. окисление ДОФА в ДОФА-хинон;
3. окисление 5,6-диоксииндола в индол-5,6-хинон.

В 1991 году был выделен и секвенирован ген тирозиназы TYR человека размером более 50 килобаз, в составе которого 5 экзонов, кодирующих 529 аминокислот [Giebel L.B.,1991]. Ген локализован на длинном плече хромосомы 11 в позиции q14-q21 [Barton D.E.,1988]. У мыши ген тирозиназы (локус «с») локализован на 7 хромосоме [Kwon B.S.,1987].

В геноме человека выявлен сегмент на коротком плече 11 хромосомы 11p11.2-cen, содержащий только 4 и 5 экзоны гена тирозиназы с прилегающими нетранслируемыми областями. Данный участок обозначают «tyrosine-related segment».

Альбинизм – группа наследственных болезней, клинические проявления которых обусловлены отсутствием или уменьшением количества красящего вещества меланина в коже, волосах и структурах глаза больного. Таким образом, заболевание относится к группе болезней обмена, патогенез которых обусловлен дефицитом конечного продукта метаболизма фенилаланина и тирозина. Меланин продуцируется субпопуляцией клеток, называемых меланоцитами. В биосинтезе меланина в меланосомах действуют три основных фермента: тирозин-гидроксилаза (тирозидаза), ДОФА-хромтаутомераза (тирозидаза-связанный протеин второго типа – TRP 2), ДГИКК-оксидаза (тирозидаза-связанный протеин первого типа – TRP 1). Важную роль в обмене меланина играет и интегральный мембранный белок, осуществляющий транспорт тирозина и ионов через мембрану меланосом (P-белок).

### **Глазо-кожный альбинизм второго типа (ГКА-2 типа)**

**Ген ОСА 2**, кодирующий Р полипептид, локализован на длинном плече хромосомы 15 человека в позиции q11-q13 [Ramsay M.,1992]. В нем выявлено 28 случаев полиморфизма. Аналогичный ген у мыши (локус «р») локализован на 7 хромосоме [Rinčič E.M., 1993].

Локус гена ОСА-2 по протяженности составляет около 600 kb (Lee S.T., 1995) и состоит из 25 экзонов.

Первый экзон гена является некодируемым и содержит 5'нетранслируемую область мРНК. Иницирующий кодон трансляции лежит во втором экзоне, 195 нуклеоти-

де мРНК. В 5'нетранслируемой области идентифицировано 12 мотивов последовательностей, соответствующих сайтам связывания транскрипционных факторов.

Мутации гена ОСА 2, обуславливающие глазокожный аутосомно-рецессивный альбинизм, представлены миссенс, сплайсинговыми мутациями и делециями (см. <http://medbiol.ru/medbiol/pathology>, Табл. 13)

### **Глазо-кожный альбинизм третьего типа (ГКА-3 типа).**

#### **TYRP1 Ген: мутации и альбинизм (ОСА-3)**

Ген TYRP1 (TRP1) человека локализован на коротком плече хромосомы 9 в позиции р22-23, у мыши гомологичный ген (локус «brown b») локализован на хромосоме 4. Первоначально описанный в Нигерии, данный тип альбинизма связан с умеренной гипопигментацией кожи, волос и глаз, а также слабой глазной дисфункцией (MIM 203290).

Зарегистрированные к настоящему времени одна терминирующая мутация в кодоне 166 с заменой ТСА-ТГА и одна делеция А в кодоне 367 в гене TYRP1 (см. <http://medbiol.ru/medbiol/pathology>, Таблице 14). Этот вариант альбинизма появляется при снижении концентрации тирозиназа-связанного белка 1-го типа, ген которого локализован на хромосоме 9p23. Основная функция этого белка заключается в стабилизации активности тирозиназы и обеспечении начального этапа синтеза ДГИКК- меланина (коричневого эумеланина). Заболевание встречается достаточно редко и его клинические проявления сходны с таковыми при ГКА 1-го типа, однако, менее выражены. В волосах и коже новорожденного ребенка присутствует меланин и его количество может увеличиваться с возрастом. Больные загорают и имеют пигментные невусы. Поражение глаз значительно менее выражено, чем при ГКА 1- и 2-го типа.

#### **Альбинизм: Глазной альбинизм ОА1 (Nettleship-Falls тип)**

Форма глазного альбинизма (ОА1, ocular albinism) наследуется сцеплено с половой X хромосомой (X-linked recessive albinism, Nettleship-Falls type; MIM 300500). Ген ОА1 локализован на коротком плече X хромосомы в позиции Xp22.3 между локусами DXS143 и DXS85. Протяженность гена около 40 килобаз; он состоит из 9 экзонов и 8 интронов. Зарегистрированные к настоящему времени преимущественно различные миссенс-мутации, а также единичные сплайсинговые и терминирующие мутации, делеции и инсерции в гене ОА1. ОА1 альбинизм ассоциирован с умеренной кожной гипопигментацией в сочетании с гипопигментацией радужной оболочки и ретины, а также фотофобией, нистагмом и стабизмом.

#### **Литература**

1. Giebel L.B., Strunk K.M., Spritz R.A. Organization and nucleotide sequences of the human tyrosinase gene and a truncated tyrosinase-related segment. – *Genomics*, 1991, v. 9, p. 435-445.
2. Barton D.E., Kwon B.S., Francke U. Human tyrosinase gene, mapped to chromosome 11 (q14 – q21), defines second region of homology with mouse chromosome 7. – *Genomics*, 1988, v. 3, p. 17-24.
3. Kwon B.S., Hao A.K., Pomerantz S.H., Halaban R. Isolation and sequence of a cDNA clone for human tyrosinase that maps at the mouse c-albino locus. – *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 1987, v. 84, p. 7473-7477

4. Ramsay M., Colman M-A., Stevens G., Zwane E., Kromberg J., Farrall M., Jenkins T. The tyrosinase-positive oculocutaneous albinism locus maps to chromosome 15q11.2-q12. – *Am.J.Hum. Genet.*, 1992, v. 52, p. 879-884.

5. Rinchik E.M., Bultman S.J., Horsthemke B., Lee S.T., Strunk K.M., Spritz R.A., Avidano K.M., Jong M.T.C., Nicholls R.D. A gene for the mouse pinkeyed dilution locus and for human type II oculocutaneous albinism. – *Nature*, 1993, v. 361, p.72-76.

6. Lee S.T., Nicholls R.D., Jong M.T.C., Fukai K., Spritz R.A. Organization and sequence of the human P gene and identification of a new family of transport proteins. – *Genomics*, 1995, v. 26, p. 354-363.

## 18.8. Пропионовая Ацидемия: общие сведения

Пропионил КоА карбоксилаза – митохондриальный матричный биотин-зависимый фермент, катализирующий карбоксилирование пропионил-КоА в D-метилмалонил-КоА [Rosenberg L.E.,1983]. Пропионил КоА карбоксилаза играет существенную роль в метаболизме четных жирных кислот, аминокислот с разветвленной цепью (валина, лейцина, изолейцина), а также метионина и треонина. Из-за недостатка пропионил-СоА-карбоксилазы заболевание характеризуется высоким содержанием пропионата (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH – пропионовая кислота) в сыворотке и нарушением катаболизма пропионата в лейкоцитах.

Клинические признаки появляются на первой недели жизни. У больных развивается рвота, дегидратация, потеря массы, респираторные расстройства, гипотония мышц, судороги, угнетение центральной нервной системы, вплоть до комы, гепатомегалия. Характерны тяжелый ацидоз, кетоз, гипераммониемия, гиперглицинемия, лейкоцитомегалия. В моче определяется повышенная концентрация 3-гидроксипропионовой кислоты, метилцитрата, триглицид-глицина, пропионил глицина, 3-гидроксимасляной кислоты, 3-гидрокси-п-валериановой кислоты и других производных. В крови регистрируется высокая концентрация пропионовой кислоты.

Лечение состоит в назначении бедной диеты и принятии мер по снижению метаболического ацидоза.

Пропионовая ацидемия обусловлена поражением генов, кодирующих ферментный комплекс -пропионил КоА карбоксилазу.

Различают две генетические формы:

- рссА (ММ 232000)при поражении гена РССА,

- рссВ (ММ 232050)при поражении гена РССВ.

Ген, кодирующий альфа субъединицу (РССА) пропионил-КоА карбоксилазы, локализован на длинном плече 13 хромосомы в позиции 13q32 (Kennerknecht I.,1990; Lamhonwah A.M.,1986).

Ген, кодирующий бета субъединицу РССВ пропионил-КоА карбоксилазы, локализован на длинном плече хромосомы 3 в позиции 3q13.3-q22 (Kraus J.P.,1986; Lamhonwah A.M.,1986).

В настоящее время признано, что группы рссА и рссВ соответствуют отдельным генам (РССА и РССВ), кодирующих две различные субъединицы фермента РСС. Однако, внутри комплементарной группы рссВ были выявлены еще подгруппы – рссВ и рссС. Как выяснилось позднее, данные подгруппы представляют собой аллельные мутации, способные к внутригенной комплементации (Gravel R.A., 1977; Loyer M., 1995).

К настоящему времени выявленные миссенс-мутации, делеции и инсерции в генах ПССА и миссенс-мутации, терминирующие и сплайсинговые мутации, делеции, инсерции и дупликация в ПССВ, лежащие в основе пропионовой ацидемии рссА и рссВС, представлены в таблицах. (см <http://medbiol.ru/medbiol/pathology/> Таблице 23 и Таблице 24, соответственно).

#### **Литература**

1. Rosenberg L.E. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. – The metabolic basis of inherited disease. Ed. Stanbury J.B., Wyngaarden J.B., Fredrickson D.S., Goldstein J.L., Brown M.S. 1983, p. 474-497.
2. Kernnerknecht I., Suormala T., Barbi G., Baumgartner E.R. The gene coding for the alpha-chain of human propionyl-CoA carboxylase maps to chromosome band 13q32. – Hum.Genet., 1990, v. 86, p. 238-240
3. Lamhonwah A.-M., Barankiewicz T.J., Willard H.F., Mahuran D.J., Quan F., Gravel R.A. Isolation of cDNA clones coding for the a and b chains of human propionyl-CoA carboxylase: chromosomal assignments and DNA polymorphisms associated with PCCA and PCCB genes. – Proc.Natl.Acad.Sci., 1986, v. 83, p. 4864-4868.
4. Kraus J.P., Fargair F., Novothy J., Kalousek F., Williams K.R., Williamson C., Ohura T., Rosenberg L.E. Coding sequence of the precursor of the B subunit of rat propionyl-CoA carboxylase. – Proc.Natl.Acad.Sci., 1986, v. 83, p. 8049-8053.
5. Gravel R.A., Lam K.F., Scully K.J., Hsia Y.E. Genetic complementation of propionyl-CoA carboxylase deficiency in cultured human fibroblasts. – Am.J.Hum.Genet., 1977, v. 29, p. 378-388.
6. Loyer M., Leclerc D., Gravel R.A. Interallelic complementation of beta-subunit defects in fibroblasts of patients with propionyl-CoA carboxylase deficiency microinjected with mutant cDNA constructs. – Hum.Mol.Genet., 1995, v. 4, p. 1035-1039.

### **18.9. Метилмалоновая Ацидемия**

Метилмалоновая ацидемия – (mut methylmalonic acidemia, mut MMA; MIM 251000) – врожденное заболевание, обусловленное комбинированным нарушением синтеза метилкобаламина и аденозилкобаламина. Метилмалоновая ацидемия, вызванная недостаточностью метилмалонил-КоА-мутазы, протекает без анемии.

#### **Аденозилкобаламин**

У человека существуют две биологически активные (коферментные) формы витамина В12 – метилкобаламин и аденозилкобаламин. Они различаются группами, присоединенными в шестом координационном положении к атому кобальта.

Аденозилкобаламин необходим для превращения метилмалонил-КоА в сукцинил-КоА. Дефицит аденозилкобаламина ведет к значительному повышению содержания в тканях метилмалонил-КоА и его предшественника – пропионил-КоА. В результате в нервных клетках синтезируются и встраиваются в липиды жирные кислоты не с четным числом атомов углерода, как обычно, а с нечетным. Это – одна из возможных причин поражения нервной системы при дефиците витамина В12.

Метилмалоновая ацидемия сопровождается ацидозом, гиперглицинемией, гиперлактемией. Наряду с этим отмечается выраженная кетонурия, гиперглицинурия, метилмалоновая ацидурия, низкий уровень бикарбонатов, повышенный уровень метилмалоно-

вой кислоты. Заболевание проявляется с первых дней жизни ребенка. У новорожденных периодически возникает рвота, обезвоживание, обнаруживается мышечная гипотония, общая вялость, отставание в весе, увеличение печени. Наследуется заболевание по ауто-сомно-рецессивному типу.

Метилмалоновая ацидемия обусловлена дефектом гена, кодирующим фермент метилмалонил КоА мутазу; (E.C.5.4.99.2).

В норме метилмалоновая кислота в виде промежуточного продукта образуется при распаде аминокислот с разветвленной цепью (валина, лейцина, изолейцина), аминокислот треонина и метионина, жирных кислот, холестерина. В тканях животных широко распространен фермент метилмалонил КоА мутазы, катализирующий изомеризацию L-метилмалонил КоА в сукцинил КоА через пропионил КоА в цикле Кребса [Rosenberg L.E., 1989]. Функциональный дефицит данного фермента приводит к экскреции метилмалоновой кислоты, предшественников и аномальных метаболитов метилмалонил КоА с мочой, а также к аккумуляции различных органических кислот в крови и тканях организма.

Ген MUT человека, кодирующий апоэнзим метилмалонил-КоА мутазу, локализован на длинном плече 6 хромосомы в позиции 6q12-21.2 [Ledley F.D., 1988].

Генетически различные формы метилмалоновой ацидемии (ММА) удалось различить с помощью комплементационного анализа соматических клеток (фибробластов), полученных от больных с разными формами метилмалоновой ацидемии.

Комплементационные формы «cbl» MMA (cbl A, cbl B, cbl C, cbl D, cbl F) – (MIM 251100, MIM 251110) обусловлены поражением генетических локусов, кодирующих аденозил-кобаламин, кофактор (MCM) [Cooper B.A., 1987; Watkins D., 1986; Rosenberg L.E., 1989].

Комплементационные формы «mut» MMA (MIM 251000) обусловлены поражением генетического локуса MUT, кодирующего апоэнзим метилмалонил КоА мутазу (MCM).

Идентифицированные мутации в гене MCM подразделяются на два класса:

- mut«0» мутации – мутации при которых наблюдается полная потеря ферментативной активности и метаболизма пропионата и – mut«-» мутации – мутации при которых наблюдается как низкий уровень ферментативной активности, так и незначительное включение пропионата.

Идентифицированные миссенс-мутации, единичные нонсенс и сплайнговые мутации, делеции и inserции в гене метилмалонил КоА мутазы человека представлены в таблице (см. <http://medbiol.ru/medbiol/pathology/> Таблице 21).

### Литература

1. Rosenberg L.E., Fenton W.A. Disorders of propionate metabolism. In: Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D. (eds.). The metabolic basis of inherited disease, 6-th edn. McGraw Hill, New York, 1989, p.822-844.
2. Ledley F.D., Lumetta M.R., Zoghbi H.Y., VanTuinen P., Ledbetter S.A., Ledbetter D.H. Mapping of human methylmalonyl CoA mutase (MUT) locus on chromosome 6. – Am.J.Hum.Genet., 1988, v. 42, p. 839-846.
3. Cooper B.A., Rosenblatt D.S. Inherited defects of vitamin B12 metabolism. – Annu.Rev.Nutr., 1987, v. 7, p. 291-320.
4. Watkins D., Rosenblatt D.S. Failure of lysosomal release of vitamin B 12: a new complementation group causing methylmalonic aciduria (cblF). – Am.J.Hum.Genet., 1986, v. 39, p. 404-408.

## 18.10. Болезнь Кленового Сиропа (Валинолейцинурия, Кетонурия разветвленных кетокислот, MSUD)

Болезнь с запахом мочи, напоминающим кленовый сироп, вызванная мутацией в гене субъединицы E1-альфа, называют типом MSUD IA; с мутацией в гене субъединицы E1-бета типом IB; и с дефектом в гене субъединицы E2 типом II. Фенотип с мутацией в компоненте E3 иногда называют типом MSUD III (Чжуан и Ши, 2001), но это нарушение чаще называют E3 или дефектом дигидролипоамиддегидрогеназы (DLD 246900). См. также мягкий вариант MSUD (MSUDMV; 615135), вызванное мутацией в гене протеинфосфатазы, PP2C домен-содержащая, 1K (PPM1K; 611065).

Наиболее ярким отличительным признаком этой болезни является характерный запах мочи больного, напоминающий запах кленового сиропа или жженного сахара. В плазме крови и в моче сильно повышается содержание аминокислот с разветвленной цепью – лейцина, изолейцина и валина, а также соответствующих им альфа-кетокислот. Поэтому болезнь «кленового сиропа» иногда называют кетонурией разветвленных кетокислот (Branch-chain ketoaciduria). Отмечено также присутствие в моче разветвленных альфа-гидроксикислот, образующихся при восстановлении альфа-кетокислот. Иногда в большом количестве выделяется индолмолочная кислота.

Характерные признаки болезни проявляются в конце первой недели после рождения. У ребенка возникают беспокойство, гипертония мышц, вытягивание и скрещивание нижних конечностей, расстройства дыхания и цианоз. Обращает на себя внимание запах мочи. В дальнейшем клиническая картина варьирует по тяжести, наблюдается задержка психического развития, нередко в сочетании с тяжелой неврологической симптоматикой: судорогами, опистотонусом, атаксией. Наряду с описанными выше нарушениями возникают трудности при кормлении ребенка, может наблюдаться рвота. Иногда наблюдается летаргия. Диагноз ранее конца первой недели возможен только с помощью ферментного анализа. Летальный исход наступает в раннем детском возрасте. У выживших детей отмечены выраженные нарушения мозговой деятельности, тяжелая умственная отсталость. При отсутствии лечения летальный исход наступает к концу первого года жизни.

Биохимической причиной болезни является отсутствие или сильное снижение активности декарбоксилазы альфа-кетокислот, катализирующей превращение всех трех разветвленных альфа-кетокислот в ацил-СоА-тиоэфиры с выделением  $\text{CO}_2$ . Это было установлено путем ферментного анализа лейкоцитов и клеток культуры фибробластов кожи больных детей. Механизм токсического действия накапливающихся соединений неизвестен.

Наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Частота в популяции, по различным данным, от 1:100000 до 3: 100000.

Различают четыре варианта заболевания: классический, интермиттирующий, промежуточный, тиамин-зависимый [Wong P.W.K., 1972].

Болезнь с запахом мочи, напоминающим кленовый сироп, (MSUD) может быть вызвана соединением гомозиготных или гетерозиготных мутаций, по крайней мере, 3 генов: BCKDHA (608348) на хромосоме 19q13, BCKDHB (248611) на хромосоме 6q14,



и DBT (248610) на хромосоме 1p21. Эти гены кодируют два каталитических компонента комплекса альфа-кето-дегидрогеназы кетокислот с разветвленной цепью (BCKDC), который катализирует катаболизм аминокислот с разветвленной цепью, лейцина, изолейцина и валина. Мутация третьего компонента, E3 (МГ; 238331), на хромосоме 7q31, вызывает перекрывающийся, но более тяжелый фенотип известный как дефицит DLD (ОД33; 246900). Дефицит МГ иногда называют MSUD3.

### Литература

1. Wong P.W.K., Justice P., Smith G.F., Hsia D.Y.Y. A case of classical maple syrup urine disease 'thiamine non-responsive.' – Clin.Genet., 1972, v. 3, p. 27-33.
2. Chuang, D. T., Shih, V. E. Maple syrup urine disease (branched-chain ketoaciduria). In: Scriver, C. R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D. (eds.) : The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Vol. II. New York: McGraw-Hill (8th ed.) : 2001. Pp. 1971-2005.
3. Chuang, J. L., Wynn, R. M., Moss, C. C., Song, J., Li, J., Awad, N., Mandel, H., Chuang, D. T. Structural and biochemical basis for novel mutations in homozygous Israeli maple syrup urine disease patients. J. Biol. Chem. 279: 17792-17800, 2004. [PubMed:14742428, related citations] [Full Text: HighWire Press]
4. Nellis, M. M., Danner, D. J. Gene preference in maple syrup urine disease. Am. J. Hum. Genet. 68: 232-237, 2001. [PubMed: 11112664, related citations] [Full Text: Elsevier Science]
5. Nellis, M. M., Kasinski, A., Carlson, M., Allen, R., Schaefer, A. M., Schwartz, E. M., Danner, D. J. Relationship of causative genetic mutations in maple syrup urine disease with their clinical expression. Molec. Genet. Metab. 80: 189-195, 2003. [PubMed: 14567968, related citations] [Full Text: Elsevier Science]

## 18.11. Гомоцистинурии

Классическая гомоцистинурия является аутосомно-рецессивным заболеванием с расстройством метаболизма серы. Клинические признаки гомоцистинурии: близорукость, эктопия хрусталика, умственная отсталость, скелетные аномалии, напоминающие синдром Марфана (MFS; 154700) и тромбозы обычно проявляются в первом или втором десятилетии жизни из-за дефицита фермента Цистатион-β-синтетазы (CBS). Изменяется цвет кожи и волос. Наблюдается повышение гомоцистеина и метионина в моче. Существуют 2 основные формы заболевания: пиридоксин (витамин B6)–чувствительная форма, и более тяжелая пиридоксин-нечувствительная форма. Пиридоксин является кофактором для фермента CBS, и необходим для превращения гомоцистеина в цистеин (резюме, Рэш др., 1995, Testai и Горелик, 2010). У некоторые пациентов мягкая форма характеризуется повышенным содержанием гомоцистеина в плазме и риском тромбоза в юношеском возрасте, без скелетных и глазных аномалий или проявлений со стороны нервной системы, наблюдаемых при классической гомоцистинурии (Келли и др., 2003).

Гомоцистинурия была описана независимо друг от друга Gerritsen et al. (1962) в Медисоне, Висконсине и Carson and Neill (1962) в Белфасте, Северная Ирландия. Пациенты обеих групп изучались в связи с задержкой умственного развития. Mudd et al. (1985) собрали сведения о 629 пациентах с гомоцистинурией со всего мира. При скрининге новорожденных и дальнейшем лечении умственные способности у B6-чувстви-

тельных пациентов были выше (значение IQ, 79), чем у В6-нечувствительных (значение IQ, 57). У нелеченных больных с В6-чувствительной и с В6-нечувствительной формой наблюдали: эктопию хрусталика в возрасте 10 лет у 55% и 82%; тромбоз эмболии в возрасте 15 лет у 12% и 27% больных; спинальный остеопороз выявляли в возрасте 15 лет у 36% и 64%; недоеживали до 30 лет 30,4% и 23% больных, соответственно.

Когда в неонатальном периоде применяли диету с ограничением метионина, предотвращалась задержка умственного развития, снижались случаи эктопии хрусталика, снижался уровень суицидов. Лечение пиридоксинами больных с поздно выявленной В6-чувствительной гомоцистинурией уменьшало количество случаев тромбоз эмболии. Abbott et al. (1987) обследовали 63 больных с гомоцистинурией, отвечающих на лечение витамином В6, с целью установления возможных психических расстройств, уровня интеллекта и других проблем ЦНС. Клинически значимые психические расстройства были обнаружены в 51% случаев. Средний IQ был 80; IQ был ниже среди витамин В6 – нечувствительных пациентов. Для гомоцистинурии характерна гипопигментация, которая исчезает у пациентов с пиридоксин – чувствительной формой после начала лечения пиридоксинами, наблюдается потемнение волос и снижается жесткость текстуры волос (Reish et al., 1995). Testai and Gorelick (2010) подчеркивают, что тромбоз эмболия в большинстве случаев является причиной смерти больных с классической гомоцистинурией и может проявляться тромбозом периферических вен, легочной эмболией, окклюзией периферических артерий, инфарктом миокарда. Риск сосудистых нарушений составляет 25% до 16 лет и 50% в 30 лет.

**Клиническая вариабельность: Тромботическая гипергомоцистеинемия, CBS-связанная.**

Gaustadnes et al. (2000) нашел, что у 3 из 5 нелеченных пациентов была гипергомоцистеинемия и тромбозы, но не было других признаков классической гомоцистинурии, что связано с соединением двух разных гетерозиготных аллелей по мутациям в гене цистатион-β-синтетазы (CBS), с CBS недостаточностью. Maclean et al. (2002) сообщили о 2 больных, ранее нелеченных, в Дании с транзиторной ишемической атакой в возрасте 36 и 22 лет. Биохимические анализы показали повышение содержания гомоцистеина в сыворотке крови, без других признаков классической гомоцистинурии, таких как задержка умственного развития, эктопия хрусталика или изменения в скелете. Каждый пациент имел гетерозиготность по двум мутациям в гене CBS: у одного больного выявили мутации в локусах D444N (613381.0010) и P422L (613381.0013), у другого мутации в локусах I278T (613381.0004) и S466L (613381.0014). Функциональные исследования *in vitro* показали более высокую каталитическую активность мутантных белков с заменами P422L and S466L, чем белков дикого типа, но с повреждением регуляции с помощью S-аденозилметионина (AdoMet).

**Диагностика.** Spaeth и др. (1967) описали тест с серебристым нитропруссидом почти полностью специфичный для гомоцистеина. Wadman и др. (1983) называют реакцию с цианид-нитропруссидом, используемую для обнаружения цистинурии и гомоцистинурией, как реакцию Марка.

**Неонатальный скрининг.** Peterschmitt и др. (1999) рассмотрели результаты неонатального скрининга гомоцистинурии, проводившегося в течение 32 лет в Новой Ан-

глии, и пришли к выводу, что уровень метионина в крови 1 мг на децилитр в неонатальных скрининговых тестах на гомоцистинурию позволяет выявить больных младенцев, и уменьшить частоту ложноотрицательных результатов. Частота ложноположительных результатов значительно ниже, чем при неонатальном скрининге других расстройств, таких как врожденная гиперплазия коры надпочечников, врожденный гипотиреоз, и фенилкетонурия. Гуттормсен соавт. (2001) пришли к выводу, что самым чувствительным и удовлетворительным тестом для изучения умеренных нарушений метаболизма гомоцистеина была аномальная реакция общего гомоцистеина в моче после нагрузки метионином.

**Дифференциальный диагноз.** Гомоцистеинемия с гомоцистинурией может возникать из-за дефицита N(5,10)-метилентетрагидрофолатредуктазы (236250) и дефицита транскобаламина II (275350). К гомоцистеинемии / гомоцистинурии и мегалобластной анемии могут привести нарушения метаболизма витамина B12 (кобаламина; CBL), которые были классифицированы как например, CBLE (236270) и cblG (250940), в соответствии с группами комплементации клеток в пробирке. Сочетания метилмалоновой ацидурии (MMA) и гомоцистинурии из-за дефектов в метаболизме кобаламина называют cblC (277400), cblD (277410), и cbl F (277380).

Fowler et al. (1978) обнаружили три типа цистатионсинтетазы в линиях культуры фибробластов: один без остаточной активности; один со сниженной активностью и нормальным средством с кофактором – пиридоксальфосфатом; и один с остаточной активностью и со снижением средства с коферментом.

Kraus et al. (1999) сообщили о 92 различных мутациях гена CBS, выявленных в 310 исследованных аллельных генах, у больных гомоцистинурией, в более чем в дюжине лабораторий со всего мира. Большинство из этих мутаций были миссенс-мутации, причем единичные мутации, встречающиеся только в 1 или в очень малом числе семей. Две наиболее часто встречающиеся мутации были пиридоксин-чувствительная I278T (613381.0004) и пиридоксин-нечувствительная G307S (613381.0001). Мутации с дезаминированием метилцитозина представляют 53% всех точковых замен в кодирующем участке CBS гена.

Lee et al. (2005) идентифицировали 8 различных мутаций в гене CBS, 4 из них, вновь выявленные мутации гена, у 6 пациентов из 5 Корейских семей с гомоцистинурией. В *in vitro* исследованиях функциональной экспрессии этих генов установлено, что мутации значительно понижают активность фермента.

### **Генотип/Фенотип Корреляции**

Kluijtmans et al. (1999) исследовал молекулярные основы недостаточности CBS у 29 голландских пациентов из 21 неродственных родословных и изучали возможные связи между генотипом и фенотипом биохимических и клинических показателей и экспрессией гена в ответ на гомоцистин-понижающее лечение. Из 10 разных мутаций, обнаруженных в CBS гене, мутация 833T-C (I278T; 613381.0004) была преобладающей и обнаружена в 23 (55%) из 42 независимых аллелей. При диагностике, все 12 гомозигот по этой мутации имели тенденцию к большему повышению уровня гомоцистеина, чем 17 пациентов с другими генотипами, но со сходными клиническими проявлениями.

Дальнейшие наблюдения показали большую эффективность гомоцистеин понижающей терапии у I278T гомозигот. После теста на дрожжах и лечения 378 пациентов, только у 2 из них зарегистрировали сосудистые нарушения; у нелеченных больных, по крайней мере, у 30 можно ожидать такие нарушения. (P – менее чем 0,01).

Maclean et al. (2002) описали новые 3 класса миссенс-мутаций, включая P422L (613381.0013) and S466L (613381.0014), которые локализируются в некаталитическом С-концевом регионе CBS гена и продуцируемый геном энзим каталитически активен, но дефектен по ответу на индуцирующее воздействие S-аденозилметионина (AdoMet). Мутации P422L and S466L обнаружены у пациентов с преждевременными тромбозами и уровнем гомоцистеина, характерным для гомоцистеинурии (смотри 603174), но при этом отсутствуют нарушения в тканях, характерные для гомоцистинурии. Gaustadnes et al. (2002) определили молекулярные основы CBS недостаточности у 36 австралийских пациентов из 28 неродственных семей, используя прямое секвенирование полностью кодирующего региона CBS гена. Семь новых и 20 известных мутаций были детектированы. Наиболее общие мутации G307S and I278T нашли в 19% и 18% независимых аллелей, соответственно. Изучение экспрессии двух новых мутаций (C109R and G347S), как и двух известных мутаций (L101P and N228K) показало полную потерю каталитической активности мутантных протеинов. Мутации G307S приводили к строгому нечувствительному фенотипу, тогда как I278T приводили к мягкому В6-чувствительному фенотипу. Gaustadnes et al. (2002) нашел еще три другие мягкие мутации: P49L, R369C, and V371M. Kruger et al. (2003) определяли взаимоотношение клинических и биохимических фенотипов с генотипами у 12 CBS дефектных больных из 11 семей в штате Джорджия, США. Путем секвенирования всех кодирующих экзонов, они идентифицировали мутации в CBS гене в 21 из возможных 22 мутантных аллелей. 10 различных миссенс мутаций были идентифицированы и одна новая сплайсиговая мутация была выявлена. Пять миссенс мутаций были ранее описаны и пять новых мутаций были выявлены. Каждая миссенс мутация тестировалась на функциональную экспрессию в *S. cerevisiae* и все они замедляли скорость роста и значительно снижали CBS энзимную активность. Мутации I278T (613381.0004) and T353M (613381.0015) составили 45% мутантных аллелей в этой когорте пациентов.

### **Патогенез**

McKusick (1966) предполагает, излишнее количество гомоцистеина может мешать нормальному синтезу коллагенов с перекрестными связями. Lubec et al. (1996) изучали синтез коллагена и перекрестное связывание в неинвазивном тесте у 10 больных с гомоцистинурией и не нашли различий в синтезе коллагенов типа I и III по сравнению с контролем, т.е. костные проявления гомоцистинурии не связаны с синтезом дефектных коллагенов. Werstuck et al. (2001) нашли, что гомоцистеин-индуцированный стресс в эндоплазматическом ретикулуме (ER) активирует нефолдированный протеин и регулируемые стеролом элемент-связывающие протеины. Такой стресс приводит к дисрегуляции стерол-чувствительных метаболических путей, ведущей к повышению биосинтеза и захвату холестерина и триглицеридов в печени, который способствует стеатозу в печени и атеросклеротическим нарушениям наблюдаемым при гипергомоцистеинемии.

Hubmacher et al. (2005) подчеркнул, что скелетные и глазные нарушения у пациентов с гомоцистинурией напоминают изменения при синдроме Марфана (MFS; 154700), причиной которых является мутации в гене фибриллина-1 (FBN1; 134797). Концентрация гомоцистеина у пациентов с гомоцистинурией причина структурных модификаций рекомбинантных фрагментов фибриллина-1 человека с потерей связывания кальция. Молекулярные изменения результата повышения протеазной чувствительности фрагментов фибриллина.

Подобные изменения происходят из-за ковалентных модификаций остатков цистеина в фибриллине и /или прерывания дисульфидной связи. Эти находки предполагают, что деградация фибриллина-1 в соединительных тканях у пациентов с гомоцистинурией играют большую роль в патогенезе болезни.

### Популяционная генетика

Mudd et al. (1995) оценили частоту гомоцистинурии в пределах от 1:58000 до 1:1 000 000 в странах, в которых систематически проводят скрининг новорожденных. В мире частота гомоцистинурии оценивается как 1:344 000, в Ирландии 1:65 000, основанные на скрининге новорожденных и регистрации клинических случаев.

**Клинические проявления.** До настоящего времени сведения о гомоцистинурии, обусловленной недостаточностью редуктазы, получены при обследовании менее 10 детей. В наиболее тяжелых случаях уже в раннем возрасте у ребенка были заметны резкая задержка развития и атрофия головного мозга. У остальных больных в возрасте после 10 лет отмечались психические нарушения (кататония) или некоторое отставание в развитии. Клинические проявления зависят, вероятно, от степени недостаточности редуктазы.

Кататонический синдром, **кататония** (др.-греч. *κατατείνω* – натягивать, напрягать) – психопатологический синдром (группа синдромов), основным клиническим проявлением которого являются двигательные расстройства.

**Диагностика и лечение.** Основанием для диагноза должно служить сочетание повышенной концентрации гомоцистеина в жидких средах организма с нормальным или сниженным уровнем метионина. У некоторых больных снижен уровень фолата в сыворотке. Для подтверждения диагноза необходимо прямое определение активности редуктазы в тканевых экстрактах (мозг, печень, культура фибробластов). Несмотря на то что опыт лечения при этом состоянии невелик, но у одной девочки-подростка с кататоническим психозом отметили заметное улучшение состояния и нормализацию биохимических показателей после введения фолата (5-10 мг/сут). При его отмене психические нарушения становились более тяжелыми. Это наблюдение позволяет надеяться, что ранняя диагностика с последующей терапией фолатом сможет предотвратить неврологические и психические проявления.

**Недостаточность синтеза витамин В12 коферментов** также обусловлена нарушением превращения гомоцистеина в метионин. При всех формах гомоцистеинурии эффективность лечения зависит от ранней диагностики. Определенные успехи достигаются путем обогащения питания больных витаминами: при первой форме – витамином В6, при второй – фолиевой кислотой, при третьей – витамином В12.

### **Недостаточность синтеза кобаламиновых (витамин В12) коферментов**

Эта форма гомоцистинурии также обусловлена нарушением превращения гомоцистеина в метионин. Первичный дефект связан с синтезом метилкобаламина – кобаламинового (витамин В 12) кофермента, необходимого для функционирования метилтетрагидрофолатгомоцистеинметилтрансферазы. Одновременно в жидких средах организма накапливается метилмалоновая кислота, поскольку нарушен синтез и второго кофермента – аденозилкобаламина, необходимого для изомеризации метилмалонилкофермента А (КоА) в сукцинил-КоА.

Как и недостаточность 5, 10-метилентетрагидрофолатредуктазы, этот дефект приводит к нарушению реметилирования гомоцистеина. В основе лежит недостаточный синтез кобаламиновых коферментов. Поскольку для переноса метильной группы с метилтетрагидрофолата на гомоцистеин необходим метилкобаламин, нарушение метаболизма витамина В12 обуславливает снижение активности метилтрансферазы. Синтез метилкобаламина нарушается на каком-то раннем этапе активации витаминного предшественника в лизосомах или цитозоле. Генетические исследования на соматических клетках указывают на возможность существования трех механизмов нарушения образования коферментов, каждый из которых наследуется аутосомным рецессивным способом.

Заболевание может проявляться резкой задержкой развития, В12-дефицитной анемией, нарушениями функций спинного и головного мозга.

Биохимическими признаками заболевания служат гомоцистинурия, гипометионинемия и метилмалоновая ацидурия. Эти изменения могут быть выявлены и при пернициозной анемии ювенильного или взрослого типа, при которой нарушено всасывание кобаламина в кишечнике. Дифференциальному диагнозу помогает определение сывороточной концентрации кобаламина: низкой при пернициозной анемии и нормальной у больных с нарушением превращения кобаламина в коферменты. Окончательный диагноз требует доказательства нарушенного синтеза коферментов в культуре клеток. Лечение больных детей добавками кобаламина (1-2 мг/сут) достаточно перспективно: экскреция гомоцистеина и метилмалоната почти достигает нормы; гематологические и неврологические признаки также нивелируются в той или иной степени (Т.Р. Harrison. Principles of internal medicine. Перевод д.м.н. А. В. Сучкова, к.м.н. Н. Н. Заваденко, к.м.н. Д. Г. Катковского)

#### **Литература**

1. Reish, O., Townsend, D., Berry, S. A., Tsai, M. Y., King, R. A. Tyrosinase inhibition due to interaction of homocyst(e)ine with copper: the mechanism for reversible hypopigmentation in homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 57: 127-132, 1995. [PubMed: 7611281, related citations]
2. Testai, F. D., Gorelick, P. B. Inherited metabolic disorders and stroke part 2: homocystinuria, organic acidurias, and urea cycle disorders. *Arch. Neurol.* 67: 148-153, 2010. [PubMed: 20142522, related citations] [Full Text: HighWire Press]
3. Kelly, P. J., Furie, K. L., Kistler, J. P., Barron, M., Picard, E. H., Mandell, R., Shih, V. E. Stroke in young patients with hyperhomocysteinemia due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Neurology* 60: 275-279, 2003. [PubMed: 12552044, related citations] [Full Text: HighWire Press]

4. Gerritsen, T., Vaughn, J. G., Waisman, H. A. The identification of homocystine in the urine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 9: 493-496, 1962. [PubMed: 13960563, related citations]
5. Carson, N. A. J., Neill, D. W. Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Arch. Dis. Child.* 37: 505-513, 1962. [PubMed: 14018926, related citations]
6. Mudd, S. H., Skovby, F., Levy, H. L., Pettigrew, K. D., Wilcken, B., Pyeritz, R. E., Andria, G., Boers, G. H. J., Bromberg, I. L., Cerone, R., Fowler, B., Grobe, H., Schmidt, H., Schweitzer, L. The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 37: 1-31, 1985. [PubMed: 3872065, related citations]
7. Abbott, M. H., Folstein, S. E., Abbey, H., Pyeritz, R. E. Psychiatric manifestations of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency: prevalence, natural history, and relationship to neurologic impairment and vitamin B(6)-responsiveness. *Am. J. Med. Genet.* 26: 959-969, 1987. [PubMed: 3591841, related citations]
8. Reish, O., Townsend, D., Berry, S. A., Tsai, M. Y., King, R. A. Tyrosinase inhibition due to interaction of homocyst(e)ine with copper: the mechanism for reversible hypopigmentation in homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 57: 127-132, 1995. [PubMed: 7611281, related citations]
9. Gaustadnes, M., Rudiger, N., Rasmussen, K., Ingerslev, J. Intermediate and severe hyperhomocysteinemia with thrombosis: a study of genetic determinants. *Thromb. Haemost.* 83: 554-558, 2000. [PubMed: 10780316, related citations]
10. Maclean, K. N., Gaustadnes, M., Oliveriusova, J., Janosik, M., Kraus, E., Kozich, V., Kery, V., Skovby, F., Rudiger, N., Ingerslev, J., Stabler, S. P., Allen, R. H., Kraus, J. P. High homocysteine and thrombosis without connective tissue disorders are associated with a novel class of cystathionine beta-synthase (CBS) mutations. *Hum. Mutat.* 19: 641-655, 2002. [PubMed: 12007221, related citations]
11. Spaeth, G. L., Barber, G. W. Prevalence of homocystinuria among the mentally retarded: evaluation of a specific screening test. *Pediatrics* 40: 586-589, 1967. [PubMed: 6051058, related citations]
12. Wadman, S. K., Cats, B. P., de Bree, P. K. Sulfite oxidase deficiency and the detection of urinary sulfite. (Letter) *Europ. J. Pediat.* 141: 62-63, 1983.
13. Peterschmitt, M. J., Simmons, J. R., Levy, H. L. Reduction of false negative results in screening of newborns for homocystinuria. *New Eng. J. Med.* 341: 1572-1576, 1999. [PubMed: 10564686, related citations]
14. Guttormsen, A. B., Ueland, P. M., Kruger, W. D., Kim, C. E., Ose, L., Folling, I., Refsum, H. Disposition of homocysteine in subjects heterozygous for homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency: relationship between genotype and phenotype. *Am. J. Med. Genet.* 100: 204-213, 2001. [PubMed: 11343305, related citations]
15. Fowler, B., Kraus, J., Packman, S., Rosenberg, L. E. Homocystinuria: evidence for three distinct classes of cystathionine beta-synthetase mutants in cultured fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 61: 645-653, 1978. [PubMed: 641146, related citations]
16. Kraus, J. P., Janosik, M., Kozich, V., Mandell, R., Shih, V., Sperandeo, M. P., Sebastio, G., de Franchis, R., Andria, G., Kluijtmans, L. A. J., Blom, H., Boers, G. H. J., Gordon, R. B., Kamoun, P., Tsai, M. Y., Kruger, W. D., Koch, H. G., Ohura, T., Gaustadnes, M. Cystathionine beta-synthase mutations in homocystinuria. *Hum. Mutat.* 13: 362-375, 1999. [PubMed: 10338090, related citations]
17. Lee, S.-J., Lee, D. H., Yoo, H.-W., Koo, S. K., Park, E.-S., Park, J.-W., Lim, H. G., Jung, S.-C. Identification and functional analysis of cystathionine beta-synthase gene mutations in patients with homocystinuria. *J. Hum. Genet.* 50: 648-654, 2005. [PubMed: 16205833, related citations]
18. Kluijtmans, L. A. J., Boers, G. H. J., Kraus, J. P., van den Heuvel, L. P. W. J., Cruysberg, J.

R. M., Trijbels, F. J. M., Blom, H. J. The molecular basis of cystathionine beta-synthase deficiency in Dutch patients with homocystinuria: effect of CBS genotype on biochemical and clinical phenotype and on response to treatment. *Am. J. Hum. Genet.* 65: 59-67, 1999. [PubMed: 10364517, related citations]

19. Gaustadnes, M., Wilcken, B., Oliveriusova, J., McGill, J., Fletcher, J., Kraus, J. P., Wilcken, D. E. The molecular basis of cystathionine beta-synthase deficiency in Australian patients: genotype-phenotype correlations and response to treatment. *Hum. Mutat.* 20: 117-126, 2002. [PubMed: 12124992, related citations]

20. Kruger, W. D., Wang, L., Jhee, K. H., Singh, R. H., Elsas, L. J., II. Cystathionine beta-synthase deficiency in Georgia (USA): correlation of clinical and biochemical phenotype with genotype. *Hum. Mutat.* 22: 434-441, 2003. [PubMed: 14635102, related citations]

21. McKusick, V. A. *Heritable Disorders of Connective Tissue* St. Louis: C. V. Mosby (pub.) (3rd ed.): 1966. P. 155.

22. Lubec, B., Fang-Kircher, S., Lubec, T., Blom, H. J., Boers, G. H. J. Evidence for McKusick's hypothesis of deficient collagen cross-linking in patients with homocystinuria. *Biochim. Biophys. Acta* 1315: 159-162, 1996. [PubMed: 8611653, related citations]

23. Werstuck, G. H., Lentz, S. R., Dayal, S., Hossain, G. S., Sood, S. K., Shi, Y. Y., Zhou, J., Maeda, N., Krisans, S. K., Malinow, M. R., Austin, R. C. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J. Clin. Invest.* 107: 1263-1273, 2001. [PubMed: 11375416, images, related citations]

24. Hubmacher, D., Tiedemann, K., Bartels, R., Brinckmann, J., Vollbrandt, T., Batge, B., Notbohm, H., Reinhardt, D. P. Modification of the structure and function of fibrillin-1 by homocysteine suggests a potential pathogenetic mechanism in homocystinuria. *J. Biol. Chem.* 280: 34946-34955, 2005. [PubMed: 16096271, related citations]

25. Mudd, S. H., Levy, H. L., Skovby, F. *Disorders of transsulfuration*. In: Scriver, C. R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D. (eds.) : *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Vol. 1. New York: McGraw-Hill (7th ed.) : 1995. Pp. 1279-1327.

### **Контрольные вопросы**

1. Какие наиболее распространенные нарушения обмена аминокислот приводят к наследственным заболеваниям?
2. Какие методы диагностики и профилактики наследственных болезней нарушений обмена аминокислот могут предотвратить развитие заболеваний?
3. Какие наиболее общие признаки характерны для большинства болезней нарушения обмена аминокислот?

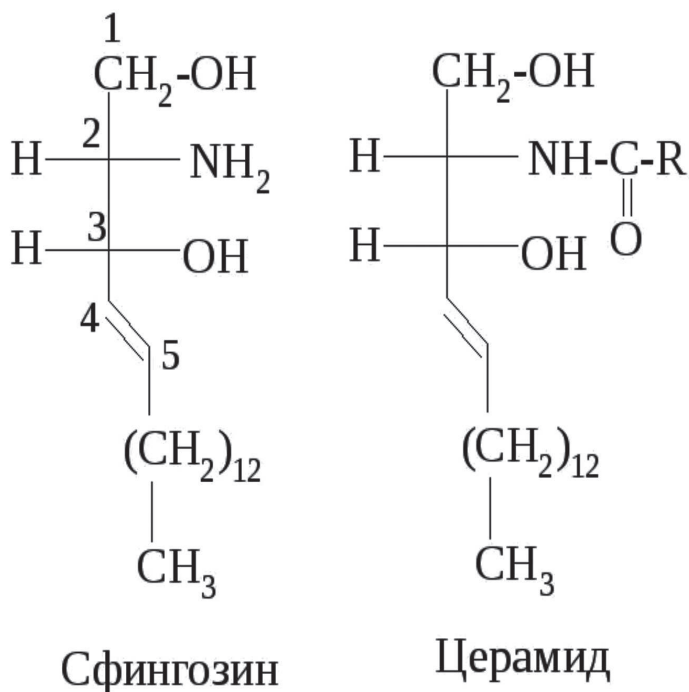


## ГЛАВА 19

## ЛИЗОСОМНЫЕ БОЛЕЗНИ. СФИНГОЛИПИДОЗЫ

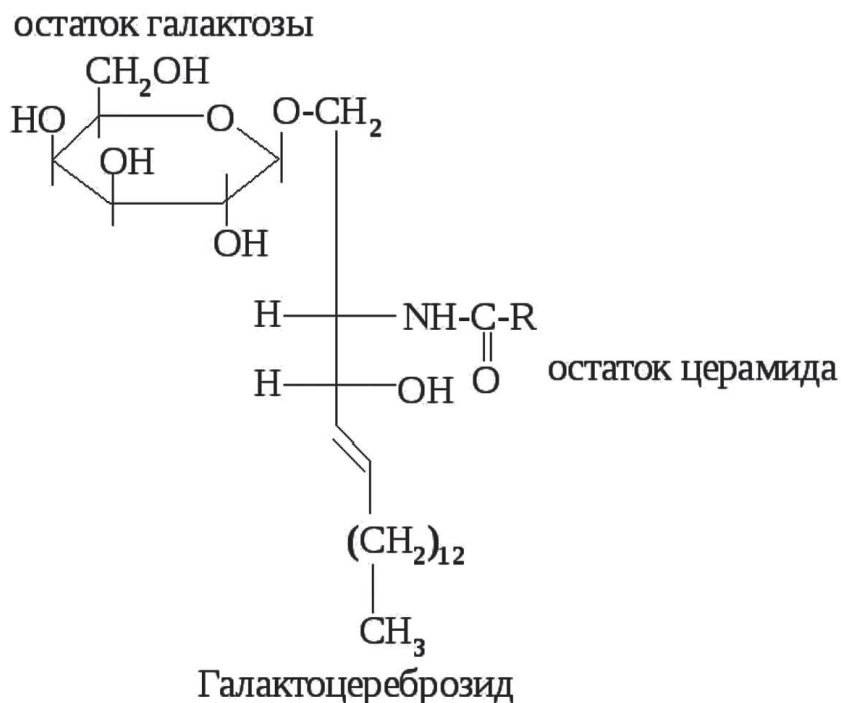
## 19.1. Сфинголипиды

Сфинголипиды являются производными не глицерина, а сфингозина – ненасыщенного длинноцепочечного двухатомного аминоспирта с транс-конфигурацией двойной связи.



Примером сфинголипидов являются церамиды – N-ацильные производные сфингозина, аминогруппа которого ацилирована жирной кислотой.

Галактозилцерамид синтезируется из церамида и UDPGal. Сульфогалактозилцерамид образуется в результате реакции галактозилцерамида с 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфатом (ФАФС, «активный сульфат»). ФАФС участвует также в биосинтезе других сульфолипидов, а именно сульфо(гадансто)глицеролипидов и сульфостероидов. Ганглиозиды синтезируются из церамида путем последовательного присоединения активированных сахаров, поставляемых, например, UDPGlc и UDPGal, и одной из сиаловых кислот, как правило N-ацетилнейраминовой кислоты.

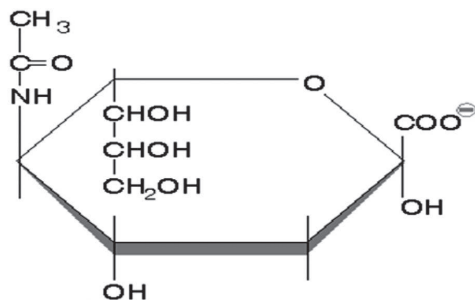


Таким образом может образоваться большое число ганглиозидов с возрастающими молекулярными массами. Большинство ферментов, катализирующих перенос остатков сахаров от нуклеотидсахаров (гликозилтрансферазы), находятся в аппарате Гольджи.

## 19.2. Гликолипиды

Гликолипиды включают углеводные остатки, чаще всего D-галактозы. Представителями гликолипидов являются цереброзиды (входят в состав оболочек нервных клеток) и ганглиозиды (выделены из серого вещества мозга). В цереброзидах остаток церамида связан с D-галактозой или D-глюкозой  $\beta$ -гликозидной связью.

Ганглиозиды отличаются от цереброзидов тем, что вместо остатка моносахарида они содержат сложный олигосахарид. Самые сложные из гликолипидов – ганглиозиды содержат один или более остатков сиаловой кислоты (NANA), которые придают молекулам этих гликолипидов отрицательный заряд, см. рисунок 19.2 (Рисунок 6-12, <http://humbio.ru/humbio/cytology/001140ae.htm>). Особенно много ганглиозидов содержится в плазматической мембране нейронов, где они составляют около 6% общей массы липидов. В настоящее время идентифицировано более 30 различных ганглиозидов, см. рисунок 19.3 (Рисунок 6-13, <http://humbio.ru/humbio/cytology/000db106.htm>).



Структура сиаловой кислоты  
(N-ацетилнейраминовой кислоты, или NANA).

Рисунок 19.2. (Рисунок6-12) Кислота сиаловая: структура. (<http://humbio.ru/humbio/cytology/001140ae.htm>)

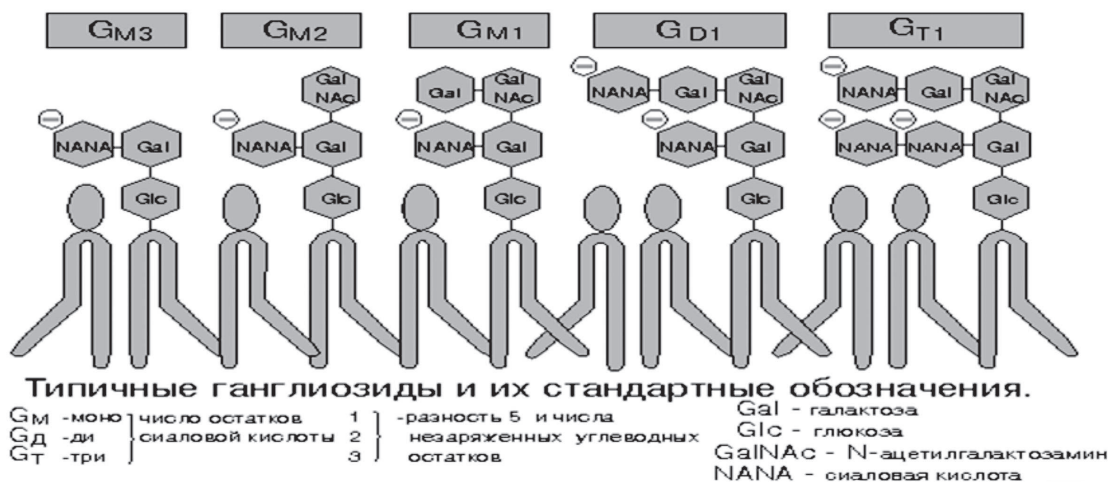


Рисунок 19.3. (Рисунок6-13) Ганглиозиды. (<http://humbio.ru/humbio/cytology/000db106.htm>)

**Функции гликофинголипидов.** Гликофинголипиды, являющиеся компонентами наружного слоя плазматической мембраны, могут участвовать в межклеточных взаимодействиях и контактах. Некоторые из них являются антигенами, например антиген Форссмана и вещества, определяющие группы крови системы АВО. Сходные олигосахаридные цепи обнаружены и у других гликопротеинов плазматической мембраны. Ряд ганглиозидов функционирует в качестве рецепторов бактериальных токсинов (например, холерного токсина, который запускает процесс активации аденилатциклазы).

**Болезни накопления липидов** характеризуются рядом постоянных признаков:

- 1) в тканях накапливаются сложные липиды, структурным компонентом которых является керамид;
- 2) скорость синтеза запасаемого липида сравнима со скоростью его биосинтеза у здоровых людей;

3) при этих заболеваниях наблюдается недостаток специфичного фермента в лизосомах, необходимого для гидролиза липида;

4) степень снижения активности фермента во всех тканях одинакова. С учетом всех вышеизложенных признаков были разработаны специальные методы диагностики данных заболеваний. Стало возможным также выявлять гетерозиготных носителей дефектных генов, ответственных за развитие этих заболеваний, и определять сфинголипидострофию у плода.

Множественная недостаточность сульфатаз приводит к накоплению сульфогалактозилцерамида, сульфостероидов и протеогликанов из-за одновременного недостатка ацилсульфатаз А, В, С и стероидсульфатазы.

Поскольку сфинголипиды являются важнейшими структурными компонентами клеточных мембран, в частности миелиновых оболочек нервных волокон, нарушение постоянно протекающего в организме их обновления и распада в лизосомах клеток создает патологическую картину поражения большинства жизненно важных органов, включая серое и белое вещества головного мозга. Дефекты деградации сфинголипидов связаны с недостаточностью соответствующих ферментов, специфических для каждого типа сфинголипидов (таблица 19.1. : <http://medbiol.ru/medbiol/biochem/000be156.htm>).

*Глобозиды* отличаются от цереброзидов тем, что имеют в своём составе несколько углеводных остатков, связанных с церамидом.

**В основе GM1** – ганглиозидозов лежит недостаточность ганглиозидазы. Их проявления сходны с клинической картиной GM2 -ганглиозидозов. Диагноз ганглиозидозов подтверждается при выявлении ферментативного дефекта в лейкоцитах.

### **19.3. Липидозы (Липоидозы, Наследственные нарушения обмена фосфолипидов и сфинголипидов)**

Липидозы – группа наследственных заболеваний, связанных с нарушением жирового обмена и отложением липидов в различных органах и тканях. Относятся к лизосомным болезням.

Эти заболевания, характеризующиеся накоплением избыточных количеств фосфолипидов и сфинголипидов в клетках, чаще всего в нервных, можно разделить на 3 группы:

- 1) болезни, обусловленные истинной демиелинизацией нервных волокон,
- 2) сфинголипидозы,
- 3) лейкоцидистрофии.

**При рассеянном склерозе**, который относится к первой группе заболеваний, наблюдается уменьшение содержания как фосфолипидов (в частности, этаноламинплазмалогена), так и сфинголипидов в белом веществе мозга; в результате белое вещество по составу становится похожим на серое вещество мозга. В белом веществе обнаруживаются эфиры холестерина, отсутствующие в норме, а спинномозговая жидкость характеризуется повышенным содержанием фосфолипидов.

### 19.3.1. Сфинголипидозы: общие сведения

#### Классификация

Согласно Международной классификации болезней десятого пересмотра (МКБ-10), различают:

E75 Нарушения обмена сфинголипидов и другие болезни накопления липидов.

E75.2 Другие сфинголипидозы. *Метахроматическая лейкодистрофия*

Сфинголипидозы – группа наследственных заболеваний, проявляющихся чаще всего в детском возрасте. Эти заболевания относятся к большой группе лизосомных болезней, или болезней накопления (Neufeld, Lim, Shapiro, 1975).

Сфинголипидозы – врожденные нарушения метаболизма липидов, главным образом сфинголипидов, входящих в состав клеточных мембран головного мозга и других органов. Нарушения обусловлены отсутствием лизосомных ферментов, катализирующих процессы распада сфинголипидов.

В клиническом плане болезни накопления сфинголипидов характеризуются прогрессирующими умственными и двигательными расстройствами вследствие изменений головного мозга, поражениями костей, паренхиматозных органов (печень, селезенка, почки), кожи и сетчатки глаз.

Основу молекулярной структуры сфинголипидов составляет керамид – продукт соединения через аминогруппу аминок спирта сфингозина и жирной кислоты. Разнообразие сфинголипидов связано с присоединением к керамиду более простых молекулярных групп, главным образом гексоз.

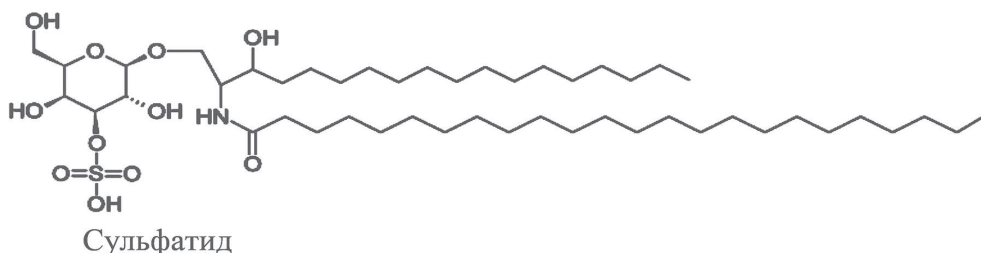
Сфинголипидозы (СЛ) – группа наследственных заболеваний, которая обусловлена снижением активности ферментов, обеспечивающих деградацию сфингомиелинов – галактозидов и цереброзидов. Сфингомиелины – сложные липиды, основным структурным компонентом которых является керамид. Разнообразие сфинголипидов объясняется различиями в структуре компонентов, присоединяющихся к керамиду, главным образом гексоз. В настоящее время идентифицировано несколько нозологических форм СЛ, сводные данные о них представлены в таблице 19.1 и рисунке 19.4.

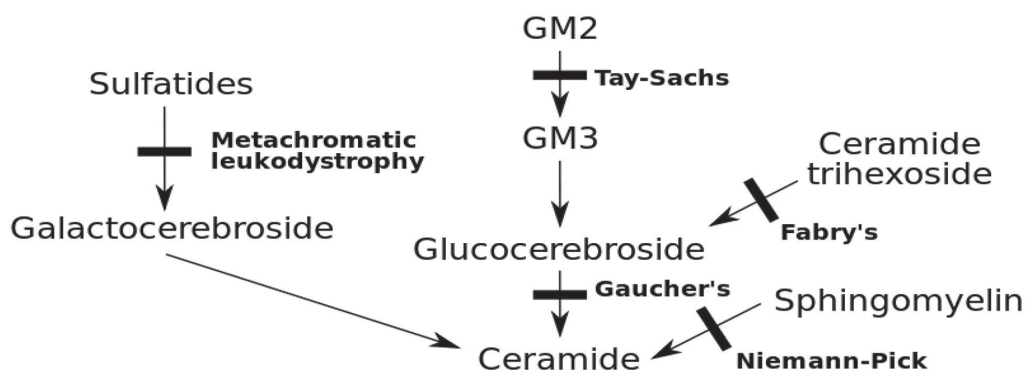
**Таблица 19.1. Сфинголипиды, метаболизм: сфинголипидозы**

Заболевание	Фермент, недостаточность которого обуславливает заболевание	Накапливающийся липид :	Клинические симптомы
Фукозидоз	альфа-Фукозидаза	Cer-Glc-GalNAc-Gal-:-Fuc Н-Изоантиген	Слабоумие, спастическое состояние мышц, утолщение кожи
Генерализованный ганглиозидоз	GM1-бета-Галактозидаза	Cer-Glc-Gal(NeuAc)-GalNAc-:-Gal Ганглиозид GM1	Умственная отсталость, увеличение печени, деформация скелета

Болезнь Тея-Сакса	Гексозаминидаза А	Cer-Glc-Gal-(NeuAc)-:GalNAc Ганглиозид GM2	Умственная отсталость, слепота, мышечная слабость
Вариант болезни Тея-Сакса, или болезнь Сандхоффа	Гексозаминидазы А и В	Cer-Glc-Gal-Gal-:GalNAc Глобозид + ганглиозид GM2	Те же, что и в случае болезни Тея-Сакса, но развиваются быстрее
Болезнь Фабри (сильно выражена только у мужчин); рецессивный генетический признак, связан с X-хромосомой	альфа-Галактозидаза	Cer-Glc-Gal-:Gal Глоботриаозилцерамид	Кожная сыпь, почечная недостаточность
Церамидлактозиллипидоз	Церамидлактозидаза (бета-галактозидаза)	Cer-Glc-:Gal Церамидлактозид	Прогрессирующее поражение мозга, увеличение печени и селезенки
Метахроматическая лейкодистрофия	Арилсульфатаза	Cer-Gal-:OSO <sub>3</sub> 3-Сульфогалактозилцерамид	Умственная отсталость и психические нарушения у взрослых; демиелинизация
Болезнь Краббе	бета-Галактозидаза	Cer-:Gal Галактозилцерамид	Умственная отсталость, почти полное отсутствие миелина
Болезнь Гоше	бета-Глюкозидаза	Cer-:Glc Глюкозилцерамид	Увеличение печени и селезенки, эрозия трубчатых костей, умственная отсталость у детей
Болезнь Нимана-Пика	Сфингомиелиназа	Cer-:P-холин Сфингомиелин	Увеличение печени и селезенки, умственная отсталость; фатальна в раннем возрасте
Болезнь Фарбера	Церамидаза	Ацил-:Сфингозин Церамид	Хрипота, дерматит, деформация скелета, умственная отсталость; фатальна в раннем возрасте

Обозначения: NeuAc – N-ацетилнейраминовая кислота; Cer – церамид; Glc – глюкоза; Gal – галактоза; Fuc – фукоза. Заболевание Фермент, недостаточность Накапливающийся липид : Место действия Клинические симптомы





**Рисунок 19.4.** Диаграмма демонстрирует нарушение биохимического пути метаболизма сульфатида. Neufeld E.F., Lim T.W., Shapiro L.J. Inherited disorders of lysosomal metabolism, Ann. Rev. Biochem. 44:357 (1975).

### 19.3.2. Метахроматическая лейкодистрофия (МЛД)

**Метахроматическая лейкодистрофия** (англ. *Metachromatic leukodystrophy (MLD)*), также *сульфатидный липидоз* – редкое наследственное заболевание из группы лизосомных болезней накопления с аутосомно-рецессивным механизмом наследования нарушения обмена веществ [Le, Tao., 2012]. Данная нозологическая единица из разряда лейкодистрофий (патология роста и/или развития миелиновой оболочки, покрывающей большинство нервных волокон центральной и периферической нервной системы) относится к сфинголипидозам. Лейкодистрофии – это группа заболеваний, характеризующихся прогрессирующим поражением белого вещества головного мозга и глии (в слове «лейкодистрофия» корень «лейко» происходит от латинского слова *leucos* – белый). Первое описание МЛД было сделано Альцгеймером в 1919 году. Тип наследования заболевания аутосомно-рецессивный.

Метахроматическая лейкодистрофия встречается с частотой от 1 на 40 000 [Т. Р. Харрисон., 1996] до 1 на 160 000 в зависимости от региона [Metachromatic leukodystrophy at «Dorland's Medical Dictionary» Reviewed September 2007 (англ.)].

**Патогенез** Метахроматическая лейкодистрофия развивается в результате дефицита лизосомного фермента арилсульфатазы А (APCA, англ. *ARSA*) [Роеппел Р, Хабета М, Марсão А, et al., (March 2005)] или цереброзидсульфатазы. На фоне развёртывания клинической симптоматики уровень активности фермента в лейкоцитах существенно снижается и составляет менее 10 % от нормальных величин. Тем не менее, одного анализа активности цереброзидсульфатазы недостаточно для верификации диагноза. Описана форма псевдодефицита APCA (англ. *ARSA pseudo deficiency*), при которой активность фермента составляет от 5 до 20 % от нормы и при этом отсутствуют признаки метахроматической лейкодистрофии [Fluharty, Arvan.GeneReviews, 2006 англ.]. На фоне дефицита или недостаточности фермента происходит накопление сульфатида во многих тканях организма, что в конечном счёте приводит к разрушению миелиновой оболочки нервных волокон.

Миелиновая оболочка – липидное покрытие нервного волокна, которое не только защищает его, но и способствует повышению скорости проведения импульса по нерву. Потеря миелина центральной нервной системой (мозг) и периферической нервной системой нарушает систему контроля и снижает мобильность мышц, таким образом нарушая их функцию.

В основе патогенеза большинства случаев МЛД лежит мутация в структурном гене фермента арилсульфатазы А, картированном на хромосоме 22q 13.31-qter и содержащем 8 экзонов. К настоящему времени описано более 60 различных патологических мутаций, что свидетельствует о выраженной аллельной гетерогенности этого заболевания. Показано, что арилсульфатаза А обеспечивает гидролиз сульфата от цереброзил сульфатов (галактозил- и лактозилсульфатов) в лизосомах миелина центральной и периферической нервной системы, а также некоторых внутренних органов, прежде всего печени и почек. При возникновении блока этих обменных превращений происходит накопление субстратов в лизосомах, приводящее к нарушению функции нейронов. Наряду с классическим генетическим вариантом МЛД описано несколько случаев со снижением активности арилсульфатазы А вследствие мутации в гене просапозина, локализованном на хромосоме 10 и содержащем 15 экзонов. Показано, что продуктом этого гена являются четыре активаторных белка: сапозин А, В, С, D – один из которых, а именно сапозин В, регулирует активность арилсульфатазы А. При гистологическом исследовании мозга больного обнаруживаются увеличенные в размерах лизосомы, содержащие гранулярные массы диаметром от 5 до 15 мкм, окрашивающиеся метахроматически. При прижизненном исследовании мозга с помощью метода магнитно-резонансной томографии обнаруживаются очаги демиелинизации, наиболее часто концентрирующиеся вокруг четвертого желудочка и субкортикально (рисунок 19.5).

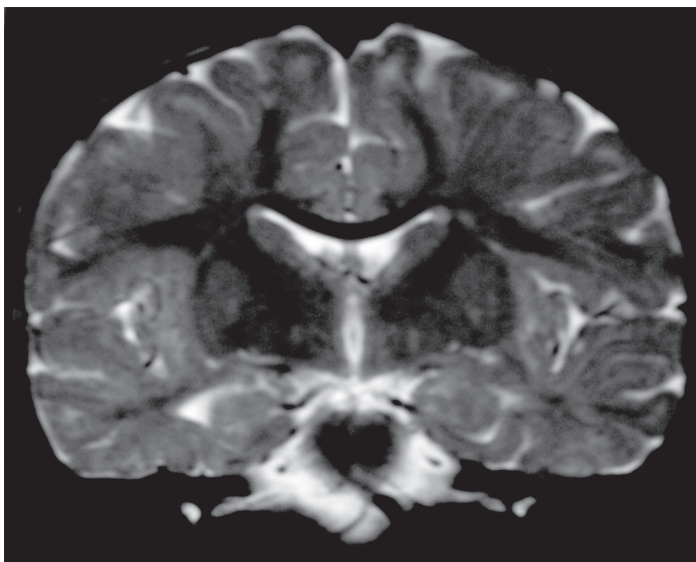


Рисунок 19.5. Вид фронтального среза головного мозга при метахроматической лейкодистрофии (МЛД).



Клинические проявления МЛД полиморфны. Выделяют несколько вариантов, отличающихся возрастом начала, характером клинических симптомов и тяжестью течения. Первый вариант встречается довольно редко и называется врожденным; клиническая картина разворачивается в возрастном диапазоне от рождения до 4-месячного возраста. Характерные симптомы: мышечная гипотония, снижение сухожильных рефлексов, эпизоды апноэ, цианоз и тонико-клонические судороги. Смерть больных наступает спустя несколько месяцев или даже дней от момента появления первых симптомов. Второй вариант – наиболее распространенный, его называют ювенильным. Симптомы при этой форме заболевания становятся заметными в возрасте от 6 месяцев до 2 лет, после периода нормального психомоторного развития. У ребенка возникает мышечная гипотония; потеря ранее приобретенных двигательных навыков; прогрессирующая умственная отсталость; атрофия дисков зрительных нервов; корковая слепота, дизартрия, переходящая в афазию; атаксия; бульбарный или псевдобульбарный паралич и судороги. В терминальных стадиях заболевания мышечная гипотония сменяется мышечным гипертонусом с появлением спастического тетрапареза. Смерть больных наступает спустя 2–3 года от начала заболевания. Взрослая форма начинается на втором-третьем десятилетии жизни. Клинические проявления заболевания характеризуются наличием выраженных психических нарушений в виде психозов, шизофреноподобных симптомов в виде бреда, слуховых галлюцинаций и деперсонализации. По мере прогрессирования заболевания к этим симптомам присоединяется очаговая неврологическая симптоматика в виде пирамидных и экстрапирамидных симптомов, атрофии дисков зрительных нервов, энуреза и энкопреза. Часто такие больные оказываются пациентами психиатрических клиник. Смерть больных наступает через пять – десять лет от манифестации заболевания. Диагноз МЛД основывается на типичных клинических проявлениях, наличии очагов поражения белого вещества на МРТ головного мозга, снижении активности арилсульфатазы А в лимфоцитах и культуре кожных фибробластов и повышении уровня сульфатидов в моче больного. Молекулярно-генетическая диагностика затруднена в связи с выраженной аллельной гетерогенностью. В отягощенных семьях возможно проведение родовой диагностики на основе использования биохимических методов.

Метахроматическая лейкодистрофия (MLD) вызвана гомозиготной или сложной гетерозиготной мутацией в гене арилсульфатазы А (ARSA, 607574) на хромосоме 22q13.

Gieselmann et al. (1994) заявили, что в генах ARSA при метахроматической лейкодистрофии были идентифицированы 31 аминокислотная замена, 1 нонсенс мутация, 3 небольших делеции, 3 сплайсинговые мутации донорного сайта и 1 объединенная миссенс и сплайсинг мутация. Два из этих мутантных аллелей составляют около 25% аллелей MLD каждый.

#### *Аллели псевдодефицита*

Gieselmann et al. (1989) определили 2 аллеля псевдодефицита гена ARSA (607574,0001 – 607574,0002).

Hohenschutz et al. (1988) описал вероятный случай генетического соединения между метахроматической лейкодистрофией и псевдодефицитом. У пациента развилась легкая спастичность левой ноги в возрасте 36 лет и левосторонний ретробульбарный

неврит в возрасте 62 лет, а также небольшая спастичность обеих ног. Был поставлен диагноз распространения энцефаломиелита. Были и психические проявления. Исходя из фактов, что аллель псевдодефицита в локусе ARSA является общим (частота генов = 13,7-17%), генетические соединения между аллелем псевдодефицита и истинным аллелем дефицита могут быть такими же частыми, как 0,073%, и что остаточная активность фермента может упасть ниже критического порога у таких людей, Hohenschutz et al. (1989) предположил, что генотип соединения гетерозигот может быть связан с нейропсихическими нарушениями позднего начала.

**Лечение** не разработано – не существует лекарства от метахроматической лейкодистрофии. Терапия сводится к купированию болевого синдрома и симптомов заболевания. В случае мягких форм болезни, характеризующихся умеренными проявлениями клинической картины, существует возможность трансплантации костного мозга (в том числе, стволовых клеток). Однако, эти методики только разрабатываются и проходят клинические испытания, в результате которых будет выяснена возможность замедления прогрессирования болезни, а также возможность полной остановки развития патологического процесса на уровне клеток центральной нервной системы. Тем не менее, данные полученные в процессе исследования периферической нервной системы не так драматичны, а долгосрочные результаты проведенной терапии на сегодняшний день неоднозначны.

В то же время ведутся разработки других вариантов лечения метахроматической лейкодистрофии. Они включают в себя методы генной терапии, фермент-заместительной терапии (англ. *ERT*), субстрат-снижающую терапию (с англ. – «СРТ») и повышение активности собственного фермента (англ. *EET*).

В 2008 году группа международных исследователей при поддержке фонда создала Международный реестр метахроматической лейкодистрофии из научных, академических и отраслевых ресурсов. Задача консорциума создать и управлять общим хранилищем данных, в том числе историй болезни пациентов с сульфатидным липидозом [MLD Registry <http://www.MLDregistry.org>].

### Литература

1. Le, Tao. First Aid for the USMLE Step 1 / Tao Le, Bhushan, Hofmann. – McGraw-Hill, 2012. – P. 117
2. Poppel P, Habetha M, Marcão A, Büsow H, Berna L, Gieselmann V (March 2005). "Missense mutations as a cause of metachromatic leukodystrophy, Degradation of arylsulfatase A in the endoplasmic reticulum". FEBS J. 272 (5): 1179–88.
3. Metachromatic leukodystrophy at «Dorland's Medical Dictionary» (англ.)
4. Т. Р. Харрисон. Внутренние болезни в 10 книгах. Книга 8. Пер. с англ. М., Медицина, 1996, 320 с.: ил. Глава 316. Лизосомные болезни накопления (с. 250–273). med-books.info. Metachromatic leukodystrophy at Genetics Home Reference. Reviewed September 2007 (англ.)
5. Fluharty, Arvan. "Arylsulfatase A Deficiency: Metachromatic Leukodystrophy, ARSA Deficiency". GeneReviews, 2006 (англ.)
6. Hohenschutz, C., Eich, P., Friedl, W., Waheed, A., Conzelmann, E., Propping, P. Pseudodeficiency of arylsulfatase A: a common genetic polymorphism with possible disease implications. Hum. Genet. 82: 45-48, 1989.

7. Hohenschutz, C., Friedl, W., Schlor, K.-H., Waheed, A., Conzelmann, E., Sandhoff, K., Propping, P. Probable metachromatic leukodystrophy/pseudodeficiency compound heterozygote at the arylsulfatase A locus with neurological and psychiatric symptomatology. *Am. J. Med. Genet.* 31: 169-175, 1988.

8. Gieselmann, V., Polten, A., Kreysing, J., von Figura, K. Arylsulfatase A pseudodeficiency: loss of a polyadenylation (sic) signal and N-glycosylation site. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 86: 9436-9440, 1989.

9. Gieselmann, V., Zlotogora, J., Harris, A., Wenger, D. A., Morris, C. P. Molecular genetics of metachromatic leukodystrophy. *Hum. Mutat.* 4: 233-242, 1994. [

## 19.4. Ганглиозидозы GM2

**К ганглиозидозам GM2** – аутосомно-рецессивным заболеваниям, обусловленным недостаточностью гексозаминидазы, – относят болезнь Тея-Сакса и болезнь Сандхоффа. Мужчины и женщины болеют одинаково часто. Обе болезни могут начинаться как в раннем детстве, так и в молодости. В последнем случае (взрослые формы заболеваний) часто возникают нарастающая атаксия, легкие пирамидные симптомы, возможны большие эпилептические припадки. Иногда первыми проявлениями могут быть симптомы поражения мотонейронов (нарастающая слабость и мышечные спазмы), напоминая боковой амиотрофический склероз. Глазное дно обычно не изменено, но у части больных имеется типичный для ранних форм симптом вишневой косточки. Диагноз подтверждается при обнаружении цитоплазматических включений при электронной микроскопии или сниженной активности гексозаминидазы в лейкоцитах.

### 19.4.1. Болезнь ТЕЯ-САКСА; ТСД (# 272800ICD +)

*Альтернативные названия; символы*

GM2-ганглиозидоз, ТИП I

#### **Болезнь Тея-Сакса: общие сведения**

Болезнь Тея-Сакса (Tay-Sachs disease; MIM 272800) – наследственное нейрометаболическое, связанное с накоплением в головном мозге ганглиозида GM2. Болезнь Тея-Сакса является аутосомно-рецессивным, прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием, которое, в классической инфантильной форме, как правило, приводит к смертельному исходу в возрасте 2 или 3-х лет.

Выявлен взрослый вариант этой болезни – ювенильный, при котором течение болезни более благоприятное с мозжечковой атаксией и разнообразными неврологическими расстройствами. Первые случаи описаны Тая в 1881 году и Sachs в 1887 году. Болезнь Тея-Сакса обусловлена дефицитом лизосомного фермента альфа цепи бета-гексозаминидазы. Бета-гексозаминидаза (EC 3.2.1.52.) существует в двух формах – А и В. Гексозаминидаза А (hexosaminidase A; HEXA) – лизосомный фермент, катализирующий катаболизм GM2 ганглиозида. При отсутствии данного фермента в лизосомах клеток накапливается субстрат реакции – GM2 ганглиозид, главным образом в центральной нервной системе.

При патолого-анатомическом исследовании обнаруживаются увеличение мозга, явления гидроцефалии, диффузная атрофия отдельных областей больших полушарий, а также истончение зрительных нервов. Лечение симптоматическое. Formiga и др. (1988) сообщили, что структурный ген гексозаминадазы А расположен между 15q22 и 15q25 и включается в состав делеции. С помощью *in situ* гибридизации с высоким разрешением, в Takeda и соавт. (1990) сузили локус расположения гена до 15q23-q24. Используя клон кДНК для *in situ* гибридизации, Накаи и др. (1991) локализовали ген HEXA на 15q23-q24 хромосоме.

Myerowitz и Костиган (1988) показали, что наиболее частым поражением ДНК при болезни Тея-Сакса у ашкенази является инсерция (вставка) 4-п.н. в экзон 11 гена HEXA (606869.0001). Методом молекулярного анализа гена HEXA было показано, что две формы, ювенильная и классическая инфантильная формы, болезни Тея-Сакса вызываются разными аллелями одного и того же гена (Paw et al., 1990). Пациенты с классической формой Тея-Сакса с полным отсутствием гексозаминадазы А умирают в возрасте до 5 лет, пациенты с частичной недостаточностью умирают в возрасте 15 лет. Танака и др. (1990) выявлена мутация с заменой arg178-на his, называемая DN (см 606869.0006) у 6 пациентов и у одного пациента мутация в том же кодоне: с заменой C532T, приводящей к замене arg178-на-cys в белке (см606869.0007).

Болезнь Тея-Сакса примерно в 100 раз чаще встречается у детей ашкенази еврейского происхождения (в Центрально-Восточной Европе), чем у нееврейских младенцев (Kaback и др., 1977).

Taniike и др. (1995) воспроизвели мышиную модель болезни Тея-Сакса целенаправленным повреждением гена HEXA.

Гвидотти и др. (1999) показали, что внутривенное совместное введение аденовирусных векторов, кодирующих альфа- и бета-субъединицы, приводит к преимущественной трансдукции в печень, что имеет важное значение для получения наиболее успешных результатов. Только введение обеих субъединиц обеспечивает избыточную экспрессию Hexa, приводящую к массивной секреции фермента в сыворотку, а также к полному или частичному восстановлению ферментативной активности во всех тестируемых периферических тканях. Эти результаты подчеркивают необходимость гиперэкспрессии обеих субъединиц гетеродимерных белков, чтобы получить высокий уровень секреции у животных, дефектных по 1 субъединице. В противном случае, эндогенная дефектная субъединица является ограничивающим фактором.

### Литература

1. Myerowitz, R., Costigan, F. C. The major defect in Ashkenazi Jews with Tay-Sachs disease is an insertion in the gene for the alpha-chain of beta-hexosaminidase. *J. Biol. Chem.* 263: 18587-18589, 1988.
2. Kaback, M. M., Rimoin, D. L., O'Brien, J. S. Tay-Sachs Disease: Screening and Prevention. New York: Alan R. Liss (pub.) 1977.
3. Taniike, M., Yamanaka, S., Proia, R. L., Langaman, C., Bone-Turrentine, T., Suzuki, K. Neuropathology of mice with targeted disruption of Hexa gene, a model of Tay-Sachs disease. *Acta Neuropath.* 89: 296-304, 1995.
4. Guidotti, J. E., Mignon, A., Haase, G., Caillaud, C., McDonell, N., Kahn, A., Poenaru, L.

Adenoviral gene therapy of the Tay-Sachs disease in hexosaminidase A-deficient knock-out mice. *Hum. Molec. Genet.* 8: 831-838, 1999.

5. Takeda, K., Nakai, H., Hagiwara, H., Tada, K., Shows, T. B., Byers, M. G., Myerowitz, R. Fine assignment of beta-hexosaminidase A alpha-subunit on 15q23-q24 by high resolution in situ hybridization. *Tohoku J. Exp. Med.* 160: 203-211, 1990.

6. Formiga, L. de F., Poenaru, L., Couronne, F., Flori, E., Eibel, J. L., Deminatti, M. M., Savary, J. B., Lai, J. L., Gilgenkrantz, S., Pierson, M. Interstitial deletion of chromosome 15: two cases. *Hum. Genet.* 80: 401-404, 1988.

## 19.4.2. Синдром Фабри (болезнь Фабри, диффузная ангиокератома туловища, наследственный дистопический Липоидоз)

### Синдром Фабри: общие сведения

Синдром Фабри (болезнь Фабри, диффузная ангиокератома туловища, наследственный дистопический липоидоз; MIM 301500) впервые описали Fabry в Германии и Anderson в Англии 1898 году (Fabry J., 1898).

Болезнь Фабри – наследственное лизосомное заболевание, связанное с недостаточностью альфа-галактозидазы А, что приводит к накоплению гликофинголипидов (церамид-тригексозида) в стенках мелких сосудов всех органов, эпителии роговицы, клубочках почек, миокарде, в нейронах вегетативных ганглиев.

Клиническая картина характеризуется развитием сосудистых поражений кератизированных узелков на коже губ, щек, подкрыльцовой (подмышечной) впадины, концевых фаланг пальцев, живота, ягодиц, груди и других частей туловища в виде мелких сосудистых пятен с окраской различной интенсивности, возвышающихся над окружающей кожей. При травмировании узелки кровоточат, гистологически они идентичны ангиокератомам на пальцах. У больных могут быть повышение артериального давления, изменения сосудов сетчатки, помутнение роговицы глаз, почечная и сердечная недостаточность. Отмечается увеличение фосфатов и липидов в крови, фосфолипидные скопления в коже и гиперкератоз. Позже развиваются инфаркты мозга, кардиомегалия, ишемия миокарда, ангидроз, гиперкератоз, остеопороз. Характерны замедленный рост и позднее начало пубертата. Больные обычно умирают от почечной недостаточности, поражения сердца и сосудов головного мозга.

Тип наследования – рецессивный, сцепленный с X-хромосомой.

Ген альфа-галактозидазы А (ген GLA) локализуется на X-хромосоме человека в позиции q22. кДНК гена GLA человека клонирована в 1985-1986 годах. Уникальной особенностью кДНК является отсутствие 3'-нетранслируемой области. Структура гена изучена в 1988 году (Bishop D.F., 1988). Ген GLA (около 12 килобаз) состоит из 7 экзонов и 6 интронов. Размер экзонов варьирует от 92 до 291 пар оснований, интронов – от 200 до 3700. В первом экзоне локализуется целиком 5'-нетранслируемая область, кодирующая первые 33-и аминокислоты зрелого пептида и часть сигнального пептида. Ген содержит 12 Alu повторов, рассеянных по интронным последовательностям, что составляет 30 процентов генетической информации гена. Как результат Alu-Alu рекомбинации в гене выявлена делеция (Kornreich R., 1989b). В интроне 1 находятся СТ повторы из 84 нукле-

отидов. Сигнальные последовательности полиаденилирования расположены в кодирующей части, на расстоянии 12 пар оснований от терминирующего кодона.

Первая мутация в гене альфа-галактозидазы А (GLA-гене) человека была описана Berstein H.S. в 1989 году. Выявлены миссенс-, нонсенс-, сплайсинговые мутации, делеции, дубликации, инсерции.

Диагноз при развернутой клинической картине можно установить уже при осмотре; для его подтверждения определяют экскрецию гликофинголипидов с мочой и активность альфа-галактозидазы в лейкоцитах.

Заболевание часто приводит к терминальной почечной недостаточности. Гемодиализ переносится плохо: из-за поражения сосудов больные тяжело реагируют на перепады АД во время сеанса. Несмотря на частые рецидивы в трансплантате, трансплантация почки дает удовлетворительные результаты.

### **Литература**

1. Fabry J. Ein Beitrag Zur Kenntnis der Purpura haemorrhagica nodularis (Purpura papulosa hemorrhagica Hebrae). – Arch.Derm.Syph., 1898, v. 43, p. 187-200
2. Bishop D.F., Kornreich R., Desnick R.J. Structural organization of the human alpha-galactosidase A gene: further evidence for the absence of a 3-prime untranslated region. – Proc.Natl.Acad.Sci., 1988, v. 85, p. 3903-3907.
3. Kornreich R., Bishop D.F., Desnick R.J. The gene encoding alpha-galactosidase A and gene rearrangements causing Fabry disease. – Trans.Assoc.Am.Phys., 1989, v. 102, p. 30-43.

## **19.5. Нейрональные Цероид-Липофусцинозы**

Взрослая форма нейрональных цероид-липофусцинозов – болезнь Куфса – начинается в подростковом либо зрелом возрасте. Болезнь характеризуется деменцией, эпилептическими припадками, атаксией, спастичностью и слепотой. Накопление липофусцина в коже или конъюнктиве, а также характерные электронно-микроскопические изменения подтверждают диагноз.

К нейрональным цероид-липофусцинозам относятся также болезнь Краббе, болезнь Гоше и болезнь Нимана-Пика.

Липофусцин (название произошло от греческого *lipos* – липиды и латинского *fuscus* – темный) содержит гетерогенную смесь сшитых поперечными связями полимеров липидов и недопереваренных белковых продуктов (Tsuchida et al., 1987). В основном они происходят из поврежденных пероксидацией клеточных органелл, samozaxваченных лизосомами. Предполагается, что липофусцин является компонентом возрастных пятен.

### **Литература**

1. Tsuchida M., Miura T., Aibara K. 1987. Lipofuscin and lipofuscin-like substances. Chem. Phys. Lipids. 44, 297-325.

### 19.5.1. Болезнь Гоше

**Болезнь Гоше типа I** вызвана гомозиготной или сложной гетерозиготной мутацией в гене, кодирующем кислую бета-глюкозидазу (GBA, 606463). Ген глюкоцереброзидазы (бета-глюкозидазы – GBA) локализуется на 1-ой хромосоме человека в позиции q21 (Cormand B., 1997). Gene: [01q21/GCGD] glucocerebrosidase (D-glucosyl-N-acylsphingosine glucohydrolase).

Болезнь Гоше (Gaucher disease; MIM 230800) описана Gaucher в 1882 году. Представляет собой форму внутриклеточных липоидозов, характеризующуюся накоплением цереброзидов в клетках ретикулоэндотелиальной системы. Патологоанатомически наиболее тяжелые изменения наблюдаются в селезенке, печени, а также в лимфатических узлах, костном мозге, легких, почках. **Ретикуло-эндотелиальная система (РЭС)** – устаревший термин для обозначения тканевых макрофагов (например: микроглия, клетки Купфера в печени, альвеолярные макрофаги, клетки Лангерганса).

Клинически различают три формы болезни Гоше:

- 1) Тип I (MIM 230800) – взрослый тип
- 2) Тип II (MIM 230900) – инфантильный тип
- 3) Тип III (MIM 231000) – ювенильный тип.

**Болезнь Гоше I (нейронопатического) типа** встречается с частотой 1/50000. Заболевание наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Болезнь Гоше, тип I, проявляется обычно гепатоспленомегалией, панцитопенией и инфильтрацией костного мозга характерными «клетками Гоше» уже в детском возрасте. Существует широкий спектр тяжести клинического проявления болезни Гоше I типа, начиная от пострадавших младенцев до бессимптомного течения у взрослых без вовлечения нервной системы (Goldblatt, 1988). **Тип II представляет собой нейронопатическую инфантильную форму.** Средний возраст заболевания 3-5 мес. Нейродегенеративные процессы происходят быстро, с вовлечением черепно-мозговых нервов и экстрапирамидных путей (Stone и др., 2000). Неврологические осложнения (тяжелые судорожные приступы, гипертонус, апноэ, выраженная задержка умственного развития) проявляются к 6 месяцам. Симптомы включают гепатоспленомегалию, широкое прогрессирующее повреждение мозга, нарушенную моторику глаз, спастичность, судороги, ригидность конечностей. Больные дети плохо сосут и глотают; обычно умирают в возрасте от одного до двух лет. Частота встречаемости 1/100000, этнической предрасположенности не имеет. **Тип III** может начинаться как в детстве, так и у взрослых с частотой встречаемости 1/100000. У большинства **характеризуется медленным прогрессированием и умеренностью неврологических симптомов.** Первым неврологическим признаком является, как правило, окуломоторная апраксия, расстройство глазодвигательных функций. По мере прогрессирования заболевания, присоединяется атаксия, мышечная спастичность и слабумие. Наряду с гепатоспленомегалией в патологический процесс вовлекаются и другие органы и системы. Спленомегалия безболезненная и обычно выявляется случайно. Больные доживают до подросткового и взрослого возраста.

Одна из главных причин инвалидизации при 1 и 3 типе болезни Гоше — пораже-

ние костной ткани. Нарушение нормальных физиологических процессов происходит из-за накопления липидов в остеокластах и замещении инфильтратами клеток Гоше нормальных элементов костного мозга. Несмотря на увеличение печени и её дисфункцию, случаи тяжелой печеночной недостаточности встречаются редко.

В 1984-1987 годах были проведены работы по клонированию и секвенированию кДНК гена глюкоцереброзидазы (glucocerebrosidase; GBA). В 1988-89 годах был клонирован ген глюкоцереброзидазы. Промоторная область гена содержит «ТАТА»-подобные и «СААТ»-подобные последовательности и утрачивает «GGCGGG» мотив. Ген разделяется 10 интронами на 11 экзонов. 3' область содержит два сигнала полиаденилирования: «СТТААА» последовательность для полиаденилирования 2,6 kb мРНК и «АТТААА» последовательность для полиаденилирования минорной 2,2 kb мРНК.

**Псевдоген** глюкоцереброзидазы имеет 96 процентов гомологии с функциональным геном. Интроны 2, 4, 5 и 7 несут большие делеции, состоящие из Alu последовательностей (Horowitz M., 1989; Tayebi N., 1996).

Глюкоцереброзидаза (бета-глюкозидаза; glucocerebrosidase; GBA); EC 3.2.1.21; EC 3.2.1.45) – лизосомный фермент, катализирующий гидролизный распад бета-D-глюкозилцерамида на бета-D-глюкозу и церамид (Brady R.O., 1983; Beutler E., 1995b; Dinur T., 1986; Mistry P.K., 1993).

Первая мутация в гене глюкоцереброзидазы человека была выявлена в 1987 году Tsuji S.

Почти 200 мутаций в гене GBA были описаны у пациентов с болезнью Гоше типов I (230800), II (230900), III (231000) (Jmoudiak и Futerman, 2005). Tsuji и др. (1987) определили мутацию в гене GBA (L444P; 606463,0001) у пациентов с болезнью Гоше типов I, II, и III. Четыре мутации (L444P; D409H; 606463,0006, A456P и V460V; 606463,0009), как известно, присутствуют также и в псевдогене.

Tayebi др. (2003) изучили образцы ДНК 240 пациентов с болезнью Гоше, используя несколько взаимодополняющих подходов к идентификации и характеристики рекомбинантных аллелей. Среди 480 исследованных аллелей было выявлено 59 рекомбинантных аллелей, в том числе 34 конверсии генов, 18 сшивков и 7 нижеследующих дублирований. Некоторые пациенты были носителями 2 рекомбинаций или мутаций в одном и том же аллеле. Гомозиготность по рекомбинантным аллелям была связана с ранней летальностью. Были определены десять различных кроссоверных сайтов и отдельных пентамерных мотивов (САССА), которые могут быть горячими точками рекомбинации.

**Конверсия гена** – *нереципрокная гомологичная рекомбинация, основанная на корреляции неспаренных оснований в рекомбинационном гетеродуплексе.*

Энквист и др. (2006) использовали систему Cre / LoxP, обуславливающую удаление экзонов 9-11 гена GBA у мышей после рождения. Мыши были жизнеспособными, но с недостаточностью глюкоцереброзидазы и у них развилась спленомегалия и микроцитарная анемия сходная с болезнью Гоше I типа, включая инфильтрацию клеток Гоше в костном мозге, селезенке и печени. Трансплантация костного мозга или генная терапия ретровирусным вектором предотвращали болезнь и исправляли уже существующий фенотип Гоше. Оба вида терапии привели к увеличению активности GBA и снижению числа клеток Гоше на 5 -6 месяц после лечения.



### Мутации гена ГЦБ при болезни Гоше I типа

Наиболее распространенная мутация гена ГЦБ при болезни Гоше I типа N370S, которая вызвана заменой нуклеотида А на G в позиции 1226 комплементарной ДНК. Эта мутация присутствует в 67,2% мутантных аллелей у евреев ашкенази и в 35% у пациентов других национальностей [Mankin H.J., Rosenthal D.I., Xavier R., 2001]. По данным Международного регистра, наиболее частым генотипом болезни Гоше в мире является генотип N370S/N370S [Beutler E., Demina A., Gelbart T., 1994].

Результаты молекулярно-генетических исследований, проведенных у российских пациентов с болезнью Гоше, показали: мутацию N370S выявили у 114 (93%) больных, в том числе генотип N370S/N370S у 23 (19%) больных, генотип N370S/L444P у 21 (17%), генотип N370S / IVS2+1 у 2, генотип N370S/другая мутация у 68 (56%) больных.

Миссенс-мутация 1444P вызвана заменой нуклеотида Т на С в позиции 1448 комплементарной ДНК. Данная мутация встречается с частотой 3,1% мутантных аллелей в популяции евреев ашкенази и 27,5% аллелей у пациентов других национальностей [Mankin H.J., Rosenthal D.I., Xavier R., 2001]. По данным Международного регистра, генотип N370S/L444P занимает второе место по частоте встречаемости [International Collaborative Gaucher Group Gaucher Registry Annual Report; 2011].

В российской группе мутацию 444P выявили у 25 (21%) больных, в том числе генотип N370S/L444P у 21 (17%), 1444P/8466 у 1, 444P/другая мутация у 3 больных.

Мутации, приводящие к нарушению синтеза ГЦБ, в гомозиготном и сочетанном гетерозиготном (84GG/IVS2+1) состоянии являются летальными. Мутация 8466 приводит к сдвигу рамки считывания, что препятствует трансляции глюкозидазы, а мутация IVS2+1 (замена G на A в позиции 1067) нарушает сплайсинг первичного транскрипта вследствие удаления из него 2 экзона [Beutler E., Demina A., Gelbart T., 1994].

### Литература

1. Cormand B., Grinberg D., Gort L., Fiumara A., Barone R., Vilageliu L., Chabas A. Two new mild homozygous mutations in Gaucher disease patients: clinical signs and biochemical analysis. – *Am.J.Med.Genet.*, 1997, v. 70, p. 437-441.
2. Goldblatt J. Type I Gaucher disease. – *J.Med.Genet.*, 1988, v. 25, p. 415-418.
3. Stone D.L., van Diggelen O.P., de Klerk J.B.C., Gaillard J.L.J., Niermeijer M.F., Willemsen R., Tayebi N., Sidransky E. Is the perinatal lethal form of Gaucher disease more common than classic type 2 Gaucher disease. – *Eur.J.Hum.Genet.*, 1999, v. 7, p. 505-514.
4. Horowitz M., Wilder S., Horowitz Z., Reiner O., Gelbart T., Beutler E. The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution. – *Genomics*, 1989, v. 4, p. 87-96.
5. Tayebi N., Cushner S., Sidransky E. Differentiation of the glucocerebrosidase gene from pseudogene by long-template PCR: implications for Gaucher disease. – *Am.J.Hum.Genet.*, 1996, v. 59, p. 740-741.
6. Brady R.O. – *Metabolic Basis of Inherited Disease*. Glucosyl ceramide lipidosis: Gaucher's disease. Ed. Stanbury J.B., Wyngaarden J.B., Fredrickson D.S., Goldstein J.J., Brown M.S. 1983, p. 842-856, New York: McGraw-Hill.
7. Beutler E. Gaucher disease. – *Advances in genetics*, 1995, v. 32, p. 17-49.
8. Dinur T., Osiecki K.M., Legler G., Gatt S., Desnick R.J., Grabowski G.A. Human acid beta-

glucosidase: isolation and amino acid sequence of a peptide containing the catalytic site. – Proc.Natl. Acad. Sci., 1986, v. 83, p. 1660-1664.

9. Mistry P.K., Cox T.M. The glucocerebrosidase locus in Gaucher's disease: molecular analysis of a lysosomal enzyme. – J.Med.Genet., 1993, v. 30, p. 889-894.

10. Jmoudiak M(1), Futerman AH. Gaucher disease: pathological mechanisms and modern management. Br J Haematol. 2005 Apr;129(2):178-88

11. Tsuji S., Martin B.M., Barranger J.A., Stubblefield B.K., LaMarca M.E., Ginns E.I. Genetic heterogeneity in type I Gaucher disease: multiple genotypes in Ashkenazic and non-Ashkenazic individuals. – Proc.Natl.Acad.Sci., 1988, v. 85, p. 2349-2352.

12. Ольхович Н. В., 'Недобой А. Н., 'Пичкур Н. А., 'Горовенко Н. Г. Анализ мутаций в гене *GBA* у пациентов с болезнью Гоше в Украине. Biopolym. Cell. 2017; 33(1):34-47.

13. Rida Nasir Butt and Sikander Ali. Glucocerebrosidase Deficiency: A Leading Cause of Acute Neurological Disorders in Humans. International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences Volume 2, Issue 6, July 2015, PP 1-7 ISSN 2394-5885

14. Лукина Е.А. Болезнь Гоше. М.: Литгеппа; 2011.

15. Futerman A.H., Zimran A. eds. Gaucher disease. Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC; 2007.

16. Grabowski G.A. Gaucher disease and other storage disorders. In: Hematology 2012: 54th ASH Annual Meeting and Exposition. Atlanta, Georgia; 2012: 13-8.

17. Mankin H.J., Rosenthal D.I., Xavier R. Gaucher disease. New approaches to an ancient disease. J. Bone Joint Surg. Am. 2001; 83-A (5): 748-62.

18. International Collaborative Gaucher Group Gaucher Registry Annual Report; 2011.

19. Beutler E., Demina A., Gelbart T. Glucocerebrosidase mutations in Gaucher disease. Mol. Med. 1994; 1 (1): 82-92.

### 19.5.2. Болезнь Нимана-Пика: общие сведения

Болезнь Нимана-Пика (Niemann-Pick; сфингомиелиноз MIM 257200) впервые описал Niemann в 1914 году, Pick в 1922 году дал детальную характеристику болезни. Это наследственное заболевание из группы липидозов (тезауризм, болезней накопления) связано с недостаточностью фермента сфингомиелиназы, вызванной мутациями гена сфингомиелиназы (*ASM*-гена), кодирующего кислую сфингомиелиназу. Дефекты в активности фермента, локализованного в лизосомах, приводят к накоплению сфингомиелина и других липидов в печени, селезенке, лимфатических узлах, костном и головном мозге. Относится к наследственно-дегенеративным болезням нервной системы с прогрессирующим характером патологического процесса и различной его локализацией. Заболевание проявляется нейропатией нервной системы, задержкой психомоторного развития, спастическими парезами, ригидностью мышц конечностей, эпилептическими припадками. Наблюдаются увеличение печени и селезенки, инфильтрация легочной ткани; у части больных на сетчатке выявляется вишнево-красное пятно. В тяжелых случаях болезнь Нимана-Пика начинается в раннем детском возрасте и приводит к летальному исходу. В возрасте 40-70 лет характеризуется медленно прогрессирующей деменцией, нередко в сочетании с булимией, нарушениями речи, расторможенностью, раздражительностью и постоянными бесцельными блужданиями. Речевые нарушения включают афазию, произвольное повторение услышанных слов, вплоть до эхолалии, обеднение

речи и мутизм. В легких случаях у взрослых заболевание протекает доброкачественно. Диагноз подтверждается определением активности сфингомиелиназы в лейкоцитах и фибробластах.

Заболевание наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Ген сфингомиелиназы (sphingomyelinase gene; sphingomyelin phosphodiesterase 1; SMPD1; acid sphingomyelinase gene; ASM) локализуется на 11 хромосоме человека в позиции p15.4-p15.1 (Pereira L.V., 1991).

Gene: [11p154/SMPD1] sphingomyelin phosphodiesterase 1, acid lysosomal (acid sphingomyelinase)

В 1992 году Schuchman клонировал и секвенировал ген сфингомиелиназы (сфингомиелинфосфодиэстеразы; ASM; SMPD1) человека (Schuchman E.H., 1992; Schuchman E.H., 1991; Quintern L.E., 1989).

Кодирующая область гена состоит из 1116 нуклеотидов, некодирующие 5' и 3' области состоят из 468 нуклеотидов. Ген разделяется 5 интронами на 6 экзонов. Размер экзонов варьирует от 77 до 773 нуклеотидов, а интронов от 153 до 1059 нуклеотидов.

Регуляторная область гена включает отдельные промоторные элементы – четыре SP-1 связывающих сайта, два TATA-box, два CAAT-box, два NF-1 и один AP-1 связывающих сайта. Во втором интроне локализуется Alu элемент. Интригующим обстоятельством в строении данного гена является наличие трех дополнительных открытых рамок считывания (ORFs), предположительно кодирующих полипептиды из 101, 104, и 158 аминокислот.

Болезнь Ниманна-Пика обусловлена мутационными поражениями гена сфингомиелиназы. Продукт данного гена – кислая сфингомиелиназа. При наследственном дефекте этого фермента происходит отложение сфингомиелина, холестерина и родственных фосфолипидов внутри лизосом в клетках различных тканей, преимущественно в клетках паренхиматозных органов (печени, селезенки, почках) и головного мозга.

При болезни Ниманна-Пика разделяют 5 форм:

- 1) классическая инфантильная форма – тип А,
- 2) висцеральная форма – тип В,
- 3) ювенильная форма – тип С,
- 4) Nova Scotian форма – тип D,
- 5) взрослая форма – тип Е.

При классическом инфантильном типе (тип А), как показали Brady др. (1966), имеется биохимический дефект с дефицитом активности фермента, который катализирует расщепление сфингомиелина до фосфорилхолина и церамида. Uhlendorf и др. (1967) обнаружили метаболический дефект в клеточной культуре. Увеличение сфингомиелина было продемонстрировано в клетках костного мозга, кожи и амниона; последнее делает возможной пренатальную диагностику. Шнайдер и Кеннеди (1967) обнаружили дефицит сфингомиелиназы только при инфантильных и висцеральных формах болезни (тип В).

Примечательно, что активность ASM снижается в клетках пациентов с болезнью Ниманна-Пика типа А и В (607616), тяжелых лизосомальных болезней накопления, обусловленных мутациями в гене сфингомиелиназы-1 (SMPD1; 607616), кодирующем

ASM, также связана со снижением стабильности лизосом, и этот фенотип может быть эффективно исправлен путем лечения рекомбинантным HSP70. Kirkegaard и др. (2010) пришли к выводу, что, вместе взятые эти данные открыли интересные возможности для развития новых методов лечения болезней лизосомального накопления и рака соединениями, которые вводят в люмины лизосом путем эндоцитоза.

Наиболее распространенные мутации R608del (607608,0002) и A482E найдены в 38% и 9% аллелей. Мутация R608del всегда встречается у больных с болезнью типа В; A482E и Y467S мутации были обнаружены у пациентов типа А.

Путем гомологичной рекомбинации в эмбриональных стволовых клетках, Otterbach и Штоффеля (1995) получили целенаправленный разрыв гена SMPD1 у трансгенных мышей. Гомозиготные мыши накапливали сфингомиелин в ретикулоэндотелиальной системе печени, селезенки, костного мозга, и легких, а также в головном мозге. Поразительно, что ганглиозный слой клеток Пуркиньи мозжечка полностью дегенерировал, что привело к тяжелым нарушениям нейромоторной координации. Картина напоминала частично нейровисцеральный тип болезни Нимана-Пика (тип А). Horinouchi др. (1995) получили аналогичные результаты на мышцах с нокаутом ASM.

#### **Список использованной литературы**

1. Akerman, B. R., Natowicz, M. R., Kaback, M. M., Loyer, M., Campeau, E., Gravel, R. A. Novel mutations and DNA-based screening in non-Jewish carriers of Tay-Sachs disease. *Am. J. Hum. Genet.* 60: 1099-1106, 1997.
2. Akli S., Chelly J., Kahn A., Poenaru L. A null allele frequent in non-Jewish Tay-Sachs patients. – *Hum.Genet.*, 1993, v. 90, p. 614- 620.
3. Goldfarb L.G., Park K.J., Kaneski C., Jeffries N., Litvak S., Nagle J.W., Schiffmann R. Identification of fifteen novel mutations and genotype/phenotype relationship in Fabry disease. – *Clin. Genet.*, 2001, v. 60, p. 46-51.
4. Kint J.A. Fabry's disease: alpha-galactosidase deficiency. – *Science*, 1970, v. 167, p. 1268-1269
5. Beutler E. Gaucher disease as a paradigm of current issues regarding single gene mutations of humans. – *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 1993, v. 90, p. 5384-5390.
6. Beutler E. Gaucher disease. – *Advances in genetics*, 1995, v. 32, p. 17-49.
7. Liu, Y., Suzuki, K., Reed, J. D., Grinberg, A., Westphal, H., Hoffmann, A., Doring, T., Sandhoff, K., Proia, R. L. Mice with type 2 and 3 Gaucher disease point mutations generated by a single insertion mutagenesis procedure (SIMP). *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95: 2503-2508, 1998.
8. Otterbach, B., Stoffel, W. Acid sphingomyelinase-deficient mice mimic the neurovisceral form of human lysosomal storage disease (Niemann-Pick disease). *Cell* 81: 1053-1061, 1995.
9. Horinouchi, K., Erlich, S., Perl, D. P., Ferlinz, K., Bisgaier, C. L., Sandhoff, K., Desnick, R. J., Stewart, C. L., Schuchman, E. H. Acid sphingomyelinase deficient mice: a model of types A and B Niemann-Pick disease. *Nature Genet.* 10: 288-293, 1995.

#### **Контрольные вопросы**

6. Какие основные признаки характерны для ганглиозидозов?
7. Какие нарушения связаны с болезнью Тея-Сакса, синдромом Фабри?
8. Какие нарушения приводят к нейрональным цероид-липофуцинозам: болезни Гоше, болезни Нимана-Пика?
9. Дефекты в активности какого фермента, локализованного в лизосомах, приводит к накоплению сфингомиелина?

## ГЛАВА 20

## НАСЛЕДСТВЕННЫЕ НАРУШЕНИЯ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА

**20.1. Липидный обмен: Холестерин, фосфолипиды и липопротеины**

Холестерин в составе клеточной плазматической мембраны играет роль модификатора бислоя, придавая ему определённую жёсткость за счёт увеличения плотности «упаковки» молекул фосфолипидов. Таким образом, холестерин – стабилизатор текучести плазматической мембраны.

Холестерин открывает цепь биосинтеза стероидных половых гормонов и кортикостероидов, служит основой для образования желчных кислот и витаминов группы D, участвует в регулировании проницаемости клеток и предохраняет эритроциты крови от действия гемолитических ядов.

Холестерин нерастворим в воде и в чистом виде не может доставляться к тканям организма при помощи основанной на воде крови. Вместо этого холестерин в крови находится в виде хорошо растворимых комплексных соединений с особыми белками-транспортёрами, так называемыми *аполипопротеидами*. Такие комплексные соединения называются *липопротеидами*.

Существует несколько видов аполипопротеидов, различающихся молекулярной массой, степенью сродства к холестерину и степенью растворимости комплексного соединения с холестерином (склонностью к выпадению кристаллов холестерина в осадок и к формированию атеросклеротических бляшек). Различают следующие группы: высокомолекулярные (HDL, ЛПВП, липопротеиды высокой плотности) и низкомолекулярные (LDL, ЛПНП, липопротеиды низкой плотности), а также очень низкомолекулярные (VLDL, ЛПОНП, липопротеиды очень низкой плотности) и хиломикрон.

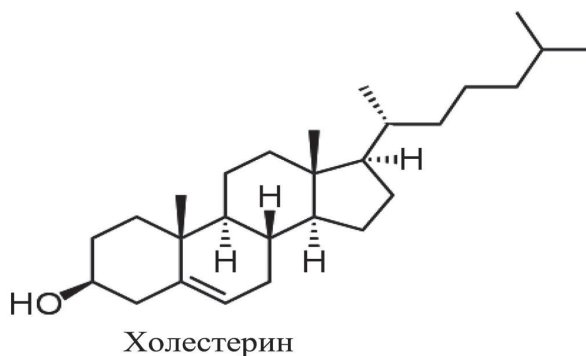
К периферийным тканям холестерин транспортируется хиломикроном, ЛПОНП и ЛПНП. К печени, откуда затем холестерин удаляется из организма, его транспортируют аполипопротеины группы ЛПВП.

**Холестерин** (др.-греч. χολή – жёлчь στερεός – твёрдый) – органическое соединение, природный полициклический липофильный спирт, содержащийся в клеточных мембранах всех живых организмов, за исключением растений, грибов и безъядерных (прокариоты).

Холестерин нерастворим в воде, растворим в жирах и органических растворителях. Около 80 % холестерина вырабатывается самим организмом человека: (печенью, кишечником, почками, надпочечниками, половыми железами), остальные 20 % поступают с пищей [[https://ru.wikipedia.org/wiki/Холестерин#cite\\_note-1](https://ru.wikipedia.org/wiki/Холестерин#cite_note-1)].

Холестерин обеспечивает устойчивость клеточных мембран в широком интервале температур. Он необходим для выработки витамина D, выработки надпочечниками

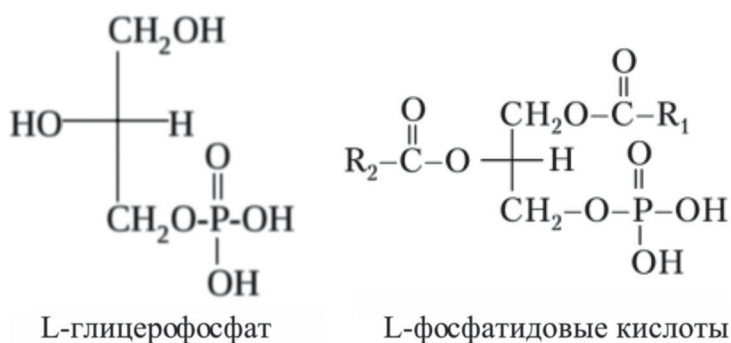
различных стероидных гормонов (включая кортизол, альдостерон, половые гормоны: эстрогены, прогестерон, тестостерон), жёлчных кислот.



### Фосфолипиды

Фосфолипиды являются главным компонентом клеточных мембран, они сопутствуют жирам в пище и служат источником фосфорной кислоты, необходимой организму человека.

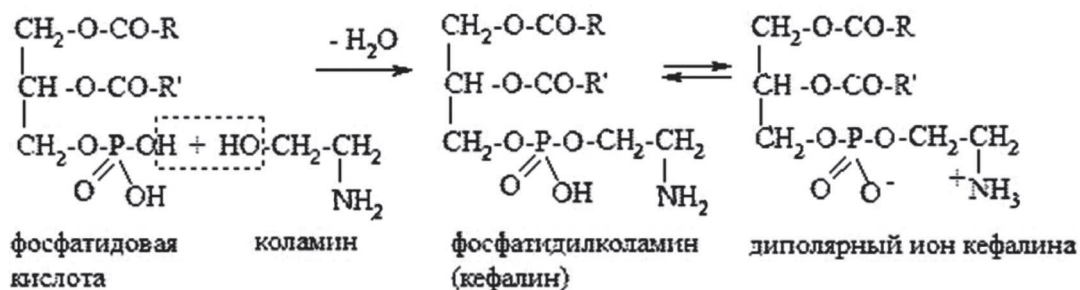
Фосфолипиды относят к сложным липидам. Они являются сложными эфирами фосфатидовых кислот и аминокспиртов. В свою очередь фосфатидовые кислоты – сложные эфиры глицерофосфата и высших карбоновых кислот.



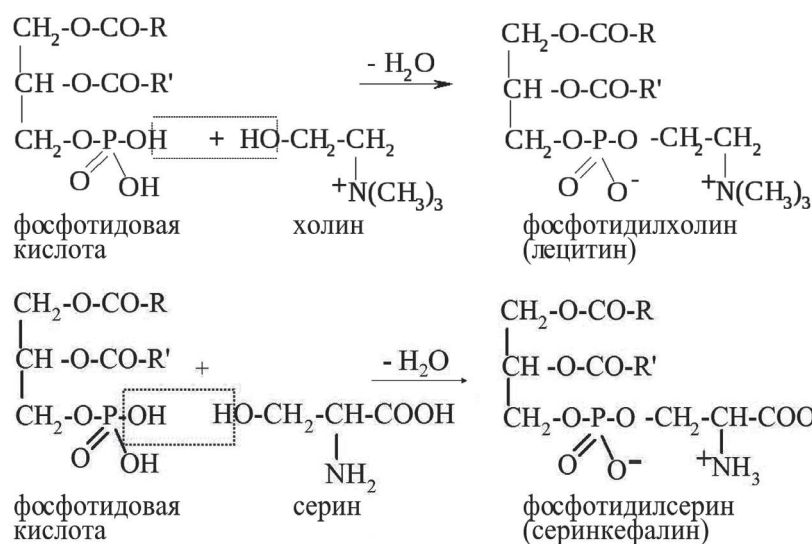
Глицерофосфат содержит асимметрический атом углерода, поэтому может существовать в виде двух стереоизомеров. Все природные фосфолипиды являются производными L-глицерофосфата.

Фосфатидовые кислоты – ацильные производные L-глицерофосфата. Как правило, в положении 1 находится остаток насыщенной карбоновой кислоты, в положении 2 – ненасыщенной:

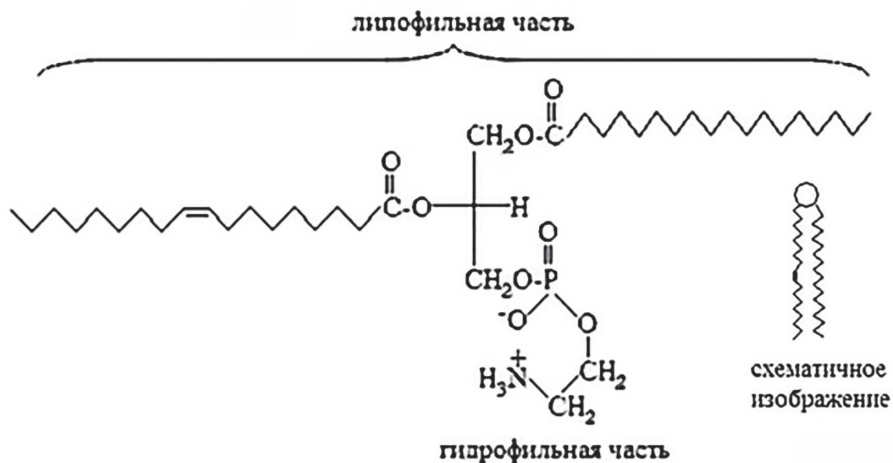
Примерами фосфолипидов являются фосфатидилколамины (коламинкефалины), фосфатидилхолины (лецитины), фосфатидилсерины (серинкефалины), в которых фосфатидовые кислоты этерифицированы по фосфатному гидроксилу коламином, холином и серином соответственно.



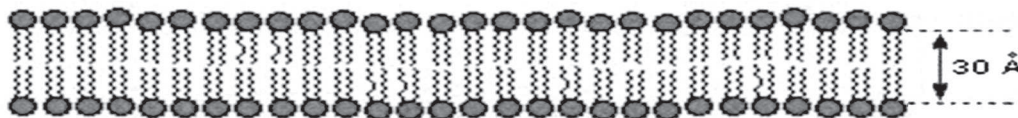
В условиях организма фосфолипиды существуют в виде биполярных ионов.



Молекулы фосфолипидов дифильны: полярная часть (ионизированная) гидрофильна, неполярные остатки карбоновых кислот – липофильны.

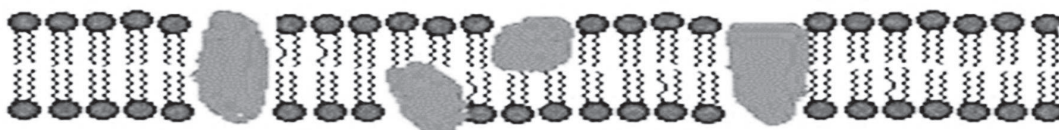


На границе раздела фаз за счет дифильности структуры фосфолипиды действуют как эмульгаторы. Липидные компоненты, входящие в структуру биомембран, обеспечивают их высокое электрическое сопротивление, непроницаемость для полярных молекул и ионов и проницаемость для неполярных веществ. Фосфолипиды составляют до 90% от общего количества липидов в мембране.

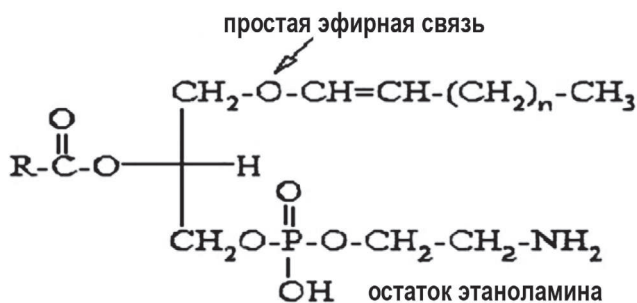


Существует несколько моделей клеточной мембраны. В одной из них мембрана рассматривается как липидный бислой (двойной липидный слой).

Неполярные углеводородные хвосты липидов удерживаются друг возле друга в вытянутом состоянии во внутренней полости за счет гидрофобных взаимодействий. Полярные группы липидов располагаются на внешней поверхности бислоя.



При использовании данной модели биомембран нельзя объяснить, как сквозь нее могут транспортироваться полярные молекулы воды, углеводов, ионы  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ . Эти факты объясняет жидко-мозаичная модель. В структуру бислоя встроены молекулы белков. Молекулы белков свернуты таким образом, что их гидрофобные остатки погружены в липидный бислой, а гидрофильные – находятся внутри, поэтому молекула белка является «каналом» для транспорта полярных молекул и ионов. К менее распространенным фосфолипидам относятся *плазмалогены*, (альдегидогенные липиды) – фосфолипиды, у которых в первом положении глицерина находится не жирная кислота, а остаток спирта с длинной алифатической цепью, связанный простой эфирной связью.



#### Плазмалогены

Плазмалогены составляют до 10% от общего количества липидов ЦНС.

Кроме фосфолипидов к сложным липидам относят сфинголипиды и гликолипиды.



Лецитин:холестерин ацилтрансфераза (LCAT, EC 2.3.1.43) является растворимым ферментом, который превращает холестерин и фосфатидилхолины (лецитины) в сложные эфиры холестерина и лизофосфатидилхолины на поверхности липопротеинов высокой плотности (Jonas, 2000).

McLean et al. (1986) клонировали ген LCAT и обнаружили, что он кодирует белок из 416 аминокислот с гидрофобной лидерной последовательностью из 24 аминокислот. Необычной особенностью месседжа является то, что сигнал poly (A), по-видимому, перекрывает COOH-терминальную глутаминовую кислоту и стоп-кодона. Белок имеет несколько длинных последовательностей гидрофобных аминокислот, одна из которых аналогична последовательностям в липазе поджелудочной железы и лингвальной липазе.

McLean et al. (1986) секвенировал ген LCAT и обнаружил, что он содержит 6 экзонов и охватывает около 4200 пар оснований.

Azoulay et al. (1987) использовали кДНК-клон, соответствующий LCAT, чтобы выявить локус 16q22 путем анализа ДНК из гибридов соматических клеток и гибридизации *in situ*.

У мыши локус *Lcat* расположен на хромосоме 8 вместе с рядом других локусов, которые обнаружены на хромосоме человека 16q (Scherer et al., 1989).

LCAT (606967) играет важную роль в метаболизме липопротеинов, особенно в процессе, называемом «обратным холестериновым транспортом». Фермент синтезируется в печени и циркулирует в плазме крови как комплекс с компонентами липопротеинов высокой плотности (ЛПВП). Холестерин из периферических клеток переносится на частицы HDL (high density lipoprotein), этерифицируется посредством действия LCAT на липопротеины высокой плотности (HDL) и включается в ядро липопротеина. Таким образом, эфир холестерина переносится в печень (Jonas, 2000). Ожидается, что отсутствие активности LCAT приведет к накоплению свободного холестерина в тканях. Большинство эфиров холестерина, присутствующих в плазме, являются продуктом реакции, катализируемой LCAT, в которой холестерин этерифицируется с sn-2 жирной кислотой фосфатидилхолина. Полученные холестериновые эфиры упаковывают в гидрофобное ядро липопротеинов. При болезни рыбьего глаза (136120) существует определенная неспособность LCAT этерифицировать холестерин в ЛПВП, дефицит функции альфа-LCAT. В случае болезни Норума (245900) генерируется неполная этерификация (Kinoshita and Teramoto, 2001).

Humphries et al. (1988) использовали клонированную кДНК LCAT для изучения структуры гена у пациентов с семейным дефицитом LCAT (245900). Ферментативное расщепление образцов ДНК у пациентов вызывало фрагменты гена LCAT, которые были неотличимы от тех, которые были обнаружены у нормальных индивидуумов, что исключало большую делецию или перегруппировку гена.

У итальянского пациента с семейным дефицитом LCAT, о котором сообщает Vergani et al. (1983), Taramelli et al. (1990) обнаружили транзицию C-to-T в четвертом экзоне гена LCAT (606967,0001), что привело к замене аргинина на триптофан в 147 положении зрелого белка.

Многочисленные мутации в гене LCAT описаны у пациентов с дефицитом LCAT и болезнью рыбьего глаза (136120), сплайсинговые мутации в последовательности точки ветвления (BPS, branchpoint sequence) приводят к абберантному сплайсингу мРНК и генетическим нарушениям, Kuivenhoven et al. (1996) описал точечную мутацию в лассо

латентной последовательности точки ветвления гена LCAT у 3 сестер с болезнью рыбьего глаза ( 606967.0019 ). Повышенное перескакивание через экзоны и удерживание интронов, наблюдаемое *in vivo*, были повторены для каждой мутантной пре-мРНК, но воспроизводимость активации криптового (скрытого) сайта сплайсинга была ниже. ВР в репортерных пре-мРНК часто индуцировали aberrантные сайты сплайсинга с 3-prime конца, а также активировали криптовый сайт связывания с 5-prime конца. Систематический мутагенез аденозинов ВР показал, что в большинстве пре-мРНК экспрессия канонических транскриптов была ниже при транзиции А в Г, чем при трансверсии ВР.

## 20.2. Гиперлипидемия

**Гиперлипидемия** (гиперлипопротеинемия, дислипидемия) – аномально повышенный уровень липидов и/или липопротеинов в крови человека. Нарушение обмена липидов и липопротеинов встречается довольно часто в общей популяции. Гиперлипидемия является важным фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний в основном в связи со значительным влиянием холестерина на развитие атеросклероза. Кроме этого, некоторые гиперлипидемии влияют на развитие острого панкреатита.

Классификация липидных нарушений, основанная на изменении профиля липопротеинов плазмы при их электрофоретическом разделении или ультрацентрифугировании, была разработана Дональдом Фредриксоном в 1965. Классификация Фредриксона принята Всемирной организацией здравоохранения в качестве международной стандартной номенклатуры гиперлипидемий. Однако, она не учитывает уровень ЛПВП, который является важным фактором, снижающим риск атеросклероза, а также роль генов, вызывающих липидные нарушения. Данная система остаётся самой распространённой классификацией (таблица 20.1).

**Таблица 20.1. Классификация липидных нарушений, основанная на изменении профиля липопротеинов плазмы**

Гипер-липо-протеинемия	ОМIM	Синонимы	Этиология	Выявляемое нарушение	Лечение
Тип I		Первичная гиперлипопротеинемия, Наследственная гиперхиломикронемия	Пониженная липопротеинлипаза (Л-ПЛ) или нарушение активатора ЛПЛ - apoC2	Повышенные хиломикроны	Диета
Тип IIa	143890	Полигенная гиперхолестеринемия, Наследственная гиперхолестеринемия	Недостаточность ЛПНП-рецептора	Повышенные ЛПНП	Статины, Никотиновая кислота
Тип IIb	144250	Комбинированная гиперлипидемия	Снижение ЛПНП-рецептора и повышенный ApoB	Повышенные ЛПНП, ЛПОНП и триглицериды	Статины, Никотиновая кислота, Гемфиброзил
Тип III	107741	Наследственная дис-бета-липопротеинемия	Дефект apoE(гомозиготы apoE 2/2)	Повышенные ЛППП	Преимущественно: Гемфиброзил

Тип IV	144600	Эндогенная гиперлипемия	Усиленное образование ЛПОНП и их замедленный распад	Повышенные ЛПОНП	Преимущественно: Никотиновая кислота
Тип V	144650	Наследственная гипертриглицеридемия	Усиленное образование ЛПОНП и пониженная липопротеинлипаза	Повышенные ЛПОНП и хиломикроны	Никотиновая кислота, Гемфиброзил

### Гиперлипопротеинемия I типа

Редкий тип гиперлипидемии, который развивается при недостаточности липопротеинлипазы (ЛПЛ) или дефекте в белке-активаторе ЛПЛ – апоС2. Проявляется в повышенном уровне хиломикрон, классе липопротеинов, переносящих липиды от кишечника в печень. Частота встречаемости в общей популяции – 0,1 %.

### Гиперлипопротеинемия II типа

Наиболее частая гиперлипидемия. Характеризуется повышением холестерина ЛПНП. Подразделяется на типы IIa и IIb в зависимости от отсутствия или наличия высоких триглицеридов.

#### Тип IIa

Эта гиперлипидемия может быть спорадической (в результате неправильного питания), полигенной или наследственной. Наследственная гиперлипопротеинемия IIa типа развивается в результате мутации гена ЛПНП-рецептора (0,2 % популяции) или гена апоВ (0,2 % популяции). Семейная или наследственная форма проявляется ксантомами и ранним развитием сердечно-сосудистых заболеваний.

#### Тип IIb

Этот подтип гиперлипидемии сопровождается повышенной концентрацией триглицеридов в крови в составе ЛПОНП. Высокий уровень ЛПОНП возникает из-за усиленного образования главного компонента ЛПОНП – триглицеридов, а также ацетил-кофермента А и апоВ-100. Более редкой причиной этого нарушения может быть замедленный клиренс (удаление) ЛПНП. Частота встречаемости этого типа в популяции – 10%. К этому подтипу относятся также наследственная комбинированная гиперлипопротеинемия и вторичная комбинированная гиперлипопротеинемия (как правило при метаболическом синдроме).

**Лечение** этой гиперлипидемии включает изменение питания как основной компонент терапии. Многим больным требуется назначение статинов для снижения риска сердечно-сосудистых заболеваний. В случае сильного подъема триглицеридов часто назначаются фибраты. Комбинированное назначение статинов и фибратов высокоэффективно, но имеет побочные эффекты, такие как риск миопатии, и должно быть под постоянным контролем врача. Используются также другие лекарственные препараты (никотиновая кислота и др.) и растительные жиры ( $\omega_3$ -жирные кислоты).

### Гиперлипопротеинемия III типа

Эта форма гиперлипидемии проявляется увеличением хиломикрон и липопротеинов промежуточной плотности (ЛППП) – класс липопротеинов крови, образующихся при липолитической деградациии липопротеинов очень низкой плотности под действи-

ем липопротеинлипазы, поэтому называется ещё дис-бета-липопротеинемия. Наиболее частая причина – гомозиготность по одной из изоформ апоЕ – Е2/Е2, которая характеризуется нарушением связывания с ЛПНП-рецептором. Встречаемость в общей популяции – 0,02%.

#### **Гиперлипопротеинемия IV типа**

Этот подтип гиперлипидемии характерен повышенной концентрацией триглицеридов, поэтому также называется гипертриглицеридемией. Частота встречаемости в общей популяции – 1%.

#### **Гиперлипопротеинемия V типа**

Этот тип гиперлипидемии во многом похож на I тип, но проявляется не только высокими хиломикронами, но и ЛПОНП.

#### **Другие формы**

Другие редкие формы *дислипидемий*, не входящие в принятую классификацию:

- Гипо-альфа-липопротеинемия
- Гипо-бета-липопротеинемия (0.01-0.1%)

### **20.3. Причины и признаки болезни обмена липидов.**

Наследственные болезни обмена липидов - обширная группа заболеваний, возникающих в результате нарушения одной из стадий синтеза, транспорта и деградации липопротеинов, в состав которых входят все основные плазменные липиды – триглицериды (ТГ), фосфолипиды, холестерол (ХС) и свободные жирные кислоты. Липиды плазмы крови наиболее часто находятся в соединении с различными апопротеинами, образуя липопротеины. К настоящему времени лучше всего изучены 8 основных апопротеинов - Apo-A 1, 2,4, Apo-B, Apo-C 1,2,3 и Apo-E. Некоторые апопротеины являются составной частью определенных липопротеинов, другие же могут мигрировать от одного липопротеина к другому. Существует четыре основных класса липопротеинов плазмы крови: 1) хиломикроны (ХМ) - образуются в клетках слизистой оболочки кишечника и являются носителями пищевых ТГ; 2) липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП) – образуются в печени и используются для экспорта ТГ в другие ткани; 3) липопротеины низкой плотности (ЛПНП) - являются конечными продуктами катаболизма ЛПОНП и переносчиками ХС в клетки; 4) липопротеины высокой плотности (ЛПВП) - осуществляют метаболизм ХМ и ЛПОНП и транспортируют ХС из клеточных мембран в печень. Типичный липопротеин состоит из липидного ядра, образованного триглицеридами и эфирами холестерола и наружного слоя, представленного фосфолипидами, холестеролом и апопротеинами (рисунок 20.1). Нормальный метаболизм липидов происходит следующим образом. Синтезированные в кишечнике ХМ и в печени ЛПОНП попадают в кровеносное русло и переносят ТГ в жировые клетки и другие ткани. После отделения ТГ в жировых клетках, ХМ вновь поступают в печень, а ЛПОНП превращаются в ЛПНП, обогащенные ХС и содержащие Apo-B и Apo-E. ЛПНП сохраняются в кровеносном русле в течение 2,5 суток и служат транспортерами ХС в различные клетки.

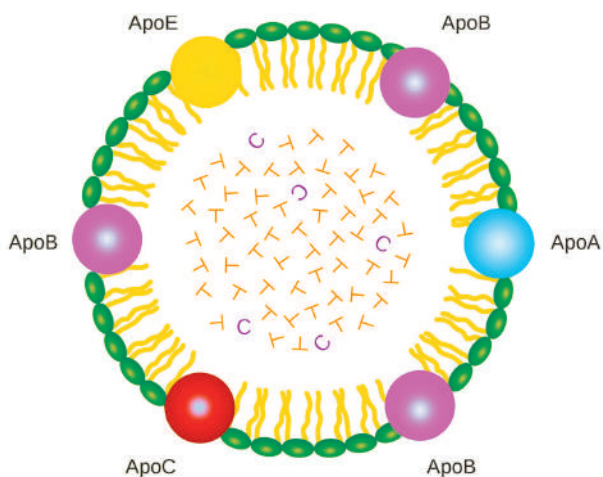


Рисунок 20.1. Липопротеины. Структура (<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d1/Chylomicron.svg>)

Схема обменных превращений липопротеинов представлена на рисунке 20.2.

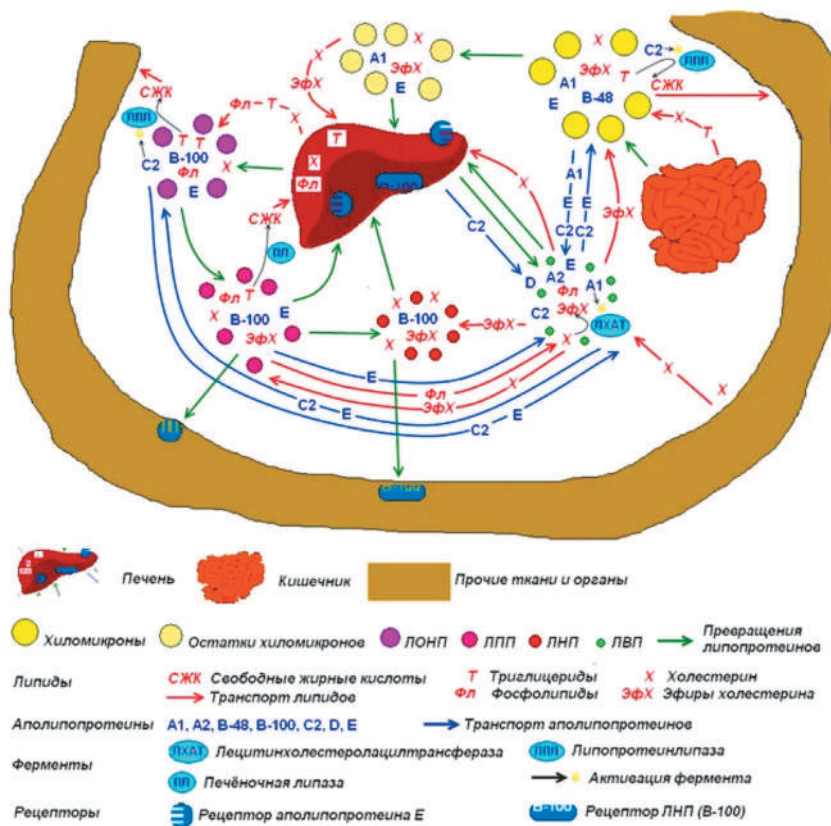


Рисунок 20.2. Метаболизм липопротеинов. Схема обменных превращений липопротеинов, <https://ru.wikipedia.org/wiki/Липопротеины#/m>.

Поступление ХС в клетки осуществляется при помощи рецепторов ЛПНП, количество и функции которых находятся под генетическим контролем. Клеточные рецепторы группируются в специальных участках клеточной мембраны, погруженных в виде кратера в цитоплазму. После взаимодействия рецептора с ЛПНП участок мембраны, содержащий рецепторы, втягивается внутрь клетки и образует окаймленную везикулу. В цитоплазме ЛПНП отделяются от рецептора и проникают в лизосомы, а рецепторы возвращаются на клеточную мембрану. Освобождение ХС из ЛПНП осуществляется под действием нескольких ферментов. Обратная доставка ХС в клетки печени и тонкого кишечника осуществляется ЛПВП также с использованием механизма рецепторного эндоцитоза.

**Липопротейны очень низкой плотности (ЛПОНП, ЛОНП; англ. *Very Low Density Lipoprotein, VLDL*)** – подкласс липопротеинов плазмы крови. ЛПОНП образуются в печени из липидов и аполипопротеинов. В крови они подвергаются частичному гидролизу и превращаются в липопротеины промежуточной плотности. Размер частиц ЛПОНП достигает 30–80 нм. Вместе с хиломикронами липопротеины очень низкой плотности относятся к триглицерид-богатым липопротеинам. Однако, в отличие от хиломикронов, которые переносят экзогенные липиды (поступающие в организм с пищей), ЛПОНП транспортируют эндогенные липиды (в основном триглицериды, синтезированные в печени).

#### **Функция**

ЛПОНП транспортируют эндогенные триглицериды, фосфолипиды, холестерин и эфиры холестерина. Таким образом, ЛПОНП выполняют роль переносчика липидов в организме.

#### **Метаболизм**

Насцентные (то есть вновь синтезированные) ЛПОНП секретируются из печени в кровотоки и получают дополнительно аполипопротеины С-II и Е (апоС-II и апоЕ) от липопротеинов высокой плотности. Основной аполипопротеин, стабилизирующий структуру частицы – это одна из изоформ апоВ (апоВ-100). В процессе циркуляции в крови ЛПОНП подвергаются гидролизу под действием фермента липопротеинлипаза, находящейся на стенках сосудов многих тканей организма (жировая ткань, сердечная мышца, скелетные мышцы). При этом триглицериды расщепляются и переносятся в соответствующие ткани, где используются либо как источник энергии либо как жировые отложения для более позднего использования.

Гидролиз ЛПОНП приводит к существенному уменьшению размера частицы, амфифильные аполипопротеины (апоС2 и апоЕ) переносятся обратно на липопротеины высокой плотности. Кроме этого т.н. эфиры холестерина-переносящий белок переносит на ЛПОНП эфиры холестерина от липопротеинов высокой плотности в обмен на фосфолипиды и триглицериды.

Основные этапы обмена ХС в организме находятся под сложным генетическим контролем. Нарушение в результате мутаций различных этапов этого метаболического пути может привести к задержке выведения ХС из организма и возникновению различных вариантов гиперлипидемий, развитию атеросклероза сосудов сердца и мозга. В последние годы удалось расшифровать молекулярно-генетические механизмы некоторых моногенных болезней, обусловленных нарушением обмена липидов. Их основные характеристики представлены в таблице 20.2. Рассмотрим более подробно одно из этих заболеваний.

### Нарушения липидного обмена

Связаны в первую очередь с нарушениями их переваривания и всасывания. Обязательный признак всех нарушений – *стеанорея*, появление в кале липидов. В зависимости от этиологии различают три группы стеанорей:

1) *панкреатогенная стеанорея* обусловлена дефицитом панкреатической липазы. Это приводит к снижению интенсивности процессов гидролитического расщепления в кишечнике триацилглицеридов до глицерина и ЖК. Наблюдается обычно при панкреатинах, гипоплазии поджелудочной железы, наследственном дефиците липазы;

2) *гепатогенная стеанорея* связана с нарушением поступления желчи в 12-перстную кишку. В связи с этим жиры не эмульгируются и намного хуже подвергаются гидролизу липазой. Наблюдается при закупорке или сужении желчных путей, гепатитах и циррозе. Помимо стеанорей в кале отсутствуют желчные пигменты;

3) *энтерогенная стеанорея* обусловлена снижением метаболической активности слизистой оболочки тонкого отдела, где происходит синтез собственных липидов организма. Наблюдается при наследственном дефиците ферментов синтеза липидов, воспалении слизистой оболочки и обширной резекции тонкого отдела кишечника.

Всосавшиеся в слизистую оболочку липиды транспортируются по крови и лимфе в составе липопротеидного комплекса. Повышенное содержание липопротеинов – гиперлипотеинемия, пониженное – гиполитопротеинемия.

*Гиперлипотеинемии* обусловлены замедленным распадом липопротеидного комплекса (недостаточность фермента липопротеинлипазы) или как следствие гиперинсулинизма, индуцирующего в печени усиленный синтез триглицеридов из углеводов.

**Таблица 20.2. Моногенные дефекты метаболизма липопротеинов, приводящие к гиперлипидемиям**

№	Группа метаболических нарушений	Локализация гена	ОМIM
I	Дефицит апопротеинов:		
	Аpo-A1	1q23	107680
	Аpo-B	2p24-23	107730
	Аpo-C2	19q13.1	207750
	Аpo-C3	11q23	107720
II	Аpo-E	19q13.1	107741
	Дефицит ферментов метаболизма:		
	Липопротеинлипазы	8p22	238600
	Печеночной триглицеридлипазы	15q21-23	151670
	холестеролацилтрансферазы	16q22	245900
III	Дефект рецепторов к липопротеинам		
	Дефицит рецепторов ЛПНП	19p13.2-p13.1	143890
IV	Дефект транспортных белков липопротеинов:		
	Транспортных белков эфиров холестерина	16q21	118470
	Транспортный белок фосфолипидов	20q12-q13.1	172425
	Микросомальный транспортный белок триглицеридов	4q22-24	157147

Гиперлиппротеинемия в комплексе с гиперхолестеролемией (повышенное содержание в крови холестерина) являются главной причиной атеросклероза. Напомним, что холестерол – важнейшая составная часть клеточных мембран и липопротеинов. По химическому строению это одноатомный циклический мононенасыщенный спирт, производное циклопентанпергидрофенантрена. Используется для биосинтеза стероидных гормонов, желчных кислот и предшественника витамина D<sub>3</sub>. Поступающий с пищей холестерол в клетках слизистой подвергается этерификации при участии фермента холестеринэстеразы. Далее он поступает в лимфу, где связывается с липопротеинами очень низкой плотности (ЛПОНП) и входит в состав хиломикрон, а в крови в состав липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и также хиломикрон

*Гиперхолестеролемии* связаны прежде всего с нарушением желчегенеза и транспорта холестерина липопротеидами, а именно отсутствие (или исчезновение) у клеток рецепторов ЛПНП. Результатом этого является развитие *холестериозов*.

1) *неосложненный* (физиологическая старость) накопление холестерина в плазматических мембранах клеток в связи с уменьшением стероидогенеза;

2) *осложненный* (атеросклероз) – отложение холестерина в стенках артерий. Предпосылкой являются повреждения эндотелия сосудов в результате воспалений, повышенной свертываемости крови, гипертонии, воздействия токсинов. Холестерол и липопротеины проникают в клетки эндотелия сосудов, что провоцирует еще больший их поток в клетки. В них есть ферментная система этерификации холестерина, но не системы его разрушения. Поэтому эфиры холестерина накапливаются в большом количестве в клетках эндотелия и в межклеточном пространстве. Где инкапсулируются за счет разрастания соединительной ткани. Так образуются атеросклеротические бляшки.

*Гиполиппротеинемии* могут быть связаны с

1) нарушением переваривания, всасывания жиров в тонком отделе кишечника, как результат дефицита липазы и нарушениями образования и поступления желчи;

2) гипертиреозом, который приводит к повышению катаболизма сывороточных липидов;

3) генетическим нарушением синтеза липопротеинов и хиломикрон.

## 20.4. Роль рецептор липопротеинов очень низкой плотности ЛПОНП в патологии

Повышенный уровень ЛПОНП связан с повышенным риском атеросклероза, а также связан с рядом других заболеваний.

**Рецептор липопротеинов очень низкой плотности** (ЛПОНП-рецептор; англ. *Very Low Density Lipoprotein Receptor; VLDLR*) по структуре схож с рецептором липопротеинов низкой плотности, но не способен связывать липопротеины низкой плотности. Рецептор VLDLR играет роль в метаболизме липопротеинов очень низкой плотности. Экспрессия VLDLR высока в сердце, скелетных мышцах, жировой ткани; VLDLR совместно с рецептором LDLR связывает и захватывает остаточные липопротеины: липопротеины промежуточной плотности и хиломикронные ремнанты [Takahashi S, et al. (2004)].



### 20.4.1. РИЛИН: РОЛЬ В РАБОТЕ МОЗГА

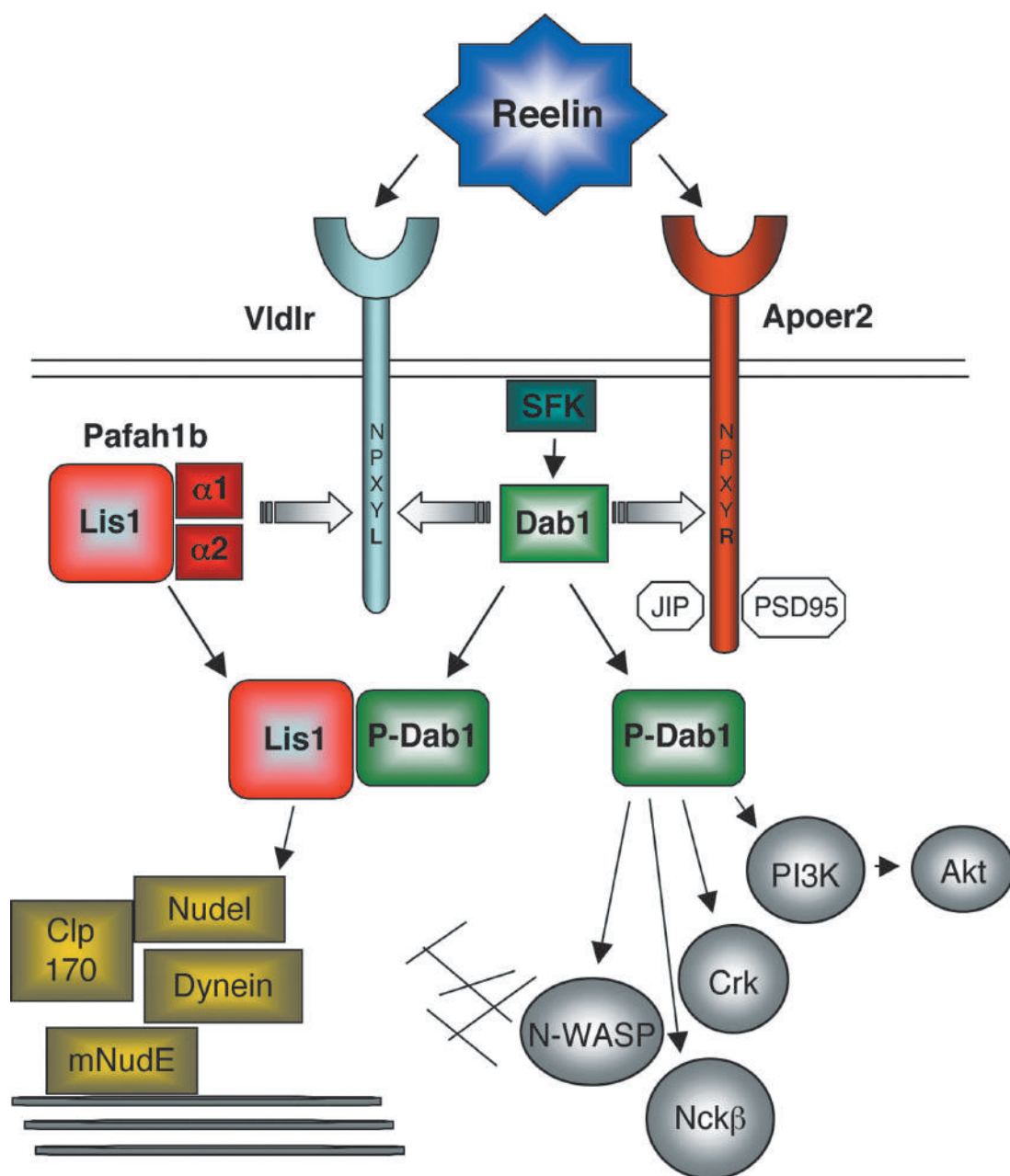
В мозге VLDLR является одним из рецепторов рилина - белка внеклеточного матрикса, регулирующего миграцию и позиционирование нейробластов в развивающемся и взрослом мозге, влияющего на процессы синаптической пластичности.

Название «рилин» происходит от английского глагола *to reel* – кружиться, вертеться, идти нетвёрдой походкой. Именно такая, «закрученная», неровная походка была отмечена у мышей с генетически обусловленным недостатком рилина. Острая нехватка белка ведет к нарушению миграции нейронов. Если ген, кодирующий синтез рилина, отключён полностью (гомозиготный генотип), наблюдается инверсия слоев коры головного мозга. При гетерозиготном генотипе нарушения мозга у мышей менее заметны, однако напоминают нарушения человеческого мозга при психотических расстройствах [Tueting P, et al., 2006; Pappas GD, Kriho V, Pesold C (May 2001)]. У людей генетически обусловленное отсутствие рилина приводит к лиссэнцефалии, тяжелой умственной отсталости и эпилепсии. Значительный недостаток рилина наблюдается при посмертных исследованиях мозга людей, которым при жизни были поставлены диагнозы шизофрении и биполярного расстройства, [Torrey EF, et al., 2005] однако следует отметить возможное воздействие медикаментов [Hossein S. Fatemi, 2008]. Есть данные о возможной связи полиморфизмов гена RELN с шизофренией [база данных Schizophrenia Gene] и болезнью Альцгеймера [Seripa D, Matera MG, Franceschi M, et al (July 2008)].

#### Механизм действия

Доказано, что рилин воздействует на рецепторы VLDLR и ApoER2 (рисунок 20.3). N-терминальный участок рилина связывается с альфа-3-бета-1-интегрином [Schmid RS, et al. (2005)]. Внутриклеточные сегменты рецепторов VLDLR и ApoER2 вызывают фосфорилирование адаптерного белка цитоплазмы DAB1 двумя киназами src-семейства, Src [Howell BW, Gertler FB, Cooper JA (January 1997)] и Fyn [Arnaud L, Ballif BA, Förster E, Cooper JA (January 2003)]. Предположительно, фосфорилированный DAB1 стимулирует перестройку актинового цитоскелета клетки и изменяет насыщенность клеточной поверхности рецепторами альфа-3-бета-1-интегрина, что снижает силу сцепления мигрирующего нейрона с волокнами радиальной глии. В одном исследовании делается вывод, что для правильного построения слоёв важно наличие бета-1 интегрина рецепторов не на самих перемещающихся нейробластах, а в первую очередь на глиальных клетках [Belvindrah R, Graus-Porta D, Goebbels S, Nave KA, Müller U (December 2007)]

Радиальная глия, по данным одного исследования, содержит столько же рецепторов ApoER2, как и нейроны, но вдесятеро меньшее число рецепторов VLDLR [Hartfuss E, Förster E, Bock HH, et al (October 2003)]. Фосфорилирование DAB1 через некоторое время вызывает его убиквитинирование и последующую деградацию [Feng L, Allen NS, Simo S, Cooper JA (November 2007)], поэтому при недостатке рилина его концентрация растёт; такая отрицательная обратная связь может играть важную роль в построении кортикальных слоёв [Kerjan G, Gleeson JG., 2007]. Под воздействием двух антител, распознающих основные рецепторы, DAB1 фосфорилируется, но последующего снижения его концентрации и исправления reeler-фенотипа не происходит, что может говорить о передаче части сигнала помимо DAB1 [Jossin Y, 2004].

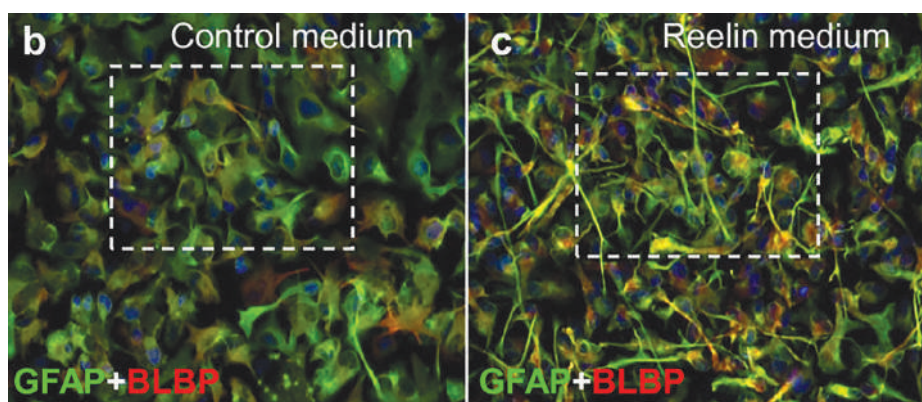


**Рисунок 20.3.** Взаимодействие основного сигнального каскада рилина с LIS1. Участники взаимодействия: SFK, PI3K, АКТ. Из работы Zhang et al., 2008 год. <sup>1</sup> Zhang G et al.2007<sup>et65</sup> <https://ru.wikipedia.org/wiki/Рилин>

С внутриклеточным сегментом VLDLR также связывается белок LIS1, известный благодаря своей роли в развитии лиссэнцефалии [Zhang G, 2007]. Отслеживание путей миграции говорит о том, что VLDLR опосредует выполнение стоп-сигнала, а ApoER2 жизненно необходим для миграции поздно зародившихся нейронов неокортекса [Hack I, et al. 2007].

Вызываемое рилином усиление дендритогенеза опосредовано киназами семейства Src и зависит от экспрессии Crk и CrkL, по результатам одного исследования [Matsuki T, Pramatarova A, Howell BW (May 2008)], согласующегося с ранними сообщениями о взаимодействии этих регуляторов с тирозин-фосфорилированным DAB1 [Ballif BA, et al., 2004]. Более того, в одном исследовании с использованием Cre-LoxP-рекомбинации заглушка экспрессии Crk и CrkL в нейронах вызвала у мыши *reeler*-фенотип, следовательно, эти адаптерные белки расположены между DAB1 и Akt в сигнальной цепочке рилина [Park TJ, Curran T (December 2008)].

Показано, что рилиновый сигнальный каскад неустановленным пока образом активирует каскад трансмембранного рецептора Notch-1, что приводит к индукции экспрессии липид-связывающего белка мозга FABP7 и переходу нейрональных клеток-предшественников к фенотипу радиальной глии [Keilani S, Sugaya K (July 2008)] (рисунок 20.4).



**Рисунок 20.4.** Рилин стимулирует переход клеток-предшественников к фенотипу радиальной глии, индуцируя экспрессию маркера BLBP воздействием на сигнальный каскад Notch1. Фрагмент иллюстрации из Keilani et al., 2008. <https://ru.wikipedia.org/wiki/Рилин>

Было показано, что молекулы рилина объединяются в олигомеры, необходимые для эффективного фосфорилирования DAB1 [Utsunomiya-Tate N., et al. 200077][ Kubo K, Mikoshiba K, Nakajima K. (2002)]. Более того, два основных рецептора рилина также способны образовывать кластеры, [Strasser V, Fasching D, Hauser C, et al (February 2004)] и этот процесс может быть важен для передачи сигнала, так как ведёт к объединению DAB1 в димеры или олигомеры, что активирует цепочку даже в отсутствие рилина [Strasser V, Fasching D, Hauser C, et al (February 2004)]

С другой стороны, рилин одновременно является сериновой протеазой, имея способность разрушать белки расщеплением пептидных связей между составляющими их аминокислотами [Quattrocchi CC, et al. 2002], что может играть роль в регулировании сцепления и миграции нейронов.

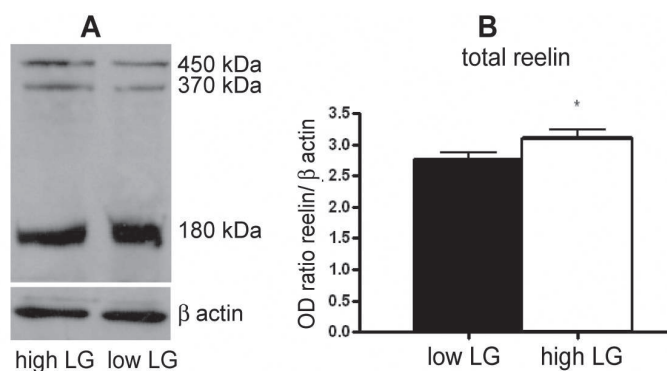
Как показано в одной работе, правильный кортикогенез происходит лишь при разделении рилина на фрагменты, осуществляемое неидентифицированными металлопротеиназами, которые выделяются эмбриональными нейронами [Jossin Y, Gui L, Goffinet AM (April 2007)] и, возможно, с участием ещё менее известных механизмов протеолиза [Lugli G, et al., 2003]. Как предполагается, полноразмерный рилин цепляется за волокна внеклеточного матрикса, а протеиназы позволяют высвободить важную центральную часть белка [Jossin Y, Gui L, Goffinet AM (April 2007)]. Возможно, центральная часть, проникая в глубинные слои, в большей степени способствует миграции нейробластов, а приближаясь к верхнему слою, клетки прекращают дальнейшую миграцию либо из-за повышенной общей концентрации рилина, либо из-за того, что его полноразмерные молекулы и гомодимеры, закреплённые в матриксе, действуют отлично от центральных фрагментов [Reelin Glycoprotein: Structure, Biology and Roles in Health and Disease / под ред. Hossein S. Fatemi. – Springer, 2008. – 444 с.].

Как и другие белки суперсемейства липопротеиновых рецепторов, VLDLR и ApoER2 содержат в своей структуре так называемые *интернализационные домены* – мотивы NPxY, позволяющие захватывать лиганды, в том числе и рилин, и осуществлять их эндоцитоз. По данным одного исследования, после эндоцитоза рилина его N-терминальный участок может снова секретироваться клеткой. [Hibi T, Hattori M (March 2009)]. Этот фрагмент белка, согласно другому исследованию, может препятствовать излишнему разрастанию апикальных дендритов пирамидальных нейронов ПIII слоя, активируя сигнальную цепочку, не связанную с основными рецепторами рилина [Chateau P, et al., 2009].

По данным одной группы исследователей, активация рилинового каскада приводит к фосфорилированию внутриклеточного белка кофилин-1 в позиции ser3, что может приводить к стабилизации актинового цитоскелета и останавливать рост нейрональных отростков при нейромиграции [Chai X, Förster E, Zhao S, Bock HH, Frotscher M (January 2009); Frotscher M, Chai X, Bock HH, Haas CA, Förster E, Zhao S (April 2009); Chai X, Förster E, Zhao S, Bock HH, Frotscher M., 2009].

### **Регуляция экспрессии рилина**

Помимо общего числа рилин-производящих клеток, на экспрессию белка влияет множество факторов. На эпигенетическом уровне фактор транскрипции TBR1 регулирует экспрессию RELN и других генов, имеющих в своей структуре «Т-элемент». Диета, богатая метионином, может активировать эпигенетические механизмы подавления экспрессии. Исследуется также роль поведения и общения: так, отмечена корреляция материнской заботы (груминга) у крыс с уровнем рилина как в гиппокампе, так и в коре мозга детёнышей. У крыс, выращенных в условиях социальной изоляции, к 80 дню отмечается сниженный уровень рилина в мозге и нарушенное преимпульсное ингибирование, что может говорить о крайней важности социальных взаимодействий для установления нормальной карты связей в развивающейся префронтальной коре (рисунок 20.5).



**Рисунок 20.5.** Повышенная экспрессия рилина в коре у детенышей «заботливых» (High LG) крыс (LG – сокр. англ. *licking and grooming*). Иллюстрация из статьи Smit-Rigter et al., 2009.

В одном исследовании отмечено значительное снижение уровня рилина в гиппокампах мышей, длительно получавших кортикостерон, [Lussier AL, Caruncho HJ, Kalynchuk LE (May 2009)], избыточное воздействие глюкокортикоидов на гиппокамп является одним из гипотетических механизмов депрессивных расстройств. В одном небольшом посмертном исследовании отмечено повышенное метилирование гена RELN в коре мозга психически здоровых лиц, прошедших пубертат, по сравнению с теми, кто ещё не вступил в период полового созревания. По данным одного исследования, инъекция трийодтиронина усилила экспрессию рилина и BDNF в гиппокампе крыс [Sui L, Ren WW, Li BM (December 2009)].

### Психотропные медикаменты

Оценка влияния медикаментов важна, так как уровень рилина обычно измеряется посмертно у пациентов, проходивших длительную терапию. Возлагаются надежды на то, что средства, активирующие деметилирование, такие как клозапин, сульпирид и вальпроевая кислота, будут способны лучше влиять на симптоматику, однако другие исследования говорят о том, что психотропные вещества могут снижать экспрессию белка, и данные по метилированию промоторов в одних публикациях не согласуются с данными экспрессии в других, что говорит о необходимости дальнейшего изучения механизмов, связанных с рилином и GAD67.

Например, Fatemi et al. была проведена оценка воздействия психотропных медикаментов на экспрессию мРНК и белка рилина во фронтальной коре крыс.

	<u>Клозапин</u>	<u>Флуоксетин</u>	<u>Галоперидол</u>	<u>Литий</u>	<u>Оланзапин</u>	<u>Вальпроевая кислота</u>
Reelin: Protein	↓	без изм.	↓	↓	↑	без изм.
mRNA	↑	↑	↓	↑	↑	↓

В 2009 году группа Fatemi et al. опубликовала результаты расширенных исследований, в ходе которых, кроме рилина, анализировалась экспрессия молекул-участников рилиновой цепочки (VLDLR, DAB1, GSK3beta), а также ферментов GAD65 и GAD67 под воздействием тех же медикаментов. [Fatemi SH, Reutiman TJ, Folsom TD (April 2009)].

## 20.5. Семейные гиперхолестеролемии. Роль рецептора ЛПНП в патологии

Семейные гиперхолестеролемии (СГ) генетически гетерогенная группа заболеваний, как моногенной, так и мультифакториальной природы. Моногенные формы заболевания - результат мутаций в различных генах, участвующих в синтезе и утилизации липопротеинов. Наиболее часто мутация затрагивает ген рецептора ЛПНП. Это приводит к развитию СГ 2а-типа (ОМIM: 143890). Болезнь поражает как гетеро-, так и гомозигот по мутантному аллелю гена и наследуется по аутосомно-доминантному типу. Гетерозиготы встречаются с частотой 1:500 человек в различных популяциях мира, частота гомозигот значительно ниже и не превышает 1:1 млн. человек. Ген рецептора ЛПНП располагается на хромосоме 19p13.2-p13,1 и содержит 18 экзонов и 17 интронов. Кодированный им рецептор относится к семейству гликопротеинов, состоит из 860 аминокислот и имеет доменную структуру (Рисунок. 20.6).

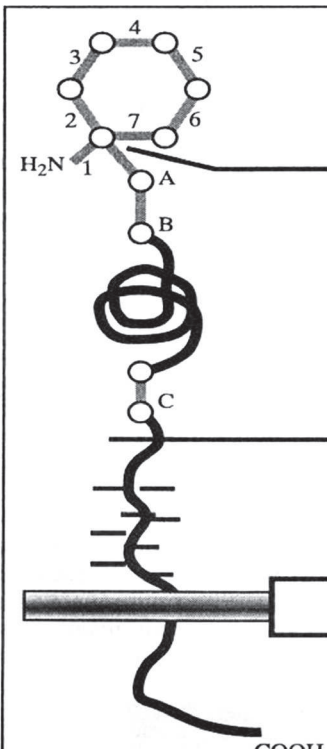
СТРУКТУРА ( — участки богатые цистеином)	ДОМЕН	№ экзона	Функция
		Сигнальная последовательность	1
	Лиганд-связывающий	2 – 6	Связывание с апобелками транспорт
	Гомолог EGF предшественника	7 – 14	Обратный транспорт рецептора на мембрану
	Гликозилированный (содержит О-концевые сахара)	15	Неизвестна
	Мембранный	16, 17	Фиксация на мембране
	Цитоплазматический	17, 18	Ориентация рецептора на мембране

Рисунок 20.6. Расположение доменов рецептора ЛПНП и их молекулярные характеристики

Первый экзон кодирует участок полипептидной цепи, играющий роль сигнальной последовательности. Экзоны со 2 по 6 кодируют 292 аминокислоты, сгруппированных в 7 tandemно повторяющихся последовательностей и образующих лиганд-связывающий домен. Основная функция этого домена заключается в формировании ионных взаимодействий с Аро-В- и Аро-Е-белками. Экзоны 7-14 кодируют аминокислотную последовательность, имеющую гомологию с предшественником эпидермального фактора роста (ПЭФР, EGF). Функции этого белкового участка окончательно не установлены. 15-й экзон кодирует образование 58 аминокислот, функции которых также не уточнены. Экзоны 16 и 17 образуют 22 гидрофобные аминокислоты, обеспечивающие заякоривание рецептора на клеточной мембране. 18-й экзон образует 50 аминокислот, содержащих две сигнальные последовательности, необходимые для правильной организации рецептора на мембране.

К настоящему времени описано более 420 различных мутаций, которые в зависимости от воздействия на патогенез можно сгруппировать в 5 классов: 1) приводящие к прекращению синтеза рецептора; 2) нарушающие миграцию рецептора из эндоплазматического ретикула в аппарат Гольджи; 3) изменяющие процесс связывания рецептора с ЛПНП; 4) нарушающие кластеризацию рецептора на клеточной мембране; 5) нарушающие процесс отщепления ЛПНП в клетке и транспорт рецептора к мембране клетки. Мутации относящиеся к первому классу, возникают в промоторе гена или представляют собой нонсенс или сплайсинговые мутации вблизи его 5'-конца. Мутации второго типа наиболее часто затрагивают экзоны 7-14 и приводят к изменению нормальной укладки и пространственной ориентации белка. Третий тип мутаций нарушает функционирование лиганд-связывающего домена и/или аминокислотную последовательность, имеющую гомологию с ПЭФР. Мутации четвертого типа нарушают функционирование домена, обеспечивающего заякоривание белка на мембране клеток (чаще всего это точковые мутации, обуславливающие замену цистина на тирозин). Мутации относящиеся к пятому классу, нарушают функционирование аминокислотной последовательности гомологичной ПЭФР. Они играют важную роль в отщеплении ЛПНП и высвобождении рецепторов внутри клетки. Существуют два региона гена, в которых мутации обнаруживаются наиболее часто - экзоны 4 и 6. Еще одна особенность мутаций в гене рецептора ЛПНП состоит в высокой частоте инсерций и делеций, возникающих в результате рекомбинации между внутригенными Alu-повторами. Патогенез семейной гиперхолестерolemии в настоящее время представляется следующим образом. При недостаточности рецепторов ЛПНП на клеточной мембране и нарушении их функционирования увеличивается концентрация ЛПНП в кровяном русле. Их длительная циркуляция в крови приводит к образованию макрофагоподобных клеток (клеток-чистильщиков), которые начинают захватывать химически измененные ЛПНП. Считают, что клетки-«чистильщики» возникают из интимы артерий и стволовых клеток и могут быть основой атеросклеротических бляшек сосудов. Второй генетический вариант гиперхолестерolemии наследуется мультифакториально и может возникать у лиц, не имеющих мутаций в гене рецептора ЛПНП. В этом случае вклад в генетическую предрасположенность к развитию заболевания вносят мутации в различных генах, участвующих в синтезе холестерина или являющихся транскрипционными факторами. В качестве средовых фак-

торов, провоцирующих развитие болезни, могут выступать различные лекарственные вещества, такие как гормон роста, тироксин, эстрадиол, холестерамин, казеин, а также избыточное потребление жира или длительное голодание. Клинические проявления разных генетических вариантов гиперхолестеролемии сходны (ярко-желтые ксантомы в области сухожилий мышц верхних и нижних конечностей, а также периорбитальный ксантелизм) и обусловлены отложением липидов на стенках сосудов, а также в коже, сухожилиях и связках. По краю роговицы часто определяется липоидная дуга. Однако наиболее тяжелые последствия возникают при появлении атеросклеротических бляшек в коронарных артериях и аорте. Это в большинстве случаев приводит к возникновению ишемической болезни сердца в молодом или даже детском возрасте. Наиболее тяжелая клиническая картина наблюдается у гомозигот по мутациям в гене рецептора ЛПНП. У этих больных патологические симптомы появляются в более раннем возрасте, быстро прогрессируют и приводят к укорочению продолжительности жизни больного. Лабораторная диагностика заболевания основана на определении концентрации общего холестерина в плазме крови больных. У гомозигот этот показатель составляет 600–1000 мг/дл, в то время как у гетерозигот этот показатель не превышает 350–550 мг/дл.

### Литература

1. Azoulay, M., Henry, I., Tata, F., Weil, D., Grzeschik, K. H., Chaves, E., McIntyre, N., Williamson, R., Humphries, S. E., Junien, C. The structural gene for lecithin:cholesterol acyl transferase (LCAT) maps to 16q22. *Ann. Hum. Genet.* 51: 129-136, 1987.
2. Jonas, A. Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 1529: 245-256, 2000.
3. Taramelli, R., Pontoglio, M., Candiani, G., Ottolenghi, S., Dieplinger, H., Catapano, A., Albers, J., Vergani, C., McLean, J. Lecithin cholesterol acyl transferase deficiency: molecular analysis of a mutated allele. *Hum. Genet.* 85: 195-199, 1990.
4. Fatemi SH, Reutiman TJ, Folsom TD (April 2009). «Chronic psychotropic drug treatment causes differential expression of Reelin signaling system in frontal cortex of rats». *Schizophr. Res.* DOI:10.1016/j.schres.2009.03.002. PMID 19359144.
5. Poepfel P, Habetha M, Marcão A, Büssow H, Berna L, Gieselmann V (March 2005). «Missense mutations as a cause of metachromatic leukodystrophy, Degradation of arylsulfatase A in the endoplasmic reticulum». *FEBS J.* 272 (5): 1179–88. DOI:10.1111/j.1742-4658.2005.04553.x. PMID 15720392. (англ.)
6. Metachromatic leukodystrophy at «Dorland's Medical Dictionary» (англ.) Т. Р. Харрисон. Внутренние болезни в 10 книгах. Книга 8. Пер. с англ. М., Медицина, 1996, 320 с.: ил. Глава 316. Лизосомные болезни накопления (с. 250–273). med-books.info. Проверено 11 декабря 2014.
7. Fluharty, Arvan. «Arylsulfatase A Deficiency: Metachromatic Leukodystrophy, ARSA Deficiency». *GeneReviews*, 2006 (англ.)
8. Maria Blomqvist, Volkmar Gieselmann and Jan-Eric Månsson (англ.). Accumulation of lysosulfatide in the brain of arylsulfatase A-deficient mice. lipidworld.com. Проверено 12 декабря 2014.
9. Austin, J., Armstrong, D., Fouch, S., Mitchell, C., Stumpf, D. A., Shearer, L., Briner, O. **Metachromatic leukodystrophy (MLD). VIII. MLD in adults: diagnosis and pathogenesis.** *Arch. Neurol.* 18: 225-240, 1968. [PubMed: 5642751, related citations] [Full Text]
10. Bayever, E., Ladisch, S., Philippart, M., Brill, N., Nuwer, M., Sparkes, R. S., Feig, S. A. Bone-marrow transplantation for metachromatic leucodystrophy. *Lancet* 326: 471-473, 1985. Note: Originally Volume II. [PubMed: 2863494, related citations] [Full Text]



11. Biffi, A., Cesani, M., Fumagalli, F., Del Carro, U., Baldoli, C., Canale, S., Gerevini, S., Amadio, S., Falautano, M., Rovelli, A., Comi, G., Roncarolo, M. G., Sessa, M. Metachromatic leukodystrophy-mutation analysis provides further evidence of genotype-phenotype correlation. *Clin. Genet.* 74: 349-357, 2008.

12. Pilz, H., Muller, D. Studies on adult metachromatic leukodystrophy. II. Biochemical aspects of adult cases of metachromatic leukodystrophy. *J. Neurol. Sci.* 9: 585-595, 1969.

13. Polten, A., Fluharty, A. L., Fluharty, C. B., Kappler, J., von Figura, K., Gieselmann, V. Molecular basis of different forms of metachromatic leukodystrophy. *New Eng. J. Med.* 324: 18-22, 1991

14. Regis, S., Corsolini, F., Stroppiano, M., Cusano, R., Filocamo, M. Contribution of arylsulfatase A mutations located on the same allele to enzyme activity reduction and metachromatic leukodystrophy severity. *Hum. Genet.* 110: 351-355, 2002.

15. Wang, R. Y., Bodamer, O. A., Watson, M. S., Wilcox, W. R. Lysosomal storage diseases: diagnostic confirmation and management of presymptomatic individuals. *Genet. Med.* 13: 457-484, 2011. Wang, R. Y., Bodamer, O. A., Watson, M. S., Wilcox, W. R. Lysosomal storage diseases: diagnostic confirmation and management of presymptomatic individuals. *Genet. Med.* 13: 457-484, 2011.

16. Zlotogora, J., Furman-Shaharabani, Y., Harris, A., Barth, M. L., von Figura, K., Gieselmann, V. A single origin for the most frequent mutation causing late infantile metachromatic leucodystrophy. *J. Med. Genet.* 31: 672-674, 1994.

### Контрольные вопросы

1. Какие группы липопротеидов участвуют липидном обмене?
2. Какую роль выполняют липопротеины в организме?
3. Как различаются липопротеиды по плотности и функциям?
4. Какие рецепторы участвуют в переносе липопротеидов низкой и очень низкой плотности?
5. Какая классификация липидных нарушений, основана на изменении профиля липопротеинов плазмы?
6. С чем связана гиперлипидемия?
7. Как холестерин и фосфолипиды обеспечивают стабильность и функцию клеточных мембран?
8. Какие нарушения обмена фосфолипидов и сфинголипидов вызывают наследственные болезни?
9. Какие нарушения липидного обмена приводят к семейным гиперхолестеролемиям?
10. Какие наследственные болезни приводят к нарушениям распределения нейронов в коре головного мозга?

## ГЛАВА 21

### НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ КРОВИ

#### 21.1. Анемия Фанкони

Анемия Фанкони наследственная апластическая, конституциональная инфантильная панмиелопатия, врожденная панмиелопатия Фанкони, (MIM 227650 ; MIM 227660) впервые описана в 1937 году Fankoni и позднее названа детским семейным апластическим миелозом.

Анемия Фанкони - болезнь с аутосомно-рецессивным типом наследования, сопровождающаяся множественными хромосомными аномалиями. Клинически проявляется прогрессирующей панцитопенией, пороками развития, патологией скелета (отсутствие лучевой кости, недоразвитие большого пальца кисти), косоглазием, микроцефалией, низкорослостью и гипогонадизмом (Chaganti R.S.K., 1991 ; Glanz A., 1982). А также предрасположенностью к злокачественным новообразованиям, ломкостью хромосом и повышенной чувствительностью к химическим мутагенам, в том числе к диэпоксидбутану (бутандиендиэпоксиду) и циклофосфамиду. Часто развиваются ОМЛ и рак кожи.

Заболевание характеризуется угнетением эритропоэза, гранулопоэза и тромбопоэза, что клинически проявляется анемией, лейкоцитопенией и тромбоцитопенией. Наблюдается задержка роста, отмечается недоразвитие половых органов, микроцефалия, микрофтальмия, косоглазие, коричневая пигментация кожи (мелонодермия), почечная и сердечная недостаточность. Первые симптомы анемии проявляются чаще от 6 месяцев до 4 лет, хотя имеются описания болезни у детей периода новорожденности. Анемия нормоцитарного характера. В пунктате костного мозга резко выраженная гипоплазия. Выявляются отклонения ряда свойств эритроцитов - повышенное содержание щелочноустойчивого гемоглобина, качественное изменение гексокиназы, снижение образования АТФ, уменьшение пероксидазы в ядрах нормобластов костного мозга, понижение уровня щелочной фосфатазы и содержания фосфолипидов и полисахаридов. Лейкоциты снижаются без изменения лейкоцитарной формулы. Резко выраженная тромбоцитопения сопровождается геморрагическими явлениями. Нередко отмечается нарушение триптофана в виде повышения экскреции 3-гидроксиантраниловой кислоты, некоторых других дериватов триптофана. Часто длительность жизни детей не превышает 2-5 лет: дети погибают от резкой анемизации, кровоизлияния в мозг или желудочно-кишечных кровотечений.

К настоящему времени выявлено восемь комплементационных групп при анемии Фанкони: FA1, FA-B, FA-C, FA-D, FA-G, FA-E, FA-H [Joenje H., 1997 ; Joenje H., 2000].

У четырех комплементационных групп анемии Фанкони (FA-A, FA-C, FA-G, FA-E) клонирована кДНК. Ген FA-A - Lo Ten Foe J.R., 1996a ; ген FA-C - Strathdee C.A., 1992 ; ген FA-G - de Winter J.P., 1998 ; ген FA-E - de Winter J.P., 2000.

Кодирующая часть гена FA-A из 4365 пар оснований кодирует пептид из 1455 аминокислотных остатков, тогда как весь ген по протяженности занимает 80 килобаз. Ген разделяется 42 интронами на 43 экзона (Centra M., 1998 ; Ianzano L., 1997). Размер интронов колеблется от 0,088 до 6,5 килобаз.

Кодирующая часть гена FA-C из 1674 пар оснований кодирует полипептид из 557 аминокислот с молекулярным весом 63000 ( Strathdee C.A.,1992 ; Gibson R.A.,1993a ).

Ген FA1 (FA-A) локализуется на 16 хромосоме в позиции 16q24.3 ( Pronk J.C.,1995 ; Gschwend M.,1996 ).

Ген FA-B,

Ген FA-C

Ген FA-D локализуется на 3 хромосоме человека в позиции 3p22-26 ( Whitney M.A.,1995 ; Hejna J.A.,2000 ).

Ген FA-G локализуется на 9 хромосоме человека в позиции 9p13 ( Saar K.,1998 ; Liu N.,1997 ).

Ген FA-E локализуется на 6 хромосоме человека в позиции 6p ( Waisficz Q.,1999 ; Wegner R.D.,1996 )

Идентифицированы мутации в генах FA-A, FA-C и FA-G в соответствующих комплементационных группах анемии Фанкони.

Клетки больных анемией Фанкони проявляют хромосомную нестабильность ( German J.,1987 ) и гиперчувствительны к ДНК-сшивающим агентам (Auerbach A.D.,1976 ; Auerbach A.D.,1992 ; Ishida R.,1982 ; Fujiwara Y.,1977 ). Отмечено, что при анемии Фанкони нарушены механизмы репарации ДНК пиримидиновых димеров, возникших вследствие УФ воздействия ( Poon P.K.,1974 ; Grompe M.,2001 ). Показано также отсутствие активности ДНК-лигазы ( Hirsch-Kauffmann M.,1978 ). Клеточные дефекты, обуславливающие анемию Фанкони, до сих пор точно не выявлены.

FANCA ген кодирует протеин с молекулярным весом 162 kDa с неизвестной функцией. По некоторым сообщениям этот белок локализуется в цитоплазме (Kruyt F.A.E.,1997 ), тогда как другие авторы говорят о локализации данного белка исключительно в ядре ( Naif D.,1998 ; Kruyt F.A.,1998 ; Lightfoot J.,1999 ; Medhurst A.L.,2001 ).

Повышенная чувствительность к агентам, вызывающим поперечные сшивки ДНК, требует низкодозовой химиотерапии, что делает необходимой последующую ТКСК (трансплантацию кроветворных стволовых клеток). Побочные эффекты трансплантации включают тяжелый стоматит, эритродермию и РТПХ . БРВ в зависимости от источника стволовых клеток колеблется от 25 до 75%. Наилучшие результаты наблюдаются после низкодозовой химиотерапии и трансплантации клеток от совместимых сиблингов, хотя эффективны и другие варианты ТКСК. Родственную трансплантацию от совместимых доноров следует проводить при появлении первых признаков панцитопении. В отсутствие совместимых родственников можно использовать и другие источники стволовых клеток (в том числе пуповинную кровь), так как возникновение миелодисплазии резко ухудшает прогноз.

### Литература

1. Auerbach A.D. Fanconi anemia and leukemia: tracking the genes. - *Leukemia*, 1992, v.6 (suppl.1), p. 1-4.
2. Auerbach A.D., Wolman S.R. Susceptibility of Fanconi's anemia. fibroblasts to chromosome damage by carcinogens. - *Nature*, 1976, v. 261, p. 494-496.

3. Centra M., Memeo E., d'Apolito M., Savino M., Ianzano L., Notarangelo A., Liu J., Doggett N.A., Zelante L., Savoia A. Fine exon-intron structure of the Fanconi anemia group A (FAA) gene and characterization of two genomic deletions. - *Genomics*, 1998, v. 51, p. 463-467.
4. de Winter J.P., Leveille P., van Berkel C.G.M., Rooimans M.A., van de Weel L., Steltenpool J., Demuth J., Morgan N.F., Alon N., Bosnoyan-Colins L. Isolation of a cDNA representing the Fanconi anemia complementation group E gene. - *Am.J.Hum.Genet.*, 2000, v. 67, p. 1306-1308.
5. de Winter J.P., Waisfisz Q., Rooimans M.A., van Berkel C.G.M., Bosnoyan-Colins L., Alon N., Carreau M., Bender O., Demuth I., Schindler D., Pronk J.C., Arwert F., Hoehn H., Digweed M., Buchwald M., Joenje H. The Fanconi anemia group G FANCG is identical with XRCC9. - *Nature Genet.*, 1998, v. 20, p. 281-283.
6. Fujiwara Y., Tatsumi M., Sasaki M. Cross-link repair in human cells and its possible defect in Fanconi's anemia cells. - *J. Molec. Biol.*, 1997, v. 113, p. 635-649.
7. German J., Scholnberg S., Caskie S., Warburton D., Falk C., Ray J.H. A test for Fanconi's anemia. - *Blood*, 1987, v. 69, p. 1637-1641.
8. Gibson R.A., Buchwald M., Roberts R.G., Mathew C.G. Characterization of the exon structure of the Fanconi anemia group C gene by vectorette PCR. - *Hum.Mol.Genet.*, 1993, v. 2, p. 35-38.
9. Grompe M., Dandrea A. Fanconi anemia and DNA repair. - *Hum.Mol.Genet.*, 2001, v. 10, p. 2253-2260.
10. Gschwend M., Levrán O., Kruglyak L., Ranada K., Verlander B.C., Shen S., Faure S., Weissenbach J., Altay C., Lander E.S. A locus for Fanconi anemia on 16q determined by homozygosity mapping. - *Am.J. Hum.Genet.*, 1996, v. 59, p. 377-384.
11. Hejna J.A. Localization of the Fanconi anaemia complementation group D gene to a 200 kb region on chromosome 3p25.3. - *Am.J.Hum.Genet.*, 2000, v. 66, p. 1400-1405.
12. Hirsch-Kauffmann M., Schweiger M., Wagner E.F., Sperling K. Deficiency of DNA ligase activity in Fanconi's anemia. - *Hum. Genet.*, 1978, v. 45, p. 25-32.
13. Ianzano L., d'Apolito M., Centra M., Savino M., Levrán O., Auerbach A.D., Cleton-Jansen A.M., Doggett M.N., Pronk J.C., Tipping A.J., Gibson R.A., Mathew C.G., Whitmore S.A., Apostolou S., Callen D.F., Zelante L., Savoia A. The genomic organization of the Fanconi anemia group A (FAA) gene. - *Genomics*, 1997, v. 41, p. 309-314.
14. Ishida R., Buchwald M. Susceptibility of Fanconi's anemia lymphoblasts to DNA-cross-linking and alkylating agents. - *Cancer Res.*, 1982, v. 42, p. 4000-4006.
15. Joenje H., Levitus M., Waisfisz Q., D Andrea A., Garcia-Higuera I., Pearson T., van Berkel C.G.M., Rooimans M.A., Morgan N., Mathew C.G. Complementation analysis of Fanconi anemia: assignment of the reference FA-H patient to group A. - *Am.J.Hum.Genet.*, 2000, v. 67, p. 759-762.
16. Joenje H., Oostra A.B., Wijker M., di Summa F.M., van Berkel C.G.M., Rooimans M.A., Ebell W., van Weel M., Pronk J.C., Buchwald M., Arwert F. Evidence for at least eight Fanconi anemia genes. - *Am.J.Hum.Genet.*, 1997, v. 61, p. 940-944.
17. Kruyt F.A., Youssoufian H. The Fanconi anemia proteins FAA and FAC function in different cellular compartments to protect against cross-linking agent cytotoxicity. - *Blood*, 1998, v. 92, p. 2229-2236.
18. Kruyt F.A.E., Waisfisz Q., Dijkmans L.M., Hermsen M.A.J.A., Youssoufian H., Arwert F., Joenje H. Cytoplasmic localization of a functionally active Fanconi anemia group A-green fluorescent protein chimera in human 293 cells. - *Blood*, 1997, v. 90, p. 3288-3295.
19. Lightfoot J., Alon N., Bosnoyan-Collins L., Buchwald M. Characterization of regions functional in the nuclear localization of the Fanconi anemia group A protein. - *Hum.Mol.Genet.*, 1999, v. 8, p. 1007-1015.
20. Liu N. XRCC9 gene corrects chromosomal instability and mutagen sensitivities in CHOUV40 cells. - *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 1997, v. 94, p. 9232-9237.

21. Lo Ten Foe J.R., Roomians M.A., Bosnoyan-Collins L., Alon N., Wijker M., Parker L., Lightfoot J., Carreau M., Callen D.F., Savoia A., Cheng N.C., van Berkel C.G.M., Strunk M.H.P., Gille J.J.P., Pals G., Kruyt F.A.E., Pronk J.C., Arwert F., Buchwald M., Joenje H. Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anaemia gene, FAA. - *Nature Genet.*, 1996, v. 14, p. 320-323.
22. Medhurst A.L., Huber P.A.J., Waisfisz Q., de Winter J.P., Mathew C.G. Direct interactions of the five known Fanconi anaemia proteins suggest a common functional pathway. - *Hum.Mol.Genet.*, 2001, v. 10, p. 423.
23. Naif D., Kupfer G.M., Suliman A., Lambert K., D'Andrea A.D. Functional activity of the Fanconi anemia protein FAA requires FAC binding and nuclear localization. - *Mol.Cell.Biol.*, 1998, v. 18, p. 5952-5960.
24. Poon P.K., O'Brien R.L., Parker J.W. Defective DNA repair in Fanconi anaemia. - *Nature*, 1974, v. 250, p. 223-225.
25. Pronk J.C., Gibson R.A., Savoia A., Wijker M., Morgan N.V., Melchionda S., Ford D., Temtamy S., Ortega J.J., Jansen S., Havenga C., Cohn R.J., de Ravel T.J., Roberts I., Westerveld A., Easton D.F., Joenje H., Mathew C.G., Arwert F. Localisation of the Fanconi anaemia complementation group A gene to chromosome 16q24.3. - *Nature Genet.*, 1995, v. 11, p. 338-340.
26. Saar K., Schindler D., Wegner R.D., Reis A., Wienker T.F., Hoehn H., Joenje H., Sperling K., Digweed M. Localization of a Fanconi anaemia gene to chromosome 9p. - *Eur.J.Hum.Genet.*, 1998, v. 6, p. 501-508.
27. Strathdee C.A., Gavish H., Shannon W.R., Buchwald M. Cloning of a cDNA for Fanconi's anemia by functional complementation. - *Nature*, 1992, v. 356, p. 763-767.
28. Waisfisz Q., Saar K., Morgan N.V., Altay C., Leegwater P.A., de Winter J.P., Komatsu K., Evans G.R., Wegner R.D., Reis A. The Fanconi anemia - group E gene, FANCE, maps to chromosome 6p. - *Am.J.Hum. Genet.*, 1999, v. 64, p. 1400-1405.
29. Wegner R.D., Henrichs I., Joenje H., Schröder Kurth T. Fanconi anemia complementation group E. Clinical and cytogenetic data of the first patients. - *Clin.Genet.*, 1996, v. 50, p. 479-482.
30. Whitney M.A. Microcell mediated chromosome transfer maps the Fanconi anemia group D gene to chromosome 3p. - *Nature Genet.*, 1995, v. 11, p. 341-343.

## 21.2. Несфероцитарные анемии

### Недостаточность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы

Гемолитическая несфероцитарная анемия ( MIM 305900 ) обусловлена дефицитом глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (G6PD) и нестойкостью глутатиона эритроцитов (Beutler E., 1996; Luzzatto L., 1995; Luzzatto L., 1985; Mason P.J., 1996; Vulliamy T.J., 1992). Фермент G6PD представляет собой олигомер (или димер или тетрамер в зависимости от условий), состоящий из субъединиц с молекулярным весом 56000 D (Persico M.G., 1986; Boyer S.H., 1962; Cohen P., 1969).

Г-6-ФД - первый фермент пентозофосфатного гликолиза . Основная функция фермента заключается в восстановлении НАДФ до НАДФН , необходимого для перехода окисленного глутатиона (GSSG ) в восстановленную форму. Восстановленный глутатион (GSH ) требуется для связывания активных форм кислорода (перекисей). Пентозофосфатный гликолиз обеспечивает клетку энергией.

Наиболее распространенная причина несфероцитарных анемий - дефекты в генах эритроцитарных ферментов (глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, пируваткиназы, фосфофруктокиназы, гексокиназы, гексофосфатизомеразы и др.). Известно, что нормальная

работа эритроцитарных ферментов необходима для успешного гликолиза - процесса, в ходе которого образуется АТФ, обеспечивающий эритроцит энергией. По пути анаэробного гликолиза метаболизируется около 90% всей глюкозы эритроцитов. Остальные 10% метаболизируются по аэробному пентозо-фосфатному пути. Нарушения функционирования хотя бы одного из ферментов метаболического расщепления глюкозы эритроцита может привести к гемолитической анемии. Описаны различные типы наследования несфероцитарных анемий - аутосомно-доминантный, аутосомно-рецессивный и Х-сцепленный рецессивный. Наиболее распространенным заболеванием этой группы является эритроцитарная энзимопатия, обусловленная недостаточностью глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (Г6ФД). Показано, что около 100 млн. человек на Земном шаре несет мутацию в гене Г6ФД. Наибольшее распространение заболевание получило в странах Средиземноморья, Ближнего и Среднего Востока, Северных регионов Африки и Юго-Восточной Азии. Заболевание широко распространено среди населения определенных областей – района Средиземноморья (Греция, Сардиния, Сицилия), среди иранцев, индусов, тайландцев, негров США ( Ahluwalia A.,1992 ; Alfinito F.,1997 ; Calabro V.,1990; Iwai K.,2001 ;Menounos P.,2000 ; Usanga E.A.,2000 ).

Этому способствовали две основные причины - устойчивость носителей мутации в гене Г6ФД к малярии, чрезвычайно распространенной в этих регионах, и высокая частота кровнородственных браков. Ген глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы локализован в области хромосомы Xq28 и содержит 13 экзонов. Этот фермент катализирует первый этап окисления глюкозы по аэробному пентозофосфатному пути, в результате которого происходит превращение D-глюкозо-6-фосфата в 6-фосфоглюконолактон. Окисление глюкозы поэтому пути приводит к образованию NADPH, необходимого для синтеза жирных кислот, стероидов, а также рибозо-5-фосфата, участвующего в синтезе нуклеотидов и нуклеиновых кислот. В эритроцитах NADPH принадлежит существенная роль в образовании восстановленного глутатиона, разрушающего перекись водорода в ходе реакции, катализируемой глутатионпероксидазой.

#### **Недостаточность Г-6-ФД (Г6ФД; G6PD) в эритроцитах: генетическая гетерогенность**

Для недостаточности Г-6-ФД подобно гемоглобину S тоже характерна значительная генетическая гетерогенность; описано свыше 400 вариантов этого фермента. Почти всегда это результат замены одной или нескольких пар нуклеотидов, что приводит к замене одних аминокислот на другие в молекуле Г-6-ФД; Делеции нехарактерны. Структурные нарушения ведут к изменению электрофоретической подвижности и кинетических свойств фермента, а также оптимального рН и термостабильности.

Многообразие мутаций лежит в основе клинического полиморфизма: тяжесть заболевания колеблется от несфероцитарной гемолитической анемии, проявляющейся спонтанно вскоре после рождения, до гемолитических кризов, провоцируемых различной силы окислителями, или отсутствия каких-либо клинических проявлений.

Нормальный вариант Г-6-ФД называется вариантом В.

Примерно у 20% выходцев из Африки обнаружена Г-6-ФД, отличающаяся от нормальной одной аминокислотой и электрофоретической подвижностью, но обладающая нормальной активностью. Этот вариант Г-6-ФД называется вариантом А+.

Из аномальных вариантов Г-6-ФД наиболее распространен вариант А-. Он появляется в результате замены двух пар нуклеотидов и встречается главным образом у выходцев из Экваториальной Африки. Вариант А- характеризуется одинаковой с вариантом А+ электрофоретической подвижностью, но менее стабилен и имеет другие кинетические свойства. Вариант А- обнаруживают примерно у 11% негров, проживающих в США.

Второй по частоте аномальный вариант Г-6-ФД встречается преимущественно у выходцев из средиземноморских стран, особенно у евреев-сефардов и сардинцев. Этот вариант фермента еще менее активен, чем вариант А-, и может стать причиной несфероцитарной гемолитической анемии.

Третий по частоте аномальный вариант Г-6-ФД вызывает менее тяжелые нарушения и распространен в Южном Китае.

### **Гемолитическая несфероцитарная анемия. Фенотип - заболевание**

Гемолитическая несфероцитарная анемия ( МIM 305900 ) обусловлена дефицитом глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (G6PD) и нестойкостью глутатиона эритроцитов (Beutler E., 1996; Luzzatto L., 1995; Luzzatto L., 1985; Mason P.J., 1996; Vulliamy T.J., 1992).

В период новорожденности гипербилирубинемия в результате интенсивного гемолиза достигает высокой степени, в связи с чем нередко возникает необходимость в проведении заменных переливаний крови. В более старшем возрасте этот дефицит реализуется в виде внутрисосудистого гемолиза с явлением выраженной гемолитической анемии. Кроме того, причиной гемолиза у больных с недостаточностью Г-6-ФД служат лекарственные средства и токсины, обладающие окислительными свойствами. Чаще всего это сульфаниламиды, противомалярийные средства и нитрофурантоин. Как причина гемолиза часто упоминается аспирин, но на больных с вариантом А - он действия не оказывает.

Тяжелый гемолиз может быть вызван случайным употреблением токсичных веществ, например нафталина, который содержится в средствах от моли.

Наконец, гемолитический криз может быть спровоцирован метаболическим ацидозом.

Гемолитический криз может развиваться в считанные часы с момента действия окислителя. В тяжелых случаях наблюдаются гемоглобинурия и шок . Поскольку происходит быстрое разрушение только старых эритроцитов, гемолитический криз обычно проходит самостоятельно, даже если действие окислителя продолжается. У негров с вариантом А - (см. «Недостаточность Г-6-ФД в эритроцитах: генетическая гетерогенность») объем циркулирующих эритроцитов снижается максимум на 25-30%.

Для острого гемолиза характерны быстрое снижение гематокрита и одновременное повышение в плазме концентраций свободного гемоглобина и непрямого билирубина и снижение уровня гаптоглобина . В результате окисления гемоглобина образуются тельца Гейнца . Их выявляют с помощью суправитальной окраски, например кристаллическим фиолетовым. Однако примерно к концу первых суток тельца Гейнца уже не определяются: они быстро удаляются селезенкой. После их удаления появляются эритроциты с полукруглым дефектом наружного края, как будто покусанные. После нескольких таких «укусов» в крови появляются фрагменты эритроцитов. В небольшом количестве могут присутствовать также микросфероциты .

Средиземноморский вариант Г-6-ФД (см. «Недостаточность Г-6-ФД в эритроцитах: генетическая гетерогенность») менее стабилен и гораздо менее активен, чем вариант А-. Поэтому у больных со средиземноморским вариантом Г-6-ФД заболевание протекает тяжелее.

В некоторых случаях хроническая гемолитическая анемия наблюдается даже в отсутствие контакта с окислителями.

При наличии аномальной молекулы Г-6-ФД в эритроцитах снижаются связывание кислорода, скорость восстановления метгемоглобина и устойчивость к воздействию различных потенциальных окислителей. При аномальном варианте Г-6-ФД нарушается основная функция фермента - поддержание стабильности мембран эритроцитов.

Усиленный гемолиз эритроцитов происходит под влиянием приема ряда лекарственных препаратов и химических веществ (сульфаниламидов, фенацетина, примихина, хинина, аспирина, салицилатов, витамина К), а также некоторых веществ растительного происхождения, в частности, при вдыхании пыльцы или употребления в пищу незрелых конских бобов *Vicia fava*, в связи с чем данное заболевание называют также фавизмом. В конских бобах содержатся два бета-гликозида, агликоны которых являются сильными восстановителями. При самоокислении этих агликонов образуются свободные радикалы кислорода. Различия в чувствительности к конским бобам, вероятно, обусловлены различиями в содержании, всасывании и метаболизме агликонов. У обладателей варианта А- фавизм не встречается.

Роль разрешающего фактора может играть также бактериальная или вирусная инфекции.

Заболевание проявляется в нескольких вариантах, что по-видимому, обусловлено тем, что фермент G6PD отличается большим наследственным полиморфизмом. Варианты фермента отличаются:

- а) степенью активности фермента;
  - б) электрофоретической подвижностью;
  - в) Константой Михаэлиса фермента для трифосфатпиридиндинуклеотида и глюкозо-6-фосфата и его относительной активностью по отношению к 2-диоксиглюкозо-6 фосфату.
- ВОЗ (1968) предлагает классифицировать дефект G6PD по указанным вариантам.

Выделяют электрофоретический тип В, отличающийся меньшей подвижностью. Если при этом отмечается дефект G6PD, то его обозначают - В(-). Фермент G6PD у африканцев с фавизмом проявляет повышенную электрофоретическую подвижность в различных щелочных буферах и обозначается символом А(-). Существует довольно большая группа (около 10%) американских негров, обладающих ферментом с высокой электрофоретической активностью, но не дефектных в отношении активности. Эта группа обозначается А(+) или просто А.

Недостаточность Г-6-ФД следует заподозрить в каждом случае острого гемолиза, особенно у негров и выходцев из средиземноморских стран. Больного необходимо подробно расспросить, какую пищу он ел, какие препараты принимал, с какими химическими веществами контактировал. Диагноз подтверждают лабораторными методами. Отрицательный результат, полученный во время гемолитического криза, не исключает недостаточности Г-6-ФД, поскольку в это время в крови много молодых эритроцитов,



а недостаточность Г-6-ФД возникает преимущественно в старших. В подобных случаях необходимо повторное исследование во время ремиссии.

У больных с вариантом А- гемолиз обычно проходит самостоятельно, поэтому специального лечения им не требуется.

Больные мужчины (гемизиготы) наследуют мутантный ген от матери, которая обычно гетерозиготна и является носителем. По причине инактивации одной из двух Х-хромосом гетерозиготы имеют два вида эритроцитов: нормальные и с недостаточностью Г-6-ФД. У большинства носительниц нет симптомов заболевания. У тех из них, у кого преобладают эритроциты с недостаточностью Г-6-ФД, возникают симптомы, сходные с таковыми у мужчин.

В норме к концу жизни эритроцита (за 120 сут) активность Г-6-ФД в нем снижается примерно наполовину. Этот процесс умеренно ускорен в эритроцитах, содержащих вариант А-, и резко ускорен в эритроцитах, содержащих средиземноморский вариант Г-6-ФД. У обладателей варианта А- в нормальных условиях срок жизни эритроцитов слегка сокращен, но анемии нет. Она развивается только под действием провоцирующих факторов, обычно вирусных и бактериальных инфекций; механизм этого явления неизвестен.

Клиническая картина характеризуется желтухой, ознобом, лихорадкой, головной болью и рвотой, возникающими после попадания в организм повреждающего агента. В крови больного в момент приступа выявляются: нормохромная анемия, ретикулоцитоз, увеличение концентрации непрямого билирубина, лейкоцитоз. Симптомы заболевания могут появиться в любом возрасте, в том числе в первые дни жизни, и имитировать гемолитическую болезнь новорожденных. В ряде случаев, при массивном гемолизе и увеличении частоты кризов возникают осложнения, связанные с патологическим воздействием продуктов распада эритроцитов на клетки печени, селезенки, а также почечные каналы. Осложнения, как правило, возникают через 4–5 дней после приема препаратов или пищевых продуктов. Длительность гемолитического криза не превышает 7–12 дней. Исчезновение симптомов происходит после замены гемолизированной популяции эритроцитов вновь образованной. Выделяют несколько клинических вариантов болезни, для которых характерен различный уровень активности фермента в крови гемизиготных носителей и варьирующая тяжесть клинических проявлений. Показано, что наиболее выраженное снижение активности фермента возникает при мутациях, локализованных в 8- или 10-ом экзонах гена. Эти варианты дефицита Г6ФД характеризуются тяжелыми гемолитическими кризами, провоцируемыми широким кругом лекарственных препаратов и пищевых продуктов. В ряде случаев, например при варианте Фрейбург, гемолиз эритроцитов возникает с рождения и происходит практически постоянно, независимо от приема лекарственных препаратов. Диагностика заболевания включает физикальное обследование, определение активности фермента в гемолизате, его электрофоретической подвижности и термостабильности, степени образования восстановленной формы NADP (NADPH). Для подтверждения диагноза проводят ДНК-анализ, направленный на обнаружение мутации в гене Г6ФД. Профилактика возникновения гемолитических кризов заключается в полном отказе от приема лекарственных препаратов и пищевых продуктов, обладающих гемолитическим действием. Лицам

с низким уровнем активности Г6ФД противопоказаны прививки и донорство (<http://medicalplanet.su/genetica/211.html> Medical Planet).

### Литература

1. Ahluwalia A., Corcoran C.M., Vulliamy T.J., Ishwad C.S., Naidu J.M., Argusti A., Stevens D.J., Mason P.J., Luzzatto L. G6PD Kalyan and G6PD Kerala; two deficient variants in India caused by the same 317 Glu-Lys mutation. - *Hum.Mol.Genet.*, 1992, v. 1, p. 209-210.
2. Alfinito F., Cimmino A., Ferraro F., Cubellis M.V., Vitagliano L., Francese M., Zagari A., Rotoli B., Filosa S., Martini G. Molecular characterization of G6PD deficiency in Southern Italy: heterogeneity, correlation genotype-phenotype and description of a new variant (G6PD Neapolis). - *Br.J.Haematol.*, 1997, v. 98, p. 41-46.
3. Beutler E., Vulliamy T., Luzzatto L. Hematologically important mutations: glucose-6-phosphate dehydrogenase. - *Blood Cell Mol.Dis.*, - 1996, v. 22, p. 49-56.
4. Boyer S.H., Porter I.H., Weilbacher R.G. Electrophoretic heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and its relationship to enzyme deficiency in man. - *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 1967, v. 48, p. 1868-1876.
5. Calabro V., Giacobbe A., Vallone D., Montanaro V., Cascone A., Filosa S., Battistuzzi G. Genetic heterogeneity at the glucose-6-phosphate dehydrogenase locus in southern Italy: a study on a population from the Matera district. - *Hum.Genet.*, 1990, v. 86, p. 49-53.
6. Cohen P., Rosemyer M.A. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: purification of the erythrocyte enzyme and the influence of ions on its activity. - *Eur.J.Biochem.*, 1969, v. 8, p. 1-7.
7. Iwai K., Hirono A., Matsuoka H., Kawamoto F., Horie T., Lin K., Tantular I.s., Dachlan V.P., Notopuro H., Hidayach N.I. Distribution of glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations in Southern Asia. - *Hum.Genet.*, 2001, v. 108, p. 445-450.
8. Luzzatto L., Battistuzzi G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. - *Adv.Hum.Genet.*, 1985, v. 14, p. 217-329.
9. Luzzatto L., Mehta A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. - *The Metabolic Bases of Inherited Diseases*, 1995, p. 3367-3398. McGraw-Hill, London.
10. Mason P.J. New insights into G6PD deficiency. - *Br.J.Haematol.*, 1996, v. 94, p. 585-591.
11. Menounos P., Zervas C., Garinis G., Doukas C., Kolakithopoulos D., Tegas C., Patrinos G.P. Molecular heterogeneity of the glucose-6 phosphate dehydrogenase deficiency in the Hellenic population. - *Hum.Hered.*, 2000, v. 50, p. 237-241.
12. Persico M.G., Viglietto G., Martini G., Toniolo D., Paonessa G., Moscatelli C., Dono R., Vulliamy T., Luzzatto L., D'Urso M. Isolation of human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) cDNA clones: primary structure of the protein and unusual 5' noncoding region. - *Nucleic Acid Res.*, 1986, v. 14, p. 2511-2522.
13. Usanga E.A., Ameen R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Kuwait, Egypt, Iran, Jordan and Lebanon. - *Hum.Hered.*, 2000, v. 50, p. 158-161.
14. Vulliamy T., Mason P., Luzzatto L. The molecular basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. - *Trends in Genetics*, 1992, v. 8, p. 138-143.

### Недостаточность пируваткиназы

Пируваткиназа - один из основных ферментов гликолитического пути. Пируваткиназа катализирует превращение фосфоэнолпирувата в пируват и, таким образом,

участвует в гликолитической реакции образования АТФ. Заболевание наследуется по аутосомно-рецессивному типу.

I. Гематологические показатели.

В общем анализе крови обнаруживают признаки гемолитической несфероцитарной анемии:

- Hb - 60-120 г/л;
- Ht - 17-37%;
- нормохромия эритроцитов;
- нормоцитоз (у детей до года и при высоком ретикулоцитозе возможен макроцитоз) эритроцитов;
- ретикулоциты 2,5-15%, после спленэктомии - до 70%.

Морфологические признаки:

- полихромазия эритроцитов;
- анизоцитоз ;
- пойкилоцитоз ;
- возможно наличие нормобластов.

Осмотическая резистентность эритроцитов до инкубации не изменена, после инкубации снижена, корригируется добавлением АТФ.

Аутогемолиз значительно повышен, корригируется добавлением АТФ, но не глюкозы.

Активность пируваткиназы эритроцитов снижена до 5-20% нормальной, содержание 2,3-дифосфоглицерата и других промежуточных метаболитов гликолиза повышено в 2-3 раза; за счет повышения содержания 2,3- дифосфоглицерата кривая диссоциации кислорода сдвинута вправо (снижено сродство Hb к кислороду).

Скрининговый тест базируется на флюоресценции НАДН в ультрафиолетовом свете: к тестируемой крови добавляют фосфоэнлапируват, НАДН и лактатдегидрогеназу, наносят на фильтровальную бумагу и исследуют в ультрафиолетовом свете. При дефиците пируваткиназы пирувата не образуется, и НАДН не используется, вследствие этого флюоресценция сохраняется в течение 45-60 мин. В норме флюоресценция исчезает через 15 мин.

Тяжесть состояния варьирует, может отмечаться анемия тяжелой степени, не индуцированная приемом лекарственных средств. Желтуха обычно развивается с рождения. Почти всегда присутствует спленомегалия. С возрастом развиваются желчнокаменная болезнь, вторичная перегрузка железом и изменение костей скелета (вследствие частых трансфузий эритроцитарной массы). Апластические кризы провоцируются парвовирусной В19 инфекцией.

Для лечения используют фолиевую кислоту по 0,001 г/сут ежедневно.

Заместительная терапия эритроцитарной массой проводится для поддержания Hb более 70 г/л.

Спленэктомия - только при повышении потребности в трансфузиях эритроцитарной массы свыше 200-220 мл/кг в год (при Ht эритроцитарной массы 75%), спленомегалии, сопровождающейся болями в левом подреберье и/или угрозой разрыва селезенки, а также при явлениях гиперспленизма. Перед проведением оперативного лечения необходимо вакцинировать пациента против менингококковой, пневмококковой и гемофильной инфекции типа В.

Нежелательно использовать салицилаты, так как в условиях дефицита пируваткиназы салицилаты провоцируют нарушение окислительного фосфорилирования в митохондриях.

### 21.3. Гемоглинопатии

**Гемоглинопатия** – наследственное или врожденное изменение или нарушение структуры белка гемоглибина, обычно приводящее к клинически или лабораторно наблюдаемым изменениям в его кислород-транспортирующей функции либо в строении и функции эритроцитов.

К наиболее часто встречающимся и известным гемоглинопатиям относятся серповидно-клеточная анемия, бета-талассемия, персистенция фетального гемоглибина.

Гемоглинопатии классифицируются на качественные и количественные. Качественные обусловлены заменой аминокислот в полипептидных цепях. Замена аминокислоты глутамина 6 на валин в  $\beta$ -цепи приводит к образованию аномального гемоглибина S, что лежит в основе развития серповидно-клеточной анемии. Аномальных гемоглибинов более 300, но не все аномалии проявляются. Первые аномальные гемоглибины назывались буквами латинского алфавита (M, C, D, S и др.). Но, так как аномальных гемоглибинов много, их названия включают места открытия (Boston, Москва, Волга и др.) или названия госпиталей.

Количественные гемоглинопатии связаны со скоростью синтеза  $\alpha$ - или  $\beta$ -полипептидных цепей глобина. Угнетение скорости синтеза  $\alpha$ -цепи приводит к развитию  $\alpha$ -талассемии, угнетение синтеза  $\beta$ -цепи лежит в основе заболевания  $\beta$ -талассемии. Диагностика гемоглинопатий основывается, кроме клинических данных, на обязательном специальном исследовании электрофореза гемоглибина. Это исследование проводится не только для больного, но и для ближайших родственников. Данные электрофореза гемоглибина позволяют поставить диагноз талассемии. Для альфа-талассемии характерно обнаружение гемоглибинов-гомотетрамеров Hb-H и Hb-Bart. Для бета-талассемии характерно повышенное содержание гемоглибина A2. Это группа заболеваний, общим признаком которых является с одной стороны гемолиз эритроцитов, а с другой - реактивно усиленный эритропоэз. При исследовании мазка крови больного обнаруживаются эритроциты аномальной структуры (в том числе сфероцитарные, мишеневидные, серповидные и другие). Увеличение количества продуктов распада эритроцитов проявляется желтушным окрашиванием кожи и слизистых и повышением концентрации в крови непрямого билирубина и железа. В этой группе можно выделить две подгруппы - гемоглинопатии, обусловленные изменением структуры гемоглибина, и мембранопатии, связанные с аномалией белковых и липидных компонентов эритроцитарной мембраны.

Гемоглинопатии - группа наследственных заболеваний, этиологическим фактором которых являются мутации в генах, кодирующих полипептидные цепи глобиновых белков. При различных вариантах гемоглинопатии гемоглибин либо приобретает неправильную форму, либо в его составе меняется соотношение глобиновых цепей. Известно, что глобин - это белок, содержащий четыре полипептидные цепи. Гемоглибин человека гетерогенен, что связано с различием его полипептидных цепей, В норме у

взрослого человека 95%–98% всего гемоглобина составляет HbA, в состав которого входят две  $\alpha$  и две  $\beta$  цепи. Таким образом, его формула записывается как HbA ( $\alpha_2; \beta_2$ ). От 2% до 2,5% приходится на долю Hb A2, имеющего формулу ( $\alpha_2; \delta_2$ ) и лишь 0,1–2% гемоглобинов у взрослого человека составляет фетальный HbF( $\alpha_2; \gamma_2$ ). В период эмбриогенеза соотношение гемоглобинов бывает совершенно другим и, кроме того, присутствуют такие его формы, которые никогда не встречаются в постнатальном периоде. Например, у плода до 18-недельного возраста имеется Hb Gower 2 ( $\alpha_2; \epsilon_2$ ), в состав которого входит отсутствующая у взрослых  $\epsilon$ -полипептидная цепь. С 20-ой недели внутриутробной жизни плода происходит постепенная замена этого типа гемоглобина на HbF ( $\alpha_2; \gamma_2$ ), который доминирует у плода и новорожденных детей. Замена фетального гемоглобина на гемоглобин A происходит в течение первого года жизни ребенка. Существует множество генетических механизмов возникновения заболеваний этой группы, обусловленных особенностями расположения генов глобиновых белков и сложным контролем их транскрипции. Для  $\alpha$ -цепи имеется два дублированных гена, расположенных на хромосоме 16p13.3-pter. Гены глобиновой цепи образуют на хромосоме 11p15.4-15.5 кластер. Последовательность генов соответствует этапам их экспрессии от периода эмбриогенеза до взрослого возраста – первым располагается ген  $\epsilon$ -цепи, затем два гена  $\gamma$ -цепей ( $\gamma$ -G и  $\gamma$ -A). Продукты этих генов вместе с  $\alpha$ -глобиновой цепью формируют различные типы гемоглобинов. Очередность такой экспрессии, по-видимому, регулируется генами контролирующими регионов, расположенных в промоторной области на некотором расстоянии от 5'-конца этого кластера. При наличии мутаций, обуславливающих снижение или полное прекращение экспрессии той или иной глобиновой цепи, возникает повышенная экспрессия других генов кластера. В результате образуются гемоглобины, не свойственные этому возрастному периоду.

Заболевания, при которых количество  $\alpha$ -или  $\beta$ -глобинов уменьшено или они полностью отсутствуют и заменены в молекуле гемоглобина другими цепями, называют средиземноморскими лихорадками, или талассемиями (от греческого слова «таласса», которым в древности называли Средиземное море). В зависимости от нарушения синтеза  $\alpha$ - или  $\beta$ -глобиновых цепей выделяют  $\alpha$ - или  $\beta$ -талассемии. Эти заболевания составляют значительную часть в структуре гемоглобинопатии и представлены множеством аллельных вариантов, возникающих в результате точковых мутаций в генах глобиновых цепей. К настоящему времени описано более 300 таких мутаций, большинство из них очень редки. Наиболее выраженные клинические проявления обусловлены мутациями, затрагивающими функционально значимые участки белковой молекулы (т.е. теми мутациями, которые нарушают формирование вторичной и третичной структуры глобина или аминокислотную последовательность в местах прикрепления гема или контактах цепей друг с другом. К наиболее распространенным аллельным вариантам гемоглобинопатии, помимо талассемий можно отнести серповидноклеточную анемию, метгемоглобинемии и эритроцитоз.

#### **Альфа-талассемия: общие сведения**

Альфа талассемия ( MIM 141800 ) может проявляться в гомозиготной и гетерозиготной формах. Гетерозиготная форма характеризуется гипохромной анемией, микро-

цитозом с наличием в пуповинной крови гемоглобина Барта. Гомозиготная форма ведет к развитию водянки плода и к его гибели до рождения.

Альфа-талассемия - гемолитическая анемия, вызванная дефицитом синтеза альфа-глобина в результате потери или повреждения одного или нескольких альфа-глобиновых генов. Снижение синтеза альфа-глобиновых цепей приводит к накоплению свободных гамма-глобиновых цепей и бета-глобиновых цепей и формированию из них тетрамеров-гамма4 (Hb Bart's) и нестабильного бета4 (Hb H) с последующим ускорением разрушения эритроцитов. Обладая очень высоким сродством к кислороду, эти тетрамеры не могут выполнять функцию переноса кислорода. Клиническая картина тяжелой альфа-талассемии характеризуется комбинацией гипохромной анемии, гемолиза и дефектного транспорта кислорода вследствие различных количеств физиологически неэффективного Hb в эритроцитах. В результате степень тканевой гипоксии значительно превышает ожидаемую при соответствующей степени анемии.

Выделяют 4 группы клинических синдромов альфа-талассемии:

- немое носительство;
- альфа-талассемию с минимальными изменениями;
- гемоглобинопатию H;
- альфа-талассемическую водянку плода.

Тяжесть фенотипического проявления альфа-талассемии прямо пропорциональна снижению альфа-глобинового синтеза.

### Малая альфа-талассемия

Малая альфа-талассемия - состояние, вызванное делецией или инактивацией двух генов альфа-цепей глобина табл. 21.1 (табл. 107.4).

**Таблица 21.1 (Табл. 107.4, Harrison). Альфа-талассемии**

Состояние	HbA, %	HbH (b <sub>4</sub> ), %	Концентрация гемоглобина, г/л	СЭО, мкм <sup>3</sup>
Норма	97	0	150	90
Носительство: -a/aa	98-100	0	150	90
Малая а-талассемия: гомозиготная а-талассемия-2 <sup>a</sup> (-a/-a) или гетерозиготная а-талассемия-1/a (- - /aa)	85-95	Незначительн <sup>б</sup>	120-130	70-80
Гемоглобинопатия H: гетерозиготная а-талассемия-1/a-талассемия-2 (- - /-a)	70-95	5-30	60-100	60-70
Водянка плода: гомозиготная а-талассемия-1 (- - /- -)	0	5-10 <sup>в</sup>	г	.

СЭО – средний эритроцитарный объем; Hb – гемоглобин.

<sup>a</sup> Отсутствие на хромосоме обоих аллелей a обозначается как а-талассемия-1, а одного аллеля a – как а-талассемия-2.

<sup>б</sup> Иногда можно обнаружить только в виде включений в эритроциты.

<sup>в</sup> Остальные 90–95% приходятся на гемоглобин Bart (g<sub>4</sub>).

<sup>г</sup> Ребенок рождается мертвым или погибает вскоре после рождения.

Два гена альфа-цепей глобина обеспечивают практически нормальный эритропоэз. Характерна легкая микроцитарная гипохромная анемия. Концентрация гемоглобина в крови на 10-20 г/л ниже нормы, средний эритроцитарный объем - 70-80 мкм<sup>3</sup>.

Среди уроженцев Африки делеция одного из генов альфа-цепей глобина необычайно распространена (около 30%), поэтому их дети с большой вероятностью унаследуют две хромосомы с делецией. Это состояние часто принимают за железодефицитную анемию и пытаются лечить препаратами железа, которые в данном случае не показаны.

#### **Альфа-талассемия: диагностика**

Большую альфа-талассемию (инактивация трех или четырех генов альфа-цепей глобина) легко диагностировать по присутствию гемоглобина Bart у грудных детей и гемоглобина H у взрослых. Оба эти гемоглобина обладают высокой электрофоретической подвижностью.

После окраски бриллиантовым крезильным синим, обладающим свойствами окислителя, в эритроцитах появляются типичные включения.

Более легкие формы заболевания таким путем выявить трудно из-за низкого содержания измененных гемоглобинов.

Наиболее достоверный диагностический метод – определение скоростей синтеза альфа- и бета-цепей глобина в ретикулоцитах, выделенных из крови больного. К сожалению, этот метод малодоступен.

Так как обычно причиной альфа-талассемий являются делеции, то для их выявления применяют анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов ДНК. Однако этим методом трудно отличить генотип «-/-альфаальфа» от нормального.

#### **Альфа-талассемия: лечение**

Водянка плода сегодня неизлечима. Установив генотип родителей, можно определить риск рождения больного ребенка. Полное отсутствие альфа-цепей глобина у ребенка возможно только тогда, когда у обоих родителей есть хромосома с делецией двух локусов «-/-альфаальфа» или «-/-альфа». С целью пренатальной диагностики исследуют ДНК из ворсин хориона или амниоцитов.

При гемоглобинопатии H иногда помогает спленэктомия - обычно при тяжелой анемии или значительной спленомегалии.

При делеции одного или двух генов альфа-цепей глобина лечения не требуется.

**Альфа-талассемия** (ОМIM: 141850). Группа заболеваний, обусловленных мутациями в генах  $\alpha$ -глобиновых цепей. Наиболее часто возникают крупные делеции, захватывающие 1,2,3 или 4 копии генов. Как указано выше, имеется четыре копии гена  $\alpha$ -цепей (по две для  $\alpha_1$  и  $\alpha_2$  цепей). Клинические проявления  $\alpha$ -талассемии варьируют в зависимости от протяженности делеции. При наличии делеции, захватывающей одну копию генов, клинические проявления, как правило, не возникают, делеция двух копий приводит к возникновению микроцитоза, трех - обуславливает типичную клиническую картину заболевания в виде хронической гемолитической анемии и сопровождается образованием новых типов гемоглобинов, например HbH, состоящего из четырех цепей (Hb  $\beta_4$ ). Протяженная делеция, захватывающая 4 копии  $\alpha$ -глобиновых генов, приводит к полному отсутствию  $\alpha$ -цепей и образованию несовместимого с жизнью гемоглоби-

на, состоящего из четырех  $\gamma$ -цепей (Hb  $\gamma_4$ ). В ряде случаев, при наличии мутаций, затрагивающих район  $\alpha$ -цепей, важный для осуществления их контактов с бета-цепями, возникает тетрамер из двух  $\gamma$ - и двух  $\alpha$ -цепей. Типичные клинические проявления  $\alpha$ -талассемии у гетерозигот по мутации в цепях характеризуются хронической гемолитической анемией средней тяжести. Гемолиз эритроцитов возникает в результате перегрузки клеток эритроидного ростка и внутренних органов железом, что приводит к неэффективному эритропоэзу и оказывает повреждающее действие на мембрану эритроцитов. Анемия часто обостряется при возникновении интеркуррентных инфекций и приеме некоторых лекарственных препаратов, например, сульфаниламидов. У 80% больных возникает спленомегалия, а у 30% деформации скелета.

### **Ген альфа глобина (HBA1, кластер глобиновых генов)**

Gene: [16p133/HBA1] hemoglobin, alpha 1;

Альфа-глобиновый кластер состоит из четырех глобиновых генов и равен 30-ти тысячи пар оснований. Первым по ходу транскрипции локализуется эмбриональный зета-глобиновый ген, следом за ним расположен альфа-подобный нефункционирующий псевдоген и дублицированный ген альфа-глобина.

Нуклеотидная последовательность кластера генов человека определена авторами:

альфа-глобина ( Wilson J.T.,1977, Wilson J.T.,1980, Michelson A.M.,1980);

альфа псевдогена ( Proudfoot N.J.,1980, Hardison R.C.,1986);

зета-глобина ( Cohen-Solal M.M.,1982, Proudfoot N.J.,1982, Hsu S.L.,1988).

Во всех четырех генах альфа-глобинового кластера выявлены 2 интрона. Первый интрон (95 пар оснований) локализуется между 30 и 31 кодонами, второй интрон (120-128 пар оснований) расположен между 99 и 100 кодонами.

Ген альфа глобина (HBA1) локализован на 16 хромосоме человека в локусе 13.3-pter ( Buckle V.J.,1988 ; Breuning M.H.,1987 ).

### **Ген альфа-глобина (HBA1): мутации гена**

Значительное число случаев альфа-талассемии обусловлено делециями в системе альфа-глобиновых генов. Делеции могут захватывать оба альфа-глобиновых гена или же один из них. Описаны случаи значительной утраты генетического материала размером более 25-30 кб. В 1990 г Hatton C.S.R выявил активирующую область альфа локуса (LAR), названную им locus control region alpha (LCRA), расположенную перед альфа глобиновым кластером. Hatton C.S.R выявил делеции более 62 кб. при альфа-талассемии в описанной области.

Однонуклеотидные замены в гене альфа глобина обуславливают гемоглобинопатии. В настоящее время в гене альфа глобина человека выявлено более двухсот аллельных вариантов. Первая мутация на генном уровне была выявлена в 1987 году Moï P.

Идентифицированные мутации в гене альфа глобина человека представлены в таблице Hb A m (Таблица Hb A m ), выявлено 141 миссенс-мутация, сплайсинговая мутация, единичные мелкие и крупные делеции и инсерции.



**Литература**

1. Wilson J.T., deRiel J.K., Forget B.G., Marrota C.A., Weissmann S.M. Nucleotide sequence of 3' untranslated portion of human alpha globin mRNA. - *Nucleic Acid Res.*, 1977, v. 4, p. 1353-2368.
2. Wilson J.T., Wilson L.B., Reddy V.B., Cavallero C., Ghosh P.K., Deriel J.K., Forget B.G., Weissman S.M. Nucleotide sequence of the coding portion of human alpha globin messenger RNA. - *J.Biol.Chem.*, 1980, v. 255, p. 2807-2815.
3. Michelson A.M., Orkin S.H. The 3' untranslated regions of the duplicated human alpha-globin genes are unexpectedly divergent. - *Cell*, 1980, v. 22, p. 371-377.
4. Proudfoot N.J., Maniatis T. The structure of the human alpha-globin pseudogene and its relationship to alpha-globin duplication. - *Cell*, 1980, v. 21, p. 537-544.
5. Hardison R.C., Sawada I., Cheng J.F., Shen C.K., Schmid C.W. A previously undetected pseudogene in the human alpha globin gene cluster. - *Nucleic Acid Res.*, 1986, v. 14, p. 1903-1911.
6. Cohen-Solal M.M., Authier B., deRiel J.K., Murnane M.J., Forget B.G. Cloning and nucleotide sequence analysis of human embryonic zeta-globin cDNA. - *DNA*, 1982, v. 1, p. 355-363.
7. Proudfoot N.J., Gil A., Maniatis T. The structure of the human zeta-globin gene and a closely linked, nearly identical pseudogene. - *Cell*, 1982, v. 31, p. 553-563.
8. Hsu S.L., Marks J., Shaw J.P., Tam M., Higgs D.R., Shen C.C., Shen C.K. Structure and expression of the human theta 1 globin gene. - *Nature*, 1988, v. 331, p. 94-96.
9. Buckle V.J., Higgs D.R., Wilkie A.O.M., Super M., Weatherall D.J. Localization of human alpha globin to 16p13.3-pter. - *J.Med.Genet.*, 1988, v. 25, p. 847-849.
10. Breuning M.H., Madan K., Vejaal M., Wijnen J.T., Meera Khan P., Pearson P.L. Human alpha-globin mapsto pter-p13.3 in chromosome 16 distal to PGP. - *Hum.Genet.*, 1987, v. 76, p. 287-289.
11. Hatton C.S.R., Wikie A.O.M., Drysdale H.C., Wood W.G., Vickers M.A., Sharpe J., Ayyub H., Pretorius I.M., Buckle V.J., Higgs D.R. Alpha-Thalassemia caused by a large (62 kb) deletion upstream of the human alpha-globin gene cluster. - *Blood*, 1990, v. 76, p. 221- 227.

**Ген бета-глобина**

Gene: [11p155/HBB] hemoglobin, beta;

GenBank: g455025

Ген бета-глобина человека локализуется на 11 хромосоме в позиции p15.5.

Кластер бета-глобиновых генов занимает участок ДНК в 65 тысяч пар нуклеотидов (Fritsch E.F.,1980). Пять бета-глобиновых генов расположены по ходу транскрипции в последовательности, в которой данные гены экспрессируются по мере развития организма. Вначале локализуется эмбриональный - эпсилон-глобиновый ген, следом за ним через 13,3 тысяч пар нуклеотидов расположены два фетальных гамма-глобиновых гена (гамма-G и гамма-A) на расстоянии 3,5 тысяч пар нуклеотидов друг от друга. Вышележащие гены отделены от генов взрослых (дельта и бета) 13,9 тысячами пар нуклеотидов. Дельта-глобиновый и бета-глобиновый гены отделены друг от друга 5,4 тысячами пар нуклеотидов.

В этом кластере выявлены еще 2 псевдогена, функционально неактивных. Один псевдоген локализуется перед 5' концом эпсилон-глобинового гена - на расстоянии 6-9 тысяч пар нуклеотидов, второй псевдоген - в промежутке между гамма-A-глобиновым геном и дельта-глобиновым геном.

В 1974-1985 годах были проведены работы по определению нуклеотидных последовательностей:

- 1) бета-глобинового гена ( Forget B.G.,1975 )

- 2) эпсилон-глобинового гена ( Proudfoot N.J., 1979 )
- 3) гамма-глобиновых генов ( Slightom J.L., 1980 )
- 4) дельта-глобинового гена ( Lawn R.M., 1978 )
- 5) псевдогенов ( Shen S.H., 1981 )

Все бета-глобиновые гены построены по одному образцу - имеют 3 экзона и 2 интрона. Малый интрон (120-130 пар нуклеотидов) локализуется между 30 и 31 кодонами, большой интрон (800-900 пар нуклеотидов) локализуется между 104 и 105 кодонами. Локализация интронов в строго определенных местах характерна для всей группы бета-глобиновых генов (Lawn R.M., 1978). Кодирующая часть бета-глобиновых генов достигает 438 пар нуклеотидов; общая длина гена, включая кодирующую и некодирующую области - 1600 пар нуклеотидов.

**Бета-талассемия** (ОМIM: 141900). Группа заболеваний, обусловленных мутациями в генах глобиновых цепей. В зависимости от типа мутации и наличия или отсутствия  $\beta$ -глобиновых цепей выделяют несколько клинико-генетических вариантов  $\beta$ -талассемий. Первый вариант обозначается как  $\beta^0$ -талассемия. Он возникает вследствие нонсенс-мутаций и сплайсинговых мутаций, а также мутаций, приводящих к сдвигу рамки считывания. Вторым вариантом -  $\beta'$  талассемия. Его причиной служат мутации в промоторной области гена, в 5'- и 3'-нетранслируемых регионах, ТАТА-, СААТ- и САССС-боксах. В результате таких мутаций происходит уменьшение или прекращение синтеза глобиновых цепей и замена их в молекуле гемоглобина. Один из редких вариантов бета-талассемии связан с персистенцией фетального гемоглобина, при котором не происходит его замена на гемоглобин взрослого. Известно несколько типов персистирующего фетального гемоглобина: 1) гемоглобин представлен двумя  $\gamma$ -цепями (G и A), при этом  $\delta$ - и  $\beta$ -цепи отсутствуют; 2) гемоглобин в основном представлен  $\gamma$ -G- и  $\delta$ -цепями, при этом ген  $\beta$ -цепи функционально активен; 3) гемоглобин представлен  $\gamma$ G- и  $\gamma$ A-цепями, а бета-цепи отсутствуют. Показано, также, что возникновение симптомов талассемии (так называемых  $\gamma$ - $\delta$ -,  $\beta$ -талассемий) может быть обусловлено делецией в регуляторном элементе глобиновых генов. Предполагается, что этот регион, обозначаемый аббревиатурой LCR, находится на расстоянии 100 т.п.н. от кластера глобиновых генов и контролирует его экспрессию в ходе развития. Клинические симптомы бета-талассемий разнообразны и зависят от типа мутаций в гене  $\beta$ -глобиновых цепей. Большая талассемия (анемия Кули), как правило, проявляется в возрасте 2-6 лет. У больных отмечается задержка роста, гепатоспленомегалия, дизморфические черты строения черепа и лица – результат остеопороза во внутриутробном периоде. Гемолиз проявляется желтушной окраской кожи и слизистых оболочек, приступами лихорадки. Анализ крови демонстрирует тяжелую гипохромную анемию, снижение содержания гемоглобина, уменьшение количества эритроцитов и изменение их морфологии (мишеневидные эритроциты, пойкилоцитоз, анизоцитоз, шизоцитоз, фрагментация и нормобластоз. Часто при большой талассемии возникают осложнения в виде трофических язв, цирроза печени, мочекишечного диатеза и гемосидероза. Для определения генетического варианта  $\alpha$ - и  $\beta$ -талассемий и выявления гетерозиготного носительства проводят молекулярно-генетический анализ мутаций в гене  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобиновых цепей. Возможна дородовая диагностика талассемии на раннем сроке беременности на основании анализа ДНК, выделенной из клеток плода.

## Литература

1. Fritsch E.F., Lawn R.M., Maniatis T. Molecular cloning and characterization of the human B-like globin gene cluster. - *Cell*, 1980, v. 19, p. 959-972.
2. Forget B.G., Marotta C.A., Weissman S.M., Cohen-Solal M. Nucleotide sequences of the 3'-terminal untranslated region of messenger RNA for human beta globin chain. - *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 1975, v. 72, p. 3614-3618.
3. Marrota C.A., Forget B.G., Weissman S.M., Verma I.M., McCaffney R.P., Baltimore D. Nucleotide sequence of human globin messenger RNA. - *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 1974, v. 71, p. 2300-2304.
4. Marotta C.A., Forget B.G., Cohen-Solal M., Wilson J.T., Weissman S.M. Human beta-globin messenger RNA. Nucleotide sequence derived from complementary RNA. - *J.Biol.Chem.*, 1977, v. 252, p. 5019-5031.
5. Lawn R.M., Fritsch E.f., Parker R.C., Blake G., Maniatis T. The isolation and characterization of linked delta- and beta-globin genes from a cloned library of human DNA. - *Cell*, 1987, v. 15, p. 1157-1174.
6. Lawn R.M., Efstratiadis A., O'Connell C., Maniatis T. The nucleotide sequence of the human beta-globin gene. - *Cell*, 1980, v. 21, p. 647-651.
7. Kaufman R.E., Kretschmer P.J., Adams J.W., Coon H.C., Anderson W.F., Nienhuis A.W. Cloning and characterization of DNA sequences surrounding the human gamma-, delta-, and beta-globin genes. - *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 1980, v. 77, p. 4229-4233.
8. Proudfoot N.P., Brownlee G.G. 3' non-coding region sequence in eukaryotic messenger RNA. - *Nature*, 1976, v. 263, p. 211-214.
9. Moschonas N., de Boer E., Grosveld F.G., Dahl H.H., Wright S., Shewmaker C.K., Flavell R.A. Structure and expression of a cloned beta o thalassemia globin gene. - *Nucleic Acid Res.*, 1981, v. 9, p. 4391-4401.
10. Carlson D.P., Ross J. Human beta-globin promoter and coding sequences transcribed by RNA polymerase III. - *Cell*, 1983, v. 34, p. 857-864.
11. Poncz M., Schwartz E., Ballantine M., Surrey S. Nucleotide sequence analysis of the delta beta-globin gene region in humans. - *J.Biol.Chem.*, 1983, v. 258, p. 11599-11609.
12. Hattori Y., Ohba Y., Suda T., Miura Y., Yoshinaka H., Miyaji T. Hemoglobin Guizhou in Japan. - *Hemoglobin*, 1985, v. 9, p. 187-189.
13. Grindlay G.J., Lanyon W.G., Allan M., Paul J. Alternative sites of transcription initiation upstream of the canonical cap site in human gamma-globin and beta-globin genes. - *Nucleic Acid Res.*, 1984, v. 12, p. 1811-1820.
14. Orkin S.H., Antonarakis S.E., Loukopoulos D. Abnormal processing of beta(Knossos) RNA. - *Blood*, 1984, v. 64, p. 311-313.
15. Fritsch E.F., Lawn R.M., Maniatis T. Molecular cloning and characterization of the human B-like globin gene cluster. - *Cell*, 1980, v. 19, p. 959-972.
16. Efstradiadis A., Poisakony J.W., Maniatis T., Lawn R.M., O'Connell C., Spritz R.A., DeRiel J.K., Forget B.G., Weissman S.M., Slighton J.L., Blechl A.E., Smithies O., Baralle F.E., Shoulders C.C., Proudfoot N.J. The structure and evolution of the human beta-globin gene family. - *Cell*, 1980, v. 21, p. 653-668.
17. Proudfoot N.J., Baralle F.E. Molecular cloning of human epsilon-globin gene. - *Proc.Natl. Acad.Sci.*, 1979, v. 76, p. 5435-5439.
18. Slighton J.L., Blechl A.e., Smithies O. Human fetal G gamma- and A gamma-globin genes: complete nucleotide sequence suggest that DNA can be exchanged between these duplicated genes. - *Cell*, 1980, v. 21, p. 627-638.
19. Shen S.H., Slighton J.L., Smithies O. A history of the human fetal globin gene duplication. - *Cell*, 1981, v. 26, p. 191-203.

**Серповидноклеточная Анемия.** Серповидноклеточная анемия (СА) - группа генетически гетерогенных заболеваний, возникающих у гомо- и гетерозигот по мутации в гене  $\beta$ -глобина, детерминирующей серповидную форму эритроцитов. Это заболевание было впервые описано в 1910 году. Наибольшее количество гетерозиготных носителей аномального гемоглобина (HbS) обнаружено в эндемичных по малярии регионах планеты – в Центральной Африке, Средиземноморье, Индии, странах Ближнего и Среднего Востока, что связано с устойчивостью обладателей такого генотипа к малярии. Около 8% афроамериканцев гетерозиготны по HbS. Причиной образования гемоглобина S является точковая мутация, в результате которой в 6-ом положении полипептидной цепи  $\beta$ -глобина аминокислота глутамин заменяется на валин. Эта замена приводит к пониженной растворимости гемоглобина и повышению его полимеризации, что в свою очередь обуславливает изменение формы эритроцитов на серповидную. Такие эритроциты становятся ригидными, теряют пластичность, закупоривают мелкие сосуды и гемолизуются. Закупорка сосудов часто приводит к образованию очагов ишемии, а при длительном течении заболевания – инфарктов во внутренних органах, костном мозге и головном мозге. Заболевание часто имеет приступообразное течение. Появление ишемических кризов часто провоцируется тканевой гипоксией, снижением рН крови, повышением температуры тела и замедлением кровотока. Обычно выделяют несколько фаз криза: ишемическую, длительностью до шести часов; инфарктную, длительностью до 3 суток; микроэмболическую, длительность которой варьирует у различных больных от недели до месяца. Типичными симптомами ишемической фазы являются сильные боли в позвоночнике, крупных суставах, костях. Если в начале этой фазы начать интенсивное лечение, то возникновение других фаз заболевания можно предотвратить. При отсутствии лечения или недостаточной терапевтической эффективности используемых препаратов возникает инфарктная фаза, во время которой боли усиливаются. Появляются лихорадка и симптомы вегето-сосудистой дистонии. Для микроэмболической фазы характерны симптомы закупорки кровеносных сосудов, клинические проявления варьируют в зависимости от локализации участка эмболии. В межприступный период у больных регистрируется умеренная нормохромная анемия. К наиболее грозным осложнениям заболевания можно отнести инсульты мозга, остеомиелит, переломы конечностей, калькулезный холецистит. Диагностика заболевания основывается на типичных клинических симптомах, выявлении серповидных эритроцитов в крови, а также обнаружении мутаций в гене  $\beta$ -цепи гемоглобина при проведении молекулярно-генетического анализа.

### Литература

1. Fritsch E.F., Lawn R.M., Maniatis T. Molecular cloning and characterization of the human B-like globin gene cluster. - Cell, 1980, v. 19, p. 959-972.
2. Forget B.G., Marotta C.A., Weissman S.M., Cohen-Solal M. Nucleotide sequences of the 3'-terminal untranslated region of messenger RNA for human beta globin chain. - Proc.Natl.Avad.Sci., 1975, v. 72, p. 3614-3618.
3. Proudfoot N.J., Baralle F.E. Molecular cloning of human epsilon-globin gene. - Proc.Natl. Acad.Sci., 1979, v. 76, p. 5435-5439.
4. Slightom J.L., Blechl A.e., Smithies O. Human fetal G gamma- and A gamma-globin genes:

complete nucleotide sequence suggest that DNA can be exchanged between these duplicated genes. - Cell, 1980, v. 21, p. 627-638.

5. Lawn R.M., Fritsch E.f., Parker R.C., Blake G., Maniatis T. The isolation and characterization of linked delta- and beta-globin genes from a cloned library of human DNA. - Cell, 1987, v. 15, p. 1157-1174.

6. Shen S.H., Slightom J.L., Smithies O. A history of the human fetal globin gene duplication. - Cell, 1981, v. 26, p. 191-203.

7. Э. Бьютлер. ГЕМОГЛОБИНОПАТИИ. From Harrison's Principles of Internal Medicine. 14-th edition. 2002

## 21.4. Эритроцитарные мембранопатии

### **Эритроцитоз; Элиптоцитоз; Сфероцитоз; Овалоцитоз: Генетика**

Эритроцитоз наследуется по доминантному типу.

Ген альфа спектрина (ген SPTA) локализуется на 1 хромосоме человека в позиции 1q21 (Middleton-Price H., 1988 ; Pakstis A.J., 1989 ; Rouleau G.A., 1990 ).

Ген бета спектрина (ген SPTB) локализуется на 14 хромосоме человека в позиции q22-q23.2. ( Forget B.G., 1988 ; Fukushima Y., 1990 ; Watkins P.C., 1987 ; Winkelmann J.C., 1987 ).

Ген анкирина (ANK1) локализуется на 8 хромосоме человека в позиции p11.2. (Tse W.T., 1990).

Ген белка мембраны эритроцитов полосы 4.1 (EPB41) локализуется на 1 хромосоме человека в позиции p36.2-p34.

### **Эритроцитоз. Строение генов спектрина (SPTA; SPTB)**

ген SPTA, ген SPTB

Первичная структура эритроцитарного спектрина была определена путем белкового секвенса отдельных пептидов альфа и бета субъединиц ( Speicher D.W., 1983a ; Speicher D.W., 1983b ; Speicher D.W., 1984 ). Данный секвенс выявил повторы из 106 аминокислот.

Впоследствии аминокислотные последовательности были эмпирически выведены из кДНК альфа и бета спектрина ( Curtis P.J., 1985 ; Linnenbach A.J., 1986 ; Cioe L., 1987 ; Winkelmann J.C., 1988 ; Sahr K.E., 1990 ).

В 1986 году Linnenbach клонировал неполноразмерную кДНК гена альфа спектрина человека ( Linnenbach A.J., 1986 ). В 1990 году Sahr проклонировал полноразмерную кДНК гена альфа спектрина человека ( Sahr K.E., 1990 ).

В 1991 году Kotula L. ( Kotula L., 1991 ) проклонировал ген альфа спектрина. Данный ген по протяженности из 80 килобаз состоит из 52 экзонов и 51 интрона. Размер экзонов варьирует от 18 до 684 пар оснований. Экзон-интронные сочленения гена альфа спектрина представлены в таблице ( Таблица SPTA int ).

В 1987 году Prchal клонировал неполноразмерную кДНК бета спектрина человека ( Prchal J.T., 1987 ). мРНК бета спектрина - 7,5-7,8 килобаз, кодирует полипептид из 2137 аминокислот с молекулярным весом 245 kD.

В 1988-1990 годах Winkelmann клонировал кДНК гена бета спектрина человека ( Winkelmann J.C., 1988 ; Winkelmann J.C., 1990 ).

### **Эритроцитоз. Мутации гена**

Спектр идентифицированных мутаций в генах альфа спектрина (SPTAI), бета спектрина (SPTB), анкирина (ANK) представлены в таблицах ( Таблица SPTA m ), ( Таблица SPTB m ) и ( Таблица ANK m ) соответственно , преобладают нуклеотидные замены, с-плайсинговые мутации, инсерция 3 или 1 нуклеотидов, делеции, мутации в промоторной области, нонсенс мутации .

### **Эритроцитоз. Биохимия**

Дефект в структуре сети плазматической мембраны эритроцитов, состоящей из спектрина и др. белков, является причиной ломкости красных кровяных клеток (эритроцитов) при наследственной гемолитической анемии, включая сфероцитоз, эллиптоцитоз и пиропойкилоцитоз ( Knowles W.J., 1983a ; Palek J., 1985 ). В случае эллиптоцитоза и полипойкилоцитоза у димеров спектрина снижена способность формировать тетрамеры. Этот дефект коррелирует с повышенной чувствительностью альфа субъединиц к протеолизу ( Knowles W.J. 1983b ; Lawler J., 1982 ).

### **Эритроцитоз. Фенотип - заболевание**

Эритроцитоз, эллиптоцитоз, сфероцитоз, овалоцитоз - группа наследственных заболеваний ( MIM 182860 ; MIM 182870 ; MIM 182900 ; MIM 130500 ; MIM 166900 ; MIM 130500 ), характеризующихся измененной овальной формой эритроцитов, обусловленной дефектами ряда генов - гена альфа спектрина (SPTAI), гена бета спектрина (SPTB), гена анкирина (ANKI), белка band 4.1 (EPBA41). У людей, имеющих в крови до 80-90% эритроцитов овальной формы, какой-либо специфической патологии не наблюдается, в связи с чем эллиптоцитоз считается безвредной для организма аномалией. Однако, в литературе имеются сообщения о том, что у 12% людей, имеющих овалоцитоз, в периоде новорожденности или в первые 1-2 месяца жизни может выявляться гемолитическая анемия в легкой форме, лечение которой проводится гемотранфузиями.

Чаще встречается у жителей Северной Европы, где распространенность заболевания составляет 1 на 5000 населения.

Овальными эритроциты становятся потому, что не восстанавливают свою первоначальную форму двояковогнутого диска после прохождения по микроциркуляторному руслу.

Наиболее тяжелые формы заболевания обусловлены структурной аномалией спектрина с последующим нарушением сборки цитоскелета эритроцита.

В некоторых семьях у больных обнаружена недостаточность другого белка цитоскелета - белка полосы 4.1 , связывающего спектрин и актин. Гомозиготная форма - полное отсутствие этого белка - проявляется более выраженным гемолизом.

В Юго-Восточной Азии широко распространен наследственный овалоцитоз, обусловленный делецией гена белка полосы 3. Этот дефект делает мембрану эритроцита ригидной и защищает эритроциты от внедрения малярийных плазмодиев.

Независимо от наличия анемии, по меньшей мере 25% (обычно - более 75%) эритроцитов составляют овалоциты с отношением малого радиуса к большому не более 0,78. При гемолизе часто обнаруживают микроовалоциты, пойкилоциты и шизоциты. Число их увеличивается после спленэктомии. Между выраженностью гемолиза и со-

держанием овалоцитов соответствия нет. Осмотическая стойкость эритроцитов в норме или понижена.

Стоматоцитами называются эритроциты, вогнутые с одной стороны и выпуклые с другой. В окрашенном мазке крови они имеют щелевидное просветление в центре.

Эта гемолитическая анемия наследуется аутосомно-доминантно. Повышена проницаемость мембраны эритроцитов для калия и натрия, вследствие чего компенсаторно усиливается активный транспорт этих катионов.

У одних больных эритроциты набухшие, с высоким содержанием ионов и воды и низкой средней концентрацией гемоглобина (гипергидратированные стоматоциты, гидроцитоз). Большинство этих случаев обусловлено отсутствием в мембране эритроцитов белка полосы 7.2 - стоматина.

У других больных эритроциты сморщенные, с низким содержанием ионов и воды и высокой средней концентрацией гемоглобина (дегидратированные стоматоциты, ксероцитоз).

Стоматоциты с укороченным сроком жизни встречаются у людей, у которых полностью отсутствуют антигены системы Rh (Rh null).

У большинства больных обнаруживают спленомегалию и легкую анемию. Спленэктомия уменьшает, но не устраняет гемолиз. Показания к операции те же, что и при наследственном микросфероцитозе.

### **Анемия Минковского-Шофара**

Одна из наиболее распространенных мембранопатий - микросфероцитарная анемия Минковского-Шофара (ОММ :182900). Ее частота составляет 2:10000 новорожденных. Это генетически гетерогенная группа гемолитических сфероцитарных анемий, две из которых встречаются чаще других: первая обусловлена мутациями в гене белка спектрина, вторая связана с мутациями в гене белка анкирина. Оба эти белка обеспечивают целостность мембраны эритроцитов и ее устойчивость к деформации. Спектрин представляет собой тетрамер из 2137 аминокислот, состоящий из двух неидентичных цепей -  $\alpha$  и  $\beta$ . Анкирин, состоящий из 1880 аминокислот, обеспечивает связь с липидными слоями мембраны и пространственную ориентацию спектрина и его взаимодействие с цитоплазматическими белками. Ген  $\alpha$ -цепи спектрина локализован на хромосоме 1q21,  $\beta$ -цепи - на хромосоме 14q22-q23, а ген анкирина - в области хромосомы 8p 11.2. Мутации в гене  $\alpha$ -цепи спектрина и промоторном районе гена анкирина приводят к возникновению редких аутосомно-рецессивных вариантов сфероцитоза, а мутации в гене  $\beta$ -цепи спектрина вызывают распространенный аутосомно-доминантный вариант сфероцитоза первого типа. В результате мутаций в гене спектрина и анкирина нарушается поверхностная структура мембраны эритроцитов и снижается мембранный индекс, что приводит к появлению сферической формы эритроцитов. Микросфероциты не обладают пластичностью нормальных эритроцитов и задерживаются при прохождении из пульпы селезенки в венозные сосуды. Клинические проявления сфероцитарных анемий часто возникают в старшем школьном и юношеском возрасте и характеризуются эпизодами желтухи, сопровождающейся потемнением мочи и появлением интенсивно окрашенного кала. По мере прогрессирования заболевания возникают гепатомегалия и спленомегалия. В редких случаях на коже голени больных образуются длительно незаживающие язвы. В далеко зашедших случаях может развиваться желчекаменная болезнь. Анализ крови больных свидетельствует об анемии, в препаратах выявляются

эритроциты сферической формы, имеющие пониженную осмотическую резистентность. В настоящее время наиболее эффективный метод лечения – спленэктомия, после которой происходит купирование большинства клинических признаков. Диагностика заболевания осуществляется на основании характерных клинических проявлений, обнаружения эритроцитов сферической формы в крови больного, а также ДНК-анализа, направленного на идентификацию мутаций в генах спектрина и анкирина.

### Литература

1. Middleton-Price H., Gendler S., Malcolm S. Close linkage of PUM and SPTA within chromosome band 1q21. - *Ann.Hum.Genet.*, 1988, v. 52, p. 273-278.
2. Pakstis A.J., Miki T., Kidd J.R., Kidd K.K. D1S75 is polymorphic in Caucasians as well as Japanese and maps between AT3 and SPTA1 on chromosome 1q. - *Cytogenet. Cell Genet.*, 1989, v. 51 (suppl.), p. 1057.
3. Rouleau G.A., Bazanowski A., Gusella J.F., Haines J.L. A genetic map of chromosome 1: comparison of different data sets and linkage programs. - *Genomics*, 190, v. 7, p. 313-318.
4. Forget B.G., Chang J.G., Coupal E., Fukushima Y., Stanislovitis P., Coata F., Byers M., Winkelmann J., Agre P., Marchesi V.T., Shows T.B., Watkins P. Molecular genetics of the human beta-spectrin gene. - *Clin.Res.*, 1988, v. 36, p. 612A.
5. Fukushima Y., Byers M.G., Watkins P.C., Winkelmann J.C., Forget B.G., Shows T.B. Assignment of the gene for beta-spectrin (SPTB) to chromosome 14q23-q24.2 by in situ hybridization. - *Cytogenet. Cell Genet.*, 1990, v. 53, p. 232-233.
6. Watkins P.C., Eddy R., Fukushima Y., Byers M.G., Cohen E.H., Dackowski W.R., Wydro R.M., Shows T.B. Regional assignment of the gene for protein S (PROS) to the chromosome region 3p11.1-q11.2. - *Cytogenet. Cell Genet.*, 1987, v. 46, p. 712.
7. Winkelmann J.C., Watkins P.C., Eddy R., Forget B.G., Shows T.B. Assignment of the gene for beta-spectrin to human chromosome 14. - *Am.J.Hum.Genet.*, 1987, v. 41 (suppl.), p. A192.
8. Speicher D.W., Davis G., Yurchenco P.D., Marchesi V.T. Structure of human erythrocyte spectrin. I. Isolation of the a-1 domain and its cyanogen bromide peptides. - *J.Biol.Chem.*, 1983, v. 258, p. 14931-14937.
9. Speicher D.W., Davis G., Marchesi V.T. Structure of human erythrocyte spectrin. II The sequence of the a-1 domain. - *J.Biol.Chem.*, 1983, v. 258, p. 14938-14947.
10. Speicher D.W., Marchesi V.T. Erythrocyte spectrin is comprised of many homologous triple helical segments. - *Nature*, 1984, v. 311, p. 177-180.
11. Curtis P.J., Palumbo A., Ming J., Fraser P., Cioe L., Meo P., Shane S., Rovera G. Sequence comparison of human and murine erythrocyte alpha-spectrin cDNA. - *Gene*, 1985, v. 36, p. 357-362.
12. Linnenbach A.J., Speicher D.W., Marchesi V.T., Forget B.G. Cloning of a portion of the chromosomal gene for human erythrocyte alpha-spectrin by using a synthetic gene fragment. - *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1986, v. 83, p. 2397-2401.
13. Cioe L., Laurila P., Meo P., Krebs K., Goodman S., Curtis P.J. - *Blood*, 1987, V. 70, p. 915-920.
14. Winkelmann J.C., Leto T.L., Watkins P.C., Eddy R., Shows T.B., Linnenbach A.J., Sahr K.E., Kathura N., Marchesi V.T., Forget B.G. Molecular cloning of the cDNA for human erythrocyte beta-spectrin. - *Blood*, 1988, v. 72, p. 328-334.
15. Sahr K.E., Laurila P., Kotula L., Scarpa A.L., Coupal E., Leto T.L., Linnenbach A.J., Winkelmann J.C., Speicher D.W., Marchesi V.T., Curtis P.J., Forget B.G. The complete cDNA and polypeptide sequences of human erythroid alpha-spectrin. - *J.Biol.Chem.*, 1990, v. 265, p. 4434-4443.
16. Kotula L., Laury-Kleintop L.D., Showe L., Sahr K., Linnenbach A.J., Forget B., Curtis P. J.



The exon-intron organization of the human erythrocyte alpha-spectrin gene. - Genomics, 1991, v. 9, p. 131-140.

17. Prchal J.T., Morley B.J., Yoon S.H., Coetzer T.L., Palek J., Conboy J.G., Kan Y.W. Isolation and characterization of cDNA clones for human erythrocyte beta-spectrin. - Proc.Natl.Acad.Sci., 1987, v. 84, p. 7468-7472.

18. Winkelmann J.C., Chang J.G., Tse W.T., Scarpa A.L., Marchesi V.T., Forget B.G. Full-length sequence of the cDNA for human erythroid beta-spectrin. - J.Biol.Chem., 1990, v. 265, p. 11827-11832.

19. Knowles W.J., Marchesi S.I., Marchesi V.T. Spectrin: structure, function and abnormalities. - Semin.Hematol., 1983, v. 20, p. 159-174.

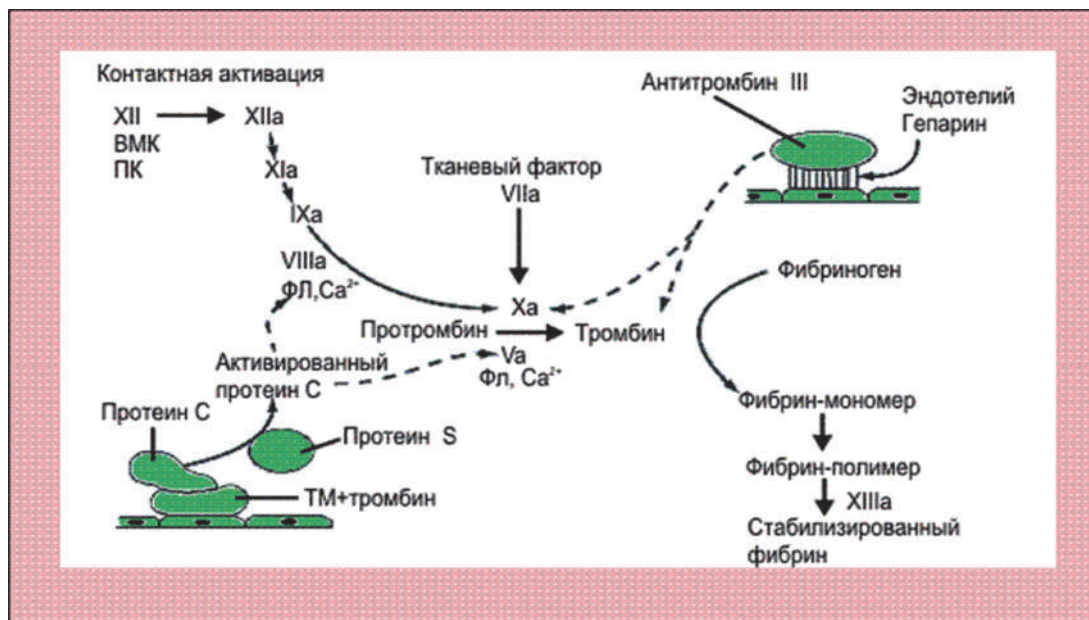
20. Palek J. - Hereditary elliptocytosis and related disorders. - Clin.Haematol., 1985, v. 14, p. 45-87.

21. Knowles W.J., Morrow J.S., Speicher D.W., Zarkowsky H.S., Mohandas N., Mentzer W.C., Shohft S.B., Marchesi V.T. Molecular and functional changes in spectrin from patients with hereditary pyropoikilocytosis. - J.Clin.Invest., 1983, v. 71, p. 1867-1877.

22. Lawler J., Liu S.C., Palek J., Prchal J. Molecular defect of spectrin in hereditary pyropoikilocytosis: alteration in the trypsin - resistant domain involved in spectrin self-association. - J. Clin.Invest., 1982, v. 70, p. 1019-1030.

## 21.5. Коагуляционные факторы

Общая схема свертывания крови (вместе с факторами противосвертывающей системы) показана на рисунке 21.1 (рис. 60.5, Harrison).



Риснок 21.1. Схема свертывания крови (воспроизведен Рис. 60.5, Harrison).

Факторы свертывания традиционно обозначаются римскими цифрами, а их активные формы - буквой «а».

Есть два независимых механизма свертывания - внутренний, или контактный, и внешний, зависимый от тканевого фактора. Они сходятся на стадии активации фактора

X и приводят к образованию тромбина, который превращает фибриноген в фибрин. Эти реакции тормозятся антитромбином III, связывающим все факторы свертывания, относящиеся к сериновым протеазам (за исключением фактора VII), а также системой протеин С-протеин S, которая инактивирует факторы V и VIII.

ВМК - высокомолекулярный кининоген;

ТМ - тромбомодулин;

ПК - прекалликреин;

ФЛ - фосфолипиды.

#### **Роль внешнего механизма свертывания и его ингибитора.**

Первоначальная активация фактора IX комплексом тканевой фактор-фактор VIIa компенсирует дефицит ранних факторов свертывания (например, XII и XI).

После того как ингибитор внешнего механизма свертывания инактивирует комплекс тканевой фактор-фактор VIIa, активация фактора X идет только с участием факторов VIIIa и IXa.

ИВМС - ингибитор внешнего механизма свертывания;

ТФ - тканевой фактор;

ФЛ - фосфолипиды.

## **21.6. Гемофилия А: Генетика**

Ген коагуляционного фактора VIII (F VIII) локализуется на дистальном конце длинного плеча X хромосомы в позиции Xq28 [Patterson M.N., 1987 ; Patterson M.N., 1989 ; Mandel J.L., 1989].

Клонирован в 1984 году независимо двумя группами исследователей [Gitschier J., 1984 ; Toole J.J., 1984].

Ген фактора VIII (более 186 килобаз) состоит из 26 экзонов. Размер экзонов варьирует от 69 нуклеотидов (экзон 5) до 3106 нуклеотидов (экзон 14). Интроны - от 200 нуклеотидов (интрон 17) до 32400 нуклеотидов (интрон 22). На кодирующую часть гена (мРНК) приходится 9 килобаз, а на интронные последовательности - 177 килобаз. Интрон 22 содержит «HTF island», ассоциированный с двумя дополнительными транскриптами. Один транскрипт имеет противоположную направленность по отношению к фактору VIII и кодируется сегментом 1,8 kb интрона 22 [Levinson B., 1990a]. Второй транскрипт (2,5 kb) одинаково ориентирован с фактором VIII и процессируется в мРНК, включающую также экзоны 23-26 фактора VIII [Levinson B., 1992]. Последовательности, локализованные в интроне 22 гена фактора VIII, соответствующие указанным транскриптам обозначаются как гены - F8A и F8B. Две дополнительные копии этих последовательностей, содержащих ген F8A и первый экзон гена F8B были выявлены на расстоянии 70 килобаз от гена фактора VIII и обозначаются как гены C6.1A и C6.1B [Kenwick S., 1992]. Функции транскриптов F8A и F8B, а также их потенциальные пептидные продукты не известны.

Фактор VIII экспрессируется в гепатоцитах печени.

С гена фактора VIII синтезируется предшественник протеина из 2351 аминокислотного остатка. Первые 19 аминокислот образуют сигнальный пептид. Зрелый протеин содержит 2332 аминокислоты с молекулярным весом 264763 Д.

Секретируемый фактор VIII состоит из трех доменов А, В и С [Vehar G.A.,1984 ; Gitschier J.,1984]. Домен А представлен в пептиде трижды и состоит из 330-380 аминокислот. Позиции А доменов соответствуют 1-329; 380-711 и 1649-2019 аминокислотам. Домены А по аминокислотной последовательности гомологичны на 30%. Первые два домена А отделены от третьего домена А доменом В, состоящим из 925 аминокислот (712-1648 аминокислоты). Два домена С расположены в карбоксильной части протеина и содержат по 160 аминокислот (2020-2172 и 2173-2332 аминокислоты). Домены С по аминокислотной последовательности гомологичны на 40%. Отличительной чертой фактора VIII является наличие двух малых кислых пептидов (a1, a2), расположенных на аминоконцах второго и третьего доменов А (соответствующих 331-372 и 1648-1689 аминокислотам).

Доменная структура фактора VIII может быть представлена как А1-a1-A2-B-a2-A3-C1-C2.

К настоящему времени удалось установить, что гемофилия А может быть вызвана следующими поражениями гена фактора VIII: дупликациями, большими делециями и инсерциями (более 100 нуклеотидов), малыми делециями и инсерциями (менее 100 нуклеотидов), заменами нуклеотидов (nonsense и missense мутациями), сплайсинговыми мутациями. Описана два случая дупликаций. Между экзонами 22 и 25 была выявлена дупликация из 22 килобаз IVS 22 [Gitschier J.,1988]. Дупликация экзона 13 зарегистрирована [Murtu S.,1990].

Около 50% тяжелой формы гемофилии А обусловлено большой инверсией интрона 22 гена фактора VIII. В интроне 22 локализована область int22h-1, а дистальнее гена фактора VIII локализовано две копии этой последовательности, обозначаемые int22h-2 и int22h-3. Внутриврохромосомная гомологичная рекомбинация между int22h-1 и экстрагенными копиями int22h-2 и int22h-3 приводит к инверсиям. Впервые подобную инверсию у больных гемофилией А описал Lakish D. в 1993. У 5% больных гемофилией А отмечаются крупные делеции (более 100 нуклеотидов). К настоящему времени зарегистрировано более 70 крупных делеций. Делеции могут захватывать как ген целиком, так и отдельные его экзоны. Данный класс мутаций приводит к тяжелой форме гемофилии А. Мелкие делеции (менее 100 нуклеотидов, от 1 до 86 нуклеотидов) также приводят к тяжелой форме гемофилии А, так как вызывают сдвиг рамки считывания. Мелких делеций в гене фактора VIII насчитывается около 40. Около 10 случаев инсерций (от 10 до 1 нуклеотида) было описано в случае гемофилии А. Интересен случай инсерции элемента Line в 14 экзон фактора VIII, обуславливающий гемофилию [Kazazian H.H.,1988]. Инсерция Line элемента в интрон 10 гена фактора VIII не приводила к развитию гемофилии [Woods-Samuels P.,1989a].

Зарегистрировано 29 nonsense и 140 missense мутаций в гене фактора VIII. Nonsense мутации возникают путем транзиций в CpG участках гена. Данные мутации формируют преждевременный терминирующий кодон, что приводит к срезанию кодонов и обрыву синтеза полипептидной цепи.

Missense мутации помогают выявить структурную организацию фактора VIII, важную для транспорта, процессинга, стабильности и функционирования белка. Так, в гене фактора VIII отмечаются missense мутации, затрагивающие сайт расщепления тромбином, участки связывания с фактором von Willebrand (VWF), факторами IX и X, возникновение новых сайтов гликозилирования и т.д.

В гене фактора VIII насчитывается 50 участков экзон-интронных сочленений. Однако, при гемофилии А выявлено незначительное количество сплайсинговых мутаций.

### Литература

1. Patterson M., Schwartz C., Bell M., Sauer S., Hofker M., Trask B., van den Engh G., Davies K.E. Physical mapping studies on the human X chromosome in the region Xp27-Xqter. - *Genomics*, 1987, v. 1, p. 297.
2. Patterson M.N., Bell M.V., Bloomfield J., Flint T., Dorkins H., Thibodeau S.N., Schaid D., Bren G., Schwartz C.E., Wieringa B., Ropers H.H., Callen D.F., Sutherland G., Froster-Iskenius U., Vissing H., Davies K.E. Genetic and physical mapping of a novel region close to the fragile X site on the human X chromosome. - *Genomics*, 1989, v. 4, p. 570-578.
3. Mandel J.L., Willard H.F., Nussbaum R.L., Romeo G., Puck J.M., Davies K.E. Report of the committee on the genetic constitution of the X chromosome. - *Cytogenet. Cell Genet.*, 1989, v. 51, p. 384.
4. Gitschier J., Wood W.I., Goralka T.M., Wion K.L., Chen E.Y., Eaton D.H., Vehar G.A., Capon D.J., Lawn R.M. Characterization of the human factor VIII gene. - *Nature*, 1984, v. 312, p. 326-330.
5. Toole J.J., Knopf J.L., Wozney J.M., Sultzman L.A., Buecker J.L., Pittman D.D., Kaufman R.J., Brown E., Shoemaker C., Orr E.C., Amphlett G.W., Foater W.B., Coe M.L., Knutson G.J., Fass D.N., Hewick R.M. Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. - *Nature*, 1984, v. 312, p. 342-347.
6. Levinson B., Kenwrick S., Lakich D., Hammonds G., Gitschier J. A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene. - *Genomics*, 1990, v. 7, p. 1-11.
7. Levinson B., Kenwrick S., Gamel P., Fisher K., Gitschier J. Evidence for a third transcript from the human factor VIII gene. - *Genomics*, 1992, v. 15, p. 585-589.
8. Kenwrick S., Levinson B., Taylor S., Shapiro A., Gitschier J. Isolation and sequence of two genes associated with a CpG island 5' of the factor VIII gene. - *Hum. Mol. Genet.*, 1992, v. 1, p. 179-186.
9. Vehar G.A., Keyt B., Eaton D., Rodriguez H., O'Brien D.P., Rotblat F., Oppermann H., Keck R., Wood W.I., Harkins R.N., Tuddenham E.G.D., Lawn R.M., Capon D.J. Structure of human factor VIII. - *Nature*, 1984, v. 312, p. 337-342.
10. Gitschier J., Kogan S., Levinson B., Tuddenham E.G.D. Mutations of factor VIII cleavage sites in hemophilia A. - *Blood*, 1988, v. 72, p. 1088-1028.
11. Murru S., Casula L., Pecorara M., Mori P., Cao A., Pirastu M. Illegitimate recombination produced a duplication within the FVIII gene in a patient with mild hemophilia A. - *Genomics*, 1990, v. 7, p. 115-118.
12. Lakich D., Kazazian H.H., Antonarakis S.E., Gitschier J. Inversion disrupting the factor VIII gene are common cause of severe haemophilia A // *Nature Genet.* - 1993. - Vol.5. - P.236-241.
13. Kazazian H.H., Wong C., Youssoufian H.G., Scott A.F., Phillips D., Antonarakis S.E. Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. - *Nature*, 1988, v. 332, p. 164-166.
14. Wood-Samuels P., Wong C., Mathias S.L., Scott A.F., Kazazian H.H., Antonarakis S.E. Characterization of a nondeleterious L1 inversion in an intron of the human factor VIII gene and further evidence of open reading frames in functional L1 elements. - *Genomics*, 1989, v. 4, p. 290-296.

## 21.7. Гемофилия В: Генетика

Фактор IX - одноцепочечный профермент с молекулярной массой 55000, превращаемый в активную протеазу (IXa) фактором XIa или комплексом с тканевым фактором в фактор VIIa. Затем, в комплексе с активированным фактором VIII, он активирует фактор X.

Фактор IX относится к витамин-К-зависимым белкам, синтезируемым в печени. Витамин К нужен для внедрения второй карбоксильной группы в некоторые остатки глутаминовой кислоты молекулы фактора IX. Эта посттрансляционная модификация обеспечивает связывание ионов кальция и адсорбцию на фосфолипидных мембранах.

Ген фактора IX расположен на X-хромосоме. Удалось выделить его кДНК, а также описать ряд делеций и мутаций.

Гемофилия В (дефицит фактора IX, болезнь Кристмаса) встречается у 1 из 100000 новорожденных мальчиков. Так как клинически она неотличима от гемофилии А, но лечится иначе, решающее значение имеет лабораторная диагностика.

Для лечения применяют свежезамороженную плазму или ее фракции, обогащенные факторами протромбинового комплекса.

Кроме обычных осложнений ( вирусный гепатит, цирроз печени, СПИД ) при лечении гемофилии В препаратами факторов протромбинового комплекса могут возникать тромбозы и эмболии (из-за следовых количеств активированных факторов свертывания в этих препаратах). Это осложнение особенно часто при болезнях печени и у лежачих послеоперационных больных. В связи с этим некоторые клиники вернулись к использованию у хирургических больных свежезамороженной плазмы; другие рекомендуют добавлять к препаратам факторов протромбинового комплекса небольшие дозы гепарина для активации антитромбина III и нормализации свертывания крови.

Проходят испытания рекомбинантные и очищенные моноклональными антителами препараты фактора IX. Предполагается, что они не будут тромбогенными.

### **Ген коагуляционного фактора IX**

Gene: [0Xq271/F9] coagulation factor IX (plasma thromboplastic component); hemophilia B

Ген фактора IX локализован на длинном плече X-хромосомы в локусе Xq27.1 [Yoshitake S.,1985]. Удалось выделить его кДНК, а также описать ряд делеций и мутаций.

В 1982-1983 годах опубликованы работы по клонированию кДНК фактора IX [Kurachi K.,1982 ;Choo K.H.,1982 ; Jaye M.,1983]. Однако, при сравнении секвенированных нуклеотидных последовательностей в этих работах было выявлено пять отличий.

Ген фактора IX (FIX) состоит из 8 экзонов (a-h) и 7 интронов (a-g) и равен 33,5 килобаз. На долю интронов приходится 92-95% длины гена. Выявлено несколько Alu повторов. Один Alu элемент локализуется в интроне А, три Alu элемента локализируются в интроне F, пятый Alu расположен в 3' фланкирующей области гена. Кроме Alu элементов в гене фактора IX встречаются повторы KpnI (в интроне D и 5' фланкирующей области гена) и HindIII повторы в 5' фланкирующей области гена [Yoshitake S.,1985].

мРНК гена фактора IX состоит из 2802 пар оснований, включая 29 пар оснований в 5' некодирующей области и 1390 пар оснований в 3' некодирующей области, исключая поли-А конец [Anson D.S.,1984].

Первые два экзона гена фактора IX кодируют препролидерную (prepro leader) последовательность, которая удаляется в процессе биосинтеза одноцепочечного полипептида. Остальные экзоны кодируют полипептид из 415 аминокислотных остатков, которые образуют зрелый протеин, циркулирующий в плазме крови человека.

8 экзонов гена фактора IX кодируют 6 больших доменов фактора IX:

1. Экзон «а» - гидрофобный сигнальный пептид, который обеспечивает секрецию протеина из гепатоцита в кровь.
2. Экзоны «b» и «c» - пропептид и « gla» домен , который содержит 12 гамма кар-

боксиглутаминовых остатков. Такая посттрансляционная модификация обеспечивает правильное сворачивание цепи и связывание ионов кальция фактором IX.

3. Экзон «d» - тип В или первый домен похож на эпидермальный фактор роста EGF, содержит консервативную последовательность карбоксилатных остатков, включая бета гидроксиспартат в положении 64. Этот домен обеспечивает дополнительное связывание ионов кальция.

4. Экзон «e» - тип А или второй домен, схожий с эпидермальным фактором роста (EGF), который утрачивает консервативную последовательность домена А.

5. Экзон «f» - активный (коагуляционный) домен - дважды расщепляется фактором IXa, переводя фактор IX в фактор IXa.

6. Экзоны «g» и «h» - сериновая протеаза или каталитический домен, ответственный за протеолиз фактора X в Xa.

При запуске процесса свертывания крови коагуляционный фактор IX путем двухстадийного последовательного расщепления пептидных связей в положениях arg145/ala146 и arg180/val181 переходит в активированную форму - фактор IXa. Фактор IXa - сериновая протеаза, состоящая из двух полипептидных цепей (тяжелой и легкой), соединенных дисульфидной связью.

Легкая цепь с молекулярным весом 10000 дальтон сформирована 145 аминокислотами, расположенными на аминоконцевом участке пептидной цепи. В цепи сосредоточены следующие модули - Gla домен, два домена, подобных эпидермальному фактору роста, линкерный пептид.

Тяжелая цепь с молекулярным весом 45000 дальтон образуется из 236 аминокислот, лежащих на карбоксильном конце пептида. Тяжелая цепь формирует каталитический модуль и высоко гомологична тяжелым цепям других витамин К-зависимых коагуляционных факторов и химотрипсина.

В 1995 году методами рентгеноструктурного анализа была установлена пространственная структура фактора IX человека (Brandstetter H., 1995).

Описан ряд делеций и мутаций гена фактора IX. Подробный спектр идентифицированных мутаций в гене коагуляционного фактора 9 (F 9) представлен в Таблице F 9m. Это различные крупные делеции, мелкие делеции, инсерции, инсерции+делеции, сплайсинговые мутации, мутации в промоторной области, миссенс-мутации, нонсенс мутации, сайленсинговые мутации.

### Литература

1. Yoshitake S., Schach B.G., Foster D.C., Davie E.W., Kurachi K. Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B). - *Biochemistry*, 1985, v. 24, p. 3736-3750.
2. Kurachi K., Davie E.W. Isolation and characterization of a cDNA coding for human factor IX. - *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 1982, v. 79, p. 6461-6464.
3. Choo K.H., Gould K.G., Rees D.J.G., Brownlee G.G. Molecular cloning of the gene for human anti-haemophilic factor IX. - *Nature*, 1982, v. 299, p. 178-180.
4. Jaye M., de la Salle H., Schamber F., Balland A., Kohli V., Findeli A., Tolstoshev P., Lecoco J.P. Isolation of a human antihemophilic factor IX cDNA clone using a unique 52-base synthetic nologonucleotide probe deduced from the amino acid sequence of bovine factor IX. - *Nucleic Acid Res.*, 1983, v. 11, p. 2325-2335.

5. Anson D.S., Choo K.H., Rees D.J.G., Giannelli F., Gould K., Huddleston J.A., Brownlee G.G. The gene structure of human anti- haemophilic factor IX. - *The EMBO J.*, 1984, v. 3, p. 1053-1060.

6. Brandstetter H., Bauer M., Huber R., Lollar P., Bode W. X-ray structure of clotting factor IXa: active site and module structure related to Xase activity and hemophilia B. - *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 1995, V. 92, p. 9796-9800.

### **Недостаточность фактора XI (гемофилия С): общие сведения**

Фактор XI - димерный белок с молекулярной массой 160000, активируемый по внутреннему механизму гемостаза. Он превращается в активную протеазу (XIa) комплексом фактора XIIa, высокомолекулярного кининогена и калликреина (рис. 21.1 или 60.5).

Дефицит фактора XI (FXI, синдром Розенталя, гемофилия С, МIM 264900) проявляется умеренной кровоточивостью, изредка бывают гемартрозы или гематомы, а также послеоперационные кровотечения (Biggs R., 1962; Rosenthal R.L., 1964; Rosenthal R.L., 1955; Seligsohn U., 1979). Клинически дефицит фактора XI асимптоматичен.

В противоположность гемофилии А и гемофилии В, между кровоточивостью и уровнем фактора XI четкого соответствия нет, спонтанная кровоточивость менее выражена, гемартрозы редки.

Диагноз ставится часто лишь при кровотечении после травмы или операции; у женщин с дефицитом фактора XI бывают обильные и продолжительные менструации.

Так как фактор XI имеет T<sub>1/2</sub> около 24 ч, свежезамороженная плазма вводится 1 раз в сутки.

Тип наследования - аутосомно-рецессивный, характерен для евреев-ашкенази.

Показано, что число мутаций гена фактора XI сравнительно невелико.

### **Литература**

1. Biggs R., MacFarlane R.G. *Human Blood Coagulation and Its Disorders*. Oxford: Blackwell (3rd ed.), 1962.

2. Rosenthal R.L. Haemorrhage in PTA (factor XI) deficiency. (Abstract) *Proc. 10th Int.Cong.Soc. Hemat., Stockholm*, 1964.

3. Seligsohn U. Factor XI (PTA) deficiency. In: Goodman R.E., Motulsky A.G. *Genetic Diseases Among Ashkenazi Jews*. New York: Raven Press, 1979, p. 141-148.

4. Seligsohn U. Factor XI (PTA) deficiency. In: Goodman R.E., Motulsky A.G. *Genetic Diseases Among Ashkenazi Jews*.

5. Rosenthal R.L., Dreskin O.H., Rosenthal N. Plasma thromboplastin antecedent (PTA) deficiency: clinical, coagulation, therapeutic and hereditary aspects of a new hemophilia-like disease. - *Blood*, 1955, v. 10, p. 120-131.

1. Asakai R., Davie E.W., Chung D.W. Organization of the gene for human factor XI. - *Biochemistry*, 1987, v. 26, p. 7221-7228.

2. Gailani D., Sun M.F., Sun Y. A comparison of murine and human factor XI. - *Blood*, 1997, v. 90, p. 1055-1064.

3. Fujikawa K., Davie E.W. Human factor XII. - *Methods in enzymology*, 1981, v. 80, p. 198-211.

4. Cool D.E., MacGillivray R.T.A. Characterization of the human blood coagulation factor XII gene: intron/exon gene organization and analysis of the 5-prime flanking region. - *J.Biol.Chem.*, 1987, v. 262, p. 13662- 13673.

5. Mancuso D.J., Tuley E.A., Westfield L.A., Worrall N.K., Shelton-Inloes B.B., Sorace J.M., Alevy Y.G., Sadler J.E. Structure of the gene for human von Willebrand factor. - *J.Biol.Chem.*, 1990, v. 264, p. 19514-19527.
6. Webb G.C., Coggan M., Ichinose A., Board P.G. Localization of the coagulation factor XIII B subunit gene (F13B) to chromosome band 1q31- 32.1 and restriction fragment length polymorphism at the locus. - *Hum.Genet.*, 1989, v. 81, p. 157-160.
7. Anwar R., Miloszewski K.J.A., Markham A.F. Identification of a large deletion, spanning exon 4 to 11 of the human factor XIII A gene, in a factor XIII-deficient family. - *Blood*, 1998, v. 91, p. 149-153.
8. Board P.G., Losowsky M.S., Miloszewski K.J.A. Factor XIII: inherited and acquired deficiency. - *Blood Reviews*, 1993, v. 7, p. 229-241.
9. Griffin J.H., Evatt B., Zimmerman T.S., Kleiss A.J., Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. - *J.Clin.Invest.*, 1981, v.68, p. 1370-1373.
10. Royle N.J., Irwin D.M., Koschinsky M.L., MacGillivray R.T.A., Hamerton J.L. Human genes encoding prothrombin and ceruloplasmin map to 11p11-q12 and 3q21-24, respectively. - *Somat. Cell Molec.Genet.*, 1987, v. 13, p. 285-292.
11. Degen S.J.F., Davie E.W. Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin. - *Biochemistry*, 1987, v. 26, p. 6165-6177.
12. Carson S.D., Henry W.M., Shows T.B. Tissue factor gene localized to human chromosome 1 (1pter-1p21). - *Science*, 1985, v. 229, p. 991-993.
13. Carson S.D., Henry W.M., Haley L., Byers M., Shows T. The gene for tissue factor (coagulation factor III) is localized on human chromosome 1pter-1p21. - *Cytogenet. Cell Genet.*, 1985, v. 40 (abstract), p. 600.
14. Gitschier J., Wood W.I., Goralka T.M., Wion K.L., Chen E.Y., Eaton D.H., Vehar G.A., Capon D.J., Lawn R.M. Characterization of the human factor VIII gene. - *Nature*, 1984, v. 312, p. 326-330.
15. Toole J.J., Knopf J.L., Wozney J.M., et al. Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. - *Nature*, 1984, v. 312, p. 342-347.
16. Levinson B., Kenwrick S., Lakich D., Hammonds G., Gitschier J. A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene. - *Genomics*, 1990, v. 7, p. 1-11.
17. Gitschier J., Kogan S., Levinson B., Tuddenham E.G.D. Mutations of factor VIII cleavage sites in hemophilia A. - *Blood*, 1988, v. 72, p. 1088-1028.
18. McAlpine P.J., Coopland G., Guy C., et al. Mapping the genes for erythrocytic alpha-spectrin 1 (SPTA1) and coagulation factor V (F5). - *Cytogenet. Cell Genet.*, 1989, v. 51, p. 1042.
19. Dahlback B., Hansson C., Islam M.Q., et al., Assignment of gene for coagulation factor V to chromosome 1 in man and to chromosome 13 in rat. - *Somat. Cell Molec. Genet.*, 1988, v. 14, p. 509-514.

### **Контрольные вопросы**

1. Какие гены повреждаются при Анемии Фанкони?
2. Недостаточность каких ферментов вызывают несфероцитарные анемии?
3. Как недостаточность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы и недостаточность пируваткиназы влияет на эритроциты?
4. Какие гемоглобинопатии вызывают альфа-талассемии и бета-талассемии и серповидноклеточную анемию?
5. Повреждения каких белков вызывают эритроцитарные мембранопатии?
6. Нарушение каких коагуляционных факторов приводит к различным гемофилиям?
7. Какие факторы повреждаются при гемофилии А?
8. Повреждение каких факторов вызывают гемофилию В.



## ГЛАВА 22

## НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

22.1. Наследственные болезни нервной системы:  
классификация

Классификация наследственных болезней нервной системы традиционно основана на клинических и патофизиологических признаках. Многообразие симптомов, фенотипическая изменчивость, общность некоторых симптомов для многих болезней затрудняют построение такой классификации и не позволяют четко выделить нозологические формы. Картирование генов, а во многих случаях и выявление конкретных мутаций позволили уточнить классификацию. Например, клиническое деление нейрофиброматоза на типы I и II подкреплено тем, что они вызываются мутациями разных генов: гена, кодирующего белок-активатор ГТФазы и гена, кодирующего белок цитоскелета - мерлин (шванномин). Напротив, открытие общего гена, мутации которого вызывают миопатию Дюшенна и миопатию Беккера, свидетельствует об общности патофизиологических механизмов этих болезней и стирает различие между ними.

При наследственных атаксиях сходные клинические проявления могут быть вызваны мутациями разных генов. В других случаях по-разному проявляются мутации одного гена. Например, X-сцепленная семейная спастическая параплегия и X-сцепленная врожденная гидроцефалия возникают в результате дефекта белка L1CAM, обеспечивающего межнейронные контакты.

Наследственные нервные болезни с картированными генами сгруппированы в таблице 22.1. (табл. 363.1, Harrison) преимущественно по клиническим и патоморфологическим признакам. Крупные хромосомные aberrации и изменения числа хромосом (анеуплоидии) вызывают множество синдромов, обычно сопровождающихся умственной отсталостью.

**Таблица 22.1. (таблица 363.1, Harrison). Наследственные нервные болезни.  
Классификация наследственных нервных болезней**

Болезнь	Локализация гена	Клиническая картина	Тип наследования	Дефект
Дегенеративные заболевания ЦНС				
Деменция				
Болезнь Альцгеймера, тип 4 (с ранним началом)	1q31—q42	Деменция, амнезия, типичная картина болезни Альцгеймера	А-Д	Мутации гена пресенилина-2 ( <i>PSEN2</i> ); предполагаемый продукт — мембранный белок, участвующий во внутриклеточном транспорте белков

Болезнь Альцгеймера, тип 3 (с ранним началом)	14q24.3	Деменция, амнезия, типичная картина болезни Альцгеймера; наиболее распространенный семейный тип болезни	А-Д	Мутации гена пресенилина-1 ( <i>PSEN1</i> ); предполагаемый продукт — мембранный белок, участвующий во внутриклеточном транспорте белков
Болезнь Альцгеймера, тип 2 (семейная форма с поздним началом и спорадическая форма)	19q13.2	Амнезия, деменция	Кодоминантное наследование	Апопротеин Е4 — фактор риска болезни и ее более раннего начала; апопротеин Е секретируется астроцитами и захватывается нейронами, где участвует в образовании липопротеидов
Болезнь Альцгеймера, тип 1 (семейная форма, вызванная дефектом предшественника (b-амилоидного белка)	21q21	Редкая причина болезни Альцгеймера с ранним началом	А-Д	Точечные мутации гена предшественника b-амилоидного белка ( <i>APP</i> ) нарушают метаболизм этого белка
Болезнь Гентингтона <sup>a</sup>	4p16.3	Хорея, депрессия, деменция; при ювенильной форме мышечная ригидность и эпилепсия	А-Д	Увеличение числа повторов ЦАГ в гене гентингтина ( <i>HD</i> ); удлинение полиглутаминовых участков нарушает функцию белка
Семейная форма болезни Крейтцфельдта–Якоба	20pter-p12	Губчатая энцефалопатия с деменцией и миоклониями	А-Д	Мутация гена прионного белка ( <i>PRNP</i> )
Летальная семейная инсомния	20pter-p12	Бессонница, начинающаяся во взрослом возрасте	А-Д	Мутация гена прионного белка ( <i>PRNP</i> )
Болезнь Герстмана-Штротслера	20pter-p12	Губчатая энцефалопатия с деменцией и миоклониями	А-Д	Мутация гена прионного белка ( <i>PRNP</i> )
Двигательные расстройства				
Атаксия-телеангиэктазия	11q22.3	Дегенерация мозжечка, хореоатетоз, зрительная апраксия, телеангиэктазии на коже и роговице, иммунодефицит, эндокринопатия	А-Р	Мутации гена <i>ATM</i> , кодирующего белок из семейства фосфа-тидилинозитол-3-киназ, участвующий во внутриклеточной передаче сигнала от факторов роста; ген <i>rad3</i> (аналог <i>ATM</i> ) регулирует репарацию ДНК и клеточный цикл у дрожжей

Спиноцеребеллярная дегенерация, тип 7 (спиноцеребеллярная дегенерация с дегенерацией сетчатки)	3p21.- p12	Мозжечковая атаксия, ухудшение зрения, офтальмоплегия, снижение вибрационной чувствительности, усиление сухожильных рефлексов	А-Д	Ген не идентифицирован; точность картирования — 8 сантиМ
Дентаторубропаллидосубталамическая дегенерация	12p13.31	Атаксия, хореоатетоз, деменция, прогрессирующая миоклоническая эпилепсия, психические расстройства	А-Д	Увеличение числа повторов ЦАГ, функция гена не установлена; чем больше число повторов, тем вероятнее миоклоническая эпилепсия
Периодическая атаксия, тип I	12p13	Приступы атаксии длительною несколько секунд или минут, миокимия, провоцируемый движениями пароксизмальный хореоатетоз, положительный эффект ацетазоламида и фенитоина	А-Д	Мутации гена калиевых каналов ( <i>KCNA1</i> )

А-Д - аутосомно-доминантный;

А-Р - аутосомно-рецессивный;

Х-Д - Х-сцепленный доминантный;

Х-Р - Х-сцепленный рецессивный.

(а) Для болезни Гентинтона характерны как деменция, так и двигательные расстройства.

Первая группа в таблице 22.1 (табл. 363.1 Harrison) - дегенеративные заболевания ЦНС. Общность их в том, что после периода нормального функционирования начинается процесс постепенного разрушения и гибели нейронов, этот процесс может затрагивать любые отделы нервной системы. Вторая группа - моногенные формы эпилепсии. Третья группа - нервно-мышечные болезни, при которых поражаются мотонейроны, нервно-мышечные синапсы либо сами мышцы. В четвертую группу объединены моногенные формы опухолей ЦНС. Пятая группа объединяет болезни, связанные с нарушением развития и миграции нейронов. Для каждой болезни указано, разработаны ли методы генодиагностики. В каждой группе есть болезни с разным типом наследования.

Аутосомно-доминантно наследуются, например, болезнь Гентингтона, семейные формы болезни Альцгеймера и бокового амиотрофического склероза, атрофическая миотония, болезнь Шарко-Мари-Туса, семейный гиперкалиемический периодический паралич, оливопонтocerebellарная атрофия, туберозный склероз. Среди аутосомно-ре-

цессивных болезней - атаксия Фридрейха, болезнь Вильсона, атаксия-телеангиэктазия, болезнь Тея-Сакса и другие лизосомные болезни.

К X-сцепленным рецессивным относятся миопатия Дюшенна, X-сцепленная бульбоспинальная амиотрофия (синдром Кеннеди), синдром Кальмана, синдром ломкой X-хромосомы. Не соответствует менделевскому наследованию по материнской линии при мутациях в митохондриальном геноме и наследование динамических мутаций, связанных с увеличением числа тринуклеотидных повторов (Таблица 22.2. (табл. 363.2, Harrison).

**Таблица 22.2 (табл. 363.2 , Harrison). Наследственные нервные болезни  
Нервные болезни, вызванные увеличением числа тринуклеотидных повторов**

Болезнь	Вид и локализация повторов	Действие на экспрессию гена
Синдром ломкой X-хромосомы, тип А	Повторы ЦГГ в 5'-концевой нетранслируемой области гена; у некоторых больных — точечные мутации	Ген не экспрессируется
Синдром ломкой X-хромосомы, тип Е	Повторы ЦГГ/ЦЦГ, связь с генами не установлена	Не установлено
Дентаторубропаллидо-субталамическая дегенерация	Повторы ЦАГ в пределах открытой рамки считывания	Нормальная экспрессия гена
Болезнь Гентингтона	Повторы ЦАГ в пределах открытой рамки считывания	Нормальная экспрессия гена гентингина (HD) без клеточной избирательности; удлинение полиглутаминового участка может нарушать взаимодействие гентингина с гентингин-связанным белком типа 1 либо с глицеральдегидфосфатдегидрогеназой
X-сцепленная бульбоспинальная амиотрофия (синдром Кеннеди)	Повторы ЦАГ в пределах открытой рамки считывания гена рецептора андрогенов	Нормальная экспрессия гена; удлинение полиглутаминовых участков в рецепторах андрогенов
Спиноцеребеллярная дегенерация типа 1	Повторы ЦАГ в пределах открытой рамки считывания	Нормальная экспрессия гена
Спиноцеребеллярная дегенерация типа 2	Повторы ЦАГ в пределах открытой рамки считывания	Нормальная экспрессия гена
Спиноцеребеллярная дегенерация типа 3 (болезнь Мачадо—Джозефа)	Повторы ЦАГ в пределах открытой рамки считывания	Нормальная экспрессия гена

Атрофическая миотония	Повторы ЦТГ в 3'-концевой нетранслируемой области гена DMI и в 5'-концевой области соседнего гена, кодирующего гомео-доменный белок; описаны также случаи болезни без изменения числа тринуклеотидных повторов	Подавление экспрессии гена; предполагается доминантно-негативное действие на уровне мРНК
Атаксия Фридрейха	Повторы ГАА в первом интроне гена фратаксина (FRDA)	Снижение содержания мРНК вследствие подавления транскрипции или нарушения сплайсинга

Наследственные нервные болезни вызываются различными типами мутаций: делециями (большинство случаев миопатии Дюшенна), вставками (болезнь Гиппеля-Линдау типа 1), дупликациями (болезнь Шарко-Мари-Туса типа 1А), транслокациями, разрывающими ген (нейрофиброматоз типа I), точечными мутациями (в гене цитозольной супероксиддисмутазы при семейном боковом амиотрофическом склерозе).

В результате точечных мутаций может происходить замена аминокислоты (миссенс-мутации) или образовываться терминирующий кодон, вызывающий преждевременное прекращение трансляции (нонсенс-мутации). Эти мутации называют статическими, поскольку они обычно стабильны в процессе мейоза и создают основу для классического менделевского наследования. В основе динамических мутаций лежит изменение числа тринуклеотидных повторов. С последними мутациями связано явление антиципации (таблица 2. табл. 363.2, Harrison)

## 22.2. Синдром ломкой X-хромосомы

Умственная отсталость, связанная с ломкой X-хромосомой (OMIM 309550), - это один из наиболее обычных случаев (causes) наследуемой умственной отсталости. Более 60 лет назад Мартин и Белл описали семью, в которой было показано, что умственная отсталость расщепляется как нарушение, сцепленное с X-хромосомой (Martin and Bell, 1943). В 1969 году Лабе сообщил о сужении на длинном плече X-хромосомы у некоторых умственно отсталых пациентов мужского пола и у бессимптомных пациентов женского пола. Такой хромосомный вариант был картирован в Xq27.3 и был назван ломкой X-хромосомой. Цитогенетические исследования, особенно те, в которых использовались культуральные среды с дефицитом фолиевой кислоты и тимидина, выявили ломкий сайт в семьях с X-сцепленной умственной отсталостью; впоследствии эти семьи были диагностированы как несущие синдром ломкой X-хромосомы (Sutherland, 1977 ; Richards et al., 1981). Мужчины с этим синдромом имеют умственную отсталость от умеренной до тяжелой, макроорхидизм , аномалии соединительных тканей , такие как сверхрастяжимость суставов , и большие уши (рис. 23.6) (Hagerman et al., 1984). Ген, отвечающий за синдром ломкой X-хромосомы, - это ген FMR1 , который кодирует белок FMRR . Наиболее

обычный механизм мутации - это экспансия нестабильного некодирующего повтора CGG (Warren and Sherman, 2001). Нормальные аллели содержат 6-60 повторов, премутационные - 60-200, а полная мутация содержит более 200 повторов. Увеличение количества повторов на 5' UTR гена FMR1 представляет собой превосходный пример генетического расстройства, опосредованного изменением структуры хроматина в *cis*-конфигурации .

Островок CpG в 5'-регуляторном участке FMR1 становится в случае полной мутации aberrантно метилированным после экспансии повторов (Verkerk et al., 1991). Пониженное ацетилирование гистонов на 5' конце было установлено в клетках пациентов с ломкой X-хромосомой при сравнении со здоровыми контрольными пациентами (Coffee et al., 1999). В свою очередь, измененные паттерны метилирования ДНК и ацетилирования гистонов приводят к потере экспрессии FMR1, и, соответственно, к потере функции белка FMRP у пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы. Таким образом, эти пациенты имеют первичную генетическую мутацию и вторичную эпигенетическую мутацию.

Интересный эпигенетический механизм был предложен для объяснения того, как повтор CGG в гене FMR1 метилируется и впоследствии сайленсируется . Тот факт, что премутационный повтор CGG формирует одиночную и стабильную шпилечную структуру (Handa et al., 2003), наряду с данными о том, что повторы CGG могут расщепляться Dicer, обусловил возможность того, что обнаружившие экспансию повторы CGG (которые в период раннего развития не метилированы) могут транскрибироваться и что получающаяся в результате РНК образует шпильку, которая может расщепляться Dicer для образования малых некодирующих РНК. Эти молекулы малых РНК связываются с РНК-индуцированным инициатором транскрипционного сайленсинга генов (RITS) и рекрутируют *de novo* метилтрансферазы ДНК и (или) метилтрансферазы гистонов к 5' UTR гена FMR1, что приводит к полному метилированию повтора CGG и транскрипционной репрессии FMR1 по мере развития (Jin et al., 2004a).

FMRP - это селективный РНК-связывающий белок, который содержит два домена KH и бокс RGG. Он связывается с полисомами РНК-зависимым способом посредством информационных рибонуклеопротеиновых частиц и предположительно участвует в супрессирующей трансляции как *in vitro*, так и *in vivo* (Laggerbauer et al., 2001 ; Li et al., 2001). Локализация белка FMRP совместно с иРНК и полирибосомами в дендритных шипиках (dendritic spines) свидетельствует о его роли в регуляции локального белкового синтеза в ответ на стимуляцию синапса (Feng et al., 1997 ; Weiler and Greenough, 1999 ; Brown et al., 2001 ; Darnell et al., 2001 , Darnell et al., 2005). Были идентифицированы предполагаемые мишени FMRP, которые играют роль в развитии синапса и которые могли бы частично объяснить возникновение фенотипов, связанных с нарушением развития нервной системы (Brown et al., 2001 ; Darnell et al., 2001).

Некоторые исследования позволяют предположить, что основным механизмом, с помощью которого FMRP регулирует трансляцию - это РНК-интерференция (RNAi). Гомолог ломкой X-хромосомы у дрозофилы (*Dfmr1*) связывается с Argonaute (ARGO2) и с комплексом РНК-индуцированного сайленсинга (RISC), а FMRP млекопитающих взаимодействует с EIF2C2 и связывается с активностью Dicer (Caudy et al., 2002 ; Ishizuka et al., 2002 ; Jin et al., 2004b). Наиболее вероятный механизм, предполагаемый для роли

FMRP как супрессора трансляции, состоит в том, что FMRP связывается со специфическими иРНК-лигандами, рекрутирует RISC вместе с miRNAs и облегчает узнавание между miRNAs и иРНК-лигандами (Jin et al., 2004a).

У носителей предмутации ломкой X-хромосомы (60-200 повторов) развивается отчетливый нейродегенеративный синдром, характеризующийся тремором и атаксией (Hagerman and Hagerman, 2004). Интересно, что эти предмутации могут индуцировать патогенез на уровне РНК, поскольку присутствуют РНК и белок гена FMR. Исследования на модельных животных предполагают, что РНК, кодируемая повторами CGG, присоединяется к некоторым клеточным белкам, изменяет их функцию, вызывая их накопление (Jin et al., 2003 ; Willemsen et al., 2003).

**РНК-интерференция** (англ. RNA interference, RNAi) — процесс подавления экспрессии гена на стадии транскрипции, трансляции, деаденилирования или деградации мРНК при помощи малых молекул **РНК**.

### Литература

1. Martin J. and Bell J., 1943. A pedigree of mental defect showing sex-linkage. Arch. Neurol. Psychiat. 6: 154-157.
2. Darnell J.C., Fraser C.E., Mostovetsky O., Stefani G., Jones T.A., Eddy S.R., and Darnell R.B., 2005. Kissing complex RNAs mediate interaction between the Fragile-X mental retardation protein KH2 domain and brain polyribosomes. Genes Dev., 19: 903-918.
3. Richards B.W., Sylvester P. E., and Brooker C., 1981. Fragile X-linked mental retardation: The Martin-Bell syndrome. J. Ment. Defic. Res. 25: 253-256.
4. Verkerk A. J.M.H., Pieretti M., Sutcliffe J.S., Fu Y.-H., Kuhl D.P.A., Pizutti A., Reiner O., Richards S., Victoria M.E, Zhang R., et al., 1991. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. Cell 65: 905-914.
5. Coffee B., Zhang E, Warren S.T., and Reines D., 1999. Acetylated histones are associated with FMR1 in normal but not fragile X-syndrome cells (erratum Nat. Genet. 22:, 209 [1999]). Nat. Genet. 22: 98-101.
6. Handa V., Saha T., and Usdin K., 2003. The fragile X syndrome repeats form RNA hairpins that do not activate the interferon-inducible protein kinase, PKR, but are cut by Dicer. Nucleic Acids Res. 31: 6243-6248.
7. Jin P., Alisch R.S., and Warren S.T., 2004a. RNA and microRNAs in fragile X mental retardation. Nat. Cell Biol. 6: 1048-1053.
8. Lagerbauer B., Ostareck D., Keidel E.M., Ostareck-Lederer A., and Fischer U., 2001. Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. Hum. Mol. Genet. 10: 329-338.
9. Li Z., Zhang Y., Ku L., Wilkinson K.D., Warren S.T., and Feng Y., 2001. The fragile X mental retardation protein inhibits translation via interacting with mRNA. Nucleic Acids Res. 29: 2276-2283.
10. Feng Y., Absher D., Eberhart D.E., Brown V., Maker H.E., and Warren S.T., 1997. FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association. Mol Cell 1: 109-118.
11. Weiler I.J. and Greenough W.T., 1999. Synaptic synthesis of the Fragile X protein: Possible involvement in synapse maturation and elimination. Am. J. Med. Genet. 83: 248-252.
12. Brown V., Jin P., Ceman S., Darnell J.C., O'Donnell W.T., Tenenbaum S.A., Jin X., Feng

Y., Wilkinson K.D., Keene J.D., et al., 2001. Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell* 107: 477-487.

13. Darnell J.C., Jensen K.B., Jin P., Brown V., Warren S.T., and Darnell R.B., 2001. Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell* 107: 489-499.

14. Caudy A.A., Myers M., Hannon G.J., and Hammond S.M., 2002. Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev.* 16: 2491-2496.

15. Ishizuka A., Siomi M.C., and Siomi H., 2002. A Drosophila fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev.* 16: 2497-2508.

16. Jin P., Zarnescu D.C., Ceman S., Nakamoto M., Mowrey J., Jongens T.A., Nelson D.L., Moses K., and Warren S.T., 2004b. Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway. *Nat. Neurosci.* 7: 113-117.

17. Jin P., Alisch R.S., and Warren S.T., 2004a. RNA and microRNAs in fragile X mental retardation. *Nat. Cell Biol.* 6: 1048-1053.

18. Hagerman P.J. and Hagerman R.J., 2004. The fragile-X premutation: A maturing perspective. *Am. J. Hum. Genet.* 74: 805-816.

19. Jin P., Zarnescu D.C., Zhang E., Pearson C.E., Lucchesi J.C., Moses K., and Warren S.T., 2003. RNA-mediated neurodegeneration caused by the fragile X premutation rCGG repeats in Drosophila. *Neuron* 39: 739-747.

20. Willemsen R., Hoogeveen-Westerveld M., Reis S., Holstege J., Severijnen L.A., Nieuwenhuizen I.M., Schrier M., Van Unen L., Tassone E., Hoogeveen A.T., et al., 2003. The FMR1 CGG repeat mouse displays ubiquitin-positive intranuclear neuronal inclusions; implications for the cerebellar tremor/ataxia syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 12: 949-959.

### 22.3. X-сцепленная бульбоспинальная амиотрофия (синдром Кеннеди)

Болезнь Кеннеди является X-сцепленной рецессивной формой спинальной мышечной атрофии. Нарушение характеризуется медленно прогрессирующей слабостью конечностей и бульбарных мышц с фасцикуляциями, мышечной атрофией и гинекомастией (Harding et al., 1982). Это заболевание клинически сходно, но генетически отличается от классических форм аутосомной спинальной мышечной атрофии (см., Например, SMA1; 253300).

Заболевание обычно начинается на четвертом десятилетии, болеют мужчины. Кроме прогрессирующей слабости и атрофии мышц конечностей и атрофии мышц со стволовой иннервацией характерны гинекомастия и снижение фертильности, обусловленные уменьшенной чувствительностью к андрогенам.

В дифференциальном диагнозе с боковым амиотрофическим склерозом (помимо гинекомастии, которая может быть малозаметной) помогают отсутствие пирамидной симптоматики (спастичности) и, у части больных, умеренно выраженная сенсорная нейропатия.

#### Молекулярная генетика

У 35 неродственных пациентов с SBMA La Spada и Fischbeck (1991) и La Spada et al. (1991) идентифицировали расширенный повтор CAG в первом экзоне гена AR – рецептора андрогенов (313700.0014)). Нарушение не наблюдалось у 263 нормальных людей. Повторение AR CAG обычно полиморфное, со средним числом повторов 22 +/- 3. У пациентов с SBMA было 11 различных (CAG) n аллелей, с числом повторов в диапазоне



от 40 до 52, более чем на 6 стандартных отклонений выше среднего значения. Аномалия гена AR сегрегирована с заболеванием в 15 семьях SBMA, без рекомбинации в 61 мейозе (оценка  $\text{lod} = 13,2$  при  $\text{teta} = 0,0$ ). Повтор CAG кодирует полиглутаминовый тракт в той части белка AR, который непосредственно не участвует в связывании гормонов или ДНК. Не было никакой корреляции между размером повтора CAG и наличием измененного *in vitro* связывания андрогена. Тем не менее, была корреляция между длиной повторов CAG и тяжестью заболевания; самые легкие клинические проявления были связаны с наименьшим повторением CAG.

Молекулярный дефект - тринуклеотидные повторы ЦАГ в первом экзоне локализованного на X-хромосоме гена рецептора андрогена. Возможна прямая генодиагностика. Чем больше число повторов, тем раньше начинается болезнь.

Tanaka et al. (1996) исследовали происхождение мутаций SBMA в японской популяции путем анализа повторов (CAG) n и (GGC) n локуса гена AR в неродственных SBMA и нормальных X-хромосомах у японских мужчин. Они обнаружили нарушение равновесия между гаплотипом (GGC) n и мутацией (CAG) n. Их результаты продемонстрировали эффект основателя для SBMA в японской популяции, что указывает на то, что *de novo* патологическое расширение повторения CAG, вероятно, реже в SBMA, чем при других заболеваниях из-за расширения триплетного повтора.

По оценкам Udd et al. (1998), распространенность болезни Кеннеди в регионе Васа на западе Финляндии составляет 13 на 85 000 жителей мужского пола

На модели SBMA у трансгенных мышей Tokui et al. (2009) показали, что убиквитин-протеасомная функция хорошо сохранялась и даже увеличивалась на поздних стадиях, когда у мышей развивались тяжелые фенотипы. Пероральное введение Hsp90 (140571) ингибитора 17- (диметиламиноэтиламино) -17-деметоксигельданамицина (17-DMAG) заметно улучшало двигательные нарушения у мышей SBMA без обнаруживаемой токсичности и уменьшало количество мономерных и ядерно-аккумулированных мутантных AR. AR мутанта был преимущественно деградирован в присутствии 17-DMAG как на моделях клеток SBMA, так и на мышцах по сравнению с AR дикого типа, а 17-DMAG также значительно индуцировал Hsp70 (см. 140550) и Hsp40 (см. 602837). Tokui et al. (2009) пришел к выводу, что 17-DMAG будет оказывать терапевтическое действие на SBMA через сохраненную функцию протеасомы.

McManamny et al. (2002) разработали модель трансгенных мышей SBMA, экспрессирующую полноразмерную кДНК AR человека, несущую 65 (AR-65) или 120 CAG-повторов (AR-120), с широко распространенной экспрессией, управляемой промотором цитомегаловируса. У мышей, несущих трансген AR-120, наблюдалась поведенческая и моторная дисфункция, в то время как у мышей, несущих 65 CAG-повторов, наблюдался мягкий фенотип. Прогрессирующая мышечная слабость и атрофия наблюдалась у мышей AR-120 и была связана с потерей альфа-моторных нейронов в спинном мозге. Не было никаких признаков нейродегенерации в других структурах мозга. Моторная дисфункция наблюдалась как у самцов, так и у самок животных, что свидетельствует о том, что расширение повторов полиглутамина может вызывать доминантную мутацию усиления функции в AR. У самцов мышей наблюдалось постепенное снижение выработки сперматозоидов, что согласуется с дефектами яичка у пациентов-людей.

Монти и др. (2009) генетически манипулировал ядерной локализацией сигнала AR с полиглутаминовыми повторами. Трансгенные мыши, экспрессирующие этот мутантный AR, проявляли неэффективную ядерную транслокацию и существенно улучшали моторную функцию по сравнению с мышами Sbma. Анализ клеточных моделей SBMA показал, что ядерная локализация расширенного полиглутамином AR была необходима, но не достаточна для агрегации и токсичности, и что связывание андрогена с помощью AR было необходимо для этих признаков заболевания. Исследования культивируемых моторных нейронов показали, что аутофагический путь способен разрушать цитоплазматически сохраненный AR, расширенный полиглутамином, и представляет собой эндогенный нейропротективный механизм. Фармакологическая индукция аутофагии спасла двигательные нейроны от токсического воздействия даже находящегося в ядре мутантного AR, Монти и др. (Montie, H. L., et al., 2009) пришли к выводу, что AR с расширенным полиглутаминовым повтором должен находиться в ядрах в присутствии своего лиганда, вызывая SBMA.

#### ***Терапевтические стратегии***

У модели дрозофилы и модели культуры тканей человека SBMA Caplen et al. (2002) обнаружили, что специфичные последовательности малых дцРНК из 22 нуклеотидов снимают токсичность и активацию каспазы-3, вызванную плазидами, экспрессирующими транскрипт, кодирующий расширенный AR-полиглутаминовый тракт.

В мышинной модели SBMA (AR-97Q) Katsuno et al. (2003) показали, что лейпрорелин, агонист лютеинизирующего гормона, высвобождающего гормон (LHRH), который предотвращает выработку тестостерона в яичках, обращал вспять как двигательную дисфункцию, так и ядерное накопление мутантных рецепторов андрогена у самцов трансгенных мышей. Флутамид, антагонист андрогенов, который способствует ядерной транслокации андрогенных рецепторов, не дал терапевтического эффекта. Авторы пришли к выводу, что лейпрорелин проявлял терапевтический эффект, предотвращая транслокацию мутантных рецепторов андрогенов и ядерное накопление.

Minamiyama, M. и соавторы, (Минамияма и соавт. (2004) изучали терапевтические эффекты бутирата натрия (SB), ингибитора гистондеацетилазы (см. HDAC1; 601241), в модели SBMA у трансгенных мышей. Пероральное введение sodium butyrate SB улучшает неврологические фенотипы и увеличивает ацетилирование ядерного гистона в нервных тканях. Эти терапевтические эффекты, однако, были замечены только в узком диапазоне доз SB. Авторы предположили, что SB может быть возможным терапевтическим средством для SBMA и других заболеваний polyQ.

В культивируемых клетках крысы, трансфицированных AR-112Q, Yang et al. (2007) обнаружили, что лечение ASC-J9, синтетическим аналогом куркумина, нарушает взаимодействие между AR-112Q и его корегулятором, а также повышает выживаемость клеток, уменьшая агрегацию AR-polyQ и увеличивая деградацию AR-polyQ. Внутрибрюшинная инъекция ASC-J9 мышам AR-97Q приводила к улучшению симптомов заболевания и уменьшению мышечной атрофии. У мышей после такого лечения сохранялась нормальная половая функция и фертильность.

В модели SBMA у трансгенных мышей Tokui et al. (2009) показали, что убиквитин-протеасомная функция хорошо сохранялась и даже увеличивалась на поздних ста-

дях, когда у мышей развивались тяжелые фенотипы. Пероральное введение ингибитора Hsp90 (140571) 17- (диметиламиноэтиламино) -17-деметоксигельданамицина (17-DMAG) заметно улучшало двигательные нарушения у мышей SBMA без обнаруживаемой токсичности и уменьшало количество мономерных и ядерно-аккумулированных мутантных AR. AR мутанта был преимущественно разложен в присутствии 17-DMAG как на моделях клеток SBMA, так и на мышцах по сравнению с AR дикого типа, а 17-DMAG также значительно индуцировал Hsp70 (см. 140550) и Hsp40 (см. 602837). Tokui et al. (2009) пришел к выводу, что 17-DMAG будет оказывать терапевтическое действие на SBMA через сохраненную функцию протеасомы.

### Литература

1. Harding, A. E., Thomas, P. K., Baraitser, M., Bradbury, P. G., Morgan-Hughes, J. A., Ponsford, J. R. X-linked recessive bulbospinal neuronopathy: a report of ten cases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 45: 1012-1019, 1982.
2. Tanaka, F., Doyu, M., Ito, Y., Matsumoto, M., Mitsuma, T., Abe, K., Aoki, M., Itoyama, Y., Fischbeck, K. H., Sobue, G. Founder effect in spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). *Hum. Molec. Genet.* 5: 1253-1257, 1996.
3. La Spada, A., Fischbeck, K. H. Androgen receptor gene defect in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. (Abstract) *Am. J. Hum. Genet.* 49 (suppl.): 20 only, 1991.
4. Kennedy, W. R., Alter, M., Sung, J. H. Progressive proximal spinal and bulbar muscular atrophy of late onset: a sex-linked recessive trait. *Neurology* 18: 671-680, 1968.
5. Udd, B., Juvonen, V., Hakamies, L., Nieminen, A., Wallgren-Pettersson, C., Cederquist, K., Savontaus, M.-L. High prevalence of Kennedy's disease in western Finland: is the syndrome underdiagnosed? *Acta Neurol. Scand.* 98: 128-133, 1998.
6. McManamny, P., Chy, H. S., Finkelstein, D. I., Craythorn, R. G., Crack, P. J., Kola, I., Cheema, S. S., Horne, M. K., Wreford, N. G., O'Bryan, M. K., de Kretser, D. M., Morrison, J. R. A mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum. Molec. Genet.* 11: 2103-2111, 2002.
7. Montie, H. L., Cho, M. S., Holder, L., Liu, Y., Tsvetkov, A. S., Finkbeiner, S., Merry, D. E. Cytoplasmic retention of polyglutamine-expanded androgen receptor ameliorates disease via autophagy in a mouse model of spinal and bulbar muscular dystrophy. *Hum. Molec. Genet.* 18: 1937-1950, 2009. [
8. Caplen, N. J., Taylor, J. P., Statham, V. S., Tanaka, F., Fire, A., Morgan, R. A. Rescue of polyglutamine-mediated cytotoxicity by double-stranded RNA-mediated RNA interference. *Hum. Molec. Genet.* 11: 175-184, 2002.
9. Katsuno, M., Adachi, H., Doyu, M., Minamiyama, M., Sang, C., Kobayashi, Y., Inukai, A., Sobue, G. Leuprorelin rescues polyglutamine-dependent phenotypes in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature Med.* 9: 768-773, 2003.
10. Minamiyama, M., Katsuno, M., Adachi, H., Waza, M., Sang, C., Kobayashi, Y., Tanaka, F., Doyu, M., Inukai, A., Sobue, G. Sodium butyrate ameliorates phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum. Molec. Genet.* 13: 1183-1192, 2004.
11. Yang, Z., Chang, Y.-J., Yu, I.-C., Yeh, S., Wu, C.-C., Miyamoto, H., Merry, D. E., Sobue, G., Chen, L.-M., Chang, S.-S., Chang, C. ASC-J9 ameliorates spinal and bulbar muscular atrophy phenotype via degradation of androgen receptor. *Nature Med.* 13: 348-353, 2007.
12. Tokui, K., Adachi, H., Waza, M., Katsuno, M., Minamiyama, M., Doi, H., Tanaka, K., Hamazaki, J., Murata, S., Tanaka, F., Sobue, G. 17-DMAG ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration through well-preserved proteasome function in an SBMA model mouse. *Hum. Molec. Genet.* 18: 898-910, 2009.

## 22.4. Дентаторубропаллидосубталамическая дегенерация

Клиническая картина разнообразна и включает прогрессирующую атаксию, хореоатетоз, дистонию, эпилептические припадки, миоклонию и деменцию. Заболевание обусловлено наличием участка из различного числа тринуклеотидных повторов ЦАГ в пределах открытой рамки считывания гена, расположенного в сегменте 12p13.31. У больных насчитывается 49 или более таких тринуклеотидных повторов (в норме - не больше 26). Чем больше число повторов, тем раньше начинается заболевание. В каждом следующем поколении число тринуклеотидных повторов возрастает, а заболевание начинается раньше (антиципация). Тяжелее протекает заболевание, передающееся по отцовской линии.

## 22.5. Болезнь Гентингтона: общие сведения

Хорея Гентингтона (MIM 143100) - одно из самых тяжелых прогрессирующих нейродегенеративных наследственных заболеваний головного мозга. Хорея (chorea; от греческого слова «choreia» - пляска) - форма гиперкинеза, характеризуется непроизвольными, быстрыми, нерегулируемыми движениями, возникающими в различных мышечных группах.

Его распространенность составляет около 10:100000. Отличительные признаки - хорея и расстройства поведения. Заболевание может начинаться с любого из этих симптомов или с обоих сразу. Болезнь Гентингтона может развиваться в любом возрасте - как в детстве, так и в 70 лет и старше, но чаще первые симптомы появляются в 30-50 лет.

Хорея начинается исподволь. Первые признаки хореи Гентингтона проявляются в возрасте 25-50 лет, реже в детском возрасте. Мужчины болеют чаще, чем женщины; первыми симптомами могут быть неусидчивость, суетливость движений, что не расценивается больным и его родственниками как заболевание. Со временем, однако, двигательные нарушения нарастают и могут привести к инвалидности. Характерны частые, внезапные, неритмичные судорожные движения конечностей или туловища. Возможны спазмы лицевой мускулатуры, всхлипывания, нарушения артикуляции. Страдает координация движений при ходьбе: походка становится «танцующей» (хореической). Память остается сохранной вплоть до поздних стадий заболевания, однако внимание, мышление и исполнительные функции нарушаются уже в самом начале заболевания. Часто наблюдаются депрессия, апатия, отчужденность, раздражительность, периодическая расторможенность. В некоторых случаях развиваются бред и навязчивые состояния, в связи с чем сначала ошибочно диагностируется шизофрения.

### Ген хореи Гентингтона, HD (IT15)

Ген хореи Гентингтона (HD - huntingtin, IT15) локализуется на четвертой хромосоме человека в позиции 4p16.3 (Gusella J.F., 1983; Conneally P.M., 1989).

Локус huntingtin довольно крупный, что составляет по протяженности около 180 килобаз и кодирует протяженный протеин, состоящий из 3144 аминокислот. Данный ген разделяется на 67 экзонов (Ambrose C.M., 1994).

Ген huntingtin экспрессируется во многих клетках. Данный ген экспрессируется в

двух альтернативных формах в различных клетках эмбриона и зрелого организма. Большой транскрипт размером 13,7 килобаз в основном экспрессируется в клетках мозга как эмбриона, так и взрослого организма. Меньший транскрипт размером 10,3 килобазы экспрессируется в более широком диапазоне клеток (Lin B., 1993).

Генетический дефект, приводящий к хорее Гентингтона, обусловлен экспансией нестабильного тринуклеотидного повтора (CAG) в гене, который транслируется в протеин как полиглутаминовый повтор.

Хорея Гентингтона наследуется по аутосомно-доминантному типу. Результаты исследований показали, что цитоплазматические и ядерные агрегаты huntingtin обладают равной токсичностью и что протеолиз является необходимой ступенью для вхождения белка huntingtin в ядро.

Белок Huntingtin необходим для нормального развития и выживания клетки. При апоптозе huntingtin специфически расщепляется цистеиновой протеазой (apoptain). Скорость расщепления huntingtin значительно возрастает при наличии длинных полиглутаминовых треков, обуславливающих несвоевременный апоптоз и как следствие хореею Гентингтона (Nasir J., 1996).

Болезнь Хантингтона представляет собой доминантную нейродегенеративную болезнь, вызываемую удлинением CAG триплетного повтора в участке гена, кодирующем N-концевую часть белка хантингина, функция которого неизвестна. В норме длина этого повтора варьирует у разных индивидуумов от 11 до 34 триплетов. У больных его длина колеблется от 37 до более чем 100 кодонов. Этот дефект, по-видимому, оказывает свое влияние через измененный белок. Однако неясно, каким образом. Одна из возможностей заключается в том, что удлинение полиглутаминового кластера в белке уменьшает его нормальную активность (механизм «потери функции»). Однако индивидуумы, у которых одна копия гена инактивирована не за счет удлинения повтора, а за счет повреждения структуры хромосомы в этом месте, хотя и имеют пониженное содержание «хантингина», но не проявляют признаков болезни Хантингтона. Это противоречит механизму «потери функции», хотя остается возможность так называемой негативной доминантности, при которой молекулы белка с утраченной функцией ингибируют функционирование нормального белка. По неясным причинам риск значительного увеличения числа тринуклеотидных повторов и развития ювенильной формы болезни Гентингтона (форма антиципации) выше, если болен отец больного. Полагают, что длинный полиглутаминовый участок нарушает связывание белков, а также другие процессы в клетках, например активность митохондрий. Сообщалось о нарушении связывания гентингина с глицеральдегидфосфатдегидрогеназой. Кроме того, имеются данные об усилении апоптоза нейронов при этой болезни.

Физикальное обследование, иногда в сочетании с психологическим обследованием, позволяет определить область распространения болезни [Walker FO (2007)]. Медицинская визуализация (компьютерная томография (КТ), магнитно-резонансная томография (МРТ)) показывает только видимую атрофию мозга на прогрессирующей стадии заболевания. Методы функциональной нейровизуализации (фМРТ и позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ)) могут показать изменения в активности мозга до появления клинических симптомов [Walker FO (2007)].

### Генетические методы

Для проведения генетической диагностики болезни Хантингтона необходим забор крови с последующим определением количества повторов ЦАГ в каждом *HTT*-аллеле. Положительный результат не подтверждает диагноз, поскольку может быть получен за несколько лет до появления первых симптомов. Однако отрицательный результат однозначно свидетельствует об отсутствии вероятности развития болезни Хантингтона [Walker FO (2007)].

Эмбрионы, полученные в результате экстракорпорального оплодотворения, могут быть подвержены генетической диагностике болезни Хантингтона с применением преимплантационной генетической диагностики. При этом методе забирается одна клетка из 4-8-клеточного эмбриона и затем проверяется на генетическую патологию. Полученная информация может впоследствии быть использована при выборе здорового эмбриона для имплантации. Кроме того, возможна пренатальная диагностика для эмбриона или плода в утробе матери [Kuliev A, Verlinsky Y (2005)].

### Дифференциальная диагностика

Около 90 % диагнозов болезни Хантингтона, основанных на обнаружении типичных симптомов и семейном анамнезе, подтверждаются генетическим тестированием. Большинство других расстройств с аналогичными симптомами называют ХГ-подобными расстройствами (англ. *HD-like disorders*, *HDL*)<sup>[28]</sup>. Причины большинства HDL-заболеваний неизвестны. Известно лишь, что некоторые из них возникают в результате мутаций генов *PRNP* (HDL1), *junctophilin 3* (HDL2), рецессивно наследуемого *HTT* гена (HDL3 — обнаружен у одной семьи и мало изучен) и гена, кодирующего ТАТА-связывающий белок (HDL4/SCA17) [Schneider SA, Walker RH, Bhatia KP (2007)]. К другим заболеваниям с аутосомно-доминантным наследованием, которые схожи с болезнью Хантингтона, относят дентаторубро-паллидолюоисовую атрофию и нейроферритинопатию [Schneider SA, Walker RH, Bhatia KP (2007)].

Болезнь Хантингтона неизлечима, но существует лечение, способное облегчить некоторые симптомы. Тетрабенезин был разработан специально для уменьшения тяжести симптомов болезни Хантингтона, был утвержден в 2008 году в США. Нейролептики и бензодиазепины помогают уменьшить проявления хореи. Амантадин и ремацемид находятся в стадии исследования, но показали положительные результаты. Для облегчения гипокинезии и ригидности мышц назначают противопаркинсонические лекарства, для облегчения миоклонической гиперкинезии — вальпроевую кислоту. В России препарат продается под торговым названием Нормокинезтин. С 1 января 2018 года Нормокинезтин включен в обновленный перечень жизненно необходимых лекарственных препаратов.

Для устранения депрессии применяют селективные ингибиторы обратного захвата серотонина и мirtазапин, а при психозах и нарушениях поведения назначают атипичные антипсихотики.

В настоящий момент ведутся активные исследования по разработке способа лечения, исследуются потенциальные направления для лечения болезни Хантингтона. Так компания Teva исследовала препарат-иммуномодулятор лахинимод, обладающий про-

тективным действием по отношению к ЦНС. Испытания препарата дошли до II фазы, но в ходе КИ препарату не удалось достигнуть конечной точки оценки эффективности. Однако испытующие определили, что на фоне терапии лахинимодом происходит снижение скорости атрофии головного мозга. Исходя из опыта неудавшегося исследования, компания приняла решение об отказе от дальнейшего изучения лекарственного препарата.

### Прогноз

С момента появления первых симптомов продолжительность жизни составляет около 15—20 лет.

Смерть обычно происходит не из-за болезни Хантингтона, а из-за сопутствующих ей осложнений, включая пневмонию, заболевания сердца и травмы. Частой причиной смерти является суицид.

### Литература

1. Gusella J.F., Tanzi R.E., Anderson M.A., Hobbs W., Gibbons K., Raschtchian R., Giliam T.C., Wallace M.R., Wexler N.S., Conneally P.M. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. - *Nature*, 1983, v. 306, p. 234-238.
2. Conneally P.M., Haines J.L., Tanzi R.E., Wexler N.S., Penchaszadeh G.K., Harper P.S., Folstein S.E., Cassiman J.J., Myers R.H., Young A.B., Hayden M.R., Falek A., Tolosa E.S., Crespi S., Maio L.D., Holmgren G., Anvret M., Kanazawa I., Gusella J.F. - *Genomics*, 1989, v. 5, p. 304-308.
3. Lin B., Rommens J.M., Graham R.K., Kalchman M., MacDonald H., Nasir J., Delaney A., Goldberg Y.P., Hayden M.R. Differential 3' polyadenylation of the Huntington disease gene results in two mRNA species with variable tissue expression. - *Hum.Mol.Genet.*, 1993, v. 2, p. 1541-1545.
4. Ambrose C.M., Duyao M.P., Barnes G., Bates G.P., Lin C.S., Srinidhi J., Baxendale S., Hummerich H., Lehrach H., Altherr M., et al. Structure and expression of the Huntington's disease gene: evidence against simple inactivation due to an expanded CAG repeat. - *Somat. Cell Mol.Genet.*, 1994, v. 20, p. 27-38.
5. Nasir J., Goldberg Y.P., Hayden M.R. Huntington disease: new insights into the relationship between CAG expansion and disease. - *Hum.Mol.Genet.*, 1996, v. 5 (review), p. 1431-1435.
6. Walker FO (2007). "Huntington's disease". *Lancet*. 369 (9557):218, 220, 224-225.
7. Kuliev A, Verlinsky Y (2005). "Preimplantation diagnosis: A realistic option for assisted reproduction and genetic practice". *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 17 (2): 179—83.
8. Schneider SA, Walker RH, Bhatia KP (2007). "The Huntington's disease-like syndromes: what to consider in patients with a negative Huntington's disease gene test". *Nat Clin Pract Neurol.* 3 (9): 517—25.
9. Frank S, Jankovic J. (2010). "Advances in the Pharmacological Management of Huntington's Disease". *Drugs.* 70 (5): 561—71. D
10. Bonelli RM, Wenning GK, Kapfhammer HP (2004). "Huntington's disease: present treatments and future therapeutic modalities". *Int Clin Psychopharmacol.* 19 (2): 51—62.

## 22.6. МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ БОЛЕЗНИ

### 22.6.1 Митохондрии и митохондриальные болезни: краткие сведения

Митохондрии содержат собственную ДНК, причем в каждой митохондрии человека обычно содержится от 5 до 10 копий кольцевой молекулы ДНК (см. Гетероплазмия), и все митохондрии наследуются от матери. Когда митохондрия делится, копии ДНК случайным образом распределяются между её потомками. Если только одна из исходных молекул ДНК содержит мутацию, в результате случайного распределения такие мутантные молекулы могут накопиться в некоторых митохондриях. Митохондриальная болезнь начинает проявляться в тот момент, когда заметное число митохондрий во многих клетках данной ткани приобретают мутантные копии ДНК (пороговая экспрессия). Число митохондрий в клетке непостоянно, как и количество митохондриальных геномов в митохондрии (обычно от 2 до 10), так что каждая клетка содержит тысячи копий митохондриальной ДНК. Эта ДНК передается через яйцеклетку в количестве 200000-300000 копий и в незначительной степени через сперматозоиды. Это означает, что все люди наследуют митохондриальные геномы от матери.

Если митохондриальный ген несет патологическую мутацию, она обычно представлена только в части митохондриальных геномов в клетке. Эту гетерогенность митохондриальных геномов в клетке или в организме называют гетероплазмией.

Мутации в митохондриальной ДНК происходят, по разным причинам, намного чаще, чем в ядерной. Это означает, что митохондриальные болезни достаточно часто проявляются из-за спонтанных вновь возникающих мутаций. Иногда темп мутирования увеличивается из-за мутаций в ядерных генах, кодирующих ферменты, которые контролируют репликацию ДНК митохондрий.

Митохондриальные заболевания обусловлены генетическими, структурными, биохимическими дефектами митохондрий, приводящими к нарушениям тканевого дыхания. Они передаются только по женской линии к детям обоих полов, так как сперматозоиды передают зиготе половину ядерного генома, а яйцеклеткаставляет и вторую половину генома, и митохондрии. Патологические нарушения клеточного энергетического обмена могут проявляться в виде дефектов различных звеньев в цикле Кребса, в дыхательной цепи, процессах бета-окисления и т. д.

Не все ферменты и другие регуляторы, необходимые для эффективного функционирования митохондрий, кодируются митохондриальной ДНК. Большая часть митохондриальных функций контролируется ядерной ДНК [Scarpulla R.C. (2006)].

Можно выделить две группы митохондриальных заболеваний:

Ярко выраженные наследственные синдромы, обусловленные мутациями генов, ответственных за митохондриальные белки (синдром Барта, синдром Кернса-Сейра, синдром Пирсона, синдром MELAS, синдром MERRF и другие).

Вторичные митохондриальные заболевания, включающие нарушение клеточного энергообмена как важное звено формирования патогенеза (болезни соединительной тка-



ни, синдром хронической усталости, гликогеноз, кардиомиопатия, мигрень, печёночная недостаточность, панцитопения, а также гипопаратиреоз, диабет, рахит и другие).

В 1972 г. Ольсон с соавт. с помощью модифицированной трехцветной окраски обнаружили в поперечнополосатых мышцах волокна с аномально большим количеством митохондрий. Они предложили новый термин - «рваные мышечные волокна». При электронной микроскопии видно, что митохондрии в таких волокнах увеличены, часто имеют необычную форму и содержат кристаллические включения. Со времени этих исследований представления о митохондриальных миопатиях и наследственных митохондриальных болезнях вообще существенно расширились.

Митохондриям принадлежит ведущая роль в образовании энергии. В результате окисления углеводов, жиров и белков образуются восстановительные эквиваленты (электроны и атомы водорода), которые переносятся по дыхательной цепи. Высвобождающаяся при этом энергия переходит в энергию электрохимического градиента для протонов на внутренней мембране митохондрий, а та, в свою очередь, используется для синтеза АТФ. Этот процесс называется окислительным фосфорилированием.

Многие митохондриальные белки кодируются генами ядерного генома, синтезируются в цитоплазме и затем транспортируются в митохондрии. Поэтому мутации, нарушающие функции митохондрий, могут происходить как в митохондриальном, так и в ядерном геномах.

Мутации в ядерном геноме наследуются так же, как и другие ядерные гены, а наследование мутаций в митохондриальном геноме носит иной характер.

Мутацию в митохондриальном геноме женщины унаследуют все ее дети, а мужчина с такой мутацией, наоборот, не передаст ее детям. Это приводит к типичному вертикальному наследованию, когда больная женщина передает заболевание большинству своих детей.

Соотношение митохондрий с мутантными и нормальными геномами у представителей одной семьи непостоянно, что приводит к фенотипической гетерогенности.

Мутации в митохондриальном геноме обуславливают: синдром Кернса-Сейра, синдром Лебера (наследственную атрофию зрительных нервов), синдром MERRF (Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibres - миоклоническую эпилепсию с рваными мышечными волокнами) и другие болезни (Scriver C. R. et al., 1995).

### Литература

1. Scarpulla R.C. (2006). «Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells». *J Cell Biochem.* 97 (4): 673-683. PMID 16329141.
2. Finsterer J (2007). «Hematological manifestations of primary mitochondrial disorders». *Acta Haematol.* 118 (2): 88-98.
3. Elliott HR, Samuels DC, Eden JA, Relton CL, Chinnery PF (August 2008). «Pathogenic mitochondrial DNA mutations are common in the general population». *Am. J. Hum. Genet.* 83 (2): 254-60.
4. Tanaka M, Nishigaki Y, Fuku N, Ibi T, Sahashi K, Koga Y (2007). «Therapeutic potential of pyruvate therapy for mitochondrial diseases».

## 22.6.2. Синдром Кернса-Сейра (0481)

Синдром Кернса-Сейра (ОМIM-530000) вариант митохондриальной энцефаломиопатии - редкое наследственное заболевание. Проявляется в детском и юношеском возрасте постепенно нарастающим двусторонним опущением век и ограничением подвижности глазных яблок, поражается также пигментный эпителий сетчатки и развиваются нарушения проводимости сердца, АВ-блокада, мозжечковая атаксия, тугоухость, ретинопатия.

Это заболевание, обусловлено делециями митохондриальной ДНК. Это обычно спорадическое заболевание, начинающееся до 20 лет и неуклонно прогрессирует, большинство больных умирают до 40 лет. В спинно-мозговой жидкости (СМЖ) повышена концентрация лактата и пирувата, а при биопсии мышц обнаруживают рваные мышечные волокна.

Иногда глаза не поражаются, и концентрация белка в СМЖ более 1 г/л (100 мг%). Встречаются также низкорослость, деменция, нейросенсорная тугоухость, сахарный диабет, гипотиреоз.

При синдроме Кернса-Сейра клетки содержат два типа митохондриальных геномов - нормальный и мутантный. В мутантном геноме имеются единичные делеции или дубликации. Эту гетерогенность митохондриальных геномов, или гетероплазмия, можно выявить с помощью блоттинга по Саузерну. Больше всего митохондрий с мутантными геномами содержится в тканях, клетки которых практически не делятся, особенно в скелетных мышцах и мозге. Однако мутации иногда обнаруживают также в лейкоцитах, гепатоцитах и фибробластах. Отсутствие мутаций в некоторых тканях, по-видимому, объясняется неравномерным распределением митохондрий между дочерними клетками на ранних стадиях эмбриогенеза и преимущественной пролиферацией нормальных клеток в быстро растущей ткани.

Синдром Кернса-Сейра обычно не наследуется, поскольку вызывающие его мутации возникают в оплодотворенной яйцеклетке.

### Литература

1. Harvey JN, Barnett D (July 1992). «Endocrine dysfunction in Kearns-Sayre syndrome». *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 37 (1): 97–103. DOI:10.1111/j.1365-2265.1992.tb02289.x. PMID 1424198.
2. Kearns TP, Sayre GP (August 1958). «Retinitis pigmentosa, external ophthalmoplegia, and complete heart block: unusual syndrome with histologic study in one of two cases». *AMA Arch Ophthalmol* 60 (2): 280–9. DOI:10.1001/archophth.1958.00940080296016. PMID 13558799.
3. Jager BV, Fred HL, Butler RB, Carnes WH (November 1960). «Occurrence of retinal pigmentation, ophthalmoplegia, ataxia, deafness and heart block. Report of a case, with findings at autopsy». *Am. J. Med.* 29 (5): 888–93. DOI:10.1016/0002-9343(60)90122-4. PMID 13789175.
4. Carod-Artal FJ, Lopez Gallardo E, Solano A, Dahmani Y, Herrero MD, Montoya J (September 2006). «[Mitochondrial DNA deletions in Kearns-Sayre syndrome]» (Spanish). *Neurologia* 21 (7): 357–64. PMID 16977556.
5. Lertrit P, Imsumran A, Karnkirawattana P, et al. (1999). «A unique 3.5-kb deletion of the mitochondrial genome in Thai patients with Kearns-Sayre syndrome». *Hum. Genet.* 105 (1–2): 127–31. DOI:10.1007/s004390051074. PMID 10480366.

6. Miller, Neil R.; Newman, Nancy J.; Bioussee, Valerie; Kerrison, John B.Ch. 20, adapted from a chapter 22 by Paul N. Hoffman // Walsh and Hoyt's Clinical Neuro-ophthalmology: the essentials. — Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008. — P. 432–6.

7. Ogasahara S, Yorifuji S, Nishikawa Y, et al. (March 1985). «Improvement of abnormal pyruvate metabolism and cardiac conduction defect with coenzyme Q10 in Kearns-Sayre syndrome». Neurology 35 (3): 372–7.

### 22.6.3. Синдром Merrf (Миоклоническая эпилепсия с рваными мышечными волокнами (# 545000))

Синдром MERRF (Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibres - миоклоническая эпилепсия с рваными мышечными волокнами) - заболевание, обусловленное точечными мутациями митохондриальной ДНК. Синдром включает митохондриальную миопатию, миоклонии (внезапное кратковременное подергивание отдельных мышц или мышц всего тела), большие эпилептические припадки, деменцию, атаксию и тугоухость; наружная офтальмоплегия не характерна. Как и при других митохондриальных болезнях, имеются значительные индивидуальные различия в симптоматике. Болезнь чаще начинается в детстве или в молодости. Повышена концентрация лактата и пирувата в крови и в СМЖ, в мышечной ткани имеются рваные мышечные волокна. Болезнь неуклонно прогрессирует, большинство больных умирают на третьем или четвертом десятилетии в состоянии тяжелой деменции.

У родственников по материнской линии может быть неполная картина синдрома, в части случаев семейный анамнез не отягощен. Характерны мутации, затрагивающие нуклеотиды 8344 и 8356 гена лизинового тРНК.

Специфическая мутация в митохондриальной ДНК была впервые продемонстрирована Шоффером и др. (1990 год) (МТТК , 590060,0001). Мутация с заменой А-на-Г в 8344 нуклеотиде составляет от 80 до 90% всех мутаций при MERRF [Shoffner and Wallace, 1992]. Биохимически мутация приводит к многочисленным повреждениям в ферментных комплексах дыхательной цепи, наиболее заметно было снижение активности NADH-CoQ редуктазы (комплекс I) и цитохромоксидазы (COX) (комплекс IV), что согласуется с дефектом в трансляции всех мтДНК-кодированных генах [Wallace et al., 1988 ; Bindoff et al., 1991, Chomyn, A., et al., 1991, Nakamura, M., et al., 1995].

Синдром MERRF наследуется по материнской линии. Чаще всего имеются точечные мутации гена, кодирующего лизиновую тРНК митохондрий; при этом изменяется конформация тРНК и нарушается трансляция (очевидно, на рибосомном уровне). Выявление этих мутаций в митохондриальной ДНК лейкоцитов или мышцы используется в диагностике и медико-генетическом консультировании

Синдром представляет собой фенотип, который может быть продуцирован мутацией более чем в 1 митохондриальном гене, например, МТТК (590060), МТТЛ1 (590050), МТТН (590040), МТТС1 (590080), МТТС2 (590085), МТТФ (590070). Особенности синдрома MERRF также связаны с мутацией в гене МТНД5 (516005).

### Литература

1. Shoffner, J. M., Wallace, D. C. Mitochondrial genetics: principles and practice. (Editorial) Am. J. Hum. Genet. 51: 1179-1186, 1992.
2. Wallace, D. C., Zheng, X., Lott, M. T., Shoffner, J. M., Hodge, J. A., Kelley, R. I., Epstein, C. M., Hopkins, L. C. Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. Cell 55: 601-610, 1988.
3. Bindoff, L. A., Desnuelle, C., Birch-Machin, M. A., Pellissier, J.-F., Serratrice, G., Dravet, C., Bureau, M., Howell, N., Turnbull, D. M. Multiple defects of the mitochondrial respiratory chain in a mitochondrial encephalopathy (MERRF): a clinical, biochemical and molecular study. J. Neurol. Sci. 102: 17-24, 1991.
4. Chomyn, A., Meola, G., Bresolin, N., Lai, S. T., Scarlato, G., Attardi, G. In vitro genetic transfer of protein synthesis and respiration defects to mitochondrial DNA-less cells with myopathy-patient mitochondria. Molec. Cell. Biol. 11: 2236-2244, 1991.
5. Nakamura, M., Nakano, S., Gato, Y.-i., Ozawa, M., Nagahama, Y., Fukuyama, H., Akiguchi, I., Kaji, R., Kimura, J. A novel point mutation in the mitochondrial tRNA (ser(UCN)) gene detected in a family with MERRF/MELAS overlap syndrome. Biochem. Biophys. Res. Commun. 214: 86-93, 1995.
6. Melone, M. A. B., Tessa, A., Petrini, S., Lus, G., Sampaolo, S., di Fede, G., Santorelli, F. M., Cotrufo, R. Revelation of a new mitochondrial DNA mutation (G12147A) in a MELAS/MERFF phenotype. Arch. Neurol. 61: 269-272, 2004.

## 22.6.4. Синдром Пирсона

Синдром Пирсона – тяжелое врожденное заболевание, при котором наблюдаются серьезные нарушения кроветворения (прежде всего выработки эритроцитов) и функции поджелудочной железы. Кроме того, нередко у больных встречаются печеночная и почечная недостаточность, а также нарушения работы желез внутренней секреции.

Синдром Пирсона относится к группе *митохондриальных заболеваний*.

Синдром Пирсона – очень редкое заболевание.

Митохондриальная ДНК передается детям только от матери; при этом для проявления болезни необходимо, чтобы число доставшихся ребенку дефектных молекул митохондриальной ДНК было достаточно велико – а это число зависит от множества случайных факторов. Поэтому при синдроме Пирсона генетическое консультирование затруднено. В одной и той же семье могут родиться и клинически здоровые, и больные дети.

### Признаки и симптомы

Многие проявления синдрома Пирсона связаны с неспособностью костного мозга больных производить нормальные клетки крови. Так, характерной чертой болезни является сидеробластная анемия. Это значит, что в предшественниках эритроцитов нарушено использование железа для синтеза гемоглобина, и возникают *сидеробласты* – клетки, где под микроскопом видны гранулы «неиспользованного» железа, расположенные обычно в виде кольца вокруг ядра клетки.

Анемия у таких больных не поддается терапии препаратами железа и витаминами, поэтому бывают необходимы переливания донорских эритроцитов. Нередко наблюдается также низкий уровень тромбоцитов (проявляющийся повышенной склонностью

к кровотечениям и образованию синяков) и лейкоцитов (низкая сопротивляемость инфекциям).

Вторая важная черта синдрома Пирсона – недостаточная выработка ферментов поджелудочной железы. В результате пища плохо усваивается, возникает хронический понос. Довольно часто наблюдаются также печеночная недостаточность, проблемы с почками, иногда – нарушения выработки гормонов.

Первые проявления болезни возникают в раннем возрасте, иногда даже с самого рождения. Дети медленно растут и недостаточно набирают вес, плохо развиваются, страдают от постоянного поноса, у них увеличена печень. Время от времени у них случаются метаболические кризы с эпизодами рвоты, сонливости и т.п. Периодически наблюдаются также тяжелые симптомы, связанные с ацидозом, то есть слишком высокой кислотностью крови; при этом страдают многие системы организма, включая желудочно-кишечный тракт, центральную нервную систему, сердце, мышцы, органы дыхания.

### **Диагностика**

При диагностике синдрома Пирсона принимают во внимание как клинические проявления, так и результаты лабораторных исследований. При исследованиях обнаруживается анемия с присутствием значительного количества кольцевых сидеробластов и определенные изменения в клетках костного мозга. Для изучения состояния поджелудочной железы могут использоваться измерения концентрации ее ферментов в сыворотке крови и другие анализы. Измеряется уровень молочной кислоты в сыворотке крови, так как при синдроме Пирсона ее обмен нарушен. Применяются и другие методы исследования.

Разумеется, прямую информацию о наличии синдрома Пирсона можно было бы получить путем генетического анализа митохондриальной ДНК. К сожалению, не всегда этот анализ дает надежные результаты, так как митохондриальная ДНК существует в различных вариантах (это называется гетероплазмией) не только в пределах организма, но даже внутри одной клетки.

### **Лечение**

Специфического лечения синдрома Пирсона не существует. Однако в ряде случаев можно облегчить состояние пациентов и продлить им жизнь.

Из-за анемии больным нужны переливания компонентов крови. Недостаточность поджелудочной железы требует приема панкреатических ферментов. Поскольку у больных нарушен обмен веществ, им бывает необходима инфузионная терапия для коррекции водно-электролитного баланса. Кроме того, так как при синдроме Пирсона обычно наблюдается повышенная кислотность крови, больные получают терапию бикарбонатом натрия или дихлорацетатом. Для купирования инфекционных осложнений используются антибиотики.

Трансплантация костного мозга теоретически может привести к нормализации показателей крови. Но, к сожалению, она не снимает прочие проблемы, возникающие при синдроме Пирсона. Кроме того, при нарушениях, развившихся в результате синдрома Пирсона, сама по себе процедура трансплантации сопряжена с повышенным риском и почти никогда не применяется.

### Прогноз

Большинство больных синдромом Пирсона умирает в первые 2-3 года жизни, несмотря на поддерживающее лечение. Однако немногочисленные пациенты проживают более долгую жизнь, причем иногда анемия прекращается сама собой. У таких больных могут развиваться признаки *синдрома Кернса-Сейра* – особой разновидности митохондриальных болезней, которая характеризуется мышечными и другими нарушениями.

### 22.6.5. Синдром MELAS

Синдром MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes - митохондриальная энцефаломиопатия, лактацидоз и инсультоподобные эпизоды) - системное заболевание, начинающееся в детстве после нормального периода раннего развития и обусловленное точечными мутациями митохондриальной ДНК. Больные низкорослы, страдают повторными инсультоподобными эпизодами в виде гемипареза, гемианопсии (двухсторонняя слепота в половине поля зрения) или корковой слепоты. Характерны повторные рвоты, тугоухость, у части больных возникают фокальные или генерализованные припадки, миоклоническая эпилепсия. В тяжелых случаях развивается деменция и глубокая инвалидизация; больные нередко умирают, не достигнув 20 лет. Характерный признак - лактацидоз.

Синдром MELAS может наследоваться по материнской линии, хотя часты спорадические случаи. Семьи с большим числом больных не описаны. В 80-90% случаев выявляется мутация в 3243-м нуклеотиде гена лейциновой тРНК митохондрий. У некоторых больных с такой же мутацией имелись только сахарный диабет и тугоухость.

Гораздо реже синдром MELAS вызывается мутацией митохондриальной ДНК, приводящей к дефекту субъединицы MTND4 комплекса I дыхательной цепи. Выявление мутации позволяет уточнить диагноз, для исследования используют лейкоциты или мышечную ткань.

В каждом конкретном случае набор симптомов и их тяжесть может сильно отличаться, поскольку синдром связан с мутациями во многих генах: MTTL1, MTTQ, MTTH, MTTK, MTTS1, MTND1, MTND5, MTND6, MTTS2. Мутации могут возникать впервые у конкретного пациента, либо наследоваться по материнской линии. Всего к 2009 году было обнаружено 23 миссенсных точечных мутаций и 4 делеции мтДНК, приводящих к MELAS, однако продолжают сообщаться о новых пациентах с симптомами расстройства при отсутствии известных мутаций [Abu-Amero KK, et al. (2009)].

Распространённость сложно оценить из-за разнообразия проявлений и связанной с этим трудностью диагностики.

Лечение синдрома пока неизвестно, зачастую он утягощается, приводя в итоге к гибели пациента. Предпринимаются попытки замедлить его течение. Исследуется применение L-аргинина для уменьшения повреждений мозга при инсультоподобных эпизодах, [Koga Y. et al., (2006); Finsterer J. (2009)] причём исследователи сообщают, что до принятия препарата уровень аргинина в крови пациентов был значительно снижен во время эпизодов [ Koga Y. et al., (2006)]. Однако более крупные и длительные исследования не подтвердили ранние находки и к тому же выявили повышенную смертность

среди тех, кто принимал это средство. Также применяется кофермент Q, в отсутствие результатов адекватных клинических исследований; такое исследование по состоянию на конец 2000-х ещё не завершено [Kerr DS (November 2009)].

Поскольку MELAS может сопровождаться судорогами и не всегда адекватно диагностируется, он может быть принят за «простую» эпилепсию. При этом назначение вальпроата - антиконвульсанта, известного своим негативным воздействием на митохондриальную дыхательную цепь - лишь усугубляет судороги [Lin CM, Thajeb P (2007)].

Синдром MELAS был впервые описан в 1984 году Павлакисом и коллегами [Pavlakis SG, et al., 1984]; десять лет спустя Павлакис и Мицио Хирано опубликовали обзор 110 случаев заболевания [Hirano M, Pavlakis SG (January 1994)].

### Литература

1. Abu-Amero KK, Al-Dhalaan H, Bohlega S, Hellani A, Taylor RW (2009). "A patient with typical clinical features of mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) but without an obvious genetic cause: a case report". *J Med Case Reports*. 3: 77. DOI:10.1186/1752-1947-3-77
2. Manwaring N, Jones MM, Wang JJ, Rochtchina E, Howard C, Mitchell P, Sue CM (May 2007). "Population prevalence of the MELAS A3243G mutation". *Mitochondrion*. 7 (3): 230—3.
3. Koga Y, Akita Y, Junko N, Yatsuga S, Povalko N, Fukiyama R, Ishii M, Matsuishi T (June 2006). "Endothelial dysfunction in MELAS improved by l-arginine supplementation". *Neurology*. 66 (11): 1766—9.
4. Finsterer J (November 2009). "Management of mitochondrial stroke-like-episodes". *Eur. J. Neurol*. 16 (11): 1178—84.
5. Kerr DS (November 2009). "Treatment of mitochondrial electron transport chain disorders: A review of clinical trials over the past decade". *Mol Genet Metab*. DOI:10.1016/j.ymgme.2009.11.005. PMID 20060349.
6. Lin CM, Thajeb P (March 2007). "Valproic acid aggravates epilepsy due to MELAS in a patient with an A3243G mutation of mitochondrial DNA". *Metab Brain Dis*. 22 (1): 105—9.
7. Pavlakis SG, Phillips PC, DiMauro S, De Vivo DC, Rowland LP (October 1984). "Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: a distinctive clinical syndrome". *Ann. Neurol*. 16 (4): 481—8.
8. Hirano M, Pavlakis SG (January 1994). "Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS): current concepts". *J. Child Neurol*. 9 (1): 4—13.

## 22.6.6. Болезнь Ли (Болезнь Лея, подострая некротическая энцефаломиопатия)

Болезнь Ли (болезнь Лея, подострая некротическая энцефаломиопатия) описана английским патологоанатомом A.D. Leigh) - наследственное заболевание из группы митохондриальных энцефаломиелопатий.

Синдром Ли представляет собой прогрессирующее нейродегенеративное расстройство раннего начала с характерной невропатологией, состоящей из фокальных двусторонних поражений в одной или нескольких областях центральной нервной системы, включая головной мозг, таламус, базальные ганглии, мозжечок и спинной мозг. Поражениями являются области демиелинизации, глиоза, некроза, спонгиоза или пролиферации капилляров. Клинические симптомы зависят от того, какие области центральной

нервной системы задействованы. Наиболее распространенной основной причиной является дефект окислительного фосфорилирования (Dahl, 1998).

Впервые данное состояние было описано в 1951 году английским психиатром Деннисом Ли, который определил его как наследственный вариант энцефаломиелопатии. Дальнейшие исследования показали, что синдром Ли является крайне гетерогенным состоянием с точки зрения этиологии – его причиной становятся дефекты множества генов, расположенных на аутосомах, X-хромосоме и митохондриальной ДНК. По этой причине механизм наследования заболевания может быть (в зависимости от характера мутации) аутосомно-рецессивным, сцепленным с полом или митохондриальным. Из-за разнообразия генетических дефектов, являющихся причиной синдрома Ли, различается и половое распределение этого состояния, однако, по мнению многих врачей-генетиков, в целом можно считать, что оно в равной степени поражает как мальчиков, так и девочек. Встречаемость составляет ориентировочно 1 случай на 34-36 тысяч новорожденных.

Синдром Ли может быть признаком дефицита любого из митохондриальных комплексов дыхательной цепи: дефицит комплекса I (252010), дефицит комплекса II (252011), дефицит комплекса III (124000), дефицит комплекса IV

Симптомы этой патологии, как правило, проявляются еще в раннем детстве, к ним относят мышечную гипотонию, проблемы со вскармливанием и задержку психомоторного развития. При дальнейшем прогрессировании заболевания возникают эпилептические припадки, гиперкинезы, дыхательные расстройства. Диагностика синдрома Ли осуществляется на основании данных настоящего статуса больного, магнитно-резонансной томографии, молекулярно-генетических анализов. Специфического лечения данной патологии не существует, симптоматическая терапия лишь незначительно замедляет прогрессирование заболевания.

DiMauro и De Vivo (1996) проанализировали генетическую гетерогенность синдрома Ли и отметили, что множественные дефекты были связаны с мутациями в PDHA1, мутациями в гене митохондриального MTATP6 и дефектами в комплексе IV. Таким образом, существует по меньшей мере 3 основных причины синдрома Ли, каждый из которых передается определенным способом наследования: X-связанный рецессивный, митохондриальный и аутосомно-рецессивный. Рахман и др. (1996); Morris et al. (1996). Grafakou et al. (2003) идентифицировали гетерозиготность соединения мутаций в гене DLD dihydroliipoamide dehydrogease(238331.0007 и 238331.0008).

### Литература

1. Dahl, H.-H. Getting to the nucleus of mitochondrial disorders: identification of respiratory chain-enzyme genes causing Leigh syndrome. (Editorial) *Am. J. Hum. Genet.* 63: 1594-1597, 1998. DiMauro, S., De Vivo, D. C. Genetic heterogeneity in Leigh syndrome. (Letter) *Ann. Neurol.* 40: 5-7, 1996.
2. Rahman, S., Blok, R. B., Dahl, H.-H. M., Danks, D. M., Kirby, D. M., Chow, C. W., Christodoulou, J., Thorburn, D. R. Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Ann. Neurol.* 39: 343-351, 1996.
3. Morris, A. A. M., Leonard, J. V., Brown, G. K., Bidouki, S. K., Bindoff, L. A., Woodward, C. E., Harding, A. E., Lake, B. D., Harding, B. N., Farrell, M. A., Bell, J. E., Mirakhur, M., Turnbull, D. M. Deficiency of respiratory chain complex I is a common cause of Leigh disease. *Ann. Neurol.* 40: 25-30, 1996.



4. Grafakou, O., Oexle, K., van den Heuvel, L., Smeets, R., Trijbels, F., Goebel, H. H., Bosshard, N., Superti-Furga, A., Steinmann, B., Smeitink, J. Leigh syndrome due to compound heterozygosity of dihydrolipoamide dehydrogenase gene mutations: description of the first E3 splice site mutation. *Europ. J. Pediat.* 162: 714-718, 2003.

### 22.6.7. Синдром Лебера

**Наследственная оптическая нейропатия LHON Лебера**, или **атрофия зрительного нерва Лебера**, является наследственной (передаётся от матери к потомству) митохондриальной дегенерацией ганглионарных клеток (РСК) сетчатки и их аксонов, что приводит к острой или почти острой потере центрального зрения. Синдром Лебера наблюдается у молодых мужчин. В течение нескольких недель у них развиваются безболезненное резкое снижение остроты зрения и центральная скотома (темнота-ограниченный слепой участок) в одном глазу, а через несколько недель или месяцев - во втором. В остром периоде диск зрительного нерва выглядит полнокровным с поверхностными капиллярными телеангиэктазиями, однако по данным флюоресцентной ангиографии проницаемость сосудов не изменена. В последующем развивается атрофия зрительных нервов.

Синдром Лебера (одна из наследственных атрофий зрительных нервов) - первая из болезней человека, при которой были обнаружены наследственные точечные мутации митохондриальной ДНК. Обнаружены мутации по меньшей мере 8 генов, среди них преобладают мутации генов, кодирующих субъединицы комплекса I дыхательной цепи, но встречаются также мутации генов, кодирующих субъединицы комплекса IV. В небольшой части семей расстройства зрения сочетаются с дистонией в результате дегенерации базальных ядер. Уоллас с сотр. установили, что синдром Лебера связан с заменой 11778-го нуклеотида митохондриального гена, кодирующего 4-ю субъединицу комплекса I дыхательной цепи. В последующем были обнаружены и другие мутации, ведущие к этой болезни. В большинстве случаев они затрагивают митохондриальные гены, кодирующие белки, которые участвуют в переносе электронов в дыхательной цепи MT-ND1, MT-ND4, MT-ND4L и MT-Nd6.[ OMIM 535000], мембранную часть белка НАДН-дегидрогеназы, участвующего в нормальной митохондриальной функции окислительного фосфорилирования. Выявлены миссенс мутации с заменами нуклеотидов в положении 11778 G на A, 3460 G на A и 14484 T на C, соответственно, в ND4, ND1 и Nd6 субъединицах генов в комплексе I окислительного фосфорилирования в митохондриях.

Возраст начала заболевания немного выше у женщин, (диапазон 19-55 лет: в среднем 31,3 лет), чем мужчин (диапазон 15-53 лет: в среднем 24,3 года). Соотношение между мужчинами и женщинами колеблется в зависимости от мутаций: 3: 1 для 3460 G>A, 6: 1 для 11 778 G>A и 8: 1 для 14484 T>C.

Распространённость заболевания в Европе составляет от 1: 30000 до 1: 50000. Мутация LHON ND4 G11778A доминирует в качестве основной мутации в большинстве стран мира, в 70 % случаев в странах Северной Европы и в 90 % случаев в азиатских странах. Мутация T14484C ND6 наблюдается в 86 % случаев LHON в Квебеке, Канада, что предполагает эффект основателя.[Laberge AM, Jomphe M, Houde L, et al. (2005)].

Более 50 процентов мужчин и более 85 процентов женщин несмотря на мутации в этих генах имеют нормальное зрение. Конкретный тип мутации может предсказать вероятность пенетрантности, тяжесть заболевания и вероятность восстановления зрения у пострадавших. Риск появления больного сына у женщин с основной LHON мутацией составляет ~ 40 %, а риск появления больной дочери равен ~ 10 % .

#### **Митохондриальные болезни: лечение**

Основу лечения составляют препараты, усиливающие активность ферментов дыхательной цепи, предшественники коферментов либо искусственные заменители переносчиков электронов в дыхательной цепи. Назначают убидекаренон, активирующий синтез АТФ и являющийся антиоксидантом, однако данных о его эффективности мало. В отдельных случаях на фоне лечения отмечено улучшение зрения и снижение концентрации лактата. Применяют также менадион, никотинамид, тиамин, рибофлавин и левокарнитин, миноциклин, куркумин, глутатион, фототерапию инфракрасного излучения, и методы генотерапии с использованием вирусного вектора.

«Экстракорпоральное оплодотворение с использованием яйцеклетки третьего лица» возможно приведет к разработке концепции исследовательских методов для предотвращения митохондриальной болезни в развитии человеческого плода. До сих пор, были произведены жизнеспособные макаки. Но препятствия этического и познавательного характера останавливают использование этого метода на людях.

#### **Литература**

1. Scarpulla R.C. (2006). «Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells». *J Cell Biochem.* 97 (4): 673-683.
2. Finsterer J (2007). «Hematological manifestations of primary mitochondrial disorders». *Acta Haematol.* 118 (2): 88–98.
3. Elliott HR, Samuels DC, Eden JA, Relton CL, Chinnery PF (August 2008). «Pathogenic mitochondrial DNA mutations are common in the general population». *Am. J. Hum. Genet.* 83 (2): 254–60.
4. Tanaka M, Nishigaki Y, Fuku N, Ibi T, Sahashi K, Koga Y (2007). «Therapeutic potential of pyruvate therapy for mitochondrial diseases».
1. Hinttala, R., Smeets, R., Moilanen, J. S., Ugalde, C., Uusimaa, J., Smeitink, J. A. M., Majamaa, K. Analysis of mitochondrial DNA sequences in patients with isolated or combined oxidative phosphorylation system deficiency. (Letter) *J. Med. Genet.* 43: 881-886, 2006.
5. Laberge AM, Jomphe M, Houde L, et al. (2005). «A “Fille du Roy” Introduced the T14484C Leber Hereditary Optic Neuropathy Mutation in French Canadians». *Am. J. Hum. Genet.* 77 (2): 313-7. DOI:10.1086/432491. PMID 15954041.
6. Hudson G, Carelli V, Horvath R, Zeviani M, Smeets HJ, Chinnery PF (2007). «X-Inactivation patterns in females harboring mtDNA mutations that cause Leber hereditary optic neuropathy». *Mol. Vis.* 13: 2339-43. PMID 18199976.
7. Qi X, Sun L, Hauswirth WW, Lewin AS, Guy J (February 2007). «Use of mitochondrial antioxidant defenses for rescue of cells with a Leber hereditary optic neuropathy-causing mutation». *Arch. Ophthalmol.* 125 (2): 268–72. DOI:10.1001/archophth.125.2.268. PMID 17296905.
8. Ghelli A, Porcelli AM, Zanna C, Martinuzzi A, Carelli V, Rugolo M (February 2008). «Protection against oxidant-induced apoptosis by exogenous glutathione in Leber hereditary optic neuropathy cybrids». *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49 (2): 671–6. DOI:10.1167/iovos.07-0880. PMID 18235013.
9. GeneTests LHON search

10. Klopstock, T.; Yu-Wai-Man, P., Dimitriadis, K., Rouleau, J., Heck, S., Bailie, M., Atawan, A., Chattopadhyay, S., Schubert, M., Garip, A., Kernt, M., Petraki, D., Rummey, C., Leinonen, M., Metz, G., Griffiths, P. G., Meier, T., Chinnery, P. F. (25 July 2011). «A randomized placebo-controlled trial of idebenone in Leber's hereditary optic neuropathy». *Brain* 134 (9): 2677. DOI:10.1093/brain/awr170.

11. Shrader W. D., Amagata A., Barnes A., Enns G. M., Hinman A., Jankowski O., Kheifets V., Komatsuzaki R., Lee E., Mollard P., Murase K., Sadun A. A., Thoolen M., Wesson K., Miller G.  $\alpha$ -Tocotrienol quinone modulates oxidative stress response and the biochemistry of aging. (англ.) // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. — 2011. — Vol. 21, no. 12. — P. 3693—3698. — DOI:10.1016/j.bmcl.2011.04.085. — PMID 21600768. исправить

12. Haroon MF, Fatima A, Scholer S, et al. (2007). «Minocycline, a possible neuroprotective agent in Leber's hereditary optic neuropathy (LHON): Studies of cybrid cells bearing 11778 mutation». *Neurobiol Dis* 28 (3): 237–50. DOI:10.1016/j.nbd.2007.07.021. PMID 17822909

13. Craven L, Tuppen HA, Greggains GD, Harbottle SJ, Murphy JL, Cree LM, Murdoch AP, Chinnery PF, Taylor RW, Lightowers RN, Herbert M, Turnbull DM (May 2010). «Pronuclear transfer in human embryos to prevent transmission of mitochondrial DNA disease». *Nature* 465 (7294): 82–85. DOI:10.1038/nature08958. PMID 20393463.

### Контрольные вопросы

1. Какие дефекты и симптомы характерны для наследственных болезней нервной системы?
1. Какие дефекты и симптомы характерны для митохондриальных болезней?
2. Какие нарушения в митохондриальных генах приводят к патологии?
3. Какие синдромы связаны с повреждениями митохондриальной и ядерной ДНК?
4. Какие мутации приводят к синдрому КЕРНСА-СЕЙРА и синдрому Пирсона?
5. Дефицит каких комплексов дыхательной цепи могут вызывать синдромы MERRF, MELAS, Ли и Лебера?

## 22.7. ПРИОННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ (трансмиссивные губчатые энцефалопатии)

**Pierluigi Gambetti, MD, Professor of Pathology, Case Western Reserve University**

Прионные болезни представляют собой прогрессирующие дегенеративные, неизлечимые и в конечном итоге летальные поражения головного мозга. Известные типы включают:

- Болезнь Крейтцфельда–Якоба (БКЯ), основной подтип
- Вариант БКЯ (вБКЯ)
- Варибельная протеазно-чувствительная прионопатия (VPSPr)
- Синдром Герстманна–Штройслера–Шейнкера (ГШШ)
- Фатальная инсомния
- Куру

Недавно были идентифицирована новая прионовая болезнь, предварительно названная прионовой болезнью, связанной с диареей и автономной нейропатией.

Прионные болезни возникают в результате структурного изменения нормального клеточного мембранного белка, который называют прионным белком (PrP<sup>C</sup>), чья точная функция неизвестна. Белки прионов с неправильной конформацией называются прионами или скрепи PrP (PrP<sup>Sc</sup> от названия прототипической прионной болезни овец).

Прионы (PrP<sup>Sc</sup>) являются патогенными и часто заразными. Они вызывают прионную болезнь благодаря

- Репликации: PrP<sup>Sc</sup> индуцирует конформационные превращения PrP<sup>C</sup>, с созданием дубликатов PrP<sup>Sc</sup>, которые при цепной реакции вызывают дальнейшее превращение PrP<sup>C</sup> в PrP<sup>Sc</sup>. Этот процесс преобразования распространяется на различные области головного мозга.

- Дегенерации ЦНС

Большой процент PrP<sup>Sc</sup> заметно устойчив к разрушению (аналогично β-амилоиду, который он напоминает), что приводит к их медленной клеточной аккумуляции и гибели нейронов. Постепенное накопление прионов вызывает глиоз и характерные вакуолярные (спонгиформные) гистологические изменения, приводящие к развитию деменции и другим видам неврологических расстройств. Субъективные и объективные симптомы заболевания формируются на протяжении многих месяцев и лет после первоначального заражения PrP<sup>Sc</sup>.

Возникает прионная болезнь

- Sporадически (по-видимому, начинаясь спонтанно, без известной причины)
- Генетически (наследуется)
- Через инфекционную передачу

**Спорадические прионные болезни** являются наиболее распространенными, с ежегодной заболеваемостью в мировом масштабе 1 случай на 1 млн населения.

**Семейные прионные заболевания** вызваны дефектами в гене *PrP*, который содержится в коротком плече хромосомы 20. Генетические мутации, вызывающие прионные болезни являются аутосомно-доминантными, т.е. они могут вызывать болезнь при наследовании только от одного родителя. Кроме того, пенетрантность является вариабельной в зависимости от типа мутации. Некоторые дефекты вызывают семейную болезнь Крейтцфельда Якоба, некоторые являются причиной синдрома Герстмана-Штреусслера-Шейнкера, а другие вызывают спорадическую фатальную инсомнию (СФИ), семейную форму фатальной бессонницы. Незначительные аномалии в определенных кодонах (нуклеотидные последовательности, которые являются строительными блоками генов) обуславливают клиническую картину и скорость прогрессирования заболевания.

**Инфекционно передаваемые прионные заболевания** являются редкими. Они могут передаваться

- От человека к человеку: ятрогенно, при пересадке органов и тканей, при использовании загрязненных хирургических инструментов или, реже, при переливании крови (как в случае заражения вБКЯ); или с помощью каннибализма (как в случае заражения куру)

- От животного к человеку: через питание зараженным мясом (как в случае заражения вБКЯ)

Для прионных болезней нет подтвержденных данных, насколько заразен случайный контакт человека с человеком.

Прионные болезни присущи многим млекопитающим (например, норкам, лосям, оленям, домашним овцам и крупному рогатому скоту) и могут передаваться между

видами через пищевую цепь. Тем не менее, передача от животных к человеку наблюдается только при вБКЯ, после того как люди употребляли говядину, полученную от крупного рогатого скота, больного губкообразной энцефалопатией крупного рогатого скота (ГЭКРС или коровьего бешенства). В нескольких западных штатах США и Канаде существуют опасения, что хроническая изнуряющая болезнь (ХИБ), прионовая болезнь лосей и оленей, может передаваться мясникам, людям, которые охотятся или принимают в пищу мясо зараженных животных. Тем не менее, передача ХИБ от животных к человеку не была бы возможной, если бы ХИБ не передавалась от животного к животному несколько раз (как может произойти в дикой природе), ослабляя барьер между видами.

Прионные заболевания следует исключать у пациентов с деменцией, особенно если она быстро прогрессирует.

### **Лечение прионных болезней**

- Поддерживающая терапия

Не существует методов лечения прионных болезней. Лечение поддерживающее.

Следует поощрять пациентов для подготовки передачи другому лицу прав по принятию важных медицинских решений в случае утраты дееспособности (например, предпочтительный уход за пожилыми и неизлечимо больными людьми) вскоре после диагностирования болезни.

Для членов семьи пациентов с семейным анамнезом прионовой болезни может быть рекомендовано генетическое консультирование.

### **Профилактика прионных болезней**

Прионы не восприимчивы к стандартным методам дезинфекции и могут представлять опасность для других пациентов и хирургов, патологоанатомов или лаборантов, которые контактируют с зараженными тканями или инструментарием.

Заражение можно предупредить, соблюдая меры предосторожности при работе с инфицированными тканями и используя соответствующие методики для очистки контаминированного инструментария. Рекомендуется одна из следующих процедур:

- Обработка паром при автоклавировании материалов при 132° С в течение 1 ч
- Погружение их в 1Н (нормальный) раствор гидроксида Na или 10% раствор гипохлорита Na в течение 1 ч

### **Болезнь Крейтцфельда-Якоба (БКЯ)**

(подострая губкообразная энцефалопатия; болезнь Крейтцфельда-Якоба)

#### **Pierluigi Gambetti, MD, Professor of Pathology, Case Western Reserve University**

Болезнь Крейтцфельда-Якоба (БКЯ) является наиболее распространенной человеческой прионной болезнью. Она наблюдается во всем мире и имеет несколько форм. Симптомы БКЯ включают в себя слабоумие, миоклонус и другие патологии ЦНС; смерть обычно происходит между 4 месяцами и 2 годами после заражения, в зависимости от формы БКЯ. Лечение поддерживающее.

БКЯ имеет несколько форм:

- Спорадическая (сБКЯ)
- Внутрисемейные контакты
- Приобретенные

**сБКЯ** является наиболее распространенным типом, на который приходится около 85% случаев. сБКЯ обычно проявляется у пациентов в возрасте >40 лет (медиана – около 60 лет).

**Семейная БКЯ** диагностируется в около 5 до 15% случаев. Наследование аутосомно-доминантное, возраст начала заболевания, как правило, раньше, чем при сБКЯ с большей длительностью заболевания.

**Приобретенная БКЯ**, вероятно, объясняет < 1% случаев. Это произошло после употребления в пищу говядины, зараженной прионами (при вБКЯ). Ятрогенно БКЯ может передаваться путем трансплантации трупной роговицы или твердой мозговой оболочки, при использовании стереотаксических интратекальных электродов или применении гормона роста, приготовленного из гипофиза человека.

### **Вариантная БКЯ (вБКЯ)**

#### **Клинические проявления**

Приблизительно у 70% пациентов, заболевших БКЯ, выявляются нарушение памяти, внимания и изменение поведения, которые в конечном счете развиваются у всех пациентов; у 15–20% отмечается расстройство координации и атаксия, которые часто появляются на ранних стадиях заболевания. На более поздних стадиях могут возникнуть миоклонические судороги, вызываемые громким звуком (миоклония при испуге) или другими сенсорными стимулами. У людей с вБКЯ диагностируются психические симптомы (например, тревога, депрессия), а не потеря памяти. Более поздние симптомы похожи при обеих формах.

Помимо наиболее характерных для БКЯ деменции, атаксии и миоклонических судорог могут появиться и другие неврологические расстройства (например, галлюцинации, эпилептиформные припадки, нейропатия, различные двигательные нарушения).

При сБКЯ часто встречаются зрительные нарушения (например, дефекты поля зрения, диплопия, затуманенность или нечеткость зрения, зрительная агнозия).

#### **Диагностика**

- Диффузионно-взвешенная МРТ
- Маркеры ЦСЖ
- Исключение других причин

БКЯ следует подозревать при быстро прогрессирующей деменции у пожилых лиц, особенно при наличии миоклонических судорог или атаксии. Тем не менее, другие расстройства могут имитировать БКЯ и тоже должны рассматриваться; они включают

- Васкулит ЦНС
- Быстро прогрессирующая болезнь Альцгеймера
- Энцефалопатия Хашимото (аутоиммунная энцефалопатия, характеризующаяся высоким уровнем тиреоидных антител и реагирующая на кортикостероиды)
- Внутрисосудистая лимфома (редкая лимфома)
- Энцефалит, влияющий на лимбическую систему, ствол головного мозга и мозжечка
- Деменция с тельцами Леви
- Интоксикация литием или висмутом.

БКЯ подозревается у симптоматических молодых пациентов, когда они были

подвержены воздействию прионов, находящихся в зараженной говядине, в Великобритании или других подверженных риску странах или если у них есть семейный анамнез заболеваемости БКЯ (семейная БКЯ). Редко сБКЯ развивается у молодых пациентов, но у таких пациентов должны быть исключены другие заболевания.

Диагностика может быть затруднена.

Лучшим неинвазивным диагностическим тестом для БКЯ является

- Диффузионно-взвешенная МРТ

Она может обнаружить развивающиеся очаговые области гиперинтенсивности (яркие участки) в корковом слое, которые убедительно свидетельствуют о БКЯ.

Концентрации белков 14-3-3, нейрон-специфической енолазы и тау в спинномозговой жидкости обычно увеличены, но не являются специфичными для БКЯ. Относительно новый тест ЦСЖ, называемый индуцированной вибрацией конверсией в режиме реального времени (RT-QUIC), амплифицирует и обнаруживает минимальное количество активности прионов (конформационные изменения PrP<sup>C</sup> в PrP<sup>Sc</sup>) в ЦСЖ. Этот тест может оказаться более точным, чем предыдущие тесты ЦСЖ. Подобный тест может надежно обнаруживать доказательства вБКЯ путем выявления прионов в моче.

Была выполнена ЭЭГ. Результаты являются положительными примерно для 70% пациентов с БКЯ. ЭЭГ показывает характерные периодические острые волны, но эта картина, как правило, возникает в конце заболевания и может быть временной. Биопсии мозга обычно не требуется.

Летальный исход наступает через 6–12 мес, чаще всего вследствие пневмонии. Продолжительность жизни при БКЯ несколько выше (в среднем 1,5 г.).

Для БКЯ не существует лечения. Лечение поддерживающее.

### **Профилактика**

Поскольку не существует эффективного лечения, жизненно необходимы мероприятия по профилактике трансмиссивной БКЯ.

Сотрудники, контактирующие с биологическими жидкостями и тканями больных с подозрением на БКЯ, должны работать в перчатках и избегать контакта зараженного материала со слизистыми оболочками. При попадании зараженного материала на кожу сначала проводят ее дезинфекцию 4% раствором гидроксида натрия в течение 5-10 мин, затем промывают под проточной водой.

Для обеззараживания материалов и инструментов рекомендуется автоклавирование при 132 °С в течение 1 ч или стерилизация в 1Н (нормальном) растворе гидроксида натрия или 10% растворе гипохлорида натрия в течение 1 ч. Стандартные методы стерилизации (например, обработка формалином) неэффективны.

Министерством сельского хозяйства США проводится в настоящее время проверка от 2000 до 5000 единиц крупного рогатого скота в месяц на предмет ГЭКРС. В 2004 г после возникновения случая ГЭКРС в США это число составляло порядка 1000 голов крупного рогатого скота в день, но позже тестирование было сокращено до 40000 / год (0,1% от количества забитого крупного рогатого скота).

### **Варибельная протеаза-чувствительная прионопатия (VPSPr)**

**Pierluigi Gambetti, MD, Professor of Pathology, Case Western Reserve University**

Варибельная протеаза-чувствительная прионопатия (VPSPr) является редкой прионовой болезнью (определенной в 2008 году).

VPSPr диагностируется у 2-3 на 100 миллионов человек.

VPSPr напоминает болезнь Герстманна-Штраусслера-Шейнке (ГШШ) с точки зрения особенностей аномального белка приона (PrP<sup>Sc</sup>). Однако, в отличие от ГШШ в гене прионного белка не было определено никаких мутаций.

Клинические проявления отличаются от БКЯ, а PrP<sup>Sc</sup> менее устойчивы к перевариванию протеазами; некоторые варианты более чувствительны к действию протеаз, чем другие, отсюда и название: варьибельные протеаза-чувствительные.

Пациенты страдают настоящими психиатрическими симптомами, расстройством речи (афазия и/или дизартрия), и когнитивными нарушениями. Могут развиваться атаксия и паркинсонизм. Средний возраст начала заболевания составляет 70 лет, а продолжительность выживания составляет 24 мес. Около 40% пациентов имеют отягощенный семейный анамнез по деменции.

Диагностика затруднена. МРТ, ЭЭГ и тесты на определение 14-3-3 белка и тау обычно не приносят пользы, и в кодирующей области гена PrP не наблюдалось никаких мутаций.

При варьибельной протеаза-чувствительной прионопатии проводится только поддерживающее лечение.

### **Синдром Герстманна–Штройслера–Шейнкера (ГШШ); (Герстманна-Штраусслера-Шейнкера заболевания).**

**Кем: Pierluigi Gambetti, MD, Professor of Pathology, Case Western Reserve University**

Синдром Герстманна–Штройслера–Шейнкера (ГШШ) является прионным заболеванием головного мозга, которое наследуется по аутосомно-доминантному типу и обычно развивается в среднем возрасте.

Синдром ГШШ встречается повсеместно и в общем заболеваемость ГШШ примерно в 100 раз ниже заболеваемости БКЯ. Заболевание развивается в более молодом возрасте (в 40 лет по сравнению с 60), и средняя продолжительность жизни после дебюта заболевания превышает таковую при БКЯ (5 лет по сравнению с 6 мес).

У больных развивается мозжечковая атаксия, дизартрия и нистагм. Могут присоединиться парез зрения, глухота, деменция, гипорефлексия и патологические подошвенные рефлексы. Миоклонические судороги встречаются гораздо реже, чем при БКЯ.

При наличии характерных симптомов и семейного анамнеза у лиц молодого возраста ( $\leq 45$  лет) более вероятен синдром ГШШ. Диагноз подтверждается данными генетического исследования.

Существует только поддерживающее лечение ГШШ.



**Фатальная инсомния****(фатальная семейная инсомния)****Pierluigi Gambetti, MD, Professor of Pathology, Case Western Reserve University**

Фатальная инсомния является редким наследственным или спорадическим прионным заболеванием, вызывающим нарушения сна, двигательные расстройства и вызывающая летальный исход.

Фатальная инсомния обычно связана с аутосомно-доминантной мутацией, однако было зарегистрировано несколько спорадических случаев.

Средний возраст дебюта заболевания составляет около 40 лет (от 20 до 60 лет). Продолжительность жизни составляет 7-73 месяца.

Ранние симптомы со фатальной инсомнии включают возрастающие трудности с засыпанием и поддержанием сна, а также снижением когнитивных способностей, атаксией и психиатрическими симптомами. Симпатическая гиперактивность (например, гипертонзия, тахикардия, гипертермия, потливость) может произойти позже.

Следует рассматривать заболеваемость фатальной инсомнией, когда у пациентов наблюдаются быстро прогрессирующие когнитивные нарушения, сопровождаются поведенческими изменениями или сменами настроения, атаксией, нарушениями сна. Подозрение на спорадическую фатальную инсомнию должны способствовать проведению исследований сна методом полисомнографии. Генетическое исследование может подтвердить диагноз семейной формы. МРТ и измерения уровня 14-3-3 белка и тау в ЦСЖ не являются полезными, но использование полисомнографии и ПЭТ (который показывает гипометаболизм зрительного бугра) может подтвердить диагноз.

При фатальной инсомнии существует только поддерживающее лечение.

**Куру****Pierluigi Gambetti, MD, Professor of Pathology, Case Western Reserve University**

Куру является редким прионовым заболеванием головного мозга эндемичным на Папуа-Новой Гвинее, и как считается, распространяемым благодаря ритуальному каннибализму.

Хотя последние ритуалы, связанные с каннибализмом, закончились в 1950-х годах, в период между 1996 и 2004 были зарегистрированы 11 новых случаев куру, предполагается, что его инкубационный период может превышать 50 лет.

Симптомы куру начинаются с тремора (напоминающего дрожь) и атаксии. Позже, после появления деменции, развиваются двигательные расстройства, такие как хореоатетоз, фасцикуляций и миоклонус.

Тестирование ЦСЖ не являются полезными. Есть сообщения о других результатах тестирования. В гене PrP диагностические аномалии выявлены не были. Вскрытие может показать типичные бляшки, содержащие PrPSc, с наибольшей плотностью в мозжечке.

Смерть обычно наступает в течение 2 лет после появления симптомов; причиной смерти, как правило, являются пневмония или инфекция, вызванная пролежнями.

В случае заболевания куру существует только поддерживающее лечение.

**Прионное заболевание, связанное с диареей и вегетативной нейропатией**  
**Pierluigi Gambetti, MD, Professor of Pathology, Case Western Reserve University**

Прионная болезнь, связанная с диареей и автономной нейропатией, описывает новую прионовую болезнь что проявляется симптомами вегетативной, а не центральной нервной системы.

Это заболевание было идентифицировано в 2013 году в расширенной британской семье и еще не было официально названо.

Это заболевание отличается от других прионовых заболеваний, потому что прионовые амилоиды не ограничивается ЦНС, а распределяется в периферических нервах и внутренних органах; таким образом, периферические симптомы преобладают на начальном этапе, и симптомы, характерные для ЦНС, возникают поздно.

Это связано с новыми мутациями в гене приона (мутация Y163X), что приводит к усечению мутантного прионного белка; таким образом, у мутантного белка отсутствует якорь, который, как правило, связывает прионовый белок с клеточными мембранами, по-видимому благоприятствуя прионовым белкам, плавающим в жидкостях тела и мигрирующим в другие ткани.

Это новая болезнь прионов показывает, что новая мутация может радикально изменить участки, где оседают аномальные белки, и симптомы, которые они вызывают, и это свидетельствует о том, что диагностику прионовой болезни следует рассматривать у больных с необъяснимой хронической диареей и невропатией или с необъяснимым синдромом аналогичной семейной амилоидной полинейропатией.

Симптомы проявляются в раннем взрослом возрасте; они включают в себя хронический водянистый понос, вегетативную недостаточность (например, задержку мочи, недержание мочи, ортостатическую гипотензию), и, прежде всего, сенсорную периферическую полинейропатию. Проявляются снижение когнитивных способностей и судорожные приступы у пациентов в возрасте 40-50 лет.

Болезнь прогрессирует в течение десятилетий, после появления симптомов пациенты могут жить до 30 лет.

Для этого заболевания существует только симптоматическое лечение.

## **22.8. Нервные болезни: генодиагностика, введение**

По мере реализации международной научной программы «Геном человека» стремительно росли знания о генах, вызывающих болезни нервной системы. Все большая доступность молекулярно-генетических исследований изменила сложившиеся подходы к диагностике многих болезней, одновременно породив новые этические проблемы. К примеру, с открытием генов «предрасположенности», не являющихся непосредственной причиной болезни, но влияющих на возраст ее начала и течение, возникли определенные трудности в использовании данных генодиагностики, например для выбора профилактических мероприятий.

### **Нервные болезни: методы генодиагностики, общие сведения**

Чтобы правильно использовать в клинической практике молекулярно-генетические методы, необходимо иметь представление о принципах этих методов. Для большинства

болезней, перечисленных в табл. 22.1, установлено местоположение на хромосоме вызывающих их генов, но далеко не для всех известен мутантный ген и характер мутации. При некоторых болезнях для проведения генодиагностики, в том числе на доклинической стадии, можно использовать анализ сцепления генов в семье. Необходимыми условиями при этом являются: достаточное число доступных для генотипирования членов семьи, четкая постановка клинического диагноза, точное установление родства (в частности, отцовства), а также наличие информативных генетических маркеров. Эти требования ограничивают возможность анализа.

### 22.8.1. Болезнь Альцгеймера: введение

Впервые это заболевание было описано профессором Алоисом Альцгеймером в Германии в 1907 г. у 55-летней женщины. Сначала его считали относительно редкой формой пресенильной деменции. Однако со временем оказалось, что болезнь Альцгеймера может начинаться у взрослых в любом возрасте и является самой частой причиной деменции у пожилых.

Это нейродегенеративное заболевание названо в честь немецкого психиатра Алоиса Альцгеймера, который дал первое описание главных гистопатологических признаков болезни: накопление амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков в тканях головного мозга [ Alzheimer ea 1907 ]. БА является главной причиной деменций людей среднего и пожилого возраста.

Заболевание имеет характерные клинические и патологоанатомические признаки. Клинически болезнь Альцгеймера обычно характеризуется исподволь развивающимся снижением памяти с последующей медленно прогрессирующей (в течение нескольких лет) деменцией. Патологоанатомически заболевание отличается выраженной диффузной атрофией коры головного мозга и вторичным расширением желудочков. При микроскопическом исследовании в межклеточном веществе головного мозга находят так называемые амилоидные бляшки, содержащие бета-амилоидный белок. При серебрении в цитоплазме нейронов видны нейрофибриллярные включения. Бета-амилоидный белок накапливается и в стенке церебральных артерий. Клинические симптомы начинаются с незначительных нарушений памяти на недавние события и снижения когнитивных способностей. В течение нескольких последующих лет прогрессирующее ухудшение памяти, интеллекта и атрофия неокортекса приводят к полному распаду личности и фатальному исходу, как правило, от различного рода осложнений, например, легочной пневмонии.

Как и при большинстве распространенных сложных заболеваний, при болезни Альцгеймера наблюдается весьма широкая клиническая гетерогенность симптомов. Эту болезнь следует также отличать от других, более редких деменций: лобнофронтальной, болезни Пика, болезни Хантингтона, а также цереброваскулярных деменций. Точный диагноз болезни Альцгеймера может быть установлен только на основе гистопатологического исследования постмортального материала.

Диагностическим критерием БА является совокупность признаков, а именно:

1) накопление так называемых амилоидных бляшек (конгломерата труднорастворимых клеточных белков), в частности, в кровеносных сосудах головного мозга;

2) внутриклеточные нейрофибриллярные клубки;

3) массовая гибель нейронов, особенно в участках гиппокампа и височных долях коры головного мозга, ответственных за хранение и механизмы активной обработки памяти.

Обнаружение четырех различных генов, ответственных за развитие болезни Альцгеймера, создает основу для быстрого развития представлений о биологических основах этого заболевания.

### **Болезнь Альцгеймера: роль генетических факторов**

Генетическая предрасположенность является четко установленным фактором риска болезни Альцгеймера. Более того, показано, что БА включает в себя несколько генетически гетерогенных форм, объединенных сходными клиническими и гистопатологическими признаками. Причиной или фактором риска развития некоторых (если не всех) форм БА являются мутации или полиморфизмы в ряде генов.

Прорывом в понимании этиологии БА явилось использование генетических подходов. Интенсивные эпидемиологические исследования позволили выявить родословные, в которых БА характеризуется ранним началом (моложе 65 лет) и моногенным аутосомнодоминантным характером наследования. При более распространенных поздних формах БА (у людей старше 65 лет) также очевидна роль генетических факторов, проявление которых, однако, зависит и от воздействий среды [ Pericak-Vance ea 1995 , Rao ea 1995 ]. К настоящему времени обнаружено, по крайней мере, четыре гена, мутации в которых вызывают БА или являются факторами генетической предрасположенности:

- ген белка амилоидного предшественника (APP) на хромосоме 21 [ Goate ea 1991 ],
- ген аполиipoproteина E (ApoE) на хромосоме 19 [ Sounders ea 1993 ] и
- ген пресенилина-1 на хромосоме 14
- ген пресенилина-2 на хромосоме 1 [ Sherrington ea 1995 , Rogaev ea 1995 , Levi-Lahad ea 1995 ].

Первый ген и генетический дефект, вызывающий болезнь Альцгеймера, был обнаружен с использованием подхода, который сейчас относят к так называемому «функциональному клонированию». Было давно отмечено, что синдром наиболее распространенной врожденной умственной отсталости, синдром Дауна , с трисомией по 21-й хромосоме, у пациентов старше 35-40 лет также характеризуется гистопатологическими признаками, характерными для БА. Из этого было сделано предположение, что ген (или гены) на 21-й хромосоме мог бы играть решающую роль в нейродегенеративном процессе также при БА.

Действительно, в конце 70-х годов был выделен один из основных компонентов амилоидных бляшек, которые накапливаются в неокортексе . Выделенный пептид, названный Ap , как оказалось, состоит всего из 39-43 аминокислотных остатков и является протеолитическим фрагментом более длинного пептида, названного предшественником амилоида (APP) [ Kang ea 1987 , Lemaire ea 1989 ].

Ген APP был локализован на хромосоме 21 , что сделало его явным кандидатом для поиска мутаций при болезни Альцгеймера. Действительно, вскоре были обнаружены несколько миссенс-мутаций в экзонах 16, 17, части которых кодируют Ap-пептид [ Goate ea 1991 , Murrell ea 1991 , Chartier-Harlin ea 1991 ].

Последующий массовый скрининг родословных и спорадических случаев во мно-

гих лабораториях мира показал, однако, что мутации в APP могут объяснить причину БА только 3-5% всех родословных с ранним началом БА.

В родословных с поздним началом БА мутаций в этом гене не было найдено вовсе [ Tanzi ea 1992, Schellenberg ea 1991 ].

Впоследствии было установлено, что полиморфизм (e4-аллель) еще в одном гене, аполипопротеине ApoE , локализованном на хромосоме 19 , ассоциирован с некоторыми поздними и ранними формами БА [ Sounders ea 1993 , Poirier ea 1993 , Strittmater ea 1993 ]. Такой полиморфизм гена ApoE, однако, не является необходимым или достаточным условием БА и рассматривается в настоящее время как фактор риска, влияющий на начало развития деменции альцгеймеровского типа [ Bennett ea 1995 ].

Предполагалось, что наиболее вероятными другими генами-кандидатами при БА могли бы стать гены, кодирующие пептиды протеолиза APP белка, например, специфические а-, Р- или у-секретазы; белки, регулирующие синтез APP; белки нейрофибриллярных клубков (NFT) или киназы, регулирующие аномальное фосфорилирование отдельных компонентов NFT, например, tau- белков и т.д.

Значительным событием явилось обнаружение нового семейства генов, ответственных за БА, получивших название гены-пресенилины [ Sherrington ea 1995 , Rogaev ea 1995 ]. Важность открытия этих генов обусловлена тем, что были, во-первых, обнаружены принципиально новые, не предполагавшиеся ранее молекулярные компоненты нейропатологии БА, которые были выявлены «слепым» позиционным клонированием, не ориентированным на предыдущие «биохимические» модели болезни; во-вторых, идентифицированы генетические факторы, ответственные за наибольшее число случаев ранних семейных форм БА.

В начале 90-х годов для поиска новых хромосомных локусов, ответственных за болезнь Альцгеймера, был использован метод классического генетического сцепления с использованием случайных полиморфных маркеров ДНК. В значительной степени такой поиск был ускорен созданием генетических карт хромосом человека и накоплением нового поколения высокоинформативных микросателлитных маркеров (или STR-Simple Tandem Repeats).

Результатом широкомасштабного поиска локуса БА явилось обнаружение в 1992 г. несколькими научными группами участка на хромосоме 14, ответственного за семейные формы БА (FAD3).

Ген PSEN1 расположен на 14-й хромосоме и кодирует белок пресенилин-1 . Мутация этого гена вызывает болезнь Альцгеймера типа 3, которая наследуется аутосомно-доминантно с высокой пенетрантностью. В семьях с самой различной этнической принадлежностью выявлено более 20 мутаций гена PSEN1.

Ген PSEN2 расположен на 1-й хромосоме и кодирует белок пресенилин-2 . Мутация этого гена впервые была обнаружена у американских потомков немцев Поволжья.

Оба гена очень похожи и кодируют сходные белки. Сначала полагали, что эти белки имеют семь трансмембранных доменов, однако дальнейшие исследования показали, что число доменов равно восьми, а девятый располагается у внутренней стороны мембраны. Функция этих белков в норме, а также ее изменения, возникающие в результате мутации кодирующих их генов, неизвестны. Оба белка экспрессируются в нейронах и

широко распространены в нервной системе. По первичной структуре они похожи на белок sel12, участвующий в морфогенезе у нематоды *Caenorhabditis elegans*.

Мутации генов PSEN1 и PSEN2 сопровождаются повышением концентрации в плазме бета-амилоидного белка, состоящего из 42 аминокислотных остатков, что позволяет предположить взаимосвязь между пресенилинами и предшественником бета-амилоидного белка.

Доказано, что мутации гена PSEN1 - самая частая причина семейной болезни Альцгеймера с ранним началом, обуславливающая 70% случаев этой относительно редкой формы. Болезнь Альцгеймера типа 3, вызванная мутацией гена PSEN1, характеризуется более ранним началом (в среднем в 45 лет) и более быстрым прогрессированием (средняя продолжительность жизни больного 6-7 лет), чем болезнь Альцгеймера типа 4, вызванная мутацией гена PSEN2 (начало в среднем в 53 года; средняя продолжительность жизни 11 лет). При некоторых редких мутациях гена PSEN2 заболевание начинается после 70 лет.

Роль мутаций этих генов в патогенезе гораздо более частых спорадических форм болезни Альцгеймера с поздним началом не изучена.

В настоящее время разработана методика исследования ДНК клеток крови, позволяющая выявлять такие мутации; пока она применяется только в исследовательских работах. Обследование необходимо при генетическом консультировании лиц с высоким риском заболевания, но без признаков деменции.

Важной вехой стало открытие роли гена, кодирующего апопротеин E и расположенного на 19-й хромосоме, в развитии поздней семейной и спорадических форм болезни Альцгеймера. Апопротеин E участвует в транспорте холестерина. Ген апопротеина E имеет три аллеля: эпсилон2, эпсилон3 и эпсилон4, кодирующие соответственно изоформы E2, E3 и E4. Аллель эпсилон4 часто обнаруживают при спорадических и поздней семейной формах болезни Альцгеймера. Примерно 24-30% здоровых представителей белой расы имеют хотя бы один аллель эпсилон4, а около 2% - гомозиготны по нему. Среди больных болезнью Альцгеймера от 40 до 65% имеют по крайней мере один аллель эпсилон4 - иными словами, среди больных распространенность этого аллеля существенно выше, чем среди здоровых. С другой стороны, у многих больных аллель эпсилон4 отсутствует и, напротив, имеется у многих здоровых. То есть наличие аллеля эпсилон4 не является ни необходимым, ни достаточным условием болезни Альцгеймера, но служит важным фактором ее риска (особенно у гомозигот). Количество аллелей влияет на возраст начала заболевания: у гомозигот болезнь Альцгеймера начинается раньше. Причины этого не ясны.

Апопротеин E присутствует в амилоидных бляшках; он связывается с тау-белком и поэтому, возможно, участвует в образовании нейрофибриллярных включений. Апопротеин E4 подавляет рост нервных окончаний в культуре клеток спинномозговых ганглиев.

Полагают, что аллель эпсилон2 уменьшает риск болезни Альцгеймера, но эти данные не подтверждены. По непроверенным сведениям, носители аллеля эпсилон4 менее чувствительны к лечению такрином. Есть также данные о том, что аллель A гена альфа1-антихимотрипсина повышает риск болезни Альцгеймера у носителей аллеля эпсилон4.

Единого мнения о целесообразности исследования апопротеина E в диагностике

болезни Альцгеймера нет. У здоровых по результатам этого исследования нельзя судить о риске болезни Альцгеймера, поскольку у многих носителей аллеля эпсилон4 она не развивается. Однако у некоторых гомозиготных носителей аллеля эпсилон4 при позитронно-эмиссионной томографии обнаруживают снижение скорости обмена веществ в коре головного мозга. Некоторые считают эти изменения предвестниками болезни Альцгеймера. Высказывалось предположение, что гомозиготное состояние по аллелю эпсилон4 у пожилого больного с деменцией с вероятностью 96-98% свидетельствует о болезни Альцгеймера. Однако лишь небольшая часть больных гомозиготны по аллелю эпсилон4, и даже у них необходимо исключить обратимые причины деменции. Тем не менее апопротеин Е остается единственным важным биохимическим маркером болезни Альцгеймера.

Продолжается изучение роли апопротеина Е в патогенезе заболевания и его диагностическое значение. Необходимо исследовать взаимосвязь апопротеина Е с другими деменциями.

Показано, что наличие аллеля эпсилон4 не связано с деменцией при болезни Паркинсона и болезни Крейтцфельдта-Якоба .

### **Болезнь Альцгеймера: семейный, близнецовый и популяционный анализ**

Вклад генетических факторов в развитие заболевания можно определить различными способами. Один из наиболее простых - анализ родословных. В среднем, эмпирическая оценка риска развития БА для родственников первой степени родства составляет 3-14% [Breitner et al, 1984]. Другой метод, использующийся для генетического анализа БА - близнецовый анализ . Исследования близнецов показали значительную (но не 100%) роль генетических факторов. Коэффициент конкордантности у монозиготных близнецов (85%) значительно выше, чем у дизиготных (42%) [Sadovnick et al, 1989]. Наиболее успешным для определения роли генетических факторов в развитии БА оказался сбор информации по родословным с использованием метода сегрегационного анализа. Несколько обнаруженных родословных (в том числе, обширных родословных евреев ашкенази и поволжских немцев) с очевидным аутосомно-доминантным характером наследования свидетельствуют о моногенном типе наследования заболевания в этих семьях с участием одного «главного» гена (для каждой родословной) [Pollen, 1996]. Результаты сегрегационного анализа оказались более информативными после разделения семей на группы с ранним и поздним началом развития БА. Оказалось, что в семьях с ранней формой БА наблюдается аутосомно-доминантное наследование заболевания, пенетрантность которого зависит от возраста. Число больных с такими генетическими формами БА, видимо, не превышает 10% [Рогаев, 1999]. Для поздней формы БА не наблюдается простого менделевского наследования, а генетическая гетерогенность дополняется влиянием негенетических факторов. Семейные случаи с поздним началом заболевания, по-видимому, имеют олиогенную (несколько генов) природу наследования с мутацией в главном гене и модификационным эффектом в других генах. Спорадические (несемейные) случаи БА как с ранним, так и с поздним началом, видимо, связаны с мутациями или полиморфизмами в генах, патогенный эффект которых зависит как от других генов, так и от эпигенетических факторов [Рогаев, 1999]. Популяционные ис-

следования показали, что к таким факторам относятся курение, отравление тяжелыми металлами, травмы головы, уровень образования, депрессия, возраст матери [Калын, Брацун, 1999]. Еще одним фактором, который может способствовать развитию «спорадических» форм БА может быть явление редактирования РНК. При наличии в генах GAGAG мотивов происходят ошибки РНК-транскриптазы: часть мРНК содержит делеции. Эти ошибки происходят в соматических клетках и не являются наследственным событием. Аномально отредактированные мРНК гена амилоидного предшественника были обнаружены у пациентов с БА [van Leeuwen et al, 1998]. В то же время, возможно, что такой процесс является частью общего механизма старения, а эпигенетические факторы, оказывая на него влияние, могут вести к развитию БА. Таким образом, хотя семейные формы БА составляют не более 10% всех случаев БА, степень генетического риска при БА оценивается от 5-50% до 100% в разных исследованиях [Рогаев, 1999].

### **Болезнь Альцгеймера 1 типа (AD1)**

AD1 (Familial Alzheimer disease - FAD, type 1)

AD1 (MIM 104760) обусловлена мутациями в гене предшественника бета-амилоида (ПБА) [amyloid beta A4 precursor protein - APP]. Спектр идентифицированных мутаций в данном гене представлен в таблице (Таблица APPm).

Ген предшественника бета-амилоида (ПБА) [amyloid beta A4 precursor protein - APP] локализован на длинном плече хромосомы 21 21q21.1 (Goate A.,1991).

Бета-амилоид (beta-amyloid) является нормальным белком организма. Данный белок образуется в результате протеолитического процессинга из своего предшественника, названного предшественником бета-амилоида (ПБА), экспрессирующегося фактически во всех изученных к настоящему времени животных клетках. Спектр идентифицированных мутаций в гене ПБА представлен в таблице (Таблица APPm) и описан многими авторами, все выявленные мутации связаны с заменами нуклеотидов в 16 и 17 экзонах.

### **Болезнь Альцгеймера 2 типа (AD2)**

AD2 (Alzheimer disease - AD, type 2)

AD2 (MIM 104310) обусловлена генетическими мутациями в гене аполипопротеина Е (апо Е; АРОЕ4).

Ген апо Е (apo E) локализован на 19 хромосоме человека в позиции 19cen-q13.2 Perical-Vance M.A.,1990 ; Perical-Vance M.A.,1991).

В данном гене была выявлена missense мутация в 112 кодоне (TGT-CGT) cys-arg (Corder E.H.,1991).

Гомозиготы по апо Е4, одной из изоформ апо Е, имеют повышенный риск развития болезни Альцгеймера в 5-15 раз (Corder E.H.,1993).

### **Болезнь Альцгеймера 3 типа (AD3, FAD)**

AD3 (Familial Alzheimer disease - FAD, type 3) MIM 104311) обусловлена генетическими мутациями в гене пресенилина 1, кодирующем 7-трансмембранный доменный протеин (7-transmembrane domain protein).

Ген пресенилина 1 (presenilin-1; PS-1; PSEN1; S182) локализован на 14 хромосоме человека в позиции 14q24.3 (Sherrington R.,1995 ; Cruts M.,1995 ; Clark R.F.,1995).



## Литература

1. Beck J.A., Janssen J.C., Campbell T.A., Dickinson A., Fox N.C., Harvey R.J., Houlden H., Rossor M.N., Collinge J. Early onset familial Alzheimer's disease: mutation frequency in 31 families. - *Neurobiology of Aging*, 2002, v. 23 (suppl.1S), p. S311.
2. Bennett C., Crawford F., ea., // *Am. J. Med. Genet.* 1995. V. 60, P. 1-6.
3. Breitner J., Silverman J., Mohs R. et al. Familial Alzheimer dementia: a prevalent disorder with specific clinical features. - *Psychol. Med.*, 1984, v. 14, pp. 83-80.
4. Chartier-Harlin M.C., Crawford F., Houlden H., Warren A., Hughes D., Fidani L., Goate A., Rossor M., Roques P., Hardy J., Mullan M. Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. - *Nature*, 1991, v. 353, p. 844-846.
5. Corder E.H. - *Science*, 1991, v. 261, p. 921.
6. Corder E.H., Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D.E., Gaskell P.C., Small G.W., Roses A.D., Haines J.L., Pericak-Vance M.A. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. - *Science*, 1993, v. 261, p. 921-923.
7. Cruts M., Backhovens H., Theuns J., Clark R.F., Le Paslier D., Weissenbach J., Goate A.M., Martin J., van Broeckhoven C. Genetic and physical characterisation of the early-onset Alzheimer's disease AD3 locus on chromosome 14q24.3. - *Hum.Mol.Genet.*, 1995, v. 4, p. 1355-1364.
8. Goate A., Chartier-Harlin M.C., Mullan M., Brown G., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., James L., Mant R., Newton P., Rooke K., Roques P., Talbot C., Pericak-Vance M., Roses A., Williamson R., Rossor M., Owen M., Hardy J. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. - *Nature*, 1991, v. 349, p. 704-706.
9. Kang J., Lemaire H.G., ea., // *Nature*. 1987. V. 325. P.733-736.
10. Kumar-Singh S., Cras P., Wang R., Kros J.M., van Swieten J., Lubke U., Ceuterick C., Serneels S., Vennekens K., Timmermans J.P., Van Marck E., Martin J.J., van Duijn C.M., Van Broeckhoven C. Dense-core senile plaques in the Flemish variant of Alzheimer's disease and vasocentric. - *Am.J.Pathology*, 2002, v. 161, p. 507-520.
11. Clark R.F., Cruts M., Korenblatt K.M., Chengshi H., Talbot C., van Broeckhoven C., Goate A.M. A yeast artificial chromosome contig from human chromosome 14q24 spanning the Alzheimer disease locus AD3. - *Hum.Mol.Genet.*, 1995, v. 4, p. 1347-1354.
12. Lemaire H.G., Salbaum J.M., ea., // *Nucleic Acids Res.* 1989. V.17. P. 517-522.
13. Levi-Lahad E., Wasco W., ea., // *Science*. 1995. V. 269. P. 973-977.
14. Murrell J., Farlow M., Ghetti B., Benson M.D. A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. - *Science*, 1991, v. 254, p. 97-99.
15. Peacock M.L., Warren J.T., Murman D.L., Roses A.D., Fink J.K. Novel mutation in codon (glu-asp) in the amyloid precursor protein (APP) in a patient with late-onset Alzheimer's disease. - *Neurology*, 1993, v. 43 (suppl.), p. A317.
16. Pericak-Vance M., Haynes J. II *Trends Genet.* 1995. V. 12(7). P. 504-508.
17. Pericak-Vance M.A., Bebout J.L., Gaskell P.C., Yamaoka L.H., Hung W.Y., Alberts M.J., Walker A.P., Bartlett R.J., Haynes C.A., Welsh K.A., Earl N.L., Heyman A., Clark C.M., Roses A.D. Linkage studies in familial Alzheimer's disease: evidence for chromosome 19 linkage. - *Am.J.Hum.Genet.*, 1991, v. 48, p. 1034-1050.
18. Pericak-Vance M.A., Bebout J.L., Haynes C.A., Gaskell P.C., Yamaoka L.H., Hung W.Y., Alberts M.J., Walker A.P., Bartlett R.J., Welsh K.A., Earl N.L., Heyman A., Clark C.M., Roses A.D. Linkage studies in familial Alzheimer's disease: evidence for chromosome 19 linkage. - *Am.J.Hum.Genet.*, 1990, v. 47 (suppl.), p. A194.
19. Poirier J., Davignon J., ea., // *Lancet*. 1993. V. 342. P. 697-699.
20. Pollen D. *Hannah's Heirs* Oxford University Press, 1996.
21. Rao V.S., Cupples L.A., Auerbach S.A., ea., // *Alzheimer's Research*. 1995. V. 1, P. 159-168.

22. Rogaev E., Sherrington R., Rogaeva E. et al. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. - *Nature*, 1995, v. 376, pp. 775-778.
23. Rossi G., Giaccone G., Maletta R., Morbin M., Capobianco R., Mangieri M.G., Giovagnoli A.R., Bizzi A., Tomaino C., Perri M., Di Natale M., Tagliavini F., Bugiani O., Bruni A.C. A family with Alzheimer disease and strokes associated with A713T mutation of the APP gene. - *Neurology*, 2004, v. 63, p. 910-912.
24. Sadovnick A., Irwin M., Baird P. et al. Genetic studies on an Alzheimer clinic population. - *Genet. Epidemiol.*, 1989, v. 6, pp. 633-643.
25. Schellenberg G.D., Andersen L., ea, // *Am. J. Hum. Genet.* 1991. V. 49. P. 511-517.
26. Sherrington R., Rogaev E., Liang Y. al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. - *Nature*, 1995, v. 375, pp. 754- 760.
27. Sounders A.M., Strittmayer W.J., Schmechel D., Georehyslop P.U.S., Perkakvance M.A., Joo S.H., Rosi B.L., Gusella J.F., Crappermaclachian D.R., Alberts M.J., Hnlette C., Cram B., Goldhaber D., Roses A.D. // *Neurology*. 1993. V. 43. P. 1467-1472.
28. Strittmatter W., Saunders A., Schmechel D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G., and Roses, A. Apolipoprotein E: High avidity binding to b-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. - *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1993, v. 90, pp. 1977-1981.
29. Tanzi R.E., Vaula G., ea, // *Am. J. Hum. Genet.* 1992. V. 51. P. 273-282.
30. Van\_ Leeuwn F., Burbach P., Hol E. Mutations in RNA: a first example of molecular misreading in Alzheimer's disease. - *Perspectives on Disease*, 1998, v. 8, pp. 331-335.
31. Калын Я.Б., Брацун А.Л. Распространенность и факторы риска развития деменций альцгеймеровского типа. - *Материалы Второй Российской конференции «Болезнь Альцгеймера и старение: от нейробиологии к терапии»*, Москва, 1999, стр. 52-58.
32. Робаев Е.И. Генетические основы болезней Альцгеймера. - *Генетика*, 1999, т. 35, стр. 1558-1571.

## 22.8.2. Паркинсонизм

Паркинсонизм берет свое название от имени известного английского врача Паркинсона (J.Parkinson, 1755-1824). Это синдром прогрессирующего поражения центральной нервной системы (экстрапирамидной системы), проявляющийся снижением общей двигательной активности, замедленностью движений (брадикинезией), дрожанием, повышением мышечного тонуса, тремором, ригидностью и гипокинезией, акинезией, тремор покоя и постуральной неустойчивостью в различных сочетаниях, а также нарушениями походки и нарушениями позы. Обычно связан с поражением базальных ганглиев или их связей с моторными зонами коры. Паркинсонизм у пожилых встречается часто. Исследования показали, что в возрасте 65-74 лет паркинсонизм встречается у 15% лиц, а в возрасте старше 85 лет - более чем у 50%.

Болезнью Паркинсона называют идиопатический прогрессирующий паркинсонизм, при котором отсутствуют другие неврологические нарушения. Болезнь Паркинсона обычно начинается в среднем или пожилом возрасте и постепенно приводит к инвалидности. Заболевание встречается во всех этнических группах, одинаково часто у мужчин и женщин. Распространенность болезни Паркинсона среди населения в целом составляет 1-2 на 1000, а среди лиц старше 65 лет - 1:100.

### **Болезнь Паркинсона: моногенные формы**

В последние годы описаны моногенные формы паркинсонизма, как с аутосомно-доминантным (АД), так и с аутосомно-рецессивным (АР) типами наследования.

Благодаря методу анализа сцепления и использования техники микросателлитного картирования удалось выделить 10 генетических локусов (PARK 1-11), обуславливающих развитие L-ДОФА чувствительного паркинсонизма. В четырех случаях идентифицированы конкретные гены, детерминирующие развитие заболевания и выявлены в них мутации.

### **Болезнь Паркинсона: аутосомно-доминантная форма I (PARK1)**

I. Аутосомно-доминантная форма паркинсонизма, обусловленная дефектами гена альфа-синуклеина (локус PARK1; MIM 163890)

В 1996 году Polymeropoulos M.H. с соавторами (Polymeropoulos M.H., 1996) выявили локус PARK1, ответственный за развитие заболевания при генетическом анализе итальянской семьи с аутосомно-доминантной формой паркинсонизма. Мутации найдены в гене синуклеина альфа (SNCA), который картируется на 4 хромосоме в области 4q21 (Spillantini M.G., 1995).

У всех больных этой итальянской семьи, а также в греческой семье была идентифицирована мутация в гетерозиготном состоянии в 53 кодоне (G-A; ala-thr) (Athanasiasidou A., 1999; Polymeropoulos M.H., 1997).

Вторая мутация при данной форме паркинсонизма была выявлена в немецкой семье в 30 кодоне (G-C; ala-pro) (Knüger R., 1998).

Ген альфа-синуклеина (ген SNCA) кодирует нейрональный пресинаптический белок альфа-синуклеин из 140 аминокислот. Альфа-синуклеин обнаруживается в нервных окончаниях и составляет около одного процента общего белка мозга. В семейство синуклеиновых белков входят три различных синуклеина альфа, бета и гамма-синуклеины.

### **Болезнь Паркинсона: аутосомно-рецессивная ювенильная форма II (PARK2)**

II. Аутосомно-рецессивная ювенильная форма паркинсонизма, обусловленная дефектами гена паркина (локус PARK2; MIM 602544)

С помощью метода позиционного клонирования был выявлен второй локус (PARK2) на шестой хромосоме человека в позиции 6q25.2-q27 (Matsumine H., 1997; Kitada T., 1998).

Ген паркина (PARK2) кодирует белок паркин из 465 аминокислот. Данный ген состоит из 12 экзонов и его протяженность составляет 500 тысяч пар нуклеотидов. Ген паркина экспрессируется в различных тканях, но наиболее активно в мозге, в области черной субстанции. Паркин играет роль в одном из основных этапов метаболизма клетки - протеасомной деградации белков.

### **Болезнь Паркинсона: аутосомно-доминантная форма III (PARK5, ген UCH-L1)**

III. Аутосомно-доминантная форма паркинсонизма, обусловленная дефектами гена убиквитин-С-концевой гидролазы L1 UCH-L1; локус PARK5; MIM 191342)

В 1998 году Leroy E. с соавторами в немецкой семье с аутосомно-доминантной формой паркинсонизма зарегистрировал миссенс мутацию в 93 кодоне (ile-met) в гене убиквитин-С-концевой гидролазы L1 (UCH-L1) (Leroy E., 1998a; Lincoln S., 1999). Данная мутация вызывает частичную потерю каталитической активности тиоловой протеазы, что вероятно обуславливает дефектный протеолиз и агрегацию протеинов.

Убиквитин-С-концевая гидролаза L1 (UCH-L1) составляет один-два процента растворимых белков мозговой ткани и ее функция заключается в гидролизе полимерных форм убиквитина и убиквитиновых конъюгатов до мономерных форм. Убиквитин-С-концевая гидролаза L1 является составной частью телец Леви. Мутации в дан-

ном гене обуславливают потерю каталитической активности, что сопровождается нарушением каскада протеолиза клетки и способствует агрегации белков.

**Болезнь Паркинсона: аутосомно-рецессивная форма IV (ген DJ-1, локус PARK7)**

IV. Аутосомно-рецессивная форма паркинсонизма, обусловленная дефектами гена DJ-1 (локус PARK7; MIM 606324)

В 2001 году Van Duijn С.М. с соавторами (Van Duijn С.М., 2001) картировали новый локус PARK7, лежащий на расстоянии 25 сантиморган от локуса PARK6 на 1 хромосоме человека в позиции 1p36. В данном локусе идентифицирован ген DJ-1, в котором детектированы мутации у больных в семьях с АР паркинсонизмом. В 2003 году Bonifati V. описал делецию размером 4 тысячи пар нуклеотидов, затрагивающую иницирующий кодон, в двух датских семьях и миссенс мутацию в 166 кодоне (Т-С; leu-pro) (Bonifati V., 2003).

**Болезнь Паркинсона: этиология**

Паркинсонизм у человека и обезьян может быть вызван 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином. Под действием MAO-B это вещество превращается в токсическое соединение М-метил-4-фенилпиридин. Последний попадает в дофаминергические нейроны черной субстанции посредством механизма, в обычных условиях обеспечивающего обратный захват дофамина. Затем он ингибирует окислительное фосфорилирование, действуя, видимо, на уровне комплекса I дыхательной цепи. В результате нейроны черной субстанции погибают, запасы дофамина в базальных ядрах истощаются и развивается паркинсонизм. Полагают, что помимо нарушения энергетического обмена М-метил-4-фенилпиридин вызывает образование свободных радикалов и свободнорадикальное окисление.

Хотя значение дофамина в этиологии болезни Паркинсона до конца не изучено, роль свободных радикалов не вызывает сомнения.

Значение наследственности в развитии болезни Паркинсона также не выяснено. На основании исследования одно- и двуяйцовых близнецов сначала полагали, что болезнь Паркинсона редко наследуется. Однако исследования с использованием позитронно-эмиссионной томографии показали, что у внешне здоровых близнецов (как одно-, так и двуяйцовых) с болезнью Паркинсона нарушен обратный захват дофамина в стриатуме. Ген или гены, ответственные за болезнь Паркинсона, еще не обнаружены. Появилось сообщение о связи наследуемой по аутосомно-доминантному типу болезни Паркинсона с сегментом 4q21-q23 у членов большой итальянской семьи.

**Болезнь Паркинсона: клиническая картина**

Для болезни Паркинсона характерен тремор покоя с частотой 4-6 Гц, усиливающийся при эмоциональном напряжении. Сначала он представлен сгибанием и разгибанием пальцев, рук или ступней, в других случаях - пронацией и супинацией предплечья. Тремор может возникать в одной конечности или в руке и ноге на одной стороне тела. Со временем он распространяется и на другие конечности. Возможен тремор подбородка. У 10-15% больных имеется поструральный тремор с частотой 7-8 Гц, напоминающий эссенциальный тремор (в том числе по реакции на лекарственные средства).

Другой распространенный симптом болезни Паркинсона - ригидность. Она приводит к характерной для болезни Паркинсона согнутой позе. Однако наиболее тяжелым проявлением болезни Паркинсона бывает гипокинезия вплоть до акинезии - замедление

и снижение объема произвольных движений и замедление и снижение объема произвольных движений. Сухожильные и подошвенные рефлексы не меняются. Постукивание по надпереносью с частотой около 2 Гц вызывает мигание (симптом Майерсона). Часто развивается депрессия. На поздних стадиях заболевания возможны нарушения интеллекта вплоть до деменции.

Эффективными, особенно в отношении тремора, могут оказаться М-холиноблокаторы. При легком паркинсонизме иногда эффективен амантадин, как в виде монотерапии, так и в сочетании с М-холиноблокаторами. Леводофа - предшественник дофамина - эффективна у большинства больных, особенно в отношении гипокинезии. Большая часть леводофы под действием ДАЛА слизистой кишечника превращается в дофамин и даже не поступает в кровь. В качестве ингибитора ДАЛА в США используют карбидофу, в Европе - бенсеразид. Соотношение леводофы и карбидофы в препаратах обычно составляет 10:1 и 4:1 (например, 100/25, 100/10 и 250/25 мг). Как правило, сначала назначают 100/25 мг 3 раза в сутки и постепенно наращивают дозу до 250/25 мг 3-4 раза в сутки. Чтобы увеличить всасывание препарата и его проникновение через гематоэнцефалический барьер, его принимают за 1 ч до еды или через 2 ч после еды.

### Литература

1. Polymeropoulos M.H., Higgins J.J., Golbe L.I. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-23. - *Science*, 1996, v. 274, p. 1197-1199.
2. Spillantini M.G., Divane A., Goedert M. Assignment of human alpha-synuclein (SNCA) and beta-synuclein (SNCB) genes to chromosome 4q21 and 5q35. - *Genomics*, 1995, v. 27, p. 379-381.
3. Athanassiadou A., Voutsinas G., Psiouri L. Genetic analysis of families with Parkinson disease that carry the Ala53Thr mutation in the gene encoding alpha-synuclein. - *Am.J.Hum.Genet.*, 1999, v. 65, p. 555-558.
4. Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E. Mutation in the a-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. - *Science*, 1997, v. 276, p. 2045-2047.
5. Knuger R., Kuhn W., Muller T. Ala30Pro mutation in the gene encoding a-synuclein in Parkinson's disease. - *Nature Genet.*, 1998, v. 18, p. 106-108.
6. Matsumine H., Saito M., et al. Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q.25-27. - *Am.J.Hum.Genet.*, 1997, v. 60, p. 588-596.
7. Kitada T., Asakawa S., Hattori N., Matsumine H., Yamamura Y., Minoshima S., Yokochi M., Mizuno Y., Shimizu N. Mutation in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. - *Nature*, 1998, v. 392, p. 605-608.
8. Leroy E., Borger R., Auburger G. The ubiquitin pathway in Parkinson disease. - *Nature*, 1998, v. 395, p. 451-452.
9. Lincoln S., Vaughan J., Wood N. Low frequency of pathogenic mutations in the ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in familial Parkinson's disease. - *Neurorept.*, 1999, v. 10, p. 427-429.
10. Van Duijn C.M., Dekker T., Bonifati V., Galjaard R.J., Houwing-Duistermaat J.J., Snijders P.J.L.M., Testers L., Breedveld G.J., Horstink M., Sandkuijl L.A., van Swieten J.C., Oostra B.A., Heutink P. Park7, a novel locus for autosomal-recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36. - *Am.J.Hum.Genet.*, 2001, v. 69, p. 629-634.
11. Bonifati V., Rizzu P., van Baren M.J., Schaap O., Breedveld G.J., Kriger E., Dekker M.C.J., Squitieri F., Ibanez P., Joosse M., van Dongen J.W., Vanacore N., van Swieten J.C., Brice A., Meco G., van Duijn C.M., Oostra B.A., Heutink P. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. - *Science*, 2003, v. 299, p. 256-259.

---

## ГЛАВА 23

---

### НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ ОБМЕНА МЕТАЛЛОВ

#### 23.1. Синдром Фанкони (псевдорахитическая ацидотическая остеопатия)

Синдром Фанкони - группа болезней, обусловленных врожденным дефектом канальцевых функций почек с соответствующим нарушением обмена веществ. Синдром Фанкони - нарушение транспорта многих веществ (нарушение транспорта аминокислот, нарушение транспорта глюкозы, нарушение транспорта фосфатов, нарушение транспорта мочевой кислоты, нарушение транспорта натрия, нарушение транспорта калия, нарушение транспорта бикарбоната, нарушение транспорта белков) в проксимальных канальцах.

Различают первичный синдром (болезнь Фанкони) и вторичный синдром Фанкони, к развитию которого могут привести цистиноз, галактоземия, гепатоцеребральная дистрофия, отравление солями тяжелых металлов, тетрациклинами с истекшими сроками годности, а также миелома, лимфогранулематоз, злокачественные новообразования яичников, печени, легких.

Первичный (врожденный) синдром Фанкони наследуется аутосомно-доминантно, аутосомно-рецессивно или сцепленно с X-хромосомой. Встречаются и спорадические случаи.

Синдром Фанкони нередко развивается одновременно с другой наследственной патологией (болезнью Вильсона, галактоземией, тирозинемией, цистинозом, непереносимостью фруктозы и синдромом Лоу).

При обследовании часто выявляют множество метаболических нарушений - почечный проксимальноканальцевый ацидоз, глюкозурию при нормальном уровне глюкозы крови, гипофосфатемию, гипоурикемию, гипокалиемию, неселективную аминоацидурию и протеинурию за счет нарушения реабсорбции низкомолекулярных белков. При легких формах заболевания возможны изолированные нарушения.

Гипофосфатемия часто приводит к рахиту или остеомаляции; иногда у таких больных нарушен также синтез  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Поражение костей усугубляется из-за метаболического ацидоза. Полиурия, потеря соли и гипокалиемия бывают причиной тяжелых осложнений.

Лечение. Проводят заместительную терапию фосфатами и кальцитриолом для восстановления минерализации костей, щелочными препаратами - для коррекции ацидоза. Жидкость и соль не ограничивают. При почечном проксимальноканальцевом ацидозе и гипокалиемии лучше применять щелочные соли калия. Аминоацидурия, глюкозурия, гипоурикемия и протеинурия с потерей низкомолекулярных белков коррекции не требуют.

#### 23.2. Гемохроматоз

Гемохроматоз - аутосомно-рецессивное наследственное заболевание, характеризующееся нарушением обмена железа в организме и при котором в организме накапли-

вается железо, нарушенной регуляцией всасывания железа в кишечнике, повышенным его содержанием в сыворотке крови и накоплением в тканях и органах.

Главное звено патогенеза - усиление всасывания железа в кишечнике. При этом заболевании характерны цирроз печени, поражение сердца (изменения на ЭКГ), сахарный диабет и выраженная гиперпигментация вследствие отложения меланина в базальном слое эпидермиса.

#### **Гемохроматоз и поражение печени**

Возможно, что это самая частая наследственная болезнь у человека. Характерно чрезмерное накопление железа в организме в результате его повышенного всасывания. Печень - это основное депо железа, поэтому при гемохроматозе она страдает в первую очередь.

В отличие от вторичных гемосидерозов, при которых железо накапливается в клетках ретикулоэндотелиальной системы, при гемохроматозе происходит диффузное отложение железа в гепатоцитах. При этом нередко наблюдается гепатомегалия. Вначале функция печени почти не нарушается, но если заболевание не лечить, то со временем развивается цирроз печени.

Как и при болезни Вильсона, ранняя диагностика позволяет своевременно начать пожизненное лечение, уменьшить запасы железа в организме и остановить прогрессирование заболевания.

### **23.3. Гипофосфатазия**

Гипофосфатазия - наследственное семейное заболевание, характеризующееся низким уровнем сывороточной и тканевой щелочной фосфатазы, нарушением минерализации костной ткани (рахит у детей, остеомаляция у взрослых) и повышенной экскрецией фосфоэтанола и пирофосфата с мочой.

**Семейная гипофосфатемия** (англ. *familial hypophosphataemia*) — редкое наследственное заболевание, характеризующееся нарушением обмена фосфатов и, в большинстве случаев, изменением метаболизма витамина D в почках, а также плохим всасывании фосфатов в кишечнике. Гипофосфатемия, возникающая в результате этих нарушений, может привести к уменьшению прочности костей, скелетной деформации (остеомаляция). Семейная гипофосфатемия также приводит к развитию рахита с характерными деформациями ног, а также другим аномалиям и прогрессирующего смягчения костей, как это происходит при остеомаляции. У детей может быть замедленный рост, поэтому больные семейной гипофосфатемией могут обладать небольшим ростом. Семейная гипофосфатемия чаще всего наследуется X-хромосомой. Тем не менее, возможна аутосомно-рецессивная и доминантная формы передачи семейной гипофосфатемии.

#### **Семейная гипофосфатемия: общие сведения**

Семейная гипофосфатемия (витамин D-резистентный рахит, X-сцепленная гипофосфатемия) - наиболее частая форма рахита, не связанного с нарушением питания. Обычный способ наследования - X-сцепленный доминантный; у некоторых матерей больных детей имеются клинические признаки заболевания (искривление костей или низкорослость), у других обнаруживается только гипофосфатемия натошак. Описаны также аутосомно-доминантные и спорадические формы заболевания.

Патогенез. При семейной гипофосфатемии нарушены реабсорбция фосфата в проксимальных почечных канальцах и превращение 25(OH)D в 1,25(OH)2D. Последний дефект находит свое отражение в относительно низком уровне 1,25(OH)2D в сыворотке крови на фоне гипофосфатемии и отсутствии стимуляции его синтеза при дальнейшем снижении уровня фосфата. У животных с этим заболеванием обнаруживаются оба дефекта: и нарушение реабсорбции фосфата в проксимальных почечных канальцах, и снижение синтеза 1,25(OH)2D. Только один дополнительный прием фосфата не полностью устраняет остеомалацию; необходима витаминотерапия 1,25(OH)2D.

Снижение активности Na<sup>+</sup>-зависимого транспортера фосфата в проксимальных канальцах почек приводит к избыточной экскреции фосфата с мочой. Однако сам этот транспортный белок кодируется геном, расположенным на хромосоме 5, а при X-сцепленной доминантной семейной гипофосфатемии дефектный ген локализован на хромосоме X (Xp22.1). Он получил название PHEX (phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome – фосфат-регулирующий ген с последовательностями, гомологичными генам эндопептидаз на X-хромосоме).

При аутосомно-доминантной форме гипофосфатемического рахита найдена мутация гена фактора роста фибробластов F6P23, который является, очевидно, естественным субстратом белка, кодируемого геном PHEX. Если F6F23 не расщепляется, то он тормозит транспорт фосфата в почечных канальцах и ингибирует синтез 1,25(OH)3D.

Клинические проявления. У детей с семейной гипофосфатемией, когда они начинают ходить, нижние конечности искривляются. Тетания отсутствует. Не наблюдается также выраженной миопатии, рахитических «четок» и гаррисоновой борозды (деформация грудной клетки), характерных для кальцийдефицитного рахита. У детей развивается утиная походка, а также O- и X-образная деформация ног. Дети отстают в росте. Без лечения рост в зрелом возрасте составляет 130-165 см.

В типичных случаях поражается зубная пульпа, поражается также внутриглобулярный дентин, но дефект зубной эмали наблюдается редко. В отличие от этого для кальцийдефицитного рахита характерны дефекты именно зубной эмали. При обеих формах рахита находят околоверхушечную инфекцию. Обычное лечение метаболической спондилопатии не нормализует состояние внутриглобулярного дентина.

Рентгенологические признаки семейной гипофосфатемии включают расширение метафизов и грубую шероховатую поверхность коротких или плоских костей. Конусообразное расширение метафизов наблюдается на проксимальном и дистальном концах большеберцовых и на дистальном конце бедренных, лучевых и локтевых костей.

Лабораторные исследования. Уровень кальция в сыворотке крови нормальный или слегка повышен (9-9,4 мг%; 2,24-2,34 мМ), а уровень фосфата несколько снижен (1,5-3 мг%; 0,48-0,96 мМ). Активность щелочной фосфатазы повышена; признаки вторичного гиперпаратиреоза отсутствуют. На фоне гипофосфатемии отмечается высокая экскреция фосфата с мочой, что указывает на нарушение канальцевой реабсорбции фосфата в почках, связанное, вероятно, с отсутствием расщепления F6F23 продуктом гена PHEX. Это заболевание представляет собой типичный чисто фосфат-



дефицитный рахит, поскольку при нем никогда не находят аминокацидурию, глюкозурию, бикарбонатурию или калийурию. У облигатных гетерозигот, у которых болезнь развивается позднее, уровень фосфата в сыворотке крови в первые месяцы жизни может оставаться нормальным. Первым обычно обнаруживают повышение активности щелочной фосфатазы в крови. Нормальная концентрация фосфата объясняется, вероятно, достаточно низкой СКФ у новорожденных. В спорадических случаях иногда находят гиперплазию околотитовидных желез с повышенным уровнем ПТГ в сыворотке крови.

Лечение. Помимо фосфатов назначают аналоги витамина D, чтобы предотвратить вторичный гиперпаратиреоз, который может развиваться при нагрузке фосфатами.

**Рахит гиперкальциурический гипофосфатемический аутосомно-рецессивный**

Аутосомно-рецессивный гиперкальциурический гипофосфатемический рахит характеризуется гипофосфатемией и нормокальциемией, а также повышенной экскрецией фосфата и кальция. Уровень  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  снижен, поэтому всасывание кальция в тонкой кишке усилено. Уровень ПТГ 1-84 в сыворотке снижен.

Клиническая картина: низкорослость, признаки рахита и остеомаляции; мочекаменная болезнь нехарактерна. Заболевание обусловлено мутациями генов Na/P-переносящих белков на 5-й и 6-й хромосомах.

**Периодические Семейные параличи: основные сведения**

Выяснение молекулярных нарушений при семейных периодических параличах позволило прояснить их патогенез и легло в основу классификации. Основные болезни, входящие в эту группу, имеют много общего (табл. 383.5). Все они начинаются рано; если эпизоды слабости впервые появляются после 25 лет, это почти наверняка не семейный периодический паралич. Приступы, как правило, возникают после отдыха или сна и почти никогда - в разгар физической активности, хотя предшествующая нагрузка может быть провоцирующим фактором. Во время приступа больные сохраняют ясное сознание. В начальной стадии мышечная сила вне приступа сохранена, но с годами развивается и может нарастать постоянная слабость.

Болезни этой группы поддаются лечению, и прогрессирующую стойкую слабость можно не только предупредить, но иногда даже устранить.

Диагноз предполагается на основании анамнеза и подтверждается исследованием электролитов сыворотки во время приступа, провокационными пробами (глюкоза с инсулином, препараты калия, охлаждение) либо обнаружением мутации при ДНК-диагностике (табл.23. 1).

**Таблица 23.1(табл. 383.5, Harrison). Периодические параличи**

Признаки	Семейный гипокалиемический периодический паралич	Семейный гиперкалиемический периодический паралич	Врожденная параμιотония
Тип наследования	Аутосомно-доминантный (67%) или спорадические случаи (33%)	Аутосомно-доминантный	Аутосомно-доминантный
Миотония	Только век	В большинстве случаев	Да

Возраст начала	До 30 лет, чаще подростковый	Ранний детский	Ранний детский
Частота приступов	От 1 в сутки до 1 в год	До 2—3-в сутки	При охлаждении; спонтанные — реже 1 в месяц
Длительность приступов	2— 12 ч (изредка дольше)	1—2 ч (иногда дольше)	2-24 ч
Уровень К <sup>+</sup> сыворотки во время приступа	Снижен	Нормальный или повышен (изредка снижен)	Нормальный или снижен (изредка повышен)
Прием калия	Нет эффекта	Слабость	Нет эффекта (иногда слабость)
Охлаждение	Нет эффекта	Нет эффекта	Слабость
Развитие стойкой слабости	Да	Да	Да
Молекулярный дефект	Кальциевый канал Т-трубочек	Быстрый натриевый канал	Быстрый натриевый канал

### Семейный гипокалиемический периодический паралич

Семейный гипокалиемический периодический паралич обусловлен дефектом кальциевых каналов.

Заболевание проявляется приступами слабости мышц рук и ног (больше проксимальных), изредка также приступами слабости дыхательных мышц и приступами слабости мышц со стволовой иннервацией. При вовлечении дыхательных мышц возможен смертельный исход.

Приступы провоцируются избытком в рационе углеводов и поваренной соли. Во время приступа снижены сухожильные рефлексy, из-за гипокалиемии возможны аритмии.

Чаще болеют мужчины вследствие неполной пенетрантности гена у женщин. Диагноз ставится при наличии во время приступа гипокалиемии, не объяснимой иными причинами. Во многих случаях выявляется дефект кальциевых каналов Т-трубочек. При биопсии в центре мышечных волокон часто обнаруживаются одна или несколько вакуолей. Если приступы у больного очень редки, можно провести провокационную пробу с введением глюкозы с инсулином. Однако это рискованно, и во время проведения пробы необходимо тщательное наблюдение.

Несмотря на то что мутации гена кальциевого канала идентифицированы, патогенез приступов полностью не изучен. Сократительный аппарат мышцы не страдает. Влияние инсулина на поглощение мышцей калия свидетельствует о роли поражения мышечных мембран. Резкая слабость у больных часто возникает при уровне калия, не вызывающем нарушений у здоровых лиц. Более того, приступ может развиваться на фоне низкого уровня инсулина.

Приступ можно купировать введением препаратов калия. При выраженной слабости назначают хлорид калия, 0,2- 0,4 ммоль/кг внутрь, и повторяют введение каждые 15-30 минут под контролем ЭКГ, сывороточной концентрации калия и клинического состояния (определяют мышечную силу). Нетяжелые приступы проходят самостоятельно. При расстройствах глотания или рвоте KCl вводят в/в струйно: 0,1 мг/кг каждые 5-10 мин под контролем ЭКГ и сывороточной концентрации калия. Введение слабых растворов калия (20-40 ммоль/кг в 5% глюкозе или в физиологическом растворе) может снизить сывороточную концентрацию калия и усилить слабость. Лучше ввести калий в растворе маннитола, который обеспечивает быструю нормализацию сывороточной концентрации калия и не вызывает ее последующего снижения (в отличие от глюкозы и физиологического раствора).

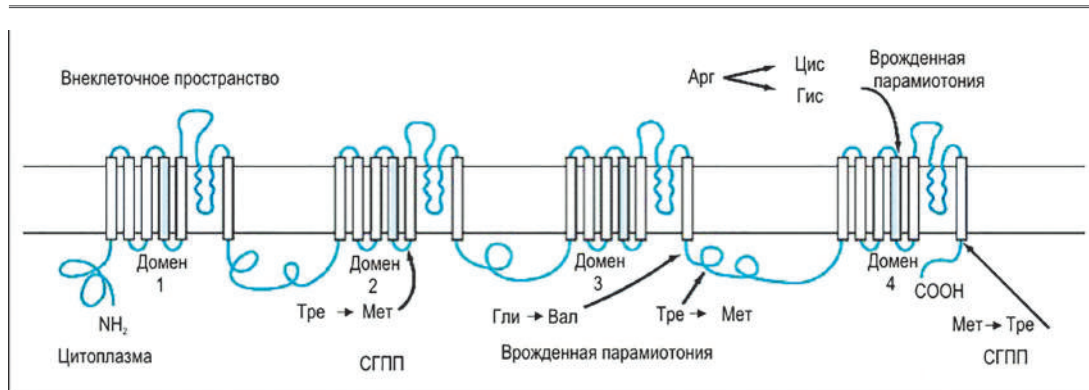
Цель лечения - предупреждение приступов и, следовательно, хронической слабости, которая раньше была частой причиной инвалидизации. Препараты калия, даже в больших дозах, в этом отношении неэффективны. У большинства больных приступы предупреждает ацетазоламид, 125-1000 мг/сут в несколько приемов. Видимо, его эффект обусловлен метаболическим ацидозом. В то же время ацетазоламид вызывает снижение содержания калия в крови, и для достижения эффекта иногда приходится дополнительно назначать препараты калия и низкоуглеводную диету. При длительном приеме ацетазоламида могут образоваться почечные камни; необходимо соответствующее наблюдение. Отдельные больные резистентны к ацетазоламиду, иногда он даже усиливает приступы. В этих случаях назначают триамтерен, 25-100 мг/сут, либо спиронолактон в той же дозе.

### **Семейный гиперкалиемический периодический паралич**

Редкая причина гиперкалиемии - семейный гиперкалиемический периодический паралич. Это аутосомно-доминантное заболевание обусловлено единичной аминокислотной заменой в белке натриевого канала поперечнополосатых мышечных волокон. Заболевание характеризуется приступами мышечной слабости или паралича, возникающими в ситуациях, способствующих развитию гиперкалиемии (например, при физической нагрузке). Заболевание проявляется приступами слабости мышц конечностей. Мышцы со стволовой иннервацией и дыхательные мышцы, как правило, не страдают. Характерный признак - провоцирующее действие калия. Часто приступы слабости сопровождаются парестезией и миалгией.

Примерно у половины больных во время приступа умеренно повышена сывороточная концентрация калия. У остальных же уровень калия во время приступа нормальный, а иногда даже пониженный. Таким образом, термин «гиперкалиемический» не вполне точен, и выделяют гиперкалиемическую и нормокалиемическую формы заболевания.

Семейный гиперкалиемический периодический паралич обусловлен аллельными мутациями гена альфа-субъединицы быстрого натриевого канала SCN4A (рис. 383.2), приводящими, как показано *in vitro*, к повышению проводимости этого канала. Это соответствует и данным, полученным на образцах мышечной ткани больных.



**Рисунок 23.1.** (Harrison). Семейный гиперкалиемический периодический паралич (быстрый натриевый канал)

Быстрый натриевый канал (изображен в «развернутом» виде) представляет собой структуру из 4 гомологичных доменов. Каждый домен содержит 6 пока не идентифицированных трансмембранных сегментов. Четвертые сегменты всех доменов (заштрихованы) предположительно служат потенциалчувствительными структурами. Взаимное расположение этих доменов (третичная структура канала) таково, что образуется селективный фильтр - пора, избирательно пропускающая ионы натрия. Приведены идентифицированные мутации и вызываемые ими болезни.

СГПП - семейный гиперкалиемический периодический паралич.

Приступ можно спровоцировать введением калия, 50-150 г/кг внутрь в неподслащенном растворе натошак, но не в/в введением глюкозы с инсулином. Проба с калием опасна и противопоказана при болезнях почек и сахарном диабете. Иногда диагноз можно заподозрить по случайно выявленной гиперкалиемии в межприступном периоде. Подтвердить его позволяют миотонические разряды при ЭМГ и обнаружение вакуолей в мышечных волокнах при биопсии.

#### **Парамииотония врожденная**

Наследственное заболевание скелетных мышц. В основе заболевания лежит генетический дефект натриевых каналов в мышцах. Характеризуется парадоксальной миотонией (усиливающейся при повторных движениях), а также приступами мышечной слабости и нарастанием слабости на холоде. Для врожденной парамииотонии характерны спонтанные или вызванные охлаждением приступы обездвиженности. Врожденная парамииотония с периодическим параличом похожа на семейный гиперкалиемический периодический паралич, но есть и отличия: феномен парадоксальной миотонии (усиление миотонии при физической нагрузке) и реакция на охлаждение.

Семейный гиперкалиемический периодический паралич и врожденная парамииотония обусловлены аллельными мутациями гена альфа-субъединицы быстрого натриевого канала SCN4A (рис.23.1), приводящими, как показано *in vitro*, к повышению проводимости этого канала. Это соответствует и данным, полученным на образцах мышечной ткани больных.

Приступы при врожденной параамиотонии обычно не требуют срочного лечения и никогда не бывают смертельными. При приеме внутрь глюкозы или других углеводов приступ заканчивается быстрее. Поскольку повторные приступы могут вызвать хроническую слабость, следует проводить их профилактику. Есть данные об эффективности тиазидных диуретиков, например хлортиазида, 250-1000 мг/сут.

**Болезнь Менкеса** — нарушение клеточного транспорта меди, при котором наблюдается замедление роста, патологии нервной системы, а также характерное закручивание волос, за что это состояние также называют «болезнью курчавых волос». Комплекс симптомов вызывается мутациями в гене АТР7А, кодирующем АТФ-азу, участвующую в поглощении меди из пищи и передаче ионов этого металла в другие клетки.

Длительность жизни детей с болезнью Менкеса невелика, обычно они погибают, не достигая 3-летнего возраста. Частая причина смерти — пневмония. Некоторые дети умирают внезапно в отсутствие выраженной острой патологии.

### 23.4. Болезнь Вильсона — Коновалова

**Болезнь Вильсона — Коновалова** (Гепатоцеребральная дистрофия, гепатолентикулярная дегенерация, болезнь Вестфала — Вильсона) — врожденное нарушение метаболизма меди, приводящее к тяжелейшим наследственным болезням центральной нервной системы и внутренних органов. Диагностируется у 5-10 % больных циррозом печени дошкольного и школьного возраста. Заболевание передается по аутосомно-рецессивному типу. Ген АТР7В, мутации которого вызывают заболевание, расположен на 13-й хромосоме (участок 13q14-q21).

Английский невролог Сэмюэль Вильсон (англ. *S. Wilson* - более нормативная передача Уилсон)(1878 - 1937) в 1912 году описал типичные для гепато-церебральной дистонии изменения в головном мозге, установил постоянное наличие цирроза печени и дал описание клиники нового заболевания, названного им прогрессивной лентикулярной дегенерацией (лат. *lenticularis* чечевицеобразный).

В качестве основных симптомов заболевания были отмечены разнообразные непроизвольные движения в конечностях и туловище, мышечная ригидность, приводящая к скованности, дисфагия и дизартрия, аффектные вспышки, иногда психические расстройства, но признаки поражения пирамидных путей отсутствовали. Ещё раньше К. Вестфалем (1883) и А. Штрюмпелем (1898) было описано заболевание, которое по клиническому сходству с рассеянным склерозом получило название «псевдосклероз». Заболевание характеризовалось распространёнными, размахистыми, ритмичными непроизвольными движениями, повышением мышечного тонуса, амимией, дизартрией и выраженными психическими нарушениями вплоть до такого расстройства интеллекта, как слабоумие. В дальнейшем оказалось, что прогрессивная лентикулярная дегенерация и псевдосклероз являются разными формами одного и того же заболевания, которое Галль (1921) назвал гепато-лентикулярной дегенерацией. Однако изменения в мозге при нём никогда не ограничиваются лентикулярными ядрами и нередко бывают даже сильнее выражены в других отделах мозга.

В 1960 году советский невропатолог Н. В. Коновалов предложил название «гепато-церебральная дистрофия», значительно расширил представления о патофизиологии, патогенезе и клинике этой болезни и выделил 4 формы поражения нервной системы и одну абдоминальную [Ерёмина Е. Ю., 2011].

Встречается в среднем в популяции 3:100000. Распространённость выше среди народностей где распространены близкородственные браки. Болеют в равной степени как мужчины, так и женщины, средний возраст дебюта 11-25 лет. Для проявления заболевания имеют значение экзогенные воздействия, поражающие печень — интоксикация и инфекция.

Ген болезни Вильсона — Коновалова (*ATP7B*) расположен в длинном плече 13-й хромосомы (13q14.3). Ген кодирует Р-тип АТФазы, которая транспортирует медь в жёлчь и включает её в церулоплазмин [Ala A, Walker AP, Ashkan K, et al., (2007)]. В 10 % случаев мутация не обнаруживается [Merle U, Schaefer M, Ferenci P, Stremmel W (2007)].

Хотя описано почти 300 мутаций *ATP7B*, в большинстве популяций болезнь Вильсона возникает в результате небольшого количества мутаций, специфичных для этих популяций. Например, для западных популяций мутация H1069Q (замена гистидина на глутамин в позиции 1069 белка) присутствует в 37-63 % случаев заболевания, в то время как в Китае эта мутация очень редка и R778L (замена аргинина на лейцин в позиции 778) встречается чаще. Относительно мало известно о влиянии мутаций на течение заболевания, хотя по данным некоторых исследований мутация H1069Q предполагает более позднее начало неврологических симптомов [Ala A, et al., 2007; de Bie P, Muller P, Wijmenga C, Klomp LW (November 2007)].

**PRNP** — ген, расположенный на коротком плече 20-й хромосомы. Кодирует нормальный прионный белок (**PrPC**) и изоформу этого белка — прионный белок **PrPSc**, связанный с заболеваниями.

Нормальные вариации в гене *PRNP* могут изменить течение болезни, увеличивая возраст появления заболевания и влияя на тип симптомов, которые развиваются. Этот ген кодирует прионный белок, который активен в головном мозге и других тканях, а также, как полагают, участвует в транспорте меди [Grubenbecher S, Stüve O, Hefter H, Korth C (2006)].

У заболевания аутосомно-рецессивный тип наследования. То есть больной должен получить дефектный ген от обоих родителей. Люди только с одним мутантным геном называются носителями (гетерозиготы). У них могут возникать слабовыраженные нарушения метаболизма меди [Roberts EA, Schilsky ML (2003)].

Медь выполняет множество функций в организме. В основном она выступает в качестве кофактора для некоторых ферментов, таких как церулоплазмин, цитохром с-оксидаза, дофамин бета гидроксилаза, супероксиддисмутаза и тирозиназа [de Bie P, Muller P, Wijmenga C, Klomp LW (November 2007)].

Медь всасывается из желудочно-кишечного тракта. Транспортный белок на клетках тонкой кишки *СMT1* (англ. *Copper Membrane Transporter 1*) перемещает медь внутрь клеток. Часть меди связывается с металлотионеином, а другая — перемещается в сеть Гольджи с помощью транспортного белка *АТОХ1*. В аппарате Гольджи в ответ

на повышение концентрации меди фермент АТР7А (англ. *Copper-transporting ATPase 1*) высвобождает этот элемент через воротную вену в печень. В печёночных клетках белок АТР7В связывает медь с церулоплазмином и высвобождает его в кровь, а также удаляет избыток меди с выделяющейся жёлчью. Обе функции АТР7В нарушены при болезни Вильсона. Медь накапливается в ткани печени; церулоплазмин продолжает выделяться, но с недостатком меди (апоцерулоплазмин) и быстро разрушается в кровотоке [de Vie P, et al., (2007)].

Когда меди в печени становится больше, чем белков её связывающих, происходит их окислительное повреждение за счёт реакции Фентона. Это приводит к воспалению печени, её фиброзу и в итоге к циррозу. Также из печени в кровоток выделяется медь, которая не связана с церулоплазмином. Эта свободная медь оседает по всему организму, особенно в почках, глазах и головном мозге.

Основную роль в патогенезе играет нарушение обмена меди, её накопление в нервной (особенно поражены базальные ганглии), почечной, печёночной ткани и роговице, а также токсическое повреждение медью данных органов. Нарушение метаболизма выражается в нарушении синтеза и снижении в крови концентрации церулоплазмينا. Церулоплазмин участвует в процессе выведения меди из организма. В печени формируется крупноузловой или смешанный цирроз. В почках в первую очередь страдают проксимальные канальцы. В головном мозге поражаются в большей степени базальные ганглии, зубчатое ядро мозжечка и черная субстанция. Отложение меди в десцеметовой мембране глаза приводит к формированию кольца Кайзера-Флейшера.

#### **Патологическая анатомия**

В головном мозге при гепато-церебральной дистрофии размягчается чечевицеобразное ядро, особенно скорлупа, с образованием мелких кист. Поражаются и другие образования: хвостатое ядро, глубокие слои коры, мозжечок, в частности зубчатые ядра, подбугорные ядра; в остальных отделах головного мозга изменения выражены меньше.

Все изменения делятся на ангиотоксические и цитотоксические. Первые выражаются в атонии сосудов, особенно мелких, и изменении их стенок. В результате возникают стазы, распространённый периваскулярный отек с аноксией нервной ткани и её гибелью; часты геморрагии и следы их в виде скоплений гемосидерина.

Цитотоксический компонент заключается в распространённых дистрофических изменениях макроглии нервных клеток, часто заканчивающихся их гибелью. Характерно появление глии Альцгеймера, которая образуется из обычных астроцитов. Нередко встречаются изменённые нервные клетки, очень похожие на глию Альцгеймера; сходные клетки обнаруживаются также в печени и почках. В основе этих клеточных изменений лежит один и тот же фактор — однотипное нарушение клеточного обмена, вероятно, обмена нуклеиновых кислот.

Чем позднее начинается заболевание, тем медленнее оно протекает, тем более диффузные изменения в головном мозге и тем более цитотоксический компонент преобладает над ангиотоксическим. Печень вследствие атрофического цирроза уменьшена и бугристая; участки нормальной ткани чередуются с участками некротическими, дегенерирующими и с островками регенерации; обильное новообразование сосудов приводит к появлению анастомозов между ветвями воротной и нижней поллой вены.

### **Клиническая картина и течение**

Гепато-церебральная дистрофия начинается в детском или молодом возрасте и имеет хроническое прогрессирующее течение. Во многих случаях появлению симптомов поражения нервной системы предшествуют висцеральные расстройства в виде нарушения деятельности печени и желудочно-кишечных расстройств (желтуха, боли в правом подреберье, диспептические явления). Порой развивается выраженный гепато-лиенальный синдром. Со стороны нервной системы на первый план выступают экстрапирамидные симптомы в виде мышечной ригидности, гиперкинезов и расстройств психики. Пирамидные симптомы могут быть, но чаще отсутствуют. Чувствительность обычно не нарушена.

Типичным симптомом болезни являются кольца Кайзера-Флейшера — отложения по периферии роговой оболочки содержащего медь зеленовато-бурого пигмента, более выраженные на поздних стадиях. Иногда отмечается желтовато-коричневая пигментация кожи туловища и лица. Часты геморрагические явления (кровоточивость дёсен, носовые кровотечения, положительная проба жгута), мраморность кожи, акроцианоз. Капилляроскопия обнаруживает атонию капилляров и застойность кровотока. Отмечаются суставные боли, профузные поты, остеопороз, ломкость костей. Патология печени клинически выявляется примерно у 30 % больных, а в ряде случаев она может быть обнаружена только функциональными пробами, например пробой с нагрузкой галактозой, пробой Квинка, пробой Бергмана-Эльботта, бромсульфоталеиновой пробой; количество билирубина в крови и уробилина в моче обычно увеличено; изменены осадочные реакции Таката-Ара и Грея, обычны лейкопения, тромбоцитопения, гипохромная анемия.

Различают 5 форм гепато-церебральной дистрофии:

- **Брюшная форма** — тяжёлое поражение печени, приводящее к смерти раньше появления симптомов со стороны нервной системы; заболевают дети. Её продолжительность от нескольких месяцев до 3-5 лет.

- **Ригидно-аритмогиперкинетическая**, или ранняя форма — отличается быстрым течением; начинается также в детском возрасте. В клинической картине преобладают мышечная ригидность, приводящая к контрактурам, бедность и замедленность движений, хореоатетонидные или торсионные насильственные движения. Характерны дизартрия и дисфагия, судорожный смех и плач, аффективные расстройства и умеренное снижение интеллекта. Заболевание длится 2-3 года, заканчивается летально.

- **Дрожательно-ригидная форма** встречается чаще других; начинается в юношеском возрасте, течёт медленнее, порой с ремиссиями и внезапными ухудшениями, сопровождающимися субфебрильной температурой; характеризуется одновременным развитием тяжёлой ригидности и дрожания, дрожание очень ритмичное (2-8 дрожаний в секунду), резко усиливается при статическом напряжении мышц, движениях и волнении, в покое и во сне исчезает. Иногда обнаруживаются атетонидные хореоформные насильственные движения; наблюдаются также дисфагия и дизартрия. Средняя продолжительность жизни около шести лет.

- **Дрожательная форма** начинается в возрасте 20-30 лет, течёт довольно медленно (10-15 лет и больше); дрожание резко преобладает, ригидность появляется лишь в конце болезни, а порой наблюдается гипотония мышц; отмечается амимия, медленная



монотонная речь, тяжёлые изменения психики, часты аффективные вспышки. Наблюдаются эпилептиформные припадки.

- **Экстрапирамидно-корковая форма** встречается реже других форм. Типичные для гепато-церебральной дистрофии нарушения в дальнейшем осложняются апоплектиформно развивающимися пирамидными парезами, эпилептиформными припадками и тяжёлым слабоумием (обнаруживаются обширные размягчения в коре больших полушарий). Длится 6-8 лет, заканчивается летально.

Наибольшая летальность (50 %) отмечается при печёночной форме с массивным некрозом и гемолизом у детей до 6 лет. Смерть больных от неврологических нарушений при отсутствии лечения наступает через 5-14 лет. Основная причина при этом интеркуррентные заболевания или желудочно-кишечные кровотечения, портальная гипертензия.

### **Диагностика**

Основой диагностики является картина болезни. Диагноз заболевания подтверждается:

- Наличием кольца Кайзера-Флейшера или его «обломков».
- Содержание «общей» меди в сыворотке крови при болезни Вильсона-Коновалова обычно снижено менее чем на 12 мкг/дл, однако в редких случаях может быть и нормальным.
- Снижение концентрации церулоплазмينا ниже 20 мг на 100 мл
- Повышение экскреции меди с мочой более 100 мкг в сутки

### **Для диагностики используют:**

- осмотр с помощью щелевой лампы (зелёное кольцо Кайзера-Флейшера на роговице у лимба)
- определение уровня церулоплазмينا (типично снижение менее 1 мкмоль/л)
- определение уровня меди в сыворотке крови (снижение менее 9,4 мкмоль/л)
- определение меди в суточной моче (повышение более 1,6 мкмоль или 50 мкг в сутки)

### **Лечение**

- Диета № 5 — с ограничением меди до 1 мг в сутки — исключение шоколада, орехов, сухофруктов, раков, печени, цельной пшеницы.
- Препаратом выбора является купренил (пеницилламин), который эффективен в 90% случаев. Д-пеницилламин или унитиол.
- Унитиол
- Витамин В6

Патогенетическое лечение направлено на выведение меди из организма. Для этого применяются комплексобразующие соединения: тиолы, пеницилламин. Лечение пеницилламином сопровождается заметным улучшением состояния больных или даже приводит к полной ликвидации симптомов.

### **Трансплантация печени**

Трансплантация печени является эффективным средством для лечения болезни Вильсона-Коновалова, однако используют ее только в отдельных случаях, что связано с риском данной процедуры. Как правило, ее проводят людям с острой печеночной не-

достаточностью, не поддающимся медикаментозному лечению или людям с развитой хронической печеночной недостаточностью.

### **Литература**

1. Ерёмкина Е. Ю. Болезнь Вильсона-Коновалова // Вестник современной клинической медицины.. — 2011. — Т. 4, № 1.
2. Ala A, Walker AP, Ashkan K, Dooley JS, Schilsky ML (2007). «Wilson's disease». *Lancet* 369 (9559): 397–408..
3. Merle U, Schaefer M, Ferenci P, Stremmel W (2007). «Clinical presentation, diagnosis and long-term outcome of Wilson's disease: a cohort study». *Gut* 56 (1): 115–20..
4. de Bie P, Muller P, Wijmenga C, Klomp LW (November 2007). «Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes». *J. Med. Genet.* 44 (11): 673–88.
5. Grubenbecher S, Stüve O, Hefter H, Korth C (2006). «Prion protein gene codon 129 modulates clinical course of neurological Wilson disease». *Neuroreport* 17 (5): 549–52. DOI:10.1097/01.wnr.0000209006.48105.90. PMID 16543824.
6. Roberts EA, Schilsky ML (2003). «A practice guideline on Wilson disease» (PDF). *Hepatology* 37 (6): 1475–92. DOI:10.1053/jhep.2003.50252. PMID 12774027.
7. Иванова-Смоленская И. А. Болезнь Вильсона-Коновалова

### **Контрольные вопросы**

1. Недостаточность какого металла вызывает болезнь Вильсона-Коновалова?
2. Мутации каких генов приводят к болезни Вильсона –Коновалова?
3. Какие 5 форм гепато-церебральной дистрофии различают при данной патологии?

## ГЛАВА 24

## НАСЛЕДСТВЕННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

## 24.1. Соединительная ткань: нарушения структуры и функции

Соединительная ткань выполняет в организме большое количество функций – опорную, формообразующую, обменную, регуляцию иммунного ответа, и входит в состав практически всех органов и систем. Поэтому наследственно обусловленные нарушения структуры и функции соединительной ткани редко проявляются изолированным нарушением. В большинстве случаев, причиной таких нарушений являются мутации генов, кодирующих структурные белки соединительной ткани (коллагены, эластины, тенасцины, фибриллины) или их регуляторы. Структурная или функциональная недостаточность этих белков может вести к нарушению синтеза, строения, эластических свойств, скорости обновления и других свойств соединительной ткани. Симптомы наследственных заболеваний приведены в таблице 24.1.

**Таблица 24.1. Симптомы, часто встречающиеся при наследственных заболеваниях соединительной ткани**

ЛОКАЛИЗАЦИЯ	ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОСОБЕННОСТЬ	ПРОЯВЛЕНИЕ
Суставы и связки	Гипермобильность	Хронические боли в суставах, привычные вывихи и/или подвывихи, патологическая подвижность позвонков, растяжения связок
Скелет	Удлинение, снижение минерализации костей	Высокий рост, длинные конечности и пальцы, склонность к переломам, костные деформации, в том числе позвоночника и грудной клетки
Кожа	Повышение растяжимости, или наоборот, хрупкость	Избыточная, мягкая, гиперэластичная или сухая и хрупкая кожа; шрамы в виде «папирозных» рубцов; стрии, не связанные с беременностью или быстрой потерей веса
Глаза	Слабость цилиарной мышцы и связочного аппарата	Миопия, вывих/подвывих хрусталика, отслоение сетчатки
Клапаны	Повышенная растяжимость	Пролапс клапанов сердца, недостаточность клапанного аппарата вен, варикоз, подострый бактериальный миокардит
Сосуды	Недостаточность эластического компонента	Расширение корня аорты, расслаивающие аневризмы аорты, разрывы крупных сосудов, «хрупкость» сосудов, легкость травматизации
Пищеварительная система	Недостаточность эластического компонента	хронические расстройства пищеварения
Мышцы	Растяжимость	Мышечная слабость; грыжи; растяжения (дилатация), опущения и выпадения внутренних органов

Выраженность симптомов при дисплазии соединительной ткани (ДСТ) весьма вариабельна – от минимально выраженной повышенной растяжимости кожи и гипермобильности суставов, до серьезных расстройств, которые могут представлять серьезную угрозу для жизни. Пациенты с этими заболеваниями часто длительно наблюдаются у врачей разных специальностей, но далеко не всегда заболевания из группы ДСТ своевременно диагностируются. Многообразие и длительность расстройств значительно снижают качество жизни пациентов. Установление правильного диагноза больным с ДСТ позволяет разработать комплексную программу лечения, реабилитации и профилактики специфических осложнений.

Наиболее частые болезни из группы наследственных заболеваний соединительной ткани:

- Синдром Марфана
- MASS-фенотип
- Синдром Элерса-Данлоса
- Синдром Стиклера
- Синдром Льюиса-Дитца (Loeys-Dietz)
- Синдром Билса (врожденной контрактурной арахнодактилии)
- Семейная аневризма аорты или крупных артерий
- Семейная патологическая извитость артерий
- Несовершенный остеогенез
- Синдром Альпорта
- Хондродистрофии
- Эластическая псевдоксантома (Pseudoxanthoma elasticum)
- Синдром доброкачественной гипермобильности суставов

Наследственные болезни соединительной ткани относятся к наиболее распространенным генетическим синдромам. К ним относят чаще всего несовершенный остеогенез, синдромы Элерса-Данло и Марфана.

Классификация этих синдромов основывается обычно на результатах работы McKusick, который проанализировал признаки, симптомы и морфологические изменения у большого числа больных. Однако классификация осложняется гетерогенностью этих синдромов. У больных, членов некоторых семей, отсутствует, например, один или несколько кардинальных признаков. В других семьях выявляют больных с двумя или тремя разными синдромами. Гетерогенность может быть обнаружена и среди членов одной семьи. Например, у одних больных в семье определяется дислокация суставов, характерная для синдрома Элерса-Данло, у других - хрупкость костей, типичная для несовершенного остеогенеза, а у третьих с тем же генным дефектом симптомы вообще отсутствуют. Из-за этих трудностей классификация, основанная на клинических данных, в конце концов, должна будет смениться классификацией, основанной на результатах анализа молекулярных дефектов в отдельных генах.

#### **Организация и химический состав соединительной ткани.**

Соединительная ткань (или ткани) имеет довольно расплывчатое определение: внеклеточные компоненты, служащие опорой и связывающие воедино клетки, органы и ткани. К соединительным тканям относятся в основном кости, кожа, сухожилия, связки и хрящи. Они включают в себя также кровеносные сосуды и синовиальные простран-

ства и жидкости. На самом деле, соединительная ткань входит в состав всех органов и тканей в виде мембран и перегородок.

Соединительные ткани содержат большие количества жидкости в виде фильтрата крови, в котором находится почти половина всего альбумина организма. Большинство соединительных тканей заполнены или окружены фибриллами или волокнами коллагена содержат протеогликаны.

Различия соединительных тканей до некоторой степени обусловлены незначительной вариабельностью размеров и ориентации коллагеновых фибрилл. В сухожилиях они собраны в толстые параллельные пучки, в коже расположены менее упорядоченно. В костях фибриллы строго организуются вокруг гаверсовых каналов, ригидность этой архитектуре придает гидроксипатит. Основной коллаген сухожилий, кожи и костей (коллаген I типа) состоит из двух полипептидных цепей, продуктов разных структурных генов. Различия между перечисленными тканями в большой мере связаны с разной экспрессией структурных генов коллагена I типа, т. е. с разным количеством синтезируемого коллагена, разными толщиной и длиной образующихся фибрилл, и их расположением.

Некоторые различия между соединительными тканями обусловлены присутствием ткане- или органоспецифических генных продуктов. Кости содержат белки, играющие важнейшую роль в минерализации коллагена, аорта - эластин и сопутствующий микрофибрилярный белок, несколько типов коллагена и другие компоненты. Базальная мембрана, лежащая под всеми эпителиальными и эндотелиальными клетками, содержит коллаген IV типа и другие тканеспецифические макромолекулы, а кожа и некоторые другие соединительные ткани - небольшие количества особых видов коллагена.

Протеогликановые структуры изучены недостаточно. Установлено примерно пять белковых ядер, и к каждому присоединен один вид мукополисахаридов или несколько. К основным мукополисахаридам кожи и сухожилий относятся дерматансульфат и хондроитин-4-сульфат, аорты - хондроитин-4-сульфат и дерматансульфат, хряща - хондроитин-4-сульфат, хондроитин-6-сульфат и кератансульфат. Базальная мембрана содержит гепарансульфат.

#### **Биосинтез соединительной ткани.**

Синтез соединительных тканей заключается в самосборке из молекулярных субъединиц с точными размерами, формой и поверхностными свойствами. Молекула коллагена представляет собой длинный тонкий стержень, состоящий из трех  $\alpha$ -полипептидных цепей, скрученных в жесткую, похожую на канат структуру. Каждая  $\alpha$ -цепь состоит из простых повторяющихся аминокислотных последовательностей, в которых каждый третий остаток представлен глицином (Гли). Поскольку каждая  $\alpha$ -цепь содержит около 1000 аминокислотных остатков, ее аминокислотную последовательность можно обозначить как (-Гли-X-Y-), где X и Y - любые аминокислоты, кроме глицина. Тот факт, что каждый третий остаток - это глицин (самая малая аминокислота), весьма важен, так как он должен входить в стерически ограниченное пространство, в котором сходятся все три нити тройной спирали. Две  $\alpha$ -цепи в коллагене I типа одинаковы и называются  $\alpha 1(1)$ . Третья же имеет несколько другую аминокислотную последовательность и называется  $\alpha 2(1)$ . Некоторые типы коллагена состоят из трех одинаковых  $\alpha$ -цепей. Те участки  $\alpha$ -цепей, в которых на месте X находится пролин или на месте Y - гидроксипролин,

придают жесткость всей молекуле коллагена и удерживают ее в форме тройной спирали. Гидрофобные и заряженные аминокислоты в положениях X и Y имеют вид кластеров на поверхности молекулы и определяют способ, которым одна молекула коллагена спонтанно связывается с другими, образуя цилиндрические фигуры, характерные для каждой коллагеновой фибриллы.

Если структура и функция молекулы коллагена достаточно просты, то ее синтез весьма сложен. Белок синтезируется в виде предшественника, называемого проколлагеном, масса которого примерно в 1,5 раза больше массы молекулы коллагена. Эта разница обусловлена присутствием в проколлагене дополнительных аминокислотных последовательностей как на N-, так и на C-конце. Для образования нитей коллагена необходимо действие специфической N-протеиназы, отщепляющей N-концевые пропептиды, и специфической C-протеиназы, отщепляющей C-концевые пропептиды. По мере сборки про- $\alpha$ -цепей коллагена на рибосомах эти цепи проникают в цистерны шероховатой эндоплазматической сети. Гидрофобные «сигнальные пептиды» на N-концах отщепляются, и начинается ряд дополнительных посттрансляционных реакций. Остатки пролина в позиции Y под действием специфической гидроксилазы, требующей аскорбиновой кислоты, превращаются в оксипролин. Другая гидроксилаза в присутствии аскорбиновой кислоты точно так же гидроксилирует остатки лизина в позиции Y. Необходимость аскорбиновой кислоты для действия обеих гидроксилаз, вероятно, объясняет, почему при цинге не заживают раны. Многие гидроксилированные остатки подвергаются дальнейшей модификации, гликолизируясь галактозой или галактозой и глюкозой. К C-концевым пропептидам каждой цепи присоединяется крупный, богатый маннозой олигосахарид. C-концевые пропептиды сближаются, и между ними образуются дисульфидные связи. Когда в каждой про- $\alpha$ -цепи окажется примерно 100 гидропролиновых остатков, белок спонтанно сворачивается, приобретая конформацию тройной спирали. Свернувшись, белок под действием N- и C-протеиназ превращается в коллаген.

Фибриллы, образованные путем самосборки коллагеновой молекулы, обладают высоким пределом прочности при растяжении, и эта прочность еще более увеличивается за счет перекрестных реакций с образованием ковалентных связей между  $\alpha$ -цепями соседних молекул. Первый этап перекрестного связывания - окисление ферментом лизиноксидазой аминокислотных групп в остатках лизина и гидроксилизина с образованием альдегидов; последние затем и формируют прочные ковалентные связи друг с другом.

Коллагеновые фибриллы и волокна во всех тканях, кроме костной, стабильны на протяжении почти всей жизни и распадаются только при голодании или истощении тканей. Однако фибробласты, синовиальные и другие клетки способны продуцировать коллагеназы, расщепляющие коллагеновую молекулу в точке, отстоящей от N-конца примерно на 3/4 длины молекулы, и тем самым запускают дальнейшее разрушение коллагеновых фибрилл и волокон другими протеиназами. В костях же непрерывно происходит разрушение и ресинтез коллагеновых фибрилл, что служит необходимым условием перестройки кости. Таким образом, для сборки и сохранения коллагеновых фибрилл в тканях требуется координированная экспрессия ряда генов, продукты которых необходимы для посттрансляционного формирования этих фибрилл или участвуют в метаболизме коллагена.

Сборка фибрилл коллагена I типа аналогична сборке фибрилл коллагена II типа

в хряще и коллагена III типа в аорте и коже. При формировании же нефибриллярных коллагенов, таких как тип IV в базальных мембранах, не происходит отщепления глобулярных доменов на концах молекул. Сохраняясь, эти домены участвуют в самосборке мономеров в плотные сети. Волокна эластина компонуются тем же путем. Однако эластиновый мономер представляет собой одну полипептидную цепь без четкой трехмерной структуры, самообразующую аморфные эластические волокна.

Синтез протеогликанов сходен с синтезом коллагена в том отношении, что он начинается со сборки полипептидной цепи, называемой белковым ядром. В цистернах шероховатой эндоплазматической сети белковое ядро модифицируется путем присоединения остатков сахаров и сульфата, которые образуют крупные мукополисахаридные боковые цепи. После секреции во внеклеточное пространство белковое ядро с его мукополисахаридными боковыми цепями связывается с соединяющим белком, а затем с длинноцепочечной гиалуроновой кислотой, образуя зрелый протеогликан с относительной молекулярной массой в несколько миллионов.

Построение кости следует тем же самым принципам, что и сборка других соединительных тканей. Первый этап заключается в отложении остеоидной ткани, которая состоит в основном из коллагена I типа. Далее, «еще не до конца выясненным путем происходит минерализация остеоидной ткани; особые белки, такие как остеонектин, связываются со специфическими участками коллагеновых фибрилл и затем хелируют кальций, начиная минерализацию.

#### **Значение для наследственных болезней.**

Наше знание химии и биохимии соединительных тканей недостаточно полно, но тем не менее позволяет понять некоторые клинические особенности наследственных болезней этих тканей. Например, понятно, почему многие из этих болезней имеют системные проявления. Поскольку весь коллаген I типа синтезируется на одних и тех же двух структурных генах, любая мутация этих генов должна экспрессироваться во всех тканях, содержащих коллаген I типа. Тканевая или органная специфичность болезни может быть объяснена двояко. Один из механизмов может заключаться в том, что болезнь вызывается мутацией гена, экспрессирующегося только в одной или двух соединительных тканях. Например, у больных с синдромом Элерса - Данло IV типа имеются мутации генов проколлагена III типа, и его проявления ограничены изменениями кожи, аорты и кишечника, т. е. тканей, богатых коллагеном III типа. Вторая причина тканевой специфичности болезней более тонка. Разные участки молекул коллагена выполняют разные биологические функции. Так, если речь идет о коллагене I типа, то отщепление N-концевых пропептидов необходимо для сборки крупных коллагеновых фибрилл и волокон в связках и сухожилиях. При неполном отщеплении N-пропептидов белок образует тонкие фибриллы. Следовательно, больные с такими мутациями генов проколлагена I типа, препятствующих эффективному отщеплению N-пропептидов, должны страдать преимущественно дислокацией бедренных и других крупных суставов. У них редко бывают переломы, поскольку формирование толстых фибрилл коллагена I типа, по-видимому, менее важно для нормальной функции костей, чем для нормальной функции суставных связок. Наоборот, у больных с мутациями, затрагивающими структуру других участков молекулы проколлагена I типа, может преобладать костная патология.

Современные данные о химии матрикса позволяют понять причины гетерогенно-

сти симптоматики и у больных с одинаковыми генными дефектами. Экспрессия гена коллагена или протеогликана зависит от координированной экспрессии генов ферментов, принимающих участие в посттрансляционной модификации этих соединений, а также от экспрессии генов других компонентов того же матрикса. В связи с этим конечное влияние этой мутации на функциональные свойства такой сложной структуры, как кость или крупный кровеносный сосуд, зависит от различий в «генетическом фоне» разных лиц, а именно от различий в экспрессии большого семейства других генов, продукты которых влияют на ту же структуру. Клинические проявления болезни должны зависеть и от других факторов, влияющих на соединительную ткань, таких как физическая нагрузка, травмы, питание и гормональные аномалии. Следовательно, имеется широкая основа для вариабельности клинических проявлений у больных с одним и тем же дефектом.

#### **Выявление молекулярных дефектов.**

Для того чтобы выявить молекулярный дефект у больного с наследственной болезнью соединительной ткани, требуются большие усилия. Одна из причин этого заключается в том, что у двух не состоящих в родственной связи больных, даже с идентичными клиническими симптомами, молекулярные дефекты различны. Вторая причина сводится к тому, что белки и протеогликаны соединительной ткани представляют собой крупные молекулы, которые трудно перевести в раствор и получить в чистом виде. Кроме того, у больных дефект определяет синтез аномального, быстро распадающегося белка. В связи с этим при анализе тканей трудно установить, какой именно генный продукт аномален. Третья причина - большие размеры генов компонентов матрикса. В случае проколлагена I типа ген про- $\alpha 1$ (1)-цепи состоит из 18 000 пар оснований, а ген про- $\alpha 2$ (1)-цепи - из 38000 пар. Каждый из этих генов имеет примерно 50 экзонов, большинство которых сходны по структуре. С помощью доступной в настоящее время техники рекомбинантной ДНК выяснение места мутации одного или нескольких оснований - задача невероятной трудности. Однако новые методы позволяют, вероятно, преодолеть большинство этих проблем.

## **24.2. Ахондроплазии и хондродисплазии**

На долю ахондродисплазий приходится значительный процент всех хондродисплазий. В нее входят танатофорная дисплазия (самая частая летальная форма хондродисплазии - 1:35000 новорожденных), ахондроплазия (самая частая нелетальная форма хондродисплазии - 1:15000-1:40000 новорожденных) и гипохондроплазия. Мутация при всех этих трех нарушениях локализуется в небольших участках гена рецептора фактора роста фибробластов FGFR1. Клинический фенотип зависит от расположения мутации.

**Танатофорная дисплазия** (OMIM 187600, OMIM 187610) выявляется до или во время рождения. В первом случае при УЗИ в середине или конце беременности обнаруживается плод с крупной головой и очень короткими конечностями.

Клинический фенотип танатофорной дисплазии II обусловлен мутацией в 650-м кодоне гена FGFR3, приводящей к замене лизина на глутаминовую кислоту в структуре рецепторного белка. Это активирует рецепторную тирозинкиназу, которая передает сигнал внутрь клетки.

Фенотип танатофорной дисплазии I связан главным образом с изменением двух



участков внеклеточного домена рецептора, в которых вместо других аминокислот появляется цистеин. Считается, что свободные цистеиновые остатки образуют между собой дисульфидные связи, способствующие димеризации рецептора, что приводит к его активации и трансдукции внутриклеточного сигнала.

Все эти мутации возникают заново; родители ребенка здоровы. Риск рождения второго ребенка с той же патологией невелик. Однако, поскольку причина мутации неизвестна и теоретически существует риск мозаицизма половых клеток, при последующих беременностях необходима пренатальная диагностика.

**Ахондроплазия**, achondroplasia (АСН) возникает в результате гетерозиготных мутаций в гене рецептора-3 фактора роста фибробластов (fibroblast growth factor receptor-3 gene, (FGFR3; 134934), расположенном на хромосоме 4p16.3.

У всех больных с типичной ахондроплазией выявляется мутация в 380-м кодоне гена FGFR3. Возникающие в результате изменения структуры трансмембранного домена рецептора, как полагают, стабилизируют рецепторы в димерном состоянии, а это приводит к усилению рецепторного сигнала и торможению линейного роста костей. Ахондроплазия наследуется как аутосомно-доминантный признак; большинство случаев обусловлено новой мутацией (при здоровых родителях). Ахондроплазия (ОМIM 100800) - наиболее распространенная скелетная дисплазия с укорочением конечностей, врожденное заболевание, при котором нарушение развития хрящевой ткани приводит к недостаточному росту конечностей.

В силу частой ахондроплазии среди низкорослых людей относительно высока и вероятность брака между больными с этой патологией. Риск гетерозиготности у каждого ребенка такой пары составляет 50%, а гомозиготной ахондроплазии - 25%. Последнее состояние по тяжести занимает промежуточное место между танатофорной дисплазией и гетерозиготной ахондроплазией и обычно приводит к гибели ребенка в неонатальном периоде.

После того, как ген ахондроплазии был картирован на 4p16.3 анализом сцепления (Le Merrer и др., 1994; Velinov и др., 1994; Francomano и др., 1994), мутации, вызывающие патологию, были идентифицированы с помощью поиска гена – кандидата. Мутации в гене фактора роста фибробластов рецептора-3 (134934) были идентифицированы Shiang и соавт. (1994) и Rousseau и др. (1994) независимо друг от друга. Ген FGFR3 ранее был нанесен на карту в том же регионе, 4p16.3, как ген АСН и ген болезни Хантингтона. Мутация в 15 из 16 случаев ахондроплазий, изученных Shiang и др. (1994), оказалась транзицией G-на-A в 1138 нуклеотиде (134934.0001) кДНК. В одном случае мутация АСН была вызвана трансверсией G-к-С в этом же положении, в 1138 нуклеотиде (134934.0002). Обе мутации привели к замене остатка глицина на аргинин в положении 380 зрелого белка, в трансмембранном домене FGFR3. Мутация была расположена в CpG динуклеотиде.

Диагноз основывается на типичных клинических и рентгенологических признаках; описание тяжелой гипохондроплазии может быть произвольным. Очень ограниченное число мутаций, вызывающих ахондроплазию и легкость, с которой они могут быть обнаружены (1 ПЦР и 1 рестрикционный разрыв) обеспечивают простой метод для пренатальной диагностики АСН гомозигот в семьях с риском наследования, в которых родители являются гетерозиготными либо по 1138A, или по 1138C аллелю (Shiang

и др., 1994). Shiang и др. (1994) высказал мнение, что кроме скрининга группы риска при беременности для гомозиготных АСН плодов, любое «другое применение диагностического теста для АСН мутации должно быть запрещено.» Bellus и др. (1994) провели пренатальную диагностику ворсинок хориона на 10 неделе и диагностику на 4 день беременности, у обоих родителей, имеющих ахондроплазию. Оба родителя и плод оказались гетерозиготами по общей транзиции G-на-A. Гомозиготность ахондроплазии была исключена.

С помощью современных диагностических критериев, Гарднер (1977) оценил частоту мутаций в 0.000014. Ogioli и др.(1986) сообщили о частоте скелетной дисплазии среди 349,470 родов (живых и мертворождений). Уровень распространенности ахондроплазии составлял от 0,5 до 1,5 / 10000 родов.

#### **Хондродисплазии: краткое определение**

Хондродисплазией, или скелетной дисплазией, называют генетически и клинически разнородную группу нарушений формирования и роста скелета. Они обнаруживаются с частотой 1:4000 новорожденных и делятся на остеодисплазии, типичным примером которых служит несовершенный остеогенез и собственно хондродисплазии. Последние обусловлены мутацией генов, ответственных за развитие и рост костей. В клинической картине преобладает деформация скелета, но в большинстве случаев ей сопутствует патология и других тканей. Нарушения могут быть как несовместимыми с жизнью (приводить к внутриутробной гибели плода), так и практически незаметными.

От других форм низкорослости хондродисплазия отличается непропорциональностью развития скелета: у одних больных укорочены, преимущественно, конечности, у других - туловище. С учетом клинических проявлений можно насчитать более 100 отдельных форм хондродисплазии. В основе многих из них лежит мутация относительно небольшой группы генов, так и называемых генами хондродисплазии (таблица 24.2, <http://humbio.ru/humbio/-ped9pdd/0006135b.htm>).

Эта классификация отличается от прежних, которые базировались главным образом на рентгенологических особенностях. Нарушения, ранее считавшиеся разными, попадают в одну и ту же группу (например, псевдоахондроплазия, множественная эпифизарная дисплазия). С генетических позиций они представляют собой аллельные дефекты. В других случаях, казалось бы, сходные нарушения попадают в разные группы (например, ахондрогенез типа IA и ахондрогенез типа II), так как в их основе лежат мутации разных генов (таблица.24.2).

**Хондродисплазии: Генетика** Многие гены, мутация которых лежит в основе хондродисплазий, установлены (табл. 24.2). Они кодируют различные белки, включая белки хрящевого матрикса, трансмембранные рецепторы переносчики ионов и факторы транскрипции.

Число установленных генетических локусов гораздо меньше числа известных клинических фенотипов. У большинства больных мутация картируется менее чем в 10 локусах, причем более 50% всех случаев хондродисплазий обусловлены мутацией всего двух генов - гена COL2A1 и гена FGFR3. Вероятно, развитие скелета, особенно линейный рост костей, зависит от функции лишь ограниченного числа генов, а их мутация определяет широкий спектр клинических фенотипов хондродисплазий.

Мутации в локусах COL2A1 и FGFR3 распределяются по-разному. В первом случае они могут локализоваться в любых частях гена и в разных семьях практически не повторяются; во втором - их локализация ограничивается немногими участками гена, новые мутации (в неродственных семьях), как правило, определяются в тех же участках. Между локализацией мутации в локусе FGFR3 (но не COL2A1) и клиническим фенотипом существует строгая корреляция.

**Таблица 24.2. Классификация хондродисплазий**

Ген	Хромосома	Белок	Функция белка	Фенотип	ОМIM**	Механизм	Способ
COL2A1	12q13.1-q13.3	Коллаген типа II, $\alpha_1$ -цепь	Белок хрящевого матрикса	Ахондрогенез II Гипохондрогенез Врожденная СЭД Дисплазия Книста Поздняя СЭД Дисплазия Стиклера	200610 120140.0002 183900 156550 108300	ДН ДН ДН ДН ДН ГН	АД* АД* АД АД АД АД
SEDL	Xp22.2-p22.1	Седлин	Внутриклеточный транспортер	Х-сцепленная поздняя СЭД	313400	ПФ	ХСР
COL11A1	1p21	Коллаген типа XI, $\alpha_1$ -цепь	Белок хрящевого матрикса	Артрофталомопатоподобная дисплазия	184840	ДН	АД
COL11A2	6p21.3	Коллаген типа XI, $\alpha_2$ -цепь	Белок хрящевого матрикса	Артрофталомопатоподобная дисплазия	215150	ПФ	АР
COMP	19p12-p13.1	Олигомерный белок хрящевого матрикса (COMP)	Белок хрящевого матрикса	Псевдоахондроплазия МЭД	177170 600969	ДН ДН	АД АД
COL9A2	1p32.2-p33	Коллаген типа IX, $\alpha_2$ -цепь	Белок хрящевого матрикса	МЭД	600969	ДН	АД
COL9A3	20q13.3	Коллаген типа IX, $\alpha_3$ -цепь	Белок хрящевого матрикса	МЭД	600969	ДН	АД
NATN3	2p24-p23	Матрилин 3	Белок хрящевого матрикса	МЭД	600969	ДН	АД

COL10A1	6q21-q22.3	Коллаген типа X, $\alpha_1$ -цепь	Белок гипертрофии хрящевого матрикса	Метафизарная хондродисплазия, тип Шмида	156500	ГН	АД
FGFR3	4p16.3	Рецептор ФРФ 3	Тирозинкиназный рецептор ФРФ	Танатофорная дисплазия I Танатофорная дисплазия II Ахондроплазия Гипохондроплазия	187600 187610 100800 146000	ПрФ ПрФ ПрФ ПрФ	АД* АД* АД АД
PTHHR	3p21-p22	Рецептор ПТГпП	Сопряженный с G-белком рецептор ПТГ и ПТГпП	Метафизарная хондродисплазия, тип Янсена	156400	ПрФ	АД
DTDST	5q32-q33	Транспортер DTD-сульфата	Транс-мембранный транспортер сульфата	Ахондрогенез IВ Ателостеогенез II Пикнодизостоз	600972 256050 222600	ПФ ПФ ПФ	АР* АР* АР
SOX9	17q24.3-q25.1	Бокс 9 SRV	Фактор транскрипции	Кампомелическая дисплазия	114290	ГН	АД
CBFA1	6p21	ДНК-связывающий фактор, $\alpha$ -субъединица	Фактор транскрипции	Ключично-черепной дизостоз	119600	ГН	АД
LMX1B	9q34.1		Фактор транскрипции	Остеониходисплазия	161200	ГН	АД
CTSK	1q21	Катепсин К	Фермент	DTD	265800	ПФ	АР
RMPR	9p21-p12	Эндорибонуклеаза мРНК	Фермент процессинга РНК	Мегафизарная хондродисплазия, тип Мак-Кьюсика	250250	ПФ	АР

<http://humbio.ru/humbio/-ped9pdd/0006135b.htm>

Каким бы способом не действовали мутации, в конечном счете они нарушают энхондральное окостенение (биологический процесс, ответственный за развитие и линейный рост костей). Действительно, при хондродисплазиях наблюдаются различные морфологические изменения в ростовых пластинках (зоны роста) - анатомических структурах, в которых и происходит энхондральное окостенение.

Излечить нарушения роста костей при любой форме хондродисплазии невозможно-

но. Поэтому усилия должны быть направлены на профилактику и коррекцию костных деформаций, лечение осложнений со стороны внутренних органов, генетическое консультирование и организационную и психологическую помощь больному и его семье.

Можно дать ряд общих рекомендаций. При большинстве хондродисплазий дети должны избегать контактных видов спорта и любой активности, грозящей повреждением суставов. Следует тщательно продумать диету, чтобы предотвратить развитие ожирения. Раннее обращение к стоматологу позволяет предотвратить неправильный рост зубов. Детям и их родственникам должна быть обеспечена помощь групп поддержки.

В ряде случаев делались попытки удлинения конечностей хирургическим путем. Наилучшие результаты получены при ахондроплазии, когда сохранялась возможность растяжения мягких тканей. Такие операции обычно проводили в подростковом возрасте. Второй подход заключается в инъекциях фармакологических доз человеческого гормона роста (сравнимых с используемыми при лечении синдрома Тернера). Результаты, как и в первом случае, противоречивы.

#### **Метафизарная дисплазия Янсена**

(OMIM 156400) - редкое состояние, наследуемое как доминантный признак и характеризующееся резким укорочением конечностей в сочетании с особенностями строения лица. Иногда ему сопутствует косолапость и гиперкальциемия. Клинические признаки позволяют диагностировать метафизарную дисплазию Янсена сразу после рождения. При рентгенологическом исследовании обнаруживается укорочение трубчатых костей с характерными изменениями метафизов (бугристостью, неравномерной минерализацией, фрагментацией и расширением зон роста). Эпифизы нормальны.

Суставы с возрастом увеличиваются; а подвижность суставов уменьшается. Сгибательная контрактура коленных и тазобедренных суставов не позволяет больным выпрямляться. Интеллект сохраняется; иногда развивается тугоухость.

Дисплазия Янсена - единственная форма хондродисплазий, обусловленная мутацией гена PTHR – рецептора ПТГ (ПТГ- Гормон паратиреоидный, РТН). Кодированный этим геном полипептид представляет собой сопряженный с G-белком трансмембранный рецептор, взаимодействующий как с самим ПТГ, так и с ПТГ-подобным пептидом. Генерируемый рецептором сигнал тормозит последнюю стадию дифференцировки хрящевой клетки на важнейшем этапе роста костей. Поскольку мутация PTHR приводит к активации рецептора, рост костей в этих случаях замедляется.

**Метафизарная дисплазия Шмида** (OMIM 156500) - одна из нескольких хондродисплазий, при которых на рентгенограммах преобладает аномалии метафизов. Она обычно проявляется в раннем детстве некоторой низкорослостью, искривлением голени и утиной походкой. Иногда отмечается увеличение суставов кисти. На рентгенограммах обращает на себя внимание неравномерная минерализация метафизов трубчатых костей в проксимальных отделах конечностей. Обычно наблюдается О-образное искривление ног, которое может требовать хирургической коррекции. С возрастом низкорослость становится более заметной, причем ноги отстают в росте больше, чем руки. Проявления ограничиваются аномалией скелета.

Метафизарная хондродисплазия Шмида обусловлена гетерозиготной мутацией гена, кодирующего коллаген типа X, наследуется аутосомно-доминантным путем. Кол-

лаген типа X присутствует только в зонах роста костей, там, где хрящ превращается в кость. Это может объяснить тот факт, что при рентгенологическом исследовании изменения обнаруживаются только в метафизах.

### **Спондилоэпифизарные Дисплазии**

Некоторые дефекты костей и суставов обусловлены нарушением функции белков хрящевого матрикса. В соответствии с типом дефектных белков [коллагена трех типов и неколлагеновых белков (COMP - cartilage oligomeric matrix protein - олигомерный белок хрящевого матрикса) и матрилина 3] эти нарушения объединяют в четыре группы. Клинические фенотипы различаются как между группами, так и внутри них, особенно в группе спондилоэпифизарных дисплазий. В некоторых группах тяжесть проявлений значительно варьирует.

Спондилоэпифизарной дисплазией называют гетерогенную группу нарушений, характеризующихся укорочением туловища и (в меньшей степени) укорочением конечностей. По тяжести дефектов различают ахондрогенез типа II и его менее тяжелую форму - гипохондрогенез (эти две формы приводят к смерти в перинатальном периоде), врожденную спондилоэпифизарную дисплазию и ее варианты, включая **дисплазию Книста** (обнаруживаемую при рождении и обычно нелетальную) и позднюю спондилоэпифизарную дисплазию (которая возможна лишь в подростковом возрасте или позднее).

Ключевой рентгенологический признак этих дефектов - аномальное развитие тел позвонков и аномальное развитие эпифизов, коррелирующее с тяжестью клинических проявлений. В основе всех спондилоэпифизарных дисплазий лежит гетерозиготная мутация гена COL2A1, и все они наследуются аутосомно-доминантным способом. Мутация происходит в различных участках гена, а клинический фенотип слабо коррелирует с локализацией мутаций.

### **Синдром Стиклера (врожденная артроофтальмопатия)**

Для этой патологии (OMIM 184840) низкорослость не характерна. По своим суставным и глазным проявлениям она напоминает спондилоэпифизарную дисплазию. При сходных синдромах (OMIM 184840, OMIM 215150) обнаружена мутация генов, кодирующих коллаген типа XI, который взаимодействует с коллагеном типа II. Дисплазию Стиклера часто диагностируют у новорожденных по расщелине неба и микрогнатии (аномалия Робена). У грудных детей обычны выраженная миопия и другие глазные осложнения, включая дегенерацию сосудистой оболочки, дегенерацию сетчатки и дегенерацию стекловидного тела. В детстве часто развивается отслойка сетчатки, а в подростковом возрасте – нейро-сенсорная тугоухость. В этом же возрасте возможны симптомы остеоартроза. В детстве особое внимание необходимо уделять глазным осложнениям.

### **Псевдоахондроплазия и множественная эпифизарная дисплазия**

Псевдоахондродисплазия (OMIM 177170) и множественная эпифизарная дисплазия (OMIM 600969) - это два различных фенотипа, объединенных потому, что в основе одного и другого лежит мутация гена, кодирующего олигомерный белок хрящевого матрикса (COMP). В обоих случаях имеет место гетерозиготная мутация, и оба наследуются аутосомно-доминантным способом. Нарушения затрагивают только костную систему.

Дети с **псевдоахондроплазией** рождаются среднего размера и без особенностей

внешнего вида. Нарушения походки и отставание в росте (преимущественно отставание в росте конечностей) становятся заметными ближе к концу грудного возраста. Позднее отставание в росте прогрессирует, сопровождаясь генерализованной слабостью суставных связок. Кисти рук короткие, широкие и отклонены в локтевую сторону, предплечья искривлены. Общее и умственное развитие, как правило, не страдает. В детстве развиваются поясничный лордоз и деформация коленных суставов, часто требующая хирургической коррекции. Дети и подростки обычно жалуются на боль в суставах, на которые приходится нагрузка массой тела, и после 10 лет нередко развивается остеохондроз. В зрелом возрасте рост колеблется в пределах 105-128 см.

При рентгенологическом исследовании обнаруживаются аномалии тел позвонков, а также нарушения строения эпифизов и метафизов трубчатых костей.

В основе **множественной эпифизарной дисплазии** (OMIM 600969) лежит гетерозиготная мутация гена, кодирующего олигомерный белок хрящевого матрикса (COMP). Тип наследования аутосомно-доминантный. Нарушения затрагивают только костную систему.

Фенотип множественной эпифизарной дисплазии включает скелетные аномалии. Как обнаруживается при рентгенографии, страдают преимущественно эпифизы. Существует две классические формы этого синдрома - тяжелая множественная эпифизарная дисплазия, тип Фейрбанка и легкая множественная эпифизарная дисплазия, тип Риббинга. Поскольку их клинические проявления перекрываются, а мутация гена COMP характерна для обеих, их можно считать клиническими вариантами одного и того же синдрома. Клинический и рентгенологический фенотип множественной эпифизарной дисплазии бывает следствием мутации и других генов. В некоторых семьях случается мутация гена, кодирующего одну из цепей коллагена типа IX. Предполагается, что COMP и коллаген типа IX функционально взаимодействуют в хрящевом матриксе, чем и объясняется формирование одного и того же фенотипа при мутации разных генов. При множественной эпифизарной дисплазии обнаруживается мутация гена, кодирующего и другой белок хрящевого матрикса, а именно мутация гена, кодирующего матрилин 3.

### 24.3. Синдром Элерса-Данло

Синдром Элерса-Данло - группа наследственных болезней соединительной ткани (дисплазия соединительной ткани). Синдром Элерса-Данлоса наследуется по аутосомно-доминантному типу.

В основе заболевания - мутация генов, отвечающих за синтез различных типов коллагена. Различают 10 типов синдрома.

Ген коллагена V типа альфа I (ген Col V A1) локализован на 9 хромосоме в локусе q34.2-q34.3 (Greenspan D.S., 1992 ; Caridi G., 1992).

Ген коллагена V типа альфа II (ген Col V A2) локализован на 2 хромосоме в локусе q31 (Huerre-Jeanpierre C., 1985 ; Huerre-Jeanpierre C., 1986a).

Ген коллагена III типа альфа I (ген Col III A1) локализуется на 2 хромосоме в локусе q31 (Huerre-Jeanpierre C., 1986a ; Huerre-Jeanpierre C., 1986b).

Синдром Элерса-Данло - вид врожденной ангиопатии (врожденного изменения сосудов, проявляющегося кровоточивостью, геморрагическими пятнами и сопровождается повышенной ломкостью капилляров. Основная причина кровоточивости: изменения

структуры эластичной ткани, в частности, сосудов. Впервые синдром Элерса-Данлоса (MIM 120215) описали Ehlers и Danlos в 1901, 1908 годах. Клиницисты разделяют данное заболевание на несколько типов (тип I, тип II, тип IV, тип V, тип VI, тип VII).

При синдроме Элерса-Данло выявлены мутации в коллагеновых генах: в гене коллагена III типа альфа I (Col III A1); в гене коллагена V типа альфа I (Col V A1); в гене коллагена V типа альфа II (Col V A2), в генах коллагена I типа альфа II (Col I A2) и коллагена I типа альфа I (Col I A1).

В основе патогенеза лежат, как упоминалось выше, дегенеративные изменения коллагеновой и эластичной ткани. Первые проявления болезни начинаются в детском возрасте. Основными признаками данного заболевания является повышенная эластичность кожи, ее растяжимость, ломкость и ранимость ее сосудов, перерастяжение связочного аппарата, обуславливающего чрезмерную подвижность суставов и частые подвывихи. Особенно выражена растяжимость и эластичность кожи в области кожи на лице и в области больших суставов. Кожа локтевых, коленных суставов истончена, пергаментобразна, сквозь нее проступает сеть телеангиэктазий. Усиленная ранимость кожи приводит к образованию рубцовых изменений. Нередко образуются мягкие, фиброзные, кожные и подкожные пигментированные опухоли, которые могут обызвестляться. В процесс иногда вовлекается слизистая оболочка щек и языка. Описывают пузырьковые высыпания, напоминающие буллезный эпидермолиз. Заболевание сопровождается аневризмой аорты, дивертикулами пищевода, дилатацией (расширение) кишечника, эвентрацией диафрагмы, вывихом хрусталика, аномалиями зубов. *Эвентрация* (лат. *eventratio* – e[x]- «отделение, удаление» + *venter* – «живот») – остро развивающийся дефект в брюшине и мышечно-апоневротическом слое передней брюшной стенки, в результате образования которого создаются условия для разгерметизации брюшной полости и выхода внутренностей за её пределы. *Дивертикул пищевода* – это мешковидное выпячивание его стенки. Чаще всего обнаруживаются в возрасте старше 50 лет у людей с другими заболеваниями органов пищеварения (язва желудка и 12-типерстной кишки, желчекаменная болезнь). Мужчины подвержены этому заболеванию в большей степени, чем женщины.

Были созданы трансгенные мыши, экспрессировавшие ген COL3A1, в котором метиониновый кодон был заменен на лизиновый в положении 939, точке пересечения в области тройной спирали белка [Toman ea 1994, Quaglino ea 1994]. Фенотипическое проявление было слабо выражено, но у беременных самок обязательно развивалась дисфункция матки [Toman ea 1994]. У тех же мышей наблюдались морфологические изменения в заживлении кожных покровов, что, однако не оказывало существенного воздействия на заживление ран [Quaglino ea 1994].

#### 24.4. Синдром Альпорта

Синдром Альпорта (семейная нефропатия с глухотой), ото-окуло-ренальный синдром, наследственный геморрагический нефрит - (MIM 104200; MIM 203780 ; MIM 120070 ; MIM 120131 ; MIM 301050). Заболевание характеризуется прогрессирующим поражением почек, развитием почечной недостаточности, глухоты, поражением глаз (катаракта, сферофакия с вторичной миопией, пигментный ретинит). Данное заболевание впервые описал Alport в 1927 году. Сферофакия - это разновидность аномалии формы хрусталика, которая сочетается с микрофакией. Хрусталик при этом резко умень-



шен, имеет шаровидную форму. При центральном положении шаровидный хрусталик может ущемляться в зрачке, вызывая вторичную глаукому.

I и II типы синдрома Альпорта (MIM 120070 ; MIM 120131) наследуются по аутосомно-рецессивному типу, III тип синдрома Альпорта (MIM 301050) наследуется сцепленно с полом (с X-хромосомой) и обусловлены мутациями в генах коллагенов Col IV AIII; Col IV AIV; Col IV AV. Как было установлено, ген коллагена IV типа альфа III (Col IV AIII) локализуется на 2 хромосоме человека в позиции q36-q37 (Turner N., 1992 ; Morrison K.E., 1991, ген коллагена IV типа альфа IV (Col IV AIV) локализуется на 2 хромосоме человека в позиции q36-37 (Kamagata Y., 1992) Ген коллагена IV типа альфа V (Col IV AV) локализуется в X-хромосоме в позиции q22-23 (Hostikka S.L., 1990 ; Myers J.C., 1990). При аутосомно-рецессивной форме синдрома Альпорта - I типа выявлены мутации в гене коллагена IV типа альфа III. При аутосомно-рецессивной форме синдрома Альпорта - II типа выявлены мутации в гене коллагена IV типа альфа IV. При форме синдрома Альпорта - III типа, сцепленного с полом, выявлены мутации в гене коллагена IV типа альфа IV.

### 24.5. Буллезный Эпидермолиз

Заболевание кожи и слизистых оболочек, при котором образуются пузыри в местах, чаще подвергающиеся давлению и трению.

Буллезный эпидермолиз (MIM 120120) фенотипически проявляется образованием пузырей на коже после механической травмы. Проявляется в раннем детском возрасте. Пузыри поверхностные. Содержимое их прозрачное или геморрагическое. Локализуются на голенях, в области коленных и локтевых суставов. Механическая травма ведет к гибели недостаточно эластичных волокон в верхнем слое дермы, в результате чего расширяются кровеносные и лимфатические сосуды.

Буллезный эпидермолиз наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Ген коллагена VII типа альфа I (Col VII A1) локализуется на 3 хромосоме в позиции p21.3 (Greenspan D.S., 1993).

В 1991-1994 годах была клонирована кДНК гена коллагена VII типа человека (Parente M.G., 1991; Tanaka T., 1992; Greenspan D.S., 1993; Christiano A.M., 1994a; Christiano A.M., 1994b). Размер мРНК гена коллагена VII типа составляет около 9,2 килобаз. Открытая рамка считывания из 8833 нуклеотидов кодирует пропептид (pro-alpha 1 VII collagen) из 2944 аминокислотных остатков. 5'-неколлагеновый сегмент из 439 аминокислотных остатков отщепляется в процессе протеолиза. Ген коллагена VII типа состоит из 118 экзонов, размер интронов колеблется от 71 нуклеотида до 1000 нуклеотидов.

Буллезный эпидермолиз обусловлен мутационными поражениями гена коллагена VII типа альфа I (Col VII A1).

### 24.6. Синдром Марфана

В 1896 году Marfan впервые описал скелетные аномалии. В 1912 году Salle отметил сочетание скелетных аномалий с глазными и сердечными.

Синдром Марфана (арахнодактилия; акромакрия, долихостеномелия; врожденная мезодермальная дистрофия, синдром Денни-Марфана, MIM 154700) – наследственное заболевание соединительной ткани, характеризующееся арахнодактилией в соче-

тании с различными глазными, скелетными и висцеральными дефектами (Robinson P.N., 2000). Синдром Марфана наследуется как аутосомно-доминантный признак с почти полной пенетрантностью, но различной экспрессивностью и встречается с частотой 1:5000-10000 новорожденных. Почти в 30% случаев этот синдром обусловлен новой спорадической миссенс мутацией. Диагноз устанавливают на основании клинических признаков, часть которых зависит от возраста больного.

Молекулы микрофибриллина равны приблизительно 148 nm в длину и 2,2 nm в ширину и соединяются между собой по принципу «голова-хвост (head-to-tail)» и параллельно, формируя микрофибриллы (Sakai L.Y., 1991).

Фибриллин является одним из важнейших структурных белков внеклеточного матрикса. кДНК гена фибриллина человека клонирована в 1991 году (Maslen C.L., 1991). Ген фибриллина человека локализован на 15 хромосоме в локусе q21.1, содержит 65 экзонов и равен приблизительно 110 kb; транскрипт гена - приблизительно 10 kb (Magenis R.E., 1991), Pereira L., 1993). Нуклеотидная и аминокислотная последовательности гена фибриллина человека представлены на Рис. FBN seq.

Пре-фибриллин из 2871 аминокислот состоит из сигнального пептида и пяти структурно организованных областей. 75 процентов белка составляет область, обогащенная цистеин-богатыми (cysteine-rich) повторами, гомологична пептидному мотиву эпидермального фактора роста (EGF) и трансформирующему фактору роста, связывающему бета-протеины (TGF- $\beta$ ). 43 из 46 EGF-подобных повторов содержат кальций связывающие консенсусные последовательности (EGF-CB), осуществляющие белок-белок взаимодействия (Corson G.M., 1993).

В основе синдрома Марфана лежит нарушение биосинтеза фибриллина-1. Этот гликопротеид с молекулярной массой 350000 Да является основным компонентом микрофибрилл эластических волокон, большое количество которых присутствует в таких тканях, как адвентициальная оболочка аорты и циннова связка. Локализация мутации в пределах гена (генотип) может играть важную роль, предопределяя тяжесть заболевания (фенотип). Неонатальный синдром Марфана вызван мутациями в экзонах 59-65, а также в экзонах 37 и 41. Описано более 100 различных мутаций этого гена; каждая из них характерна для определенной семьи. Относительно равномерное распределение мутаций в структуре гена FBN1 по-видимому, обуславливает фенотипическое разнообразие данного синдрома.

Первая мутация в гене фибриллина человека была зарегистрирована в 1991 году Dietz H.C. Полный спектр идентифицированных мутаций в гене фибриллина человека представлен в см таблицы в интернете (Табл. FBN m ; Табл. FBN sp ; Табл. FBN del). Мутации гена фибриллина-1, ассоциированные с синдромом Марфана, являются примером предсказуемых генотипически-фенотипических корреляций (Robinson P.N., 2000). Синдром характеризуется комбинацией симптомов со стороны скелета, глаз и аорты; наиболее опасными осложнениями при этом заболевании являются расслоение аорты и внезапная смерть.

### **Синдром Марфана и беременность**

При синдроме Марфана наблюдаются пролапс митрального клапана, миксоматозная дегенерация клапанов и аортальная недостаточность вследствие дилатации корня аорты. Если диаметр корня аорты превышает 40 мм (по данным ЭхоКГ), во время

беременности повышается риск ее расслаивания и разрыва. При синдроме Марфана, особенно сопровождающемся дилатацией корня аорты, беременность противопоказана. Если беременность все же наступила и женщина не желает ее прервать, назначают бета-адреноблокаторы. Они снижают силу сердечных сокращений и тем самым уменьшают силу сдвига, действующую на стенку аорты, и риск ее разрыва.

## 24.7. Несовершенный остеогенез

Несовершенный остеогенез (MIM 166200 ; osteogenesis imperfecta; OI) проявляется повышенной ломкостью костей, изменениями в суставах, глухотой, голубыми склерами, аномалиями зубов (Pore F.M., 1985). Клиницисты различают 4 типа (I-IV) остеогенеза.

### Несовершенный остеогенез I типа

Эта довольно легкая форма несовершенного остеогенеза часто наблюдается во многих поколениях семьи. Для носителей дефекта характерны голубые склеры, повторный перелом в детстве и тугоухость в относительно молодом возрасте (30-60%). Несовершенный остеогенез I типа и несовершенный остеогенез IV типа разделяют далее на подтипы А и В в зависимости от отсутствия (А) или наличия (В) несовершенного дентиногенеза. Нарушения соединительной ткани могут проявляться также легким образованием крово-подтеков, разболтанностью суставов и несколько меньшим ростом по сравнению со здоровыми членами семьи. Перелом костей возникает уже при незначительной травме, его частота после полового созревания уменьшается.

### Несовершенный остеогенез II типа

Несовершенный остеогенез II типа (летальный в перинатальном периоде): в этих случаях дети либо рождаются мертвыми, либо погибают на первом году жизни.

Масса тела и рост при рождении оказываются меньшими, чем полагается для данного гестационного возраста. Характерна резко выраженная хрупкость костей и других соединительнотканых образований.

Множественные внутриутробные переломы длинных костей придают им на рентгенограммах морщинистый вид. Отмечаются микромелия и искривление конечностей: ноги отведены от туловища под прямым углом (поза лягушки). Из-за множественных переломов ребра имеют вид нитки с бусами, а малый размер грудной клетки способствует развитию дыхательной недостаточности. Крупный череп не соответствует размерам тела; передний и задний роднички увеличены. Склеры темно-синие или серые. Микромелия - врожденное (обычно резкое) укорочение конечностей, известно у человека, др. млекопитающих, птиц.

### Несовершенный остеогенез III типа

Несовершенный остеогенез III типа (с прогрессирующими деформациями) - это самая тяжелая нелетальная форма несовершенного остеогенеза, приводящая к полной инвалидизации. Масса тела и рост при рождении обычно соответствуют нижней границе нормы. Часто имеют место внутриутробные переломы. Наблюдается относительная макроцефалия, лицо треугольной формы. В постнатальном периоде незначительная травма сопровождается переломом костей, который оставляет после себя их деформацию. Дезорганизация костного матрикса придает метафизам на рентгенограммах вид попкорна. Основания ребер расширены, грудная клетка часто деформирована. Практически у всех больных имеются сколиоз и компрессионный перелом позвонков. Ско-

рость роста уже на первом году жизни отстает от нормы. Для всех больных характерна выраженная низкорослость в зрелом возрасте. Цвет склер может быть как белым, так и голубым.

#### **Несовершенный остеогенез IV типа**

Несовершенный остеогенез IV типа - это остеогенез средней тяжести. Дети с несовершенным остеогенезом этого типа обычно рождаются с переломом костей или рождаются с искривленными ногами. Повторный перелом возникает и после того, как ребенок начинает ходить. Небольшое искривление нижних конечностей наблюдается и в отсутствие частых переломов. Такие больные требуют ортопедической помощи и реабилитационных процедур, но, как правило, могут ездить на общественном транспорте. После полового созревания перелом костей возникает реже. При рентгенологическом исследовании обнаруживаются диффузный остеопороз, утолщение метафизов и компрессионный перелом позвонков. Отставание в росте выражено умеренно. Склеры голубые или белые.

#### **Несовершенный остеогенез V типа**

Больных с некоторыми особенностями клинического фенотипа несовершенного остеогенеза IV типа предлагается выделять в отдельную группу - несовершенный остеогенез V типа (с оmozолелостью). Для них характерны гиперкератоз, мозоли, обызвествление межкостной перепонки предплечья и рентгеноконтрастные полосы в метафизах. Под поляризационным микроскопом видно ячеистое строение кости. У больных этой небольшой группы мутация генов коллагена не определяется.

#### **Гены Col I A1; Col I A2**

Ген коллагена I типа альфа I (Col I A1) локализуется на 17 хромосоме в позиции q21.31-q22.05 (Retief E., 1985 ; Huege C., 1982). Протяженность гена около 38 kb и включает в свой состав 51 экзон. На долю интронов приходится около 12 kb. Ген коллагена I типа альфа II (Col I A2) локализуется на 7 хромосоме в позиции q22.1 (Retief E., 1985). Кодированная часть гена составляет около 38 kb. Размер экзонов колеблется от 45 до 108 нуклеотидов.

#### **Col I A1 и Col I A2 Гены: мутации**

Несовершенный остеогенез обусловлен мутациями в генах коллагена I типа альфа I (Col I A1) и альфа II (Col I A2).

Первая мутация гена Col I A1 человека обнаружена в 1986 году Cohn.

Первая мутация в гена Col I A2 человека выявлена в 1984 году Pihlajane.

Структурные дефекты коллагена обусловлены преимущественно мутацией двух типов: 85% из них - это точечные мутации, приводящие к замене глицина на другие аминокислоты, 12% связано с нарушением сплайсинга одного и того же экзона. Качественный дефект коллагена при легкой форме несовершенного остеогенеза (тип I) связан с мутацией, обуславливающей «молчание» одного из аллелей гена альфа1(I)-цепи. Количество нормального коллагена в этих случаях снижено.

При мутации, сопровождающейся нарушением структуры коллагена, связь между генотипом и фенотипом практически отсутствует. Летальные и нелетальные мутации встречаются с одинаковой частотой в генах обеих цепей. В альфа2(I)-цепи летальные и нелетальные замены аминокислот локализуется в разных участках молекулы. Мутацию гена альфа1(I)-цепи невозможно связать с определенным фенотипом.

### Литература

1. Kirk J.H., Ansell B.M., Bywaters E.G. The hypermobility syndrome // *Ann. Rheum. Dis.* – 1967. – 26. – 425-7
2. Кадурина Т.И. Наследственные коллагенопатии. – СПб.: Невский проспект, 2000.
3. Симоненко В.Б., Дулин П.А., Панфилов Д.Н. и др. Соединительнотканые дисплазии (наследственные коллагенопатии) // *Клин. мед.* – 2006. – 6. – 62-8.
4. Beighton P., Solomon L., Soskolne C.L. Articular mobility in an African population // *Ann. Rheum. Dis.* – 1973. – 32. – 413-8.
5. Takahara K., Hoffman G.G., Greenspan D.S. Complete structural organization of the human alpha-1(V) collagen gene (COL5A1): divergence from the conserved organization of other characterized fibrillar collagen genes. - *Genomics*, 1995, v. 29, p. 588-597.
6. Brown R.A., Weiss J.B. Type V collagen: possible shared identity of alpha A, alpha B and alpha C chains. - *FEBS Letters*, 1979, v. 106, p. 71-75.
- Janeczko R.A., Ramirez F. Nucleotide and amino acid sequence of the entire human a1 (III) collagen. - *Nucleic acid res.*, 1989, v. 17, p. 6742.
7. Pope F.M., Nicholls A.C., McPheat J., Talmud P., Owen R. Collagen genes and proteins in osteogenesis imperfecta. - *J.Med.Genet.*, 1985, v. 22, p. 466-478.
8. Parente M.G., Chung L.C., Ryyanen J., Woodley D.T., Wynn K.C., Bauer E.A., Mattei M.G., Chu M.L., Uitto J. Human type VII collagen: cDNA cloning and chromosomal mapping of the gene. - *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 1991, v. 88, p. 6931-6935.
9. Greenspan D.S., Byers M.G., Eddy R.L., Hoffman G.G., Shows T.B. Localization of the human collagen gene COL7A1 to 3p21.3 by fluorescence in situ hybridization. - *Cytogenet.Cell Genet.*, 1993, v. 62, p. 35-36.
10. Maslen C.L., Corson G.M., Maddox B.K., Glanville R.W., Sakai L.Y. Partial sequence of a candidate gene for the Marfan syndrome. - *Nature*, 1991, v. 352, p. 334-337.
11. Magenis R.E., Maslen C.L., Smith L., Allen L., Sakai L.Y. Localization of the fibrillin (FBN) gene to chromosome 15, band q21.1. - *Genomics*, 1991, v. 11, p. 346-351.
12. Bellus, G. A., Hefferon, T. W., Ortiz de Luna, R. I., Hecht, J. T., Horton, W. A., Machado, M., Kaitila, I., McIntosh, I., Francomano, C. A. Achondroplasia is defined by recurrent G380R mutations of FGFR3. *Am. J. Hum. Genet.* 56: 368-373, 1995.
13. Robinson P.N., Godfrey M. The molecular genetics of Marfan syndrome and related microfibrinopathies. - *J.Med.Genet.*, 2000, v. 37, p. 9-25.

### Контрольные вопросы

1. Какие нарушения структуры соединительной ткани приводят к хондродисплазиям?
2. Какие мутации рецептора FGFR3 вызывают ахондроплазию?
3. Какие мутации различных коллагенов приводят к несовершенному остеогенезу?
4. Какие мутации фибриллина вызывают синдром Марфана?
5. Какими мутационными поражениями гена коллагена VII типа альфа I (Col VII A1) обусловлен буллезный эпидермолиз?
6. Какие типы синдрома Альпорта связаны с мутациями в генах коллагенов Col IV AIII; Col IV AIV; Col IV AV?
7. Какие симптомы характерны и мутации каких коллагенов вызывают для Синдром Элерса-Данло?

## ГЛАВА 25

## ВРОЖДЕННЫЕ МИОДИСТРОФИИ

## 25.1. Прогрессирующие миопатии

Прогрессирующие миопатии (Таблица 25.1 - табл. 383.1 Harrison)) называют миодистрофиями. Это редкие аутосомно-рецессивные болезни, которые условно подразделяют на четыре подгруппы, частично перекрывающиеся по клинической картине. Для некоторых форм характерно поражение ЦНС и поражение глаз. Два гена врожденных миодистрофий картированы, а один из них идентифицирован.

Таблица 25.1 (табл. 383.1(Harrison)). Прогрессирующие миопатии

Тип миопатии	Генетика	Симптомы и течение	Вовлечение других органов и систем
Миопатия Дюшенна	X-сцепленное рецессивное наследование; мутация гена дистрофина	Начало до 5 лет. Прогрессирующая слабость мышц тазового и плечевого пояса. Утрата ходьбы к 12 годам. Кифосколиоз. Дыхательная недостаточность на втором-третьем десятилетии жизни	Поражение сердца. Снижение интеллекта
Миопатия Беккера	X-сцепленное рецессивное наследование; мутация гена дистрофина	Начало в раннем или старшем детском возрасте. Прогрессирующая слабость мышц тазового и плечевого пояса. Сохранность ходьбы к 15 годам. Дыхательная недостаточность после 40 лет	Дилатационная кардиомиопатия
Тазово-плечевая миопатия (см. также табл. 383.2)	Несколько аутосомно-рецессивных форм, гены в сегментах 2p13.3-p13.1, 4q12, 13q12, 15q15.1-q21.1, 5q33-q34, 17q12-q21.33, а также несколько аутосомно-доминантных форм, ген одной из них в сегменте 5q31	Начало в раннем детском возрасте. Медленно прогрессирующая слабость мышц плечевого и тазового пояса	Поражение сердца
Врожденные миодистрофии	Несколько аутосомно-рецессивных форм, гены двух из них в сегментах 6q22-q23 и 9q31	Начало с рождения или с первых месяцев жизни. Гипотония, контрактуры, задержка двигательного развития. В части случаев прогрессирующее вплоть до дыхательной недостаточности, в других случаях прогрессирования нет	Аномалии ЦНС (гипомиелинизация и пороки развития). Аномалии глаз

Атрофическая миотония	Аутосомно-доминантное наследование; тринуклеотидные повторы в сегменте 19q13.2-13.3	Начало чаще после 10 лет (есть также врожденная форма у детей больных матерей). Медленно прогрессирующая слабость век, мимических, шейных, дистальных мышц. Миотония	Нарушения внутрисердечной проводимости. Снижение интеллекта. Катаракта. Лобные залысины. Атрофия половых желез. Артериальная гипертония. Тугоухость
Плече-лопаточно-лицевая миопатия	Аутосомно-доминантное наследование; в большинстве случаев ген в сегменте 4q35	Начало до 20 лет. Медленно прогрессирующая слабость мышц лица, плечевого пояса, передней группы мышц голени	Артериальная гипертония. Тугоухость. Поражение глаз (болезнь Кутса)
Окулофарингеальная миодистрофия	Аутосомно-доминантное наследование, ген в сегменте 14q11.2-q13	Начало в 40–60 лет. Медленно прогрессирующая слабость глазодвигательных мышц, мышц глотки и конечностей	

**Клиническая картина.** Все врожденные миодистрофии проявляются с рождения либо в первые месяцы жизни гипотонией и слабостью проксимальных мышц. У большинства больных в той или иной степени выражены контрактуры суставов - локтевых, тазобедренных, коленных, голеностопных. Врожденные контрактуры называют артрогрипозом. В части случаев имеется слабость мимических мышц, но другие мышцы, иннервируемые черепными нервами, не страдают. Тяжесть врожденных миодистрофии различна: некоторые больные умирают в детстве из-за дыхательной недостаточности, около половины не могут даже стоять без опоры, другие ходят, но их двигательная активность (например, бег) ограничена.

При одном из вариантов врожденных миодистрофии поражены только мышцы, при трех других - также ЦНС. При недостаточности ламинина альфа2 (прежнее название - мерозин) при МРТ выявляют диффузную гипомиелинизацию головного мозга (без атрофии, расширения желудочков, гипоплазии мозжечка). Клинически эта гипомиелинизация проявляется легко - не более чем нарушением способности к обучению.

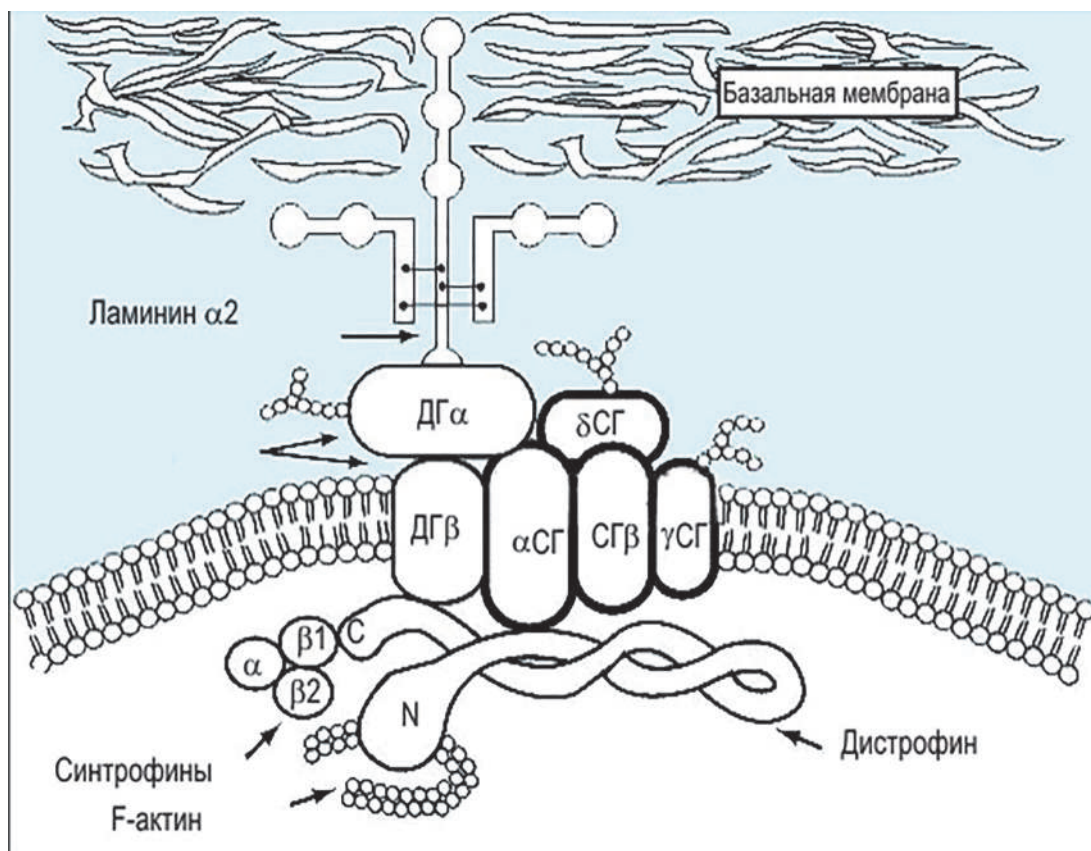
Для врожденной миодистрофии Фукуямы, встречающейся в основном у японцев, характерны тяжелая инвалидизация и умственная отсталость, большинство больных страдают эпилептическими припадками и умирают к 20 годам. Возможны микроцефалия и увеличение желудочков, характерна микрогирия.

Синдром Уокера-Варбург (врожденная миодистрофия - цереброокулярная дисгенезия) помимо этих же проявлений включает аномалии глаз: дефекты роговицы, катаракту, дисплазию сетчатки, гипоплазию зрительного нерва.

### Лабораторные и инструментальные исследования.

Активность КФК колеблется от нормальной до повышенной в 10 раз. При ЭМГ (электромиография, электромиограмма) и биопсии мышц выявляются признаки миопатии. Недостаточность ламинина альфа2 можно подтвердить отсутствием в мышце этого белка.

**Генетика.** У некоторых больных с недостаточностью ламинина альфа2 выявлены специфичные мутации гена этого белка (сегмент 6q22-q23). При этом состоянии страдает дистрофин-гликопротеидный комплекс (рисунок 25.1 - рис. 383.1 (Harrison)). Ген врожденной миодистрофии Фукуямы картирован в сегменте 9q31, но не идентифицирован. Ген врожденной миодистрофии - цереброокулярной дисгенезии не картирован. Для «чистой» врожденной миодистрофии (без поражения ЦНС и глаз) пока нет генов-кандидатов.



**Рисунок 25.1.** (рис. 383.1(Harrison)). Прогрессирующие миопатии, дистрофин.

Дистрофин находится на внутренней поверхности сарколеммы мышечного волокна. Показано предполагаемое место синтрофинового комплекса, включающего в себя синтрофины альфа, бета1 и бета2, и его связь с дистрофин-гликопротеидным комплексом.

ДГ - дистрогликан;  
СГ - саркогликан.



## 25.2. Миодистрофия Дюшенна (Псевдогипертрофическая Миопатия, Миопатия Дюшенна). Мышечная дистрофия Беккера

Миодистрофия Дюшенна (мышечная дистрофия Дюшенна, миопатия Дюшенна, псевдогипертрофическая миопатия, ММ 310200) - одно из самых частых нервно-мышечных заболеваний. Обусловлена мутациями в гене дистрофина. Дистрофин в больших количествах находится в области сарколеммы, поддерживая целостность мембраны мышечных клеток. Структурные изменения в сарколемме приводят к дегенерации цитоплазматических компонентов, усиленному входу ионов калия внутрь волокон, что вызывает гибель миофибрилл.

Наследуется по рецессивному типу, сцепленному с X-хромосомой.

Клинически разделенные два заболевания - миодистрофия Дюшенна и миодистрофия Беккера - генетически являются единой формой миодистрофии Дюшенна/Беккера

Миодистрофия Дюшенна встречается с частотой 3 на 10000 новорожденных мальчиков. Болезнь обычно проявляется в возрасте 3-5 лет прогрессирующей слабостью мышц. Мышечная слабость нарастает, преимущественно страдают проксимальные мышцы ног (особенно) и рук, сгибатели шеи. Позже, обычно через несколько лет, развиваются обездвиженность, контрактуры суставов (из-за преимущественно сидячего положения) и ограничиваются движения в тазобедренных, коленных, локтевых, лучезапястных суставах. С 8-10 лет больным требуются костыли, к 12 годам больные прикованы к коляске. Контрактуры становятся необратимыми, часто возникает и прогрессирует сколиоз, вызывающий боли. От этого деформируется грудная клетка и ухудшается функция легких, которая и без того страдает из-за мышечной слабости. В 16-18 лет часто развиваются тяжелые пневмонии, нередко с летальным исходом. Другие причины смерти - аспирация пищи и острое расширение желудка. Атрофический процесс развивается и в сердце (кардиомиопатия). Острая сердечная недостаточность является причиной летальных исходов. Нарушается моторика желудочно-кишечного тракта. На самой последней стадии атрофия мышц захватывает мышцы лица, глотки и дыхательные мышцы. Больные умирают на 2-3-м десятилетии.

Миодистрофия Беккера является доброкачественной формой. Частота у новорожденных мальчиков составляет 3:100000 (в 10 раз реже, нежели миодистрофия Дюшенна). Начало болезни не ранее 10-15 лет, течение мягкое, больные сохраняют работоспособность в возрасте 20-30 лет. Нарушения интеллекта и кардиомиопатии не отмечаются.

Хотя почти у всех больных имеется поражение сердца, все же оно редко является причиной смерти. Сердечная недостаточность возникает лишь при тяжелых сопутствующих болезнях, например, при пневмонии. Аритмии тоже редки. Типичные изменения ЭКГ - R/S более 1 в отведении V1, узкий глубокий зубец Q в левых грудных отведениях и комплекс RSR' либо зазубренный зубец R в отведении V1.

Характерно снижение интеллекта. Средний коэффициент интеллекта (IQ) больных ниже нормы на одно стандартное отклонение. Снижение интеллекта не прогрессирует; больше страдают вербальные функции. IQ при миопатии Дюшенна ниже, чем при других хронических инвалидирующих заболеваниях, то есть снижение интеллекта

нельзя объяснить только ограниченными физическими возможностями. Механизм снижения интеллекта при миопатии Дюшенна пока полностью не изучен.

### **Миодистрофия Дюшенна/Беккера: патогенез**

Дистрофин - составная часть большого дистрофин-гликопротеидного комплекса, состоящего из многих белков и связывающего внутриклеточный актин с ламинином внеклеточного матрикса, см рисунок 25.1. Для понимания патогенеза миопатии компоненты этого комплекса можно разделить на 3 группы.

Первая группа включает в себя дистрофин, а также альфа- и бета- дистрогликаны. Дистрофин N-концом связан с F-актином, а карбоксильным концом - с бета-дистрогликаном. В свою очередь, бета-дистрогликан связывается с внеклеточным гликопротеидом альфа-дистрогликаном. В базальной мембране альфа-дистрогликан связан с ламинином альфа2.

Вторая группа объединяет четыре саркогликана: альфа-саркогликан (прежнее название «адгалин»), бета-саркогликан (прежнее название «А3b»), гамма-саркогликан и дельта-саркогликан.

В третью группу входит ламинин - компонент базальной мембраны; ламинин скелетных мышц называют ламинином-2. Молекула ламинина имеет гетеротримерную крестовидную структуру с одной тяжелой альфа-цепью и двумя легкими цепями - бета1 и гамма1. Альфа-цепь ламинина скелетных мышц называют ламинином альфа2. Функции отдельных компонентов этого комплекса еще не вполне изучены, но в целом он, видимо, играет роль в укреплении сарколеммы.

Недостаточность одного из компонентов дистрофин-гликопротеидного комплекса ведет к утрате и других его составных частей. Так, недостаточность дистрофина (при миодистрофии Дюшенна/Беккера) или альфа-саркогликана (при одной из форм тазово-плечевой миопатии) ослабляет сарколемму, вызывает разрыв мембраны и далее цепь нарушений, завершающихся некрозом мышечных волокон.

### **DMD Ген дистрофина**

Gene: [0Xp212/DMD] dystrophin; muscular dystrophy, Duchenne and Becker types; cardiomyopathy, dilated, X-linked

Причиной миодистрофии Дюшенна/Беккера является дефект дистрофина - белка с молекулярной массой 427000 (3685 аминокислотных остатков), состоящего из четырех доменов. Белок находится на внутренней поверхности сарколеммы. Дистрофин - составная часть большого дистрофин-гликопротеидного комплекса, состоящего из многих белков и связывающего внутриклеточный актин с ламинином внеклеточного матрикса (рисунок 25.1 - Рис. 383.1); [Koenig M., 1988; Hoffman E.P., 1987a; Hoffman E.P., 1987b; Hammonds R.G., 1987; Nudel U., 1989; Roberts R.G., 1998; Mandel J.L., 1989)].

Ген дистрофина (DMD ген) человека локализуется на X-хромосоме в сегменте Xp21. Это один из самых крупных идентифицированных генов человека, его длина - 2 млн нуклеотидов. кДНК DMD-гена человека достигает 14 килобаз; состоит он из 60 экзонов ((Murray J.M., 1982; Davies K.E., 1985; Goodfellow P.N., 1985; Monaco A.P., 1986; Koenig M., 1987; Burghes A.H.M., 1987; Anand R., 1988; Koenig M., 1988). Нуклеотидная и аминокислотная последовательности кДНК гена дистрофина человека представлены на Рис. DMD seq. См <http://medbiol.ru/medbiol/contisdis/00022627.htm>.

### *Молекулярная генетика*

В настоящее время известные мутации удается выявить примерно у двух третей больных миодистрофией Дюшенна/Беккера. Превалирующая часть мутаций в локусе DMD человека, обуславливающих миодистрофию, представляет собой грубые структурные перестройки - частичные делеции различной протяженности (55-60 процентов всех мутаций), делеции/дупликации, дупликации. На их суммарную долю приходится около 65-70 процентов выявленных мутаций. Делеции располагаются по длине гена неравномерно, чаще в начале (5'-концевая область) и в середине гена. Течение болезни не зависит от размера делеции. Реже встречаются точечные мутации (см. Monaco A.P., 1985; Kunkel L.M., 1986; Hart K.A., 1987; Monaco A.P., 1988; Forrest S.M., 1988;) 5 процентов мутаций составляют частичные дупликации гена (Hu X., 1989; Hu X., 1990; Hu X., 1992). Данные типы мутаций возникают в результате рекомбинаций - неравного хроматидного обмена между двумя X-хромосомами в процессе мейоза. Выявлены горячие точки рекомбинаций в районе между маркерами STR 44 и STR 50 (т.е. между экзонами 44 и 51) и в районе между маркерами DXS 206 и 5'-концом DMD гена (Oudet C., 1992; Wapenaar M.C., 1988; Baldrich K., 1992; Grimm T., 1989). В ряде случаев описаны транслокации (Ray P.N., 1985; Meitinger T., 1988; Bodrug S.E., 1989; van Bakel I., 1995).

Спектр идентифицированных мутаций в гене дистрофина человека представлен см. <http://medbiol.ru/medbiol/contisdis/00058f02.htm> в Таблице DMD del; <http://medbiol.ru/med-biol/contisdis/00021085.htm> в Таблице DMD m; [000251f9.htm](http://medbiol.ru/med-biol/contisdis/000251f9.htm) в Таблице DMD sp.

Наличие специфичной мутации однозначно подтверждает диагноз и позволяет надежно выявлять носительниц мутации. Обнаружение мутации в клетках околоплодных вод либо в ворсинах хориона позволяет поставить диагноз пренатально. В семьях, где известные делеции или дупликации не выявлены, можно провести генодиагностику, исследовав наследование определенных вариантов полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.

Надежным диагностическим методом является исследование дистрофина в мышечной ткани. Содержание и размер дистрофина определяют иммуноблоттингом. Кроме того, отсутствие или недостаточность дистрофина в сарколемме можно выявить методом иммуноцитохимического окрашивания с использованием антител к дистрофину. У носительниц мутации иногда можно обнаружить мозаицизм. В целом для диагностики носительства исследование дистрофина в мышечной ткани ненадежно.

### **Миодистрофия Дюшенна/Беккера: лабораторные и инструментальные исследования**

У всех больных активность КФК в сыворотке повышена в 20-100 раз. Она высока уже с рождения, а при далеко зашедшей болезни снижается из-за обездвиженности и уменьшения мышечной массы. При ЭМГ выявляется миопатическая триада. При миопатиях выявляется так называемая миопатическая триада: снижение амплитуды и длительности и полифазные (более чем из четырех фаз) потенциалы действия двигательных единиц; количество двигательных единиц, вовлекающихся при произвольном сокращении, возрастает. При биопсии видны разнокалиберные мышечные волокна, а также небольшие группы некротизированных и регенерирующих волокон; большинство мышечных волокон заменены соединительной и жировой тканью. Несомненным

подтверждением диагноза служит выявление в биоптате недостаточности дистрофина либо обнаружение мутации молекулярно-генетическими методами.

*Мышечная дистрофия Дюшенна: генная терапия* Мышечная дистрофия Дюшенна это рецессивная X-сцепленная болезнь, и уже сейчас видны подходы к ее генно-терапевтическому облегчению. Существуют подходящие животные модели - мыши и собаки с аналогичной болезнью. Белок дистрофин, кодируемый геном DMD, для успешной генной терапии должен быть введен в клетки мышц. Оценено, что по-крайней мере 10% мышечных клеток должны получить ген дистрофина, чтобы лечебный эффект был достигнут. Поскольку болезнь начинает проявляться в детстве, то генная терапия должна проводиться в это же время. Уже испытывают различные варианты терапевтических подходов на животных. Результаты, полученные на мышах, выглядят обещающе. Использовали доставку и с помощью аденовирусов и с помощью просто ДНК, содержащей ген дистрофина. Аденовирусы здесь призваны играть важную роль в качестве векторов, поскольку они способны инфицировать неделящиеся мышечные клетки. Пытаются использовать ретровирусы, хотя здесь требуются специальные ухищрения, так как белок дистрофин очень большой (427 кДа), и его кДНК (14 кб) не помещается ни в ретровирусные, ни в аденовирусные векторы. Поэтому в этих случаях, так же как в случае фактора VIII, пытаются использовать укороченные, но тем не менее функционально активные формы белка. MDX мышшь, которая имеет дефектный ген дистрофина, использовали, в частности, как модель для введения в миобласты мини-гена дистрофина с помощью аденовирусного вектора. Оказалось, что от 5 до 50% мышечных клеток экспрессировали минидистрофин, который оказывался в тех местах, где и нормальный белок - в саркомере мышечных волокон и, что очень важно, защищал животное от дегенерации мышц.

#### **Цитогенетика**

Zneimer др. (1993) использовали комбинацию традиционных и молекулярных цитогенетических методов для исследования близнецов, впервые доложенных Richards и соавт. (1990). Близнецы несли делецию около 300 кб в гене дистрофина на одной X-хромосоме. Уникальный ДНК-фрагмент, полученные из экзона в пределах делеции, гибридизовали *in situ* с метафазными хромосомами обоих близнецов, зонд, который, предположительно, должен был гибридизоваться только с нормальной X-хромосомой, а не с X-хромосомой, несущей делецию. Хромосомы были идентифицированы с помощью реверс-полосы (R полосы) и добавления 5-бромдезоксидуридина в культуру, чтобы отличить рано и поздно реплицирующиеся X-хромосомы, что соответствует активной и неактивной X-хромосоме, соответственно. Эксперимент показал преобладающую инактивацию нормальной X-хромосомы у близнецов с МДД.

Сайто-Охара др. (2002) обследовали 16-летнего пациента с мышечной дистрофией Дюшенна с глубокой умственной отсталостью, атетозом, и нистагмом, у которого была выявлена перичентрическая инверсия в X-хромосоме, 46, Y, inv (X) (p21.2q22. 2). Его мать носила эту инверсию на одной из аллелей. Больному был изначально неправильно поставлен диагноз ДЦП. Поскольку ген DMD находится в локусе Xp21.2, который является одной из точек разрыва при инверсии inv(X), и потому, что его дефекты редко связаны с тяжелой умственной отсталостью, другие клинические признаки этого пациента были вероятно связаны с противоположной точкой разрыва на Xq22.

Молекулярно-цитогенетическая характеристика обеих точек разрыва выявила 3 генетических события, которые, вероятно, имели катастрофическое влияние на нервно-мышечное и когнитивное развитие: делеция части гена DMD в Xp21.2, дупликация гена протеолипидного белка (PLP1; 300401) в Xq22.2, и разрушение гена RAB40AL (ras-associated protein RAB40A-LIKE или RAS-like GTPase gene; RLGP) (300405). Saito-Ohara др. (2002) предположили, что повреждения RAB40AL отвечают за глубокую умственную отсталость пациента

#### **Диагностика**

**Симптом Hemizygotes** Клиническая диагностика мужчин, пораженных МДД проста. Беггс и Kunkel (1990) представлена блок-схема, иллюстрирующая процедуры для молекулярной диагностики DMD или МДБ. Для мужчин с клиническими особенностями, уровнем КФК, и биопсией мышц, они предположили, что необходимо сделать в первую очередь Western блот - тестирование на дистрофин. Если этот тест нормальный, пациент должен быть обследован для выявления других нервно-мышечных заболеваний. Если выявлено понижение или повышение размера дистрофина, с или без снижения количества дистрофина, следует заподозрить БМД. Если дистрофин отсутствует, следует заподозрить МДД. После этого ПЦР и Саузерн-блот анализ должны быть сделаны, для поиска делеций/ дупликаций. Эти процедуры обнаруживают около 65% пациентов, и Саузерн-блот позволяет прогнозировать тяжесть заболевания путем установления мутаций со сдвигом рамки считывания в более чем 90% случаев. Если ни делеций или дупликаций не найдено, то тогда необходимо прибегнуть к ПДРФ, который, к сожалению, длительный и трудоемкий. После того, как поставлен диагноз, информация может быть использована для обнаружения носительства и пренатальной диагностики. У женщин с симптомами мышечной дистрофии, иммуногистохимия дистрофина в мышцах может установить пятна с потерями дистрофина, которые могут быть использованы, для дальнейшего анализа методами, аналогичными ПЦР, блот-гибридизации по Саузерну и исследований сцепления.

### **25.3. Атрофическая Миотония**

Частота этой болезни, которой в равной степени страдают мужчины и женщины, составляет около 13, 5 на 100000 живых новорожденных. Это самая частая из миопатий у взрослых.

Клиническая картина. При атрофической миотонии клиническая картина очень разнообразна, характерно поражение мышц, помимо мышц поражаются и другие системы. Типичен вид больных: продолговатое лицо с выступающими скулами и резко очерченным носом (из-за атрофии и слабости височных, жевательных и мимических мышц). Рано поражаются мышцы шеи, в том числе сгибатели и грудино-ключично-сосцевидные, а также дистальные мышцы конечностей. Нарушается функция кисти - из-за слабости разгибателей запястья, сгибателей пальцев и собственных мышц кисти, а из-за слабости разгибателей стопы появляется свисание стопы и петушиная походка (степпаж). Проксимальные мышцы страдают гораздо меньше, хотя часто избирательно поражаются четырехглавые мышцы бедра. Характерны дизартрия (расстройство речи,

затрудненное произношение слов), дисфония (нарушение звучности речи) и дисфагия (нарушение глотания), связанные с вовлечением мышц неба, глотки и языка. Иногда в результате поражения диафрагмы и межреберных мышц развивается дыхательная недостаточность.

**Лабораторные и инструментальные исследования.** Диагноз обычно можно установить по клинической картине. Активность КФК нормальна или слегка повышена. В большинстве случаев при ЭМГ (электромиографии) можно выявить миотонические разряды. При биопсии выявляется атрофия мышц, причем в половине случаев - избирательно красных мышечных волокон, характерно также увеличение количества центрально расположенных ядер. Некроз мышечных волокон и разрастание соединительной ткани не характерны, что отличает атрофическую миотонию от других миопатий.

**Генетика.** Атрофическая миотония наследуется аутосомно-доминантно, причем новых мутаций, как теперь доказано, практически нет. Ген локализован в сегменте 19q13.2-q13.3, мутация представляет собой увеличение числа тринуклеотидных повторов ЦТГ. Усугубление болезни от поколения к поколению (антиципация) обусловлено тем, что этих повторов становится все больше. Мутация такого же типа имеет место при синдроме ломкой X-хромосомы. Характер мутации позволяет проводить пренатальную генодиагностику.

Врожденная атрофическая миотония передается почти исключительно по материнской линии, возможно, это объясняется нарушением функции сперматозоидов при большом количестве тринуклеотидных повторов. Тринуклеотидные повторы находятся в нетранслируемой области гена, кодирующего белок, гомологичный протеинкиназе и называемый миотонин-протеинкиназой. Возможно, увеличение числа тринуклеотидных повторов влияет и на другие гены. У некоторых больных с клинической картиной, близкой к атрофической миотонии, увеличения числа тринуклеотидных повторов не обнаружено. У них страдают в большей степени не дистальные, а проксимальные мышцы. Эту форму называют проксимальной миопатической миотонией. Возможно, хотя бы часть таких случаев вызвана мутацией другого гена, не связанного с геном атрофической миотонии.

**ЛЕЧЕНИЕ.** Миотония обычно не требует лечения, но если оно все же нужно, препаратом выбора является фенитоин (другие препараты, уменьшающие миотонию, особенно хинин и прокаинамид, могут вызвать аритмии). Больным с обмороками неясной природы и выраженными нарушениями ритма при наличии АВ-блокады 2-й степени либо трехпучковой блокады с выраженным удлинением интервала PQ показана имплантация электрокардиостимулятора. При свисании стопы помогает ортопедическая обувь.

## 25.4. Мышечные Дистрофии – Дистрогликанопатии; MDDG

*(Описание типов А, В и С и их генетическая гетерогенность)*

Широкий спектр фенотипических проявлений дистрогликанопатий связан с мутациями в различных генах, вовлеченных в процесс гликозилирования. Эти фенотипы, называемые серией 'MDDG', имеют диапазон от тяжелой MDDGA до более легкой формы врожденной мышечной дистрофии (смотри, например, MDDGB1, 613155), и

еще более легкой формы люмбально-конечностной мышечной дистрофии (см, например, MDDGC1, 609308). Важнейшим аспектом в определении тяжести фенотипического течения заболевания у пациентов с дистрогликанопатией является не то, какой ген мутировал, а степень влияния той или иной мутации на процесс гликозилирования DAG1 (обзор Muntoni и Voit 2004; .Muntoni др, 2008; Mercuri др. , 2009). Синдромом Уолкер-Варбурга обозначают MDDGA, так как Уолкер (1942) , возможно, первым сообщил о синдроме с лиссэнцефалией, гидроцефалией, микрофтальмией, и дисплазией сетчатки. Хотя другие, в частности Краузе (1946) и Chemke соавт. (1975) , описывали случаи заболевания, но описания Варбурга (Warburg) (1971 , 1976 , 1978) сделали синдром особенно хорошо известным. Синдром WWS также называют синдромом HARD +/- E, сокращение от слов гидроцефалия (H), агирия - (A), дисплазия сетчатки (PD), с или без энцефалоцеле (+/- (Dobyns и др., 1989).

### **Клинические признаки**

**Первые описания синдрома Walker-Warburg (WWS).TunA** Первый случай Уолкер-Варбург синдрома описан Walker (1942) и отмечен как лиссэнцефалия (Lissencephaly -греческий, 'гладкий мозг'). Pagon и др. (1978) описали результаты вскрытия после смерти брата и сестры, у которых гистологически на вскрытии обнаружены аномалии цитоархитектуры коры мозга, организованной обычно в 6 пластин. Whitley и др. (1983) описали 2 случая с WWS. В первом случае гидроцефалия была диагностирована антенатально с помощью УЗИ, катаракта и отслоение сетчатки выявлены при микрофтальмии глаза с нормальной радужной оболочкой. Младенец умер на 10 день. В мозге наблюдали полное отсутствие развития извилин и сильное растяжение боковых и третьего желудочков. Микроскопический анализ показал выраженную дезорганизацию цитоархитектуры коры с полным отсутствием ламинирования и множественную глиальную гетеротопию.

Cormand и соавт. (2001) на основе изучения МРТ у всех живорожденных пробандов выявили лиссэнцефалию (бульжный комплекс), у части из них гидроцефалию, энцефалоцеле. Глазные изменения включали микрофтальмию, буфтальм (патологическое увеличение размеров глазного яблока), врожденную глаукому, врожденную катаракту, помутнение роговицы, дисгенезию (отклонение от нормы) передней камеры глаза, и дисплазию сетчатки. Уровень креатинкиназы в сыворотке был высоким, и мышечные биопсии у 3 младенцев показали миопатические изменения. Из живорожденных детей с WWS, 1 жил 6 месяцев, 2 умерли в течение 3 лет, и 4 умерли до достижения возраста 9 месяцев.

Врожденные мышечные дистрофии-дистрогликанопатии являются генетически гетерогенными аутосомно-рецессивными заболеваниями с характерными пороками развития мозга и глаз, глубокой умственной отсталостью, врожденной мышечной дистрофией, и ранней смертью.

Врожденные мышечные дистрофии в результате неполноценного гликозилирования альфа-дистрогликана (DAG1;128239) характеризуются ранним началом мышечной слабости, как правило, еще до того, как ребенок начинает ходить; умственной отсталостью и слабовыраженными варьируемыми аномалиями мозга (Balci др., 2005; Годфри др 2007).

Пояснично-конечностные мышечные дистрофии в результате неполноценного гликозилирования альфа-дистрогликана (DAG1;128239) представляют собой самую мягкую форму в фенотипическом спектре мышечных дистрофий, известных, как дистрогликанопатии. Фенотип миодистрофии конечностей и поясницы характеризуется наступлением мышечной слабости после того как ребенок начинает ходить; варьирует как степень умственной отсталости, так и различные небольшие аномалии развития мозга (Balci др., 2005; обзор . Годфри др 2007).

#### **Патогенез**

Войт и др. (1995) продемонстрировали экспрессию М-цепи мерозина (merosin) (см. ламинин-альфа-2 (LAMA2;156225) в образцах скелетных мышц, взятых у 5 пациентов с синдромом Уолкер-Варбург. Это сохранение мерозина отличает синдром Уолкер-Варбург от врожденной мышечной дистрофии с центральной гипомиелинизацией (MDC1A; 607855), при которой merosin полностью отсутствует. В обзоре Muntoni и Войт (2004) отметили, что дистрогликан является важным структурным белком, который связывает клетки с внеклеточным матриксом, и является важным компонентом базальной мембраны. Гипогликозилирование альфа-дистрогликана приводит к разрушению дистрофин-гликопротеинового комплекса (DMD; 300377) в скелетных мышцах и может затрагивать глиальные и нейрональные взаимодействия, в результате приводящие к аномальной миграции нейронов в головном мозге.

#### **Генетическая гетерогенность врожденной мышечной дистрофии-дистрогликанопатии с аномалиями развития мозга и глаз (тип А)**

Мышечные дистрофии-дистрогликанопатии с аномалиями развития головного мозга и глаз (тип А) генетически неоднородны и могут быть вызваны мутацией в генах, участвующих в DAG1 гликозилировании: см MDDGA1, MDDGB1, MDDGC1 (236670), вызванные мутацией в гене POMT1 (607423), MDDGA2 (613150), вызванные мутацией в гене POMT2 (607439); MDDGA3 (253280), вызванные мутацией в гене POMGNT1 (606822); MDDGA4 (253800), вызванные мутацией в гене FKTN (607440); MDDGA5 (613153), вызванные мутацией в гене FKRP (606596); MDDGA6 (613154), вызванные мутацией в большом LARGE гене (603590); MDDGA7 (614643), вызванные мутацией в гене ISPD (614631); MDDGA8 (614830), вызванные мутацией в гене GTDC2 (614828); MDDGA10 (615041), вызванные мутацией в гене TMEM5 (605862); MDDGA11 (615181), вызванные мутацией в гене B3GALNT2 (610194); MDDGA12 (615249), вызванные мутацией в гене SGK196 (615247); MDDGA13 (615287), вызванные мутацией в гене B3GNT1 (605517); и MDDGA14 (615350), вызванные мутацией в гене GMPPB (615320).

#### **Генетическая гетерогенность врожденной мышечной дистрофии-дистрогликанопатии с или без умственной отсталости (тип В)**

Врожденные мышечные дистрофии с умственной отсталостью из-за дефектов гликозилирования DAG1 генетически неоднородны. Смотрите также MDDGB2 (613156), вызванные мутацией в гене POMT2 (607439); MDDGB3 (613151), вызванные мутацией в гене POMGNT1 (606822); MDDGB4 (613152), вызванные мутацией в гене FKTN (607440); MDDGB5 (616612), вызванные мутацией в гене FKRP (606596); MDDGB6 (608840), вызванные мутацией в LARGE (большом) гене (603590); и MDDGB14 (615351), вызванные мутацией в гене GMPPB (615320).



**Генетическая гетерогенность мышечной дистрофии-дистрогликанопатии (тип С)**, вызванные мутацией в гене FKTN (607440); MDDGC5 (607155), вызванные мутацией в гене FKRP (606596); MDDGC7 Мышечные дистрофии конечностей и поясницы из-за дефектов гликозилирования DAG1 генетически неоднородны. Смотрите также MDDGC2 (613158), вызванное мутацией в гене POMT2 (607439); MDDGC3 (613157), вызванные мутацией в гене POMGNT1 (606822); MDDGC4 (611588),

\* 607423 PROTEIN O-MANNOSYLTRANSFERASE 1; POMT1 *Alternative titles; symbols* ROTATED ABDOMEN, DROSOPHILA, HOMOLOG OF; RT *HGNC Approved Gene Symbol: POMT1 Cytogenetic location: 9q34.13 Genomic coordinates (GRCh38): 9:131, 502, 894-131, 523, 805 (from NCBI)*

\* 607439 PROTEIN O-MANNOSYLTRANSFERASE 2; POMT2 *HGNC Approved Gene Symbol: POMT2 Cytogenetic location: 14q24.3 Genomic coordinates (GRCh38): 14:77, 274, 955-77, 320, 884 (from NCBI)*

\*606822 PROTEIN O-MANNOSE BETA-1, 2-N-ACETYLGLUCOSAMINYLTRANSFERASE; POMGNT1 *HGNC Approved Gene Symbol: POMGNT1 Cytogenetic location: 1p34.1 Genomic coordinates (GRCh38): 1:46, 188, 680-46, 220, 304 (from NCBI)*

\* 607440 FUKUTIN; FKTN *Alternative titles; symbols* FCMD GENE; FCMD *HGNC Approved Gene Symbol: FKTN Cytogenetic location: 9q31.2 Genomic coordinates (GRCh38): 9:105, 558, 116-105, 655, 949 (from NCBI)*

\* 606596 FUKUTIN-RELATED PROTEIN; FKRP *HGNC Approved Gene Symbol: FKRP Cytogenetic location: 19q13.32 Genomic coordinates (GRCh38): 19:46, 746, 014-46, 758, 574 (from NCBI)*

\* 603590 ACETYLGLUCOSAMINYLTRANSFERASE-LIKE PROTEIN; LARGE *Alternative titles; symbols* KIAA0609 LIKE-GLYCOSYLTRANSFERASE *HGNC Approved Gene Symbol: LARGE1 Cytogenetic location: 22q12.3 Genomic coordinates (GRCh38): 22:33, 162, 236-33, 922, 840 (from NCBI)*

614631 ISOPRENOID SYNTHASE DOMAIN-CONTAINING PROTEIN; ISPD *HGNC Approved Gene Symbol: ISPD Cytogenetic location: 7p21.2 Genomic coordinates (GRCh38): 7:16, 087, 526-16, 422, 561 (from NCBI)*

\* 614828 PROTEIN O-MANNOSE BETA-1, 4-N-ACETYLGLUCOSAMINYLTRANSFERASE 2; POMGNT2 *Alternative titles; symbols* GLYCOSYLTRANSFERASE-LIKE DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 2; GTDC2 CHROMOSOME 3 OPEN READING FRAME 39; C3ORF39 AGO61 *HGNC Approved Gene Symbol: POMGNT2 Cytogenetic location: 3p22.1 Genomic coordinates (GRCh38): 3:43, 079, 228-43, 106, 091 (from NCBI)*

\* 605862 TRANSMEMBRANE PROTEIN 5; TMEM5 *HGNC Approved Gene Symbol: TMEM5 Cytogenetic location: 12q14.2 Genomic coordinates (GRCh38): 12:63, 779, 802-63, 809, 557 (from NCBI)*

\* 614828 PROTEIN O-MANNOSE BETA-1, 4-N-ACETYLGLUCOSAMINYLTRANSFERASE 2; POMGNT2 *Cytogenetic location: 3p22.1 Genomic coordinates (GRCh38): 3:43, 079, 228-43, 106, 091 (from NCBI)*

\* 610194 BETA-1, 3-N-ACETYLGALACTOSAMINYLTRANSFERASE 2; B3GALNT2 *Cytogenetic location: 1q42.3 Genomic* Мышечная дистрофия-дистрогиканопатия (*dystroglycanopathy*), *mun - 13 Zanicseucoordinates (GRCh38): 1:235, 440, 653-235, 504, 480 (from NCBI)*

\* 615247 PROTEIN-O-MANNOSE KINASE; POMK *Alternative titles; symbols* PROTEIN INASE-LIKE PROTEIN SGK196 SUGEN KINASE 196; SGK196 *HGNC Approved Gene Symbol: POMK* *Cytogenetic location: 8p11.21 Genomic coordinates (GRCh38): 8:43, 093, 505-43, 123, 179 (from NCBI)*

**Таблица 11.1. Мышечная дистрофия-дистрогиканопатия (dystroglycanopathy), тип - 13 Записей**

Расположение	Фенотип	Фенотип отображение ключ	Фенотип число МИМ	Gene / Локус	Gene / Локус МИМ число
1p34.1	Мышечная дистрофия-dystroglycanopathy (врожденная с аномалиями головного мозга и глазами аномалиями), тип А, 3	3	253280	POMGNT1, МИБ, MDDGA3, MDDGB3, MDDGC3	606822
1q42.3	Мышечная дистрофия-dystroglycanopathy (врожденная с аномалиями мозга и глаз, типа А, 11	3	615181	G3GALNT2, MGC39558, MDDGA11	610194
3p22.1	Мышечная дистрофия-dystroglycanopathy (врожденная с аномалиями мозга и глаз), типа А, 8	3	614830	POMGNT2, GTDC2, C3orf39, AGO61, MDDGA8	614828
3p21.31	Мышечная дистрофия-dystroglycanopathy (врожденная с аномалиями мозга и глазами аномалиями), тип А, 14	3	615350	GMPPB, KIAA1851, MDDGA14, MDDGB14, MDDGC14	615320
7p21.2	Мышечная дистрофия-dystroglycanopathy (врожденная с аномалиями головного мозга и глазами аномалиями), тип А, 7	3	614643	ISPD, MDDGA7	614631
8p11.21	Мышечная дистрофия-dystroglycanopathy (врожденная с аномалиями мозга и глазами аномалиями), тип А, 12	3	615249	POMK, SGK196	615247
9q31.2	Мышечная дистрофия-dystroglycanopathy (врожденная с аномалиями головного мозга и глазами аномалиями), тип А, 4	3	253800	FKTN, FCMD, CMD1X, LGMD2M, MDDGA4, MDDGB4, MDDGC4	607440
9q34.13	Мышечная дистрофия-dystroglycanopathy (врожденная с аномалиями головного мозга и глазами аномалиями), тип А, 1	3	236670 613155 609308	POMT1, MDDGA1, MDDGB1, MDDGC1	607423

11q13.2	Мышечная дистрофия-dystroglycanopathy (врожденная с аномалиями мозга и глазами аномалиями), тип А, 13	3	615287	B3GNT1, IGNT, IGAT, MDDGA13	605517
12q14.2	Мышечная дистрофия-dystroglycanopathy (врожденная с аномалиями мозга и глаз), тип А, 10	3	615041	TMEM5, MDDGA10	605862
14q24.3	Мышечная дистрофия-dystroglycanopathy (врожденная с аномалиями головного мозга и глазами аномалиями), тип А, 2	3	613150	POMT2, MDDGA2, MDDGB2, MDDGC2	607439
19q13.32	Мышечная дистрофия-dystroglycanopathy (врожденная с аномалиями головного мозга и глазами аномалиями), тип А, 5	3	613153	FKRP, MDC1C, LGMD2I, MDDGA5, MDDGB5, MDDGC5	606596
22q12.3	Мышечная дистрофия-dystroglycanopathy (врожденная с аномалиями головного мозга и глазами аномалиями), тип А, 6	3	613154	БОЛЬШОЙ, LARGE KIAA0609, MDC1D, MDDGA6, MDDGB6	603590

\* 605517 BETA-1, 3-N-ACETYLGLUCOSAMINYLTRANSFERASE 1; B3GNT1 Alternative titles; symbols i-BETA-1, 3-N-ACETYLGLUCOSAMINYLTRANSFERASE; iGNT HGNC Approved Gene Symbol: B4GAT1 Cytogenetic location: 11q13.2 Genomic coordinates (GRCh38): 11:66, 345, 371-66, 347, 689 (from NCBI)

\* 615320 GDP-MANNOSE PYROPHOSPHORYLASE B; GMPPB Alternative titles; symbols GDP-MANNOSE PYROPHOSPHORYLASE, BETA SUBUNIT GMPP-BETA HGNC Approved Gene Symbol: GMPPB Cytogenetic location: 3p21.31 Genomic coordinates (GRCh38): 3:49, 721, 475-49, 723, 973 (from NCBI)

## 25.5. Спинальная Мышечная Атрофия (СМА или SMA)

Спинальная мышечная атрофия – разнородная группа наследственных заболеваний, протекающих с поражением / потерей двигательных нейронов передних рогов спинного мозга.

Для спинальных мышечных атрофий характерно нарушение работы поперечнополосатой мускулатуры ног, а также головы и шеи. У больных отмечаются нарушения произвольных движений – ползание, ходьба, удержание головы, глотание. Мышцы рук обычно не страдают. Для спинальных амиотрофий характерно сохранение чувствительности, а также отсутствие задержки психического развития.

SMA (Спинальные мышечные атрофии) – одно из наиболее распространенных генетических нарушений (несмотря на редкую встречаемость). Спинальные мышечные атрофии детского возраста наследуются по аутосомно-рецессивному типу. Ген спинальной мышечной атрофии картирован на хромосоме 5 q11 .2 – 13.3. Этот ген

СМА был идентифицирован в 1995 г., его обозначение SMN (survival motor neuron). В среднем один из 6000 детей рождается со СМА, в разных странах частота сильно различается. 50% детей с СМА не доживают до двух лет (это дети преимущественно с 1-й формой заболевания). СМА может проявиться в любом возрасте, «мягкие» формы проявляются в среднем и пожилом возрасте. Один из каждых 40 людей имеет рецессивный ген, способный вызывать СМА. В соответствии с менделевским расщеплением ребёнок двух носителей поражается СМА с вероятностью 25 %. В этом случае оба родителя несут одиночный дефектный ген, но защищены присутствием второго, нормального гена, который является вообще достаточным для нормальной функции организма. Две дефектных копии гена приводят к генному нарушению, так как не обеспечивается синтез необходимого белка. В ходе медико-генетического обследования нескольких российских и среднеазиатских популяций (1, 8 млн человек) выявлено 33 больных спинальной мышечной атрофией (СМА): 29 с детской проксимальной СМА (СМА I–III) и 4 с редкими формами. Выявлено «перекрывание» проявлений разных типов СМА I–III (I–II и II–III) у части больных, внутрисемейные различия типов в 3-х из 6-ти семейных случаев, клинико-генетический полиморфизм редких форм СМА. (Г. Е. Руденская, Р. А. Мамедова).

СМА вызвана мутацией в гене SMN1 белка. Мутации гена снижают его экспрессию, что приводит к потере моторных нейронов.

#### **Классификация типов СМА**

- Тип 1, или болезнь Werdnig-Hoffmann, – наиболее неблагоприятная форма СМА. Дети испытывают недостаток моторного развития, имеют трудности с дыханием, затруднения с сосанием и глотанием. Тип 1 СМА проявляется у детей в период от рождения до 6 месяцев.

- Тип 2 – несколько более благоприятен. Пациенты способны сидеть без поддержки или даже стоять с поддержкой и обычно не страдают при приёме пищи. Однако они имеют увеличенный риск осложнений от инфекций дыхательных путей. Тип 2 СМА проявляется у детей в период 7-18 месяцев.

- Тип 3, также известный как болезнь Kugelberg-Welander – наименее смертельная форма СМА детского возраста. Пациент способен стоять, но испытывает сильную слабость, с тенденцией к инвалидизации (передвижение в коляске). Тип 3 СМА проявляется после 18 месяцев, реже – во взрослом состоянии.

- Тип 4 – взрослая форма болезни, признаки проявляются после 35 лет. Признаки атрофии обычно начинаются в мышцах рук, ног и языка, затем распространяются к другим областям тела.

Взрослое X-связываемое начало СМА, также известное как Синдром Кеннеди, или бульбарная спинномозговая мышечная атрофия, развивается только у взрослых людей. При этом заболевании заметно затронуты лицевые мышцы и мышцы языка. Кроме того, часто встречается гинекомастия. Прогноз болезни неопределённый, но обычно заболевание прогрессирует медленно.

#### **Лечение**

До последнего времени не было методов специфической терапии СМА.

Так как спинальная мышечная атрофия – нарушение, которое проявляется в си-

напах моторных нейронов, состояние может быть улучшено за счёт увеличения уровня SMN – белка. Цель современных исследований – поиск препаратов, увеличивающих уровня SMN. Основные результаты получены пока в исследовательских группах США, Германии, Италии.

Предложено несколько препаратов (вальпроевая кислота, бутират натрия и др.), проводятся их клинические исследования в группах добровольцев. Сведений о результативном применении стволовых клеток пока нет.

Есть сведения, что физиопроцедуры, массаж и др. методы нейро-мышечной стимуляции (напр., дельфинотерапия) положительно сказываются на состоянии больных. В то же время сведений об отрицательных эффектах от физических нагрузок нет.

Больные СМА нуждаются в специальном диетическом питании, поддерживающей терапии и многих других попечительских действиях. Количество вопросов растёт, как снежный ком – только опытный врач может помочь сориентироваться во всех проблемах.

Для объединения больных со спинальной мышечной атрофией (СМА) на Украине инициировано открытие Благотворительного Фонда родителей детей со спинальной атрофией. Регулярно проводятся телеконференции специалистов и родственников заболевших.

### **Профилактика**

В настоящий момент возможна только пассивная профилактика – предупреждение родителей с риском СМА о возможных последствиях, пренатальный скрининг – диагностика формы СМА для принятия решения о рождении. Диагностика производится в некоторых медико-генетических центрах.

### **Другие формы спинальных мышечных атрофий**

Кроме спинальных амиотрофий, обусловленных мутацией в генах SMN1 или SMN2 на длинном плече 5-й хромосомы (5q13.2), вызывающих поражение проксимальных мышц, существует множество схожих заболеваний, большинство из которых – с преимущественным поражением дистальных (то есть ближе к свободному концу конечности) мышц.

### **Список использованной литературы**

1. Boland, B. J., Silbert, P. L., Groover, R. V., Wollan, P. C., Silverstein, M. D. Skeletal, cardiac, and smooth muscle failure in Duchenne muscular dystrophy. *Pediat. Neurol.* 14: 7-12, 1996.
2. Moser, H., Emery, A. E. H. The manifesting carrier in Duchenne muscular dystrophy. *Clin. Genet.* 5: 271-284, 1974
3. Soloway, S. S., Mudge, G. H. Acute hypokalemia as a possible cause of death in a patient with advanced muscular dystrophy. *Johns Hopkins Med. J.* 144: 166-167, 1979.
4. Noguchi, S., Tsukahara, T., Fujita, M., Kurokawa, R., Tachikawa, M., Toda, T., Tsujimoto, A., Arahata, K., Nishino, I. cDNA microarray analysis of individual Duchenne muscular dystrophy patients. *Hum. Molec. Genet.* 12: 595-600, 2003.
5. Dobyns, W. B., Pagon, R. A., Armstrong, D., et al. Diagnostic criteria for Walker-Warburg syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 32: 195-210, 1989.
6. Godfrey, C., Clement, E., Mein, R., et al. Refining genotype-phenotype correlations in muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan. *Brain* 130: 2725-2735, 2007.

7. Muntoni, F., Voit, T. The congenital muscular dystrophies in 2004: a century of exciting progress. *Neuromusc. Disord.* 14: 635-649, 2004.

8. Voit, T., Sewry, C. A., Meyer, K., et al. Preserved merosin M-chain (or laminin-alpha(2)) expression in skeletal muscle distinguishes Walker-Warburg syndrome from Fukuyama muscular dystrophy and merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Neuropediatrics* 26: 148-155, 1995.

9. Balci, B., Uyanik, G., Dincer, P., et al. An autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy (LGMD2) with mild mental retardation is allelic to Walker-Warburg syndrome (WWS) caused by a mutation in the POMT1 gene. *Neuromusc. Disord.* 15: 271-275, 2005

10. Godfrey CI, Clement E, Mein R, et al. Refining genotype phenotype correlations in muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan. *Brain.* 2007 Oct;130(Pt 10):2725-35. Epub 2007 Sep 18.

11. Beltran-Valero de Bernabe, D., Currier, S., et al. Mutations in the O-mannosyltransferase gene POMT1 give rise to the severe neuronal migration disorder Walker-Warburg syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 71: 1033-1043, 2002.

12. Currier, S. C., Lee, C. K., Chang, B. S., et al. Mutations in POMT1 are found in a minority of patients with Walker-Warburg syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 133A: 53-57, 2005.

13. 600354/SURVIVAL OF MOTOR NEURON 1; SMN1 (англ.). OMIM. Johns Hopkins University. Проверено 3 июля 2017.

14. Su Y. N., Hung C. C., Lin S. Y., Chen F. Y., Chern J. P., Tsai C., Chang T. S., Yang C. C., Li H., Ho H. N., Lee C. N. Carrier screening for spinal muscular atrophy (SMA) in 107, 611 pregnant women during the period 2005-2009: a prospective population-based cohort study. (англ.) // *Public Library of Science ONE.* – 2011. – Vol. 6, no. 2. – P. e17067. – DOI:10.1371/journal.pone.0017067. – PMID 21364876.

15. Sugarman E. A., Nagan N., Zhu H., Akmaev V. R., Zhou Z., Rohlfes E. M., Flynn K., Hendrickson B. C., Scholl T., Sirko-Osadsa D. A., Allitto B. A. Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: clinical laboratory analysis of >72, 400 specimens. (англ.) // *European journal of human genetics : EJHG.* – 2012. – Vol. 20, no. 1. – P. 27-32. – DOI:10.1038/ejhg.2011.134. – PMID 21811307.

16. Спинальная амиотрофия I, II, III, IV типа... // Центр молекулярной генетики Медико-генетического научного центра.

17. Regulatory Applications for SMA Therapy Nusinersen Accepted in US, EU. BioNews Services, LLC.

18. Grant, Charley. Surprise Drug Approval Is Holiday Gift for Biogen (27 декабря 2016).

19. А.Н. Бакланов, С.В. Колесов, И.А. Шавырин. Хирургическое лечение тяжелых нейромышечных сколиозов у пациентов, страдающих спинальной мышечной атрофией // *Хирургия позвоночника.* – 2011. – № 3. – С. 31-37. – ISSN 1810-8997.

### **Контрольные вопросы**

1. Какие причины вызывают миодистрофию Дюшенна/Беккера?
2. Какие причины вызывают атрофическую миотонию?
3. Какие причины вызывают дистрогликанопатии?
4. Какие признаки характерны для дистрогликанопатий?
5. Какие типы спинальной мышечной атрофии связаны с полиморфизмом дефектного гена?

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Большое число открытых к настоящему времени полиморфных систем у человека со значительным числом аллелей приводит к тому, что практически каждый человек обладает уникальным набором генов, что позволяет говорить о биохимической и иммунологической индивидуальности личности. Это имеет большое значение в медицинской практике, особенно в судебной экспертизе.

Обычно наследственная предрасположенность носит мультифакториальный характер и определяется множеством генов с преобладающим эффектом одного или нескольких генов. Для установления этих генов пользуются биохимическими и иммунологическими методами антропогенетики. В настоящее время описано более 130 полиморфных генных локусов, кодирующих полиморфные белки. Это белки-ферменты, антигены, транспортные белки и т.д. Высказываются суждения, что около одной трети структурных генов человека должны иметь множественные аллели, т.е. кодировать полиморфные продукты метаболизма. В таком большом выборе для генетической рекомбинации заложена возможность возникновения индивидов с неблагоприятными сочетаниями генов, определяющих наследственную предрасположенность к заболеваниям. Учитывая генетический полиморфизм, для конкретного определения генетического фактора предрасположения к болезни сравнивают частоту встречаемости тех или иных полиморфных белков (антигенов) при данной болезни и в контрольной группе здоровых людей. Имеются многочисленные сведения по ассоциациям болезней с иммунологическими маркерами – антигенами групп крови АВО, системы HLA, с гаптоглобинами крови и с секретором. В частности, установлена предрасположенность людей со 2 группой (А) крови к раку желудка, толстой кишки, яичника, шейки матки, ревматизму, ишемической болезни сердца, тромбоэмболиями и т.д. Люди с 1 группой крови (0) предрасположены к заболеваниям язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки и т.д.

Генетика человека дала врачам возможность более точно определять молекулярные механизмы, лежащие в основе здоровья и болезней, выбирать подходящие для каждого конкретного пациента лекарства и другие меры исправления патологических эффектов, находить новые терапевтические мишени, выявлять повышенный риск развития болезни. Она объяснила, что многие сотни генов, взаимодействуя со средой, предрасполагают к развитию рака, аллергии, сердечно-сосудистых заболеваний, диабета, психических болезней и даже некоторых инфекционных заболеваний. Выявлены гены, благоприятствующие увеличению продолжительности жизни, что позволило предположить существование защитных генов.

Для нескольких болезней уже разработаны не только теоретические основы диагностики, но и методы профилактического лечения. Поскольку отдельные формы наследственных болезней редки, для их выявления должны быть разработаны простые и дешевые методы скрининга (просеивающей диагностики).

С точки зрения практической медицины важно осознать, что в основе патогенеза многих болезней лежит мутация одного гена. Если врач не владеет основами современной медицинской генетики и не проявляет осторожности, многие моногенные болезни остаются недиагностированными, а их наследственный характер нераспознанным.

Еще чаще наследственные факторы составляют одну из причин полигенных болезней.

Врачи должны учитывать вклад наследственных факторов в патогенез при лечении и консультировании. Во многих случаях рекомендации может дать врач-терапевт, если он овладел относительно простыми принципами медицинской генетики и медико-генетического консультирования. Сложные случаи требуют обращения к специалисту.

В настоящее время существуют большие возможности для диагностики болезней. Даже из приведенного схематического описания нетрудно понять, что существует достаточно много молекулярно-генетических методов диагностики наследственных болезней. Эти методы оказались настолько универсальными, что нашли применение не только в медицинской генетике, но и диагностике инфекционных заболеваний. Одни и те же болезни можно диагностировать разными методами. Отсюда нетрудно заключить, что есть большие возможности для диагностики болезни даже в трудных случаях (невозможность обследования родителей, малое количество биологического материала, отсутствие сведений о гене и т.д.).

На первом этапе исследований в ДНК из клинических образцов пытаются обнаружить уже описанные в литературе мутации, ассоциированные с конкретным наследственным заболеванием. На вероятность такой мутации в геномной ДНК пациента указывает диагноз наследственного заболевания, поставленный на основании симптомов болезни. В то же время необнаружение известных мутаций в его геномной ДНК не может считаться доказательством отсутствия у него соответствующего заболевания, поскольку оно может вызываться новыми мутациями в том же самом или других генах, функционально связанных с первым. Поэтому на втором этапе исследования этиологии заболевания следует воспользоваться методами, позволяющими обнаруживать неизвестные мутации.

Профилактика наследственных болезней может быть наиболее полной и эффективной, если в зиготу будет встроен ген, по функции заменяющий мутантный ген. Устранение причины наследственной болезни (а именно это и есть наиболее глубокий подход к профилактике) означает достаточно серьезное манипулирование с генетической информацией в зиготе. Это могут быть введение нормального аллеля в геном путем трансфекции, обратная мутация патологического аллеля, включение нормального гена в работу, если он блокирован, выключение мутантного гена.

Применение набора зондов, специфичных в отношении полиморфных участков ДНК, для анализа ДНК членов родословных с большим числом поколений откроет новые горизонты в генетике человека. Бурное развитие молекулярной генетики человека, начавшееся в 1980-х гг., стало возможным благодаря новаторским идеям Д. Ботштейна, Р. Уайта, М. Скольника и С. Дэвиса. Они обратили внимание, что полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) человека порождает полиморфные аллели (маркерные локусы), поддающиеся картированию. Как писали авторы в своей статье, мы хотим предложить новый способ построения генетической карты сцепления человека. В его основе лежит создание при помощи технологии рекомбинантных ДНК случайных однокопийных ДНК-зондов, способных выявлять полиморфные нуклеотидные последовательности при гибридизации с индивидуальными ДНК, обработанными рестриктазой [Глик Б., Пастернак Дж., 2002].



*Заготовки органов*

Подход на основе заготовок органов (англ. *organ bud*) представляет собой совокупность методов изготовления тканеинженерных конструкций, в которых в качестве биореактора на последней стадии морфогенеза используются полости тела человека или животного [ T. Takebe, M. Enomura, E. Yoshizawa et al., 2015]. Префабрикация таких заготовок может осуществляться различными способами формирования (3D-биопринтинг; заселение внеклеточного матрикса клетками в ротационном биореакторе; и т.д.) с последующей инкубацией *in vivo* или *in vitro*, например создание заготовки искусственной фасции из клеток и носителя в 3D-биопринтере и дальнейшее «обучение» заготовки в условиях *in vivo* [ Клабуков И.Д., 2016]

Выращивание органов – перспективная биоинженерная технология, целью которой является создание различных полноценных жизнеспособных биологических органов для человека. В настоящее время технология крайне ограниченно применяется на людях, позволяя выращивать для пересадки лишь относительно простые по внутреннему устройству органы, такие как мочевого пузыря [Gasanz, C., Raventós, C., & Morote, J. (2018)], кровеносные сосуды [Colunga, T., & Dalton, S. (2018)] или влагалище [Kim Painter., 2014].

*Устойчивость биоконструкций к шуму*

Фундаментальное исследование вопросов регуляции экспрессии генов управления развитием организма, выдерживающих различные внешние воздействия и внутреннюю стохастичность требуют применения методов моделирования метаболических процессов в клетках. [ M. B. Elowitz, et al., 2002; R. Rekhi and A. A. Qutub, , 2013]. В широком диапазоне биологических контекстов, экспрессия генов отражает процесс самоорганизации, связанный с динамикой населения и окружающей среды [E. Stolovicki and E. Braun, 2011]. Данный феномен может использоваться при проектировании сложных многокомпонентных тканей, отдельные недостатки конструкций которых могут компенсироваться самоорганизующимися и адаптирующимися клеточными сообществами. Сообщества инженерных клеток будут отличаться по своим транскрипционным профилям, паттерны экспрессии генов будут менять в результате коллективной динамики клеточных сообществ.

В последнее время появились работы по систематизации библиотек биоблоков для конструирования свойств и функций компонентов органов и тканей [ E. Cachat, W. Liu, P. Hohenstein, and J. A. Davies, 2014] для дальнейшего использования в клинической практике [ W. C. Ruder, et al. , 2011]. Одним из таких направлений использования является создание «заготовок органов» из плюрипотентных клеток различной природы для завершения морфогенеза в теле человека [ T. Takebe et al., 2013]. В настоящее время синтетические генные конструкции реализованы для узнавания клеточного типа, метаболического статуса, биохимических сигналов и света, для изменения клеточной формы, подвижности и программы дифференцировки и гибели клетки.

В 21 веке биология вступила в постгеномный этап своего развития. Активно развиваются технологии, позволяющие многократно увеличить пропускную способность стандартных экспериментальных методов. «Омиксные методы» революционизировали методологию экспериментальной биологии, анализа данных и их интеграции. Усилился акцент на функцию, структуру, эволюцию геномов. Появилось целое созвездие очень

эффективных экспериментальных дисциплин, называемых «-omics» (или «омиксные» технологии) по одинаковому окончанию: геномика, протеомика, транскриптомика, метаболомика... Сегодня мы имеем возможность анализировать первичные структуры геномов, экспрессию генов в них, выявлять различные уровни регуляции и взаимосвязи между ними. Инструментально произошел переход от микрочипов к так называемому высокопроизводительному полногеномному секвенированию, исследуется весь набор ДНК, содержащийся в отдельной клетке, клеточных популяциях или сообществах организмов и анализируется работа всех генов одновременно. Новые экспериментальные технологии порождают огромные объёмы данных, анализировать которые можно только методами биоинформатики, в основе которой лежит синтез биологических и математических знаний. [Новикова С.Е., Курбатов Л.К., Завьялова М.Г, 2017].

Вероятно, процессы регуляции у эукариотов, хотя бы частично, осуществляются с помощью системы оперона, существующей у прокариотов, ибо оперон, по крайней мере, в принципе способен обеспечить работу очень сложных регуляторных схем, оперируя относительно небольшим числом индукторно-репрессорно-операторных элементов.

#### *Методы реализации биоинженерных решений*

В настоящее время методы синтетического морфогенеза представлены молекулярно-биологическими технологиями синтеза и секвенирования нуклеиновых кислот, культивации клеток в биореакторе, дифференцировке или трансдифференцировке, в рамках которых клетки способны пройти прямой (от плюрипотентных для соматических) или обратный путь (от соматических до мульти- или плюрипотентных). Интеграция разнородных омиксных данных в совокупности с методами клеточного имиджинга позволила выполнить моделирование функционала эндотелиальных клеток кровеносного сосуда [J. Frueh, et al., 2012]. Новые направления в построении межклеточных организаций также находят свое место в создании новых симбиозов [J. K. Polka, S. G. Hays, and P. A. Silver, 2016].

Синтетический морфогенез представляет собой подход к замещению утраченных взрослым организмом тканей, органов и функций клеток, путем индуцирования локального повторения нормального онтогенеза, либо – формирования органов с принципиально новыми функциями [ Teague B. P., Guye P., Weiss R., 2016]. Однако, в настоящее время области применения клиническими специалистами как правило ограничиваются возможностями клеточной трансдифференцировки и формирования [ J. A. Davies., 2015], что связано с тремя важнейшими проблемами: а) отсутствие полноты элементов используемого биоконструктора; б) обеспечение устойчивости созданных биоконструкций к шуму; в) ограниченность методов реализации биоинженерных решений.

Использование подходов синтетической биологии позволяет решать задачу полноты элементов как конструкторскую, собирая биосистему из элементов «биоконструктора». Синтетический межклеточный сигналинг позволяет популяции клеток принимать решения и координировать поведение как локально, так и на глобальном уровне [ Teague B. P., Guye P., Weiss R., 2016]. Проектирование клеток обеспечит мощное средство тканевой инженерии для клинического применения в хирургии и восстановительной медицине. Построение простых новых систем в соответствии с теориями формирования, полученных от изучения реальных эмбрионов, будет служить средством

проверки этих теорий строго, то, что очень трудно сделать с помощью манипуляций сложных эмбрионов (системная биология как инструментарий). Требования к инженерии для синтетической морфологии включают разработку библиотеки сенсорных модулей, регулирующих модулей и эффекторных модулей, которые могут быть связаны функционально внутри клеток. Значительное число сенсорных и регуляторных модулей уже существуют, и в связи с этим библиотека, необходимая для проектирования инженерных клеток человека, находится уже в пределах досягаемости [J. A. Davies, 2008].

### Литература

1. Cantrell M.A, Kuo C.J.(2015). Organoid modeling for cancer precision medicine. *Genome Med.*;7(1):32. DOI: 10.1186/s13073-015-0158-y.PMID 25825593.
2. Colunga, T. & Dalton S. (2018). Building Blood Vessels with Vascular Progenitor Cells. *Trends in molecular medicine.* 24(7), 630-641 <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.05.002>.
3. Davies J. A., “Synthetic morphology: prospects for engineered, self-constructing anatomies.” *J. Anat.*, vol. 212, no. 6, pp. 707–19, Jun. 2008.
4. Davies J. A. (2010). Synthetic morphology: modules for engineering biological form. In book: *Synthetic & Integrative Biology: Parts & Systems, Design Theory & Application (Biotechnology in Agriculture, Industry and Medicine)*, pp.77-91. ISBN 978-1-60876-678-9.
5. Davies J. A. (2016). Synthetic Biology: Rational Pathway Design for Regenerative Medicine. *Gerontology*, 62(5), 564-570. doi:10.1159/000440721.
6. Davies J. A., & Cachat, E. (2016). Synthetic biology meets tissue engineering. *Biochemical Society Transactions*, 44(3), 696-701. doi:10.1042/BST20150289.
7. E. Stolovicki and E. Braun. “Collective Dynamics of Gene Expression in Cell Populations” *PLoS One*, vol. 6, no. 6, p. e20530, Jun. 2011.
8. E. Cachat, W. Liu, P. Hohenstein and J. A. Davies. “A library of mammalian effector modules for synthetic morphology.” *J. Biol. Eng.*, vol. 8, no. 1, p. 26, 2014.
9. Gasanz, C., Raventós, C., & Morote, J. (2018). Current status of tissue engineering applied to bladder reconstruction in humans. *Actas Urológicas Españolas (English Edition)*. 42(7), 435-441 <http://www.bioethics.gov/reports/stemcell/glossary.html>.
10. J. A. Davies. *Synthetic Biology: Rational Pathway Design for Regenerative Medicine // Gerontology*. – 2015. – Октябрь.
11. J. Frueh, N. Maimari, Y. Lui, Z. et al. “Systems and synthetic biology of the vessel wall” *FEBS Lett.*, vol. 586, no. 15, pp. 2164–2170, 2012.
12. J. K. Polka, S. G. Hays, and P. A. Silver, “Building Spatial Synthetic Biology with Compartments, Scaffolds, and Communities.” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, p. a024018, Jun. 2016.
13. Kim Painter. Lab-grown vaginas and nostrils work, doctors report, *USA Today* (April 11, 2014). Проверено 12 апреля 2014.
14. Lancaster MA, Knoblich JA.(2014). Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc.*;9 (10):2329-40. DOI:10.1038/nprot.2014.158. PMID [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ 25188634 25188634] Langman’s Medical Embryology, 11th edition. 2010. M. B. Elowitz, A. J. Levine, E. D. Siggia et al., , “Stochastic gene expression in a single cell., ” *Science*, vol. 297, no. 5584, pp. 1183–6, Aug. 2002.
15. R. Rekhi and A. A. Qutub, “Systems approaches for synthetic biology: a pathway toward mammalian design, ” *Front. Physiol.*, vol. 4, p. 285, 2013. Spirov et al. // *Development*. – 2009. – № 136. – С. 605–614.

16. T. Takebe, K. Sekine, M. Enomura, et al. "Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant.," *Nature*, vol. 499, no. 7459, pp. 481–484, Jul. 2013.
17. T. Takebe, M. Enomura, E. Yoshizawa et al. "Vascularized and Complex Organ Buds from Diverse Tissues via Mesenchymal Cell-Driven Condensation," *Cell Stem Cell*, vol. 16, no. 5, pp. 556–565, 2015.
18. Tanaka, H. & Yi T. M. (2009). Synthetic morphology using alternative inputs. *PLoS One*, 4(9), e6946. doi:10.1371/journal.pone.0006946.
19. Teague B. P., Guye P., Weiss R. Synthetic morphogenesis // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2016. – Vol. 8, № 9. – P. a023929.
20. Teague, B. P., & Weiss, R. (2015). Synthetic communities, the sum of parts. *Science*, 349(6251), 924-925. doi:10.1126/science.aad0876.
21. Turing, A. M. (1952). The chemical basis of morphogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 237(641), 37-72. doi:10.1098/rstb.1952.0012.
22. W. C. Ruder, et al., "Synthetic biology moving into the clinic." *Science*, vol. 333, no. 6047, pp. 1248–52, Sep. 2011.
23. Глик Молекулярная биотехнология. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер с англ. М. Мир, 2002. 589 с.
24. Клабуков И.Д. Сборник задач по инженерной биологии. – SSRN, 2016. – 56 с.
25. Кофмен Т + Рэфф Р, Перевод: Фомина Н, Книга: Эмбрионы, гены и эволюция. Рудольф А. Рэфф, Томас К. Кофмен. Место издания: Москва : МИР, Год издания: 1986.
26. Новикова С.Е., Курбатов Л.К., Завьялова М.Г., Згода В.Г., Арчаков А.И., Омиксные технологии для диагностики аденокарциномы лёгкого, *Биомедицинская химия*, 2017, том: 63(3), 181-210.
27. Фогель Ф., Мотульски А *Генетика человека: В 3-х т. Т. 2: Пер. с англ.-М.: Мир, 1990. - 378 с.*
28. Фогель Ф., Мотульски А. **Генетика человека: В 3-х т. Т. 3: Пер. с англ. – М.: Мир, 1990. – 366 с.**

## Терминологический словарь

**Аблефария** – отсутствие конъюнктивы.

**Абрахия** – отсутствие верхних конечностей

**Агенезия (Аплазия)** - полное врожденное отсутствие органа или части его.

**Агирия** – отсутствие извилин и борозд больших полушарий мозга.

**Аглоссия** – врожденное отсутствие языка.

**Агнатия** – аплазия нижней челюсти

**Адентия (адонтия)** – отсутствие всех или нескольких зубов.

**Акrania** – отсутствие костей свода черепа.

**Акромикрия** – маленькие кости стопы.

**Акроцефалия (Оксицефалия)** – аномально высокая или коническая форма черепа, возникающая в результате преждевременного срастания лямбдовидного и коронарного швов.

**Алопеция (Облысение, атрихоз, плешивость)** – стойкое или временное, полное или частичное выпадение волос.

**Амелия** – полное отсутствие конечностей.

**Амниотические перетяжки (тяжи Симонара)** – порок развития амниона в виде тканевых тяжей, проходящих внутри матки и связывающих между собой различные участки плодовой поверхности последа с поверхностью плода.

**Амплификация** – искусственный синтез большого числа копий небольшого фрагмента ДНК с использованием полимеразной цепной реакции.

**Аниридия** – отсутствие радужной оболочки.

**Анкилоблефарон** – сращение краев век спайками, покрытыми слизистой оболочкой.

**Анотия** – аплазия ушных раковин.

**Анофтальмия (анофтальм)** – отсутствие одного или обоих глазных яблок.

**Анорхизм** – агенезия яичек

**Антимонголоидный разрез глаз** – опущены наружные углы глазных щелей.

**Анэнцефалия** – полное или почти полное отсутствие головного мозга, костей свода черепа и мягких тканей головы.

**Арахнодактилия** – необычайно длинные и тонкие пальцы.

**Аринэнцефалия** – конечный мозг не разделен и представлен полусферой с единственной вентрикулярной полостью, свободно сообщающейся с субарахноидальным пространством.

**Артрогрипоз** – множественные врожденные контрактуры суставов.

**Атрезия** – полное отсутствие канала или естественного отверстия.

**Атрезия пищевода** – полное отсутствие канала или естественного отверстия пищевода

**Афакия** – врожденное отсутствие хрусталика

**Айхерия** – недоразвитие или отсутствие кисти или стопы

**Блефарофимоз** – укорочение век по горизонтали, т.е. сужение глазных щелей.

**Блефарохалазия** – атрофия кожи верхних век

**Брахидактилия** – укорочение пальцев.

**Брахицефалия** – увеличение поперечного размера головы при относительном уменьшении продольного размера.

**Витилиго** – очаговая депигментация кожи.

**Висцеромегалии** – аномально увеличенный лицевой череп.

**Врожденная паховая грыжа** – грыжа живота, выходящая через наружное кольцо пахового канала.

**Гетерохромия радужки** – неодинаковое окрашивание различных участков радужки.

**Гидрофтальм** – увеличение глазного яблока

**Гипертелоризм** – увеличенное расстояние между внутренними краями глазниц.

**Гипертрофия** – чрезмерное развитие органа.

**Гиперкератоз** – чрезмерное утолщение рогового слоя эпидермиса.

**Гипертрихоз** – избыточный рост волос

**Гемартомы языка** – сосудистые опухоли языка.

**Гипотония (мышечная)** – снижение тонуса мышц.

**Гипотрихоз** – недостаточный рост волос.

**Гиподонтия** – недоразвитие зубов.

**Гидроцефалия врожденная** – водянка головного мозга вследствие избыточного накопления цереброспинальной жидкости в полости черепа, сопровождающееся расширением желудочков мозга и увеличением объема головы.

**Гипоплазия врожденная** – недоразвитие органа, проявляющееся дефицитом относительной массы или размера органа.

**Гипоспадия** – нижняя расщелина уретры со смещением наружного отверстия мочеиспускательного канала.

**Гипотелоризм** – уменьшенное расстояние между внутренними краями глазниц.

**Гирсутизм** – избыточное оволосенение у девочек по мужскому типу.

**Диастема** – широкая щель между центральными резцами.

**Дискория** – зрачок в виде щели

**Дистихиазис** – двойной ряд ресниц.

**Дисплазия** – нарушение развития органов или тканей в ходе эмбриогенеза.

**Дистрофия** – расстройство питания тканей или всего организма, возникающее в результате нарушения обмена веществ.

**Долихоцефалия** – преобладание продольных размеров головы над поперечными.

**Декстрокардия** – расположение сердца справа

**Дефект межжелудочковой перегородки** – незаращение межжелудочковой перегородки, в результате часть крови из левого желудочка переходит в правый, что приводит к его переполнению, расширению и гипертрофии, а также к смешиванию артериальной и венозной крови.

**Камптодактилия** – сгибательная контрактура проксимальных межфаланговых суставов пальцев кисти.

**Кератоконус** – коническое выпячивание роговицы

**Клинодактилия** – латеральное или медиальное искривление пальца.

**Колобома** – отсутствие или, как правило, секторальный дефект какой-либо струк-

туры, чаще всего глаза. Например, колобома радужки, колобома хрусталика, колобомы лица, нижнего века, красной каймы верхней губы, мочки уха.

**Кордоцентез** – процедура взятия крови из пупочной вены плода.

**Косолапость (эквинуварусная деформация стопы)** - аномалия развития мышц, связочного аппарата и костей стопы, характеризуется ее супинацией, подошвенным сгибанием и приведением.

**Краниостеноз** – уменьшение объёма черепной коробки, обусловленное различными формами преждевременного зарастания швов.

**Краниосиностоз** – преждевременное зарастание черепных швов, ограничивающее рост черепа и приводящее к его деформации.

**Криптофтальм** – недоразвитие или отсутствие глазного яблока, век и глазной щели.

**Крипторхизм** – отсутствие одного или обоих яичек в мошонке в результате неопущения (задержка в брюшной полости или в паховом канале).

**Лагофтальм** – неполное смыкание век

**Макросомия (гигантизм)** – чрезмерно увеличенные размеры тела, росто-весовые показатели значительно превышают половозрастные нормы.

**Макростомия** – чрезмерно широкая ротовая щель.

**Макротия** – увеличенные ушные раковины.

**Макроцефалия** – увеличение размера черепа.

**Мегалокорнеа** – увеличение диаметра роговицы

**Микродонтия** – малый размер зубов

**Микрогlossия** – малые размеры языка.

**Микрогения** – малые размеры нижней челюсти.

**Микрогнатия** – уменьшенные размеры верхней челюсти.

**Микротия** – уменьшенные размеры ушных раковин.

**Микростомия** – чрезмерно уменьшенная ротовая щель

**Микроцефалия** - уменьшение окружности черепа на 5 см и более с соответствующим уменьшением массы и размеров головного мозга.

**Микрофтальмия** – малые размеры глазного яблока, уменьшение всех размеров глазного яблока.

**Монголоидный разрез глаз** – глазная щель с опущенными внутренними углами.

**Множественные ВПР** – аномалии развития, повлекшие за собой грубые изменения строения и функции органов или тканей в органах из двух и более систем.

«**Мыс вдовы**» - клиновидный рост волос на лбу.

**Олигодактилия** – отсутствие одного и более пальцев.

**Омфалоцеле** – грыжа пупочного канатика, мешковидное образование пуповины, содержащие различные участки кишечника, выходящие через широкое пупочное кольцо.

**Плагеоцефалия** – асимметрия правой и левой стороны черепа.

**Платибазия** – утолщение основания черепа

**Платиспондилия** – уплощение отдельных позвонков

**Полидактилия** – увеличение количества пальцев на кистях и (или) стопах.

**Преаксиальная полидактилия** – дополнительный палец находится со стороны I пальца, при этом I палец раздвоен (иногда трехфаланговый) с дубликацией всех или только части элементов.

**Постаксиальная полидактилия** – дополнительный палец находится с медиальной стороны (со стороны мизинца).

**Преаурикулярные папилломы** – фрагменты наружного уха, расположенные впереди ушной раковины.

**Преаурикулярные фистулы(преаурикулярные ямки)** – слепо оканчивающиеся ходы, наружное отверстие которых расположено у основания восходящей части завитка ушной раковины впереди козелка или мочки.

**Прозницефалия** – недостаточное разделение переднего мозгового пузыря на большие полушария

**Прогения** – выступание нижней челюсти вперед по сравнению с верхней.

**Прогерия** – преждевременное старение организма.

**Прогнатия** – выступание верхней челюсти вперед по сравнению с нижней вследствие ее чрезмерного развития.

**Птоз** – опущение верхнего века.

**Птериgium** – крыловидные складки кожи. Различают шейный птериgium (синдром Шерешевского-Тернера, синдром Нунан), подколенный и кубитальный птериgium (синдром множественных птериgiumов).

**Расщелина губы и/или неба** – расщелина губы, с расщелиной неба или без неё, распространяющаяся на альвеолярный отросток, твердое и мягкое небо.

**Расщелина неба** (палатосхизис) – незаращение тканей неба; по средней линии имеется широкое сообщение между ротовой и носовой полостями, которое приводит к нарушению глотания, сосания, а в дальнейшем и речи.

**Сколиоз** – заметное боковое искривление позвоночника.

**Сиреномелия (симподия, симмелия)** – слияние нижних конечностей.

**Синдактилия** – полное или частичное сращение соседних пальцев кисти или стопы.

**Синофрив** – сросшиеся брови.

**Спинномозговая грыжа (Spina bifida)** – грыжевое выпячивание спинного мозга через кистозную расщелину позвоночника.

**Стопа-качалка** – плосковыпуклая подошвенная поверхность стопы с выступающей кзади пяткой.

**Страбизм** – косоглазие.

**Сферофакция** – шаровидная форма хрусталика.

**Телеангиоэктазии** – локальное чрезмерное расширение капилляров и мелких сосудов.

**Телекант** – латеральное смещение внутренних углов глазных щелей при нормально расположенных орбитах и глазных яблоках.

**Тетрафокомелия** – порок развития конечностей, при котором кисти и стопы непосредственно прикреплены к туловищу. В легких формах отсутствуют части проксимальных отделов конечностей.

**Тетрада Фалло** – нарушение развития выходного тракта правого желудочка и ле-



гочной артерии, большой дефект межжелудочковой перегородки, дэкстрапозиция аорты и нередко резко выраженная гипертрофия мышц правого желудочка.

**Тригоцефалия** – сужение черепа в затылочной части за счет преждевременного синостоза.

**«Трилистник»** - аномальная форма черепа, характеризующаяся высоким выбухающим лбом, плоским затылком, выпячивание височных костей, при соединении которых с теменными определяются глубокие вдавления.

**Фильтр** – расстояние от нижненосовой точки до красной каймы верхней губы. Различают короткий, длинный, высокий фильтр.

**Фокомелия** – отсутствие или значительное недоразвитие проксимальных отделов конечностей, вследствие чего нормальное развитие стопы и (или) кисти кажущиеся прикрепленными непосредственно к туловищу.

**Циклопия** – наличие единственной орбиты, располагающейся по средней линии в области лба, содержащая одно либо два глазных яблока.

**Энцефалоцеле** – грыжевое выпячивание в области дефекта костей черепа, содержащее оболочку и вещество головного мозга.

**Экзенцефалия (акrania)** – отсутствие костей свода черепа и мягких покровов мозговой части черепа.

**Экзофтальм** – смещение глазного яблока вперед

**Экстрофия мочевого пузыря** – расщелина мочевого пузыря и передней брюшной стенки.

**Эктропион века (выворот века)** – ресничный край века вывернут к коже лица, глазная щель не смыкается.

**Энтропион века** – порок развития века, при котором свободный край века завернут к главному яблоку.

**Эктопия** – расположение органа в необычном месте.

**Энофтальм** – аномальное западание глазных яблок в орбите.

**Эктродактилия** – аплазия центральных компонентов кисти или стопы с формированием «клещеобразной» кисти или стопы.

**Эктопия (сублуксация) хрусталика** – подвывих, вывих хрусталика, его смещение из стекловидной ямки.

**Экзофтальм** – смещение глазного яблока вперед, сопровождающееся расширением глазной щели.

**Эпibuльбарный дермоид** – липодермоидное разрастание на конъюнктиве глазного яблока.

**Эпикант** – вертикальная кожная складка у внутреннего угла глазной щели.

**Эписпадия** – верхняя расщелина уретры, часто сопровождающаяся искривлением полового члена.

## Вопросы к итоговому контролю по медицинской генетике

### 1. ОБЩИЕ ВОПРОСЫ

1. Медицинская генетика изучает
2. Методами медицинской генетики являются
3. Медицинская генетика - это наука о
4. Удельный вес наследственных болезней в структуре заболеваемости и смертности населения увеличивается в связи с
5. Врожденные заболевания – это заболевания
6. Спорадический случай наследственного заболевания – это
7. К геномным мутациям относятся
8. Анеуплоидия – это
9. Полиплоидия – это
10. К хромосомным мутациям относятся
11. Причинами возникновения хромосомных трисомий являются
12. Понятие гена включает
13. Геном человека – это
14. Генофонд популяции – это
15. Эффектами генетического груза являются
16. Понятие пенетрантность подразумевает
17. Наследственные болезни обмена веществ у человека обусловлены
18. Синдромологический анализ – это
19. Для наследственной патологии характерно
20. Характерные особенности проявления наследственной патологии
21. Термин “врожденный порок развития” подразумевает
22. Множественные врожденные пороки развития (МВПР) – это
23. Системные врожденные пороки развития – это
24. Семиотика наследственной патологии изучает
25. Термин “синдром” в клинической генетике употребляется для обозначения
26. К особенностям наследственной патологии относятся
27. Оксицефалия – это
28. Брахицефалия – это
29. Долихоцефалия – это
30. Прогнатия – это
31. Антимонголоидный разрез глаз – это
32. Аниридия – это
33. Олигодактилия – это
34. Энцефалоцеле – это
35. Микрогнатия – это
36. Микрогения – это
37. Брахидактилия – это
38. Фильтр – это
39. Крипторхизм – это

40. Птериgium – это
41. Синдактилия – это
42. Синофриз – это
43. Арахнодактилия – это
44. Эпикант – это
45. Гипертелоризм – это
46. Гипоспадия – это
47. Гирсутизм – это
48. Кампомелия – это
49. Камптодактилия – это
50. Макротия – это
51. Омфалоцеле – это
52. Пахионихия – это
53. Прогерия – это
54. Сферофакия – это
55. Телеангиэктазия – это
56. Фокомелия – это
57. Эпibuльбарный дермоид – это

КАЗАХСТАНСКО-РОССИЙСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Н.Т. ДЖАЙНАКБАЕВ, С.А. ЕРМЕКОВА

**МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНЕТИКА**  
**Учебник**

Корректор  
*Ермекова С.А.*  
Дизайн и верстка  
*Раймкулова Н. Т.*

Отпечатано в типографии «?????»  
Печать офсетная. Ус.п.л.37, 5.

Республика Казахстан  
Алматы, 2021