

ВВЕДЕНИЕ

Генетика человека изучает явления наследственности и изменчивости у человека на всех уровнях его организации и существования: молекулярном, клеточном, организменном и популяционном. Современная генетика человека базируется на законах классической генетики, которые имеют универсальное значение. Так же, как в классической генетике, появление и становление которой связано с изучением наследования мутационных изменений в популяциях гороха, дрозофилы, мыши и других экспериментальных объектов исследования, основные достижения в генетике человека обусловлены анализом природы и характера наследования мутационных изменений у человека.

В последние годы выявлено, что спонтанная наследственная изменчивость весьма высока — в течение жизни человека приблизительно у 70% людей реализуются те или иные наследственные болезни. Таким образом, у большинства людей в течение их жизни проявляется хотя бы одно серьезное генетически обусловленное отклонение от нормы, снижающее продолжительность жизни человека по сравнению с нормой либо мешающее его нормальной жизнедеятельности и работоспособности. Изучение молекулярной природы таких генетических изменений, анализ закономерностей их наследования, оценка их распространенности в различных популяциях человека, изучение роли мутагенных факторов окружающей среды в возможном изменении спонтанного уровня мутагенеза у человека относятся к наиболее важным направлениям исследований в области генетики человека. Опираясь на эти фундаментальные знания, медицинская генетика разрабатывает методы диагностики, лечения и профилактики наследственной патологии, связанной с широким спектром менделевских, хромосомных и мультифакториальных наследственных болезней.

Современный этап развития генетики человека характеризуется стремительным прогрессом наших знаний о молекулярном строении генетического материала и о механизмах мутагенеза. Наглядным примером прогресса в области генетики человека явля-

ются успехи реализации международной программы «Геном человека». Интенсивное изучение наследственных болезней в клиниках многих стран увеличило к 1998 г их число почти до 9000 (в 1966 г было изучено только около 1500 наследственных болезней). Для более чем 3900 из этих недугов изучена локализация мутантных генов в хромосомах и проведен молекулярный анализ продуктов их деятельности. Эти достижения поставили на новую основу разработку методов диагностики наследственных болезней, их профилактики и генотерапии.

В связи с возрастающим загрязнением окружающей среды, особенно связанным с радиационным загрязнением целых регионов в результате Чернобыльской аварии, ядерных взрывов на полигонах и деятельностью предприятий ядерного топливного цикла, важное значение приобретает разработка методов оценки генетических последствий такого загрязнения для грядущих поколений.

Данный учебник не претендует на исчерпывающее изложение материалов по всем основным разделам генетики человека. По каждому из обсужденных в книге разделов имеются монографии ряда исследователей, из которых наиболее известные и доступные приведены в списке рекомендуемой литературы.

Творческие усилия авторов при подготовке учебника, состоящего из 10 глав, распределились следующим образом. Главы 1, 2, 8 и 9 написаны Н.А. Топорниной, главы 3, 4, 5 и 10 — Н.С. Стволинской. Глава 6 подготовлена В.А. Шевченко совместно с Г.П. Снигиревой. Глава 7 написана В.А. Шевченко совместно с А.В. Рубановичем.

Учебник предназначен для студентов университетов, педагогических институтов и медицинских учебных заведений, для врачей, генетиков и биологов. Книга написана достаточно популярно, поэтому она будет интересна для любого читателя, интересующегося вопросами наследственной изменчивости человека.

Успехи генетики человека, ее история тесно связаны с развитием всех разделов генетики.

Глава 1. ИСТОРИЯ ГЕНЕТИКИ ЧЕЛОВЕКА

Успехи генетики человека, ее истории, тесно связаны с развитием всех разделов генетики. Задолго до открытия Г. Менделя различными авторами были описаны патологические наследственные признаки у человека и основные типы наследования. Первые сведения о передаче наследственной патологии у человека содержатся в Талмуде (4 в. до н.э.), в котором указано на опасность обрезания крайней плоти у новорожденных мальчиков, старшие братья которых или дяди по материнской линии страдают кровотечением.

К XVIII в. относятся первые описания доминантного (полидактилии, т.е. шестипалости) и рецессивного (альбинизма у негров) признаков, сделанных французским ученым П. Мопертюи. В начале XIX в. несколькими авторами одновременно было описано наследование гемофилии, в результате изучения родословных семей, в которых встречались лица, страдающие этой болезнью.

В 1814 г. вышла книга лондонского врача Д. Адамса "Трактат о предполагаемых наследственных свойствах болезней, основанный на клиническом наблюдении." Позже она была переиздана под названием "Философский трактат о наследственных свойствах человеческой расы". Этот труд стал первым справочником для генетического консультирования. В нем Адамс сформулировал многие важные принципы медицинской генетики: "Браки среди родственников повышают частоту семейных (т.е. рецессивных) болезней", "Наследственные (доминантные) болезни не всегда проявляются сразу после рождения, но могут развиваться в любом возрасте", "Не все врожденные болезни являются на-

следственными, часть из них связана с внутриутробным поражением плода (например, за счет сифилиса)".

В середине XIX в. в России над проблемами наследственных болезней и наследственной природы человека работал В.М. Флоринский. В 1866 г. вышла его книга "Усовершенствование и вырождение человеческого рода". Наряду с противоречивыми или неверными положениями, в ней был поднят и правильно освещен ряд вопросов медицинской генетики. Среди них: значение среды для формирования наследственных признаков, вред близкородственных браков, наследственный характер многих патологий (глухонемые, альбинизма, заячьей губы, пороков развития нервной трубки). Однако этот труд В.М. Флоринского не был оценен в полной мере его современниками в силу неподготовленности к восприятию этих идей.

В последней четверти XIX в. весомый вклад в развитие генетики человека внес английский биолог Ф. Гальтон, названный К.А. Тимирязевым "одним из оригинальнейших ученых, исследователей и мыслителей." Гальтон впервые поставил вопрос о наследственности человека как предмете для изучения наследственных признаков. Анализируя наследственность ряда семей, Гальтон пришел к выводу, что психические особенности человека обусловлены не только условиями среды, но и наследственными факторами. Кроме того, он предложил и применил близнецовый метод для изучения соотносительной роли среды и наследственности в развитии признаков. Им же разработан ряд статистических методов, среди которых наиболее ценен метод вычисления коэффициента корреляции. Эти работы

заложили основу для будущего развития генетики человека. Помимо этого Гальтон стал родоначальником евгеники — науки о наследственном здоровье человека и путях его улучшения. Однако принципиальная ошибка Гальтона состояла в том, что в практических мероприятиях евгеники он рекомендовал не столько избавляться от патологических генов, сколько увеличивать количество “хороших” генов в человеческих популяциях путем создания условий для преимущественного размножения одаренных людей.

Особого внимания заслуживают исследования известного английского клинициста А. Гэррода (1857 — 1936 г.), внесшего существенный вклад в изучение проблемы генетики человека. Его работа “Распространенность алкаптонурии: изучение химических особенностей” несла ряд новых идей. Гэррод первым обнаружил взаимосвязь между генами и ферментами, открыл врожденные нарушения обмена веществ и положил начало биохимической генетике. В настоящее время изучение наследственных болезней обмена веществ — наиболее актуальный раздел генетики человека.

Труды Гэррода, Адамса и других врачей — исследователей не были оценены при их жизни. Биологи обращали мало внимания на работы медиков. Изучение наследственности проводилось главным образом на растениях. К сожалению, Г. Менделю, как и другим ученым, работавшим с растительными объектами, не были известны данные по генетике человека. В противном случае открытие законов генетики могло бы произойти значительно раньше.

В 1865 г. увидела свет знаменитая работа чешского ученого Г. Менделя “Опыты над растительными гибридами”. Законы, открытые им, оставались незамеченными в течение 35 лет и только в 1900 г.

были переоткрыты К. Корренсом (Германия), Э. Чермаком (Австрия) и Г. де Фризом (Голландия). С тех пор закономерности наследования, открытые Менделем, определяют развитие современной генетики, включая и генетику человека.

Изучая наследования признаков у гороха, Г. Мендель установил три закона:

1. Закон единообразия гибридов первого поколения;
2. Закон расщепления во втором поколении по фенотипу 3:1 (при моногибридном скрещивании);
3. Закон независимого наследования признаков.

Успех чешского ученого был связан с разработкой принципиально нового методического подхода. Он:

— ввел в науку новый гибридологический метод, выбрав для изучения контрастные пары признаков;

— проводил строгий количественный учет изучаемых признаков, что позволило обнаружить статистические закономерности наследования;

— анализируя эти закономерности, пришел к выводу, что зародышевые клетки несут набор признаков, которые могут быть определены с помощью скрещиваний.

Опыты Г. Менделя и сделанные из них выводы стали предпосылкой для создания теории гена — основы современной генетики, а 1900 г. — год вторичного открытия законов Менделя — считается годом рождения генетики. Название новой науке было дано в 1906 г. английским ученым В. Бэтсоном (от латинского слова *geneo* — порождаю), а в 1909 г. датский генетик В. Иогансен предложил такие важные генетические термины, как ген, генотип и фенотип.

В 1903 г. американский антрополог Фараби, изучая родословные в нескольких поколениях, впервые установил, что брахидактилия (короткопалость) у чело-

века наследуется по аутосомно-доминантному типу. Из этой работы следовал вывод о справедливости менделевских законов и для человека.

В 1900 г. К. Ландштейнер описал систему групп крови АВО.

В 1924 г. Ф. Бернштейн установил, что АВО-система групп крови контролируется серией множественных аллелей одного локуса. Спустя 25-30 лет был обнаружен резус-фактор (Rh) и показано, что гемолитическая желтуха новорожденных возникает из-за иммунологической несовместимости матери и плода. Эти открытия также указывали на применимость законов Менделя к наследованию признаков у человека.

В 1908 г. Г. Харди и В. Вайнберг независимо друг от друга пришли к выводу, что менделевские законы дают возможность объяснить распределение частоты генов из поколения в поколение в популяциях (от латинского — *populus* — население, народ) и условиях генетической стабильности популяции. Этот закон был установлен путем анализа наследственности человека и лег в основу популяционной генетики.

В 1919 г. Ю.А. Филипченко организовал кафедру генетики в Петроградском университете. В это же время Н.И. Вавилов сформулировал важнейший генетический закон — закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. Одновременно в Москве Н.К. Кольцов создает свою генетическую школу.

В 20 гг. XX века начала интенсивно развиваться советская генетика. Под влиянием идей евгеники, которая получила широкое распространение в ряде стран Европы (Англия, Франция, Германия) и Америке в 1921 г. в Москве Н.К. Кольцовым было организовано Русское евгеническое общество, в 1922 г. в Петрограде Ю. А. Филипченко создал Бюро по евгенике.

Эти евгенические организации ориентировались на сугубо научные задачи в отличие от евгенических обществ других стран. Н.К. Кольцов, Ю.А. Филипченко и другие ученые проводили работы по генетике одаренности, изучая родословные выдающихся личностей. Однако эти исследования грешили методическими ошибками, противоречиями, определенным примитивизмом. Вместе с тем были в евгенических работах и положительные моменты. Так, Н.К. Кольцов и Ю.А. Филипченко правильно ставили вопрос о значении социальных условий в реализации индивидуальных особенностей человека, полностью отвергали насильственный путь улучшения наследственности человека. Кроме того, силами советских евгеников были собраны родословные выдающихся личностей, например, А.С. Пушкина, Л.Н. Толстого, А.М. Горького, Ф.И. Шляпина и др.

К концу 20-х годов евгенические исследования в нашей стране были прекращены. Палада ее популярность и в других странах (кроме Германии). Число евгенических обществ быстро уменьшалось, журналы закрывались или переименовывались.

Конец 20-х — начало 30-х гг. ознаменовались значительными успехами в развитии генетики. Родилась и стала общепризнанной хромосомная теория наследственности, было установлено, что наследственность связана с генами, локализованными в хромосомах клеточных ядер, что гены в хромосомах расположены линейно и образуют группы сцепления.

В этот же период создается популяционная генетика. Большой вклад в развитие этого раздела внесли С.С. Четвериков, Р. Фишер, Н.П. Дубинин и Д.Д. Ромашев, Дж. Е. Холдейн и др.

В ряде стран, в том числе в нашей, начинает развиваться медицинская генети-

ка. С 1932 по 37 гг. работал Московский медико-биологический институт им. М. Горького (позднее — Медико-генетический институт), возглавляемый С. Г. Левитом. При нем был организован Центр близнецовых исследований. Здесь изучались болезни с наследственным предрасположением — диабет, язвенная болезнь, аллергия, гипертоническая болезнь и др. Большой интерес имели цитогенетические работы по идентификации первых хромосом человека. Особого упоминания заслуживают труды талантливого генетика и клинициста-невропатолога С.Н. Давиденкова (1880-1961). Он первым поставил вопрос о гетерогенности наследственных заболеваний и начал проводить медико-генетическое консультирование.

К концу 30-х гг. XX в. интерес к генетике человека начал снижаться. Сократилось и оставалось низким до начала 50-х гг. количество опубликованных работ.

В Советском Союзе с приходом к власти в биологической науке Т.Д. Лысенко все генетические исследования, включая и исследования по генетике человека, были запрещены. Генетика была объявлена “лженаукой”. Августовская сессия ВАСХНИЛ (1948 г.) нанесла огромный вред теоретическим и практическим достижениям генетики, утвердив антинаучные идеи Т.Д. Лысенко. Такое положение сохранялось до начала 60-х гг.

Возрождение советской генетической науки началось после разоблачения “учения” Лысенко и шло по пути развития медицинской генетики. В 1964 г. был издан учебник В.П. Эфроимсона по медицинской генетике, в 1969 г. открыт Институт медицинской генетики под руководством Н.П. Бочкова (в настоящее время — Научно-исследовательский центр медицинской генетики РАМН), где начались широкие исследования по многим направлениям медицинской генетики.

В 50-х гг. получают широкое развитие исследования по радиационной генетике человека. Еще в 1927 г. американский исследователь Г. Меллер установил сильное мутагенное действие рентгеновских лучей. Это открытие показало опасность облучения половых клеток человека для последующих поколений, в силу чего человеку как объекту генетических исследований стало уделяться больше внимания.

С 1959 по 1962 гг. количество публикаций, симпозиумов, конференций по генетике человека быстро возрастало. Слияние генетики, цитологии, цитогенетики, биохимии способствовало формированию клинической генетики.

Усилиями ученых была подтверждена гетерогенность наследственных патологий, когда один и тот же фенотип болезни обусловлен изменением разных белков. Трудно переоценить важность этого открытия для диагностики, лечения и медико-генетического консультирования наследственных болезней.

В 1944 г. было достоверно установлено, что передача наследственной информации связана с дезоксирибонуклеиновой кислотой (ДНК). Это открытие явилось мощным фактором, стимулирующим изучение наследственности на молекулярном уровне. А благодаря созданию в 1953 г. Д. Уотсоном и Ф. Криком модели макромолекулярной структуры ДНК, началось углубленное изучение молекулярной, биохимической и иммуногенетики человека.

Убедительный пример значения фундаментальных исследований для практического здравоохранения дает история развития цитогенетики. В 1956 г. Х. Тию и А. Леван установили, что в клетках человека содержится 46 хромосом, а спустя три года были открыты хромосомные болезни человека. В 1959 г. Дж. Лежен установил цитогенетическую картину воз-

никновения синдрома Дауна (трисомия по 21-й хромосоме.). В это же время несколько ученых идентифицировали на хромосомном уровне синдром Тернера (ХО) и синдром Клайнфельтера (ХХУ). Одновременно была определена роль Y-хромосомы в определении пола человека.

В 1960 г. Р. Мурхед с коллегами разработали метод культивирования лимфоцитов периферической крови для получения метафазных хромосом человека, что позволило обнаруживать мутации хромосом, характерные для определенных наследственных болезней. Другим важным открытием для развития цитогенетики человека явилась разработка методов дифференциальной окраски хромосом. Благодаря ему стала возможна идентификация каждой хромосомы человека, а это резко повысило разрешающую способность цитогенетических методов.

Еще одним этапом развития современной генетики человека явилось картирование и локализация генов в хромосомах человека. Достижения цитогенетики, генетики соматических клеток, увеличение числа генетических маркеров способствовали успешному изучению групп сцепления. В настоящее время у человека установлено 23 группы сцепления. Эти данные нашли непосредственное применение в диагностике наследственных заболеваний и медико-генетическом консультировании.

Тесная связь современной генетики с химией, физикой, биохимией, физиологией, экологией, фармакологией и другими науками способствовала появлению новых разделов генетики: цитогенетики, радиационной генетики, иммуногенетики, фармакогенетики, экологической генетики.

Во второй половине XX в. начала интенсивно развиваться молекулярная ге-

нетика и генная инженерия, были разработаны методы искусственного и ферментативного синтеза генов. В 1969 г. индийский ученый Г. Карано впервые осуществил искусственный синтез гена. С помощью генной инженерии получены искусственные гены инсулина, интерферона, соматотропина и др. Эти достижения открывают большие перспективы в диагностике, профилактике и лечении наследственных болезней человека.

Возможности молекулярной генетики и развитие современных методов работы с ДНК нашли применение для решения практических задач медицинской генетики.

Конец XX в. ознаменован разработкой и началом осуществления грандиозной международной программы "Геном человека". Ее задача — изучение генома человека, включая картирование хромосом и секвенирование их ДНК, определение полной нуклеотидной последовательности генома, состоящего из трех миллиардов пар нуклеотидов. В рамках этой программы разрабатываются методы диагностики и лечения наследственных болезней. В настоящее время уже возможна ДНК-диагностика более 100 наследственных дефектов. В недалеком будущем станет реальностью генотерапия наиболее распространенных болезней человека, патогенез которых уже известен.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие сведения о наследственных патологиях были известны в XVIII-XIX вв.?
2. Какова роль классической генетики в развитии генетики человека?
3. Назовите отечественных ученых, внесших большой вклад в развитие генетики человека.
4. Когда впервые достоверно описаны хромосомы человека?
5. Какие науки тесно взаимосвязаны с генетикой человека на современном этапе? (Объяснить, почему?)

Глава 2. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНЕТИКИ ЧЕЛОВЕКА

Основные закономерности наследственности, установленные для живых организмов, универсальны и в полной мере справедливы и для человека. Вместе с тем как объект генетических исследований человек имеет свои преимущества и недостатки.

Для людей невозможно планировать искусственные браки. Еще в 1923 г. Н.К. Кольцов отмечал, что "...мы не можем ставить опыты, мы не можем заставить Нежданову выйти замуж за Шалыпина только для того, чтобы посмотреть, какие у них будут дети". Однако эта трудность преодолена благодаря прицельной выборке из большого числа брачных пар тех, которые соответствуют целям данного генетического исследования.

В значительной мере затрудняет возможности генетического анализа человека большое число хромосом — $2n=46$. Однако разработка новейших методов работы с ДНК, метода гибридизации соматических клеток и некоторых других методов устраняют эту трудность.

Из-за небольшого числа потомков (во второй половине XX в. в большинстве семей рождалось по 2-3 ребенка) невозможен анализ расщепления в потомстве одной семьи. Однако в больших популяциях можно выбрать семьи с интересующими исследователя признаками. Кроме того, в некоторых семьях определенные признаки прослежены на протяжении многих поколений. В таких случаях возможен генетический анализ. Еще одна трудность связана с длительностью смены

поколений у человека. Одно поколение у человека занимает в среднем 30 лет. И, следовательно, генетик не может наблюдать более одного-двух поколений.

Для человека характерен большой генотипический и фенотипический полиморфизм. Проявление многих признаков и болезней в сильной степени зависят от условий внешней среды. Следует отметить, что понятие "среда" для человека более широкое по сравнению с растениями и животными. Наряду с питанием, климатом и другими абиотическими и биотическими факторами, средой для человека являются и социальные факторы, трудно изменяемые по желанию исследователя. Вместе с тем, человека как генетический объект широко изучают врачи всех специальностей, что нередко помогает установить различные наследственные отклонения.

В настоящее время интерес и внимание к изучению генетики человека активно возрастают. Так, глобальная международная программа "Геном человека" имеет своей задачей изучение генома человека на молекулярном уровне. Для ее решения используются все новейшие современные методы генетики и медицины.

Какими же методами располагает генетика человека в настоящие дни? Их немало: генеалогический, близнецовый, цитогенетический, популяционно-статистический, биохимический, метод генетики соматических клеток и молекулярно-генетический. Рассмотрим подробнее каждый из них.

Генеалогический метод

Относящийся к числу основных в генетике человека, этот метод опирается на генеалогию — учение о родословных. Его сутью является составление родословной и последующий ее анализ. Впервые такой подход был предложен английским ученым Ф. Гальтоном в 1865 г.

Генеалогический метод широко используется для решения как научных, так и прикладных проблем. Он позволяет выявить наследственный характер признака и определить тип наследования. Наряду с этим метод дает возможность установить сцепленное наследование, определить тип взаимодействия генов и пенетрантность аллелей. Генеалогический метод лежит в основе медико-генетического консультирования. Он включает два этапа: составление родословных и их генеалогический анализ.

Составление родословной

Сбор сведений о семье начинается с человека, называемого пробандом. Обычно это больной с изучаемым заболеванием. Дети одной родительской пары называются сибсами (братья-сестры). В большинстве случаев родословная собирается по одному или нескольким признакам. Родословная может быть полной или ограниченной. Чем больше поколений прослежено в родословной, тем она полнее и тем выше шансы на получение полностью достоверных сведений.

Сбор генетической информации проводится путем опроса, анкетирования, личного обследования семьи. Опрос начинается обычно с родственников по материнской линии: бабушки и дедушки по материнской линии, с указанием внуков, детей каждого ребенка бабушки и дедушки. В родословную

вносят сведения о выкидышах, абортax, мертворожденных, бесплодных браках и др.

При составлении родословной ведется краткая запись данных о каждом члене рода с указанием его родства по отношению к пробанду. Обычно указываются: фамилия, имя и отчество, дата рождения и смерти, возраст, национальность, место жительства семьи, профессия, наличие хронических заболеваний в семье, причину смерти умерших и др.

После сбора сведений составляют графическое изображение родословной, используя систему условных обозначений (рис. 2.1).

Выполняя эту работу, важно соблюдать следующие правила:

1. Составление родословной начинают с пробанда. Братья и сестры располагаются в порядке рождения слева направо, начиная со старшего.

2. Все члены родословной располагаются строго по поколениям в один ряд.

3. Поколения обозначаются римскими цифрами слева от родословной сверху вниз.

4. Арабскими цифрами нумеруются потомство одного поколения (один ряд) слева направо.

5. В связи с тем, что некоторые болезни проявляются в разные периоды жизни, указывается возраст членов семьи.

6. Отмечаются лично обследованные члены родословной.

Графическое изображение родословной может быть вертикально-горизонтальным или расположенным по кругу (в случае обширных данных). Схема родословной сопровождается описанием обозначений под рисунком, которое называется легендой (рис. 2.2).

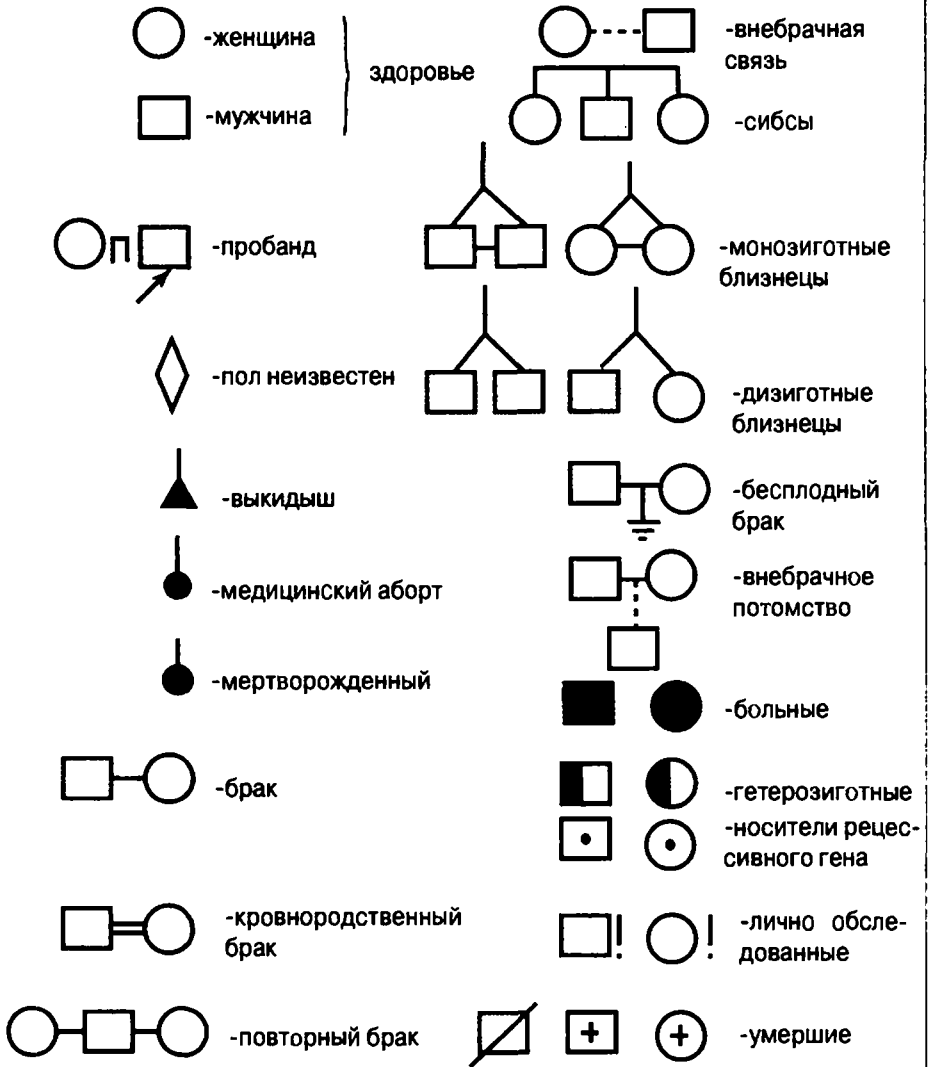


Рис. 2.1. Символы, используемые при составлении родословной

Генетический анализ родословной

Задача генетического анализа — установление наследственного характера заболевания и типа наследования, выявление гетерозиготных носителей мутантного гена, а так же прогнозирование

рождения больных детей в семьях с наследственной патологией.

Анализ родословной включает следующие этапы: 1. Установление, является ли данный признак или заболевание единичным в семье или имеется

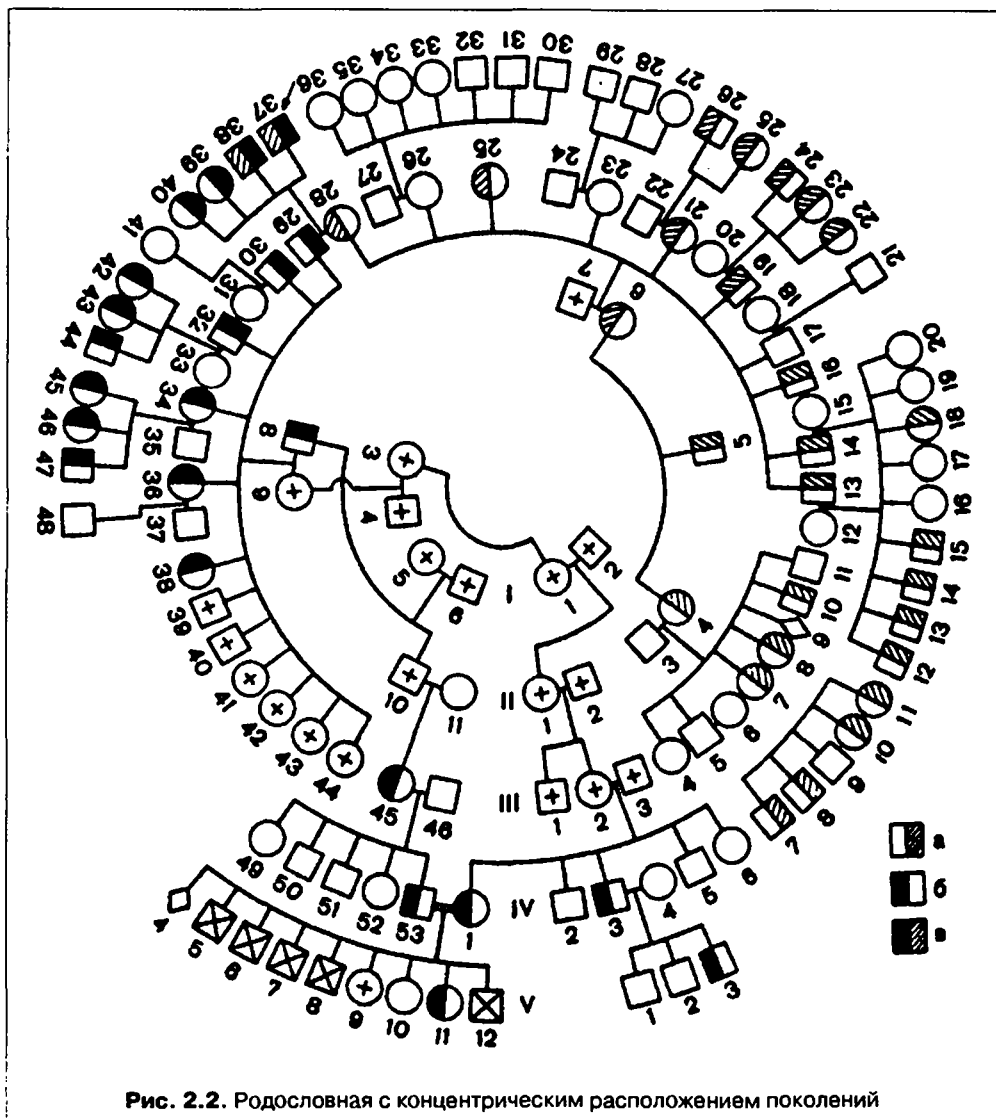


Рис. 2.2. Родословная с концентрическим расположением поколений

несколько случаев (семейный характер). Если признак встречается несколько раз в разных поколениях, то можно предполагать, что этот признак имеет наследственную природу.

2. Определение типа наследования признака. Для этого анализируют родословную, учитывая следующие моменты:

1) встречается ли изучаемый признак во всех поколениях и многие ли члены родословной обладают им;

2) одинакова ли его частота у лиц обоих полов и у лиц какого пола он встречается чаще;

3) лицам какого пола передается признак от больного отца и больной матери;

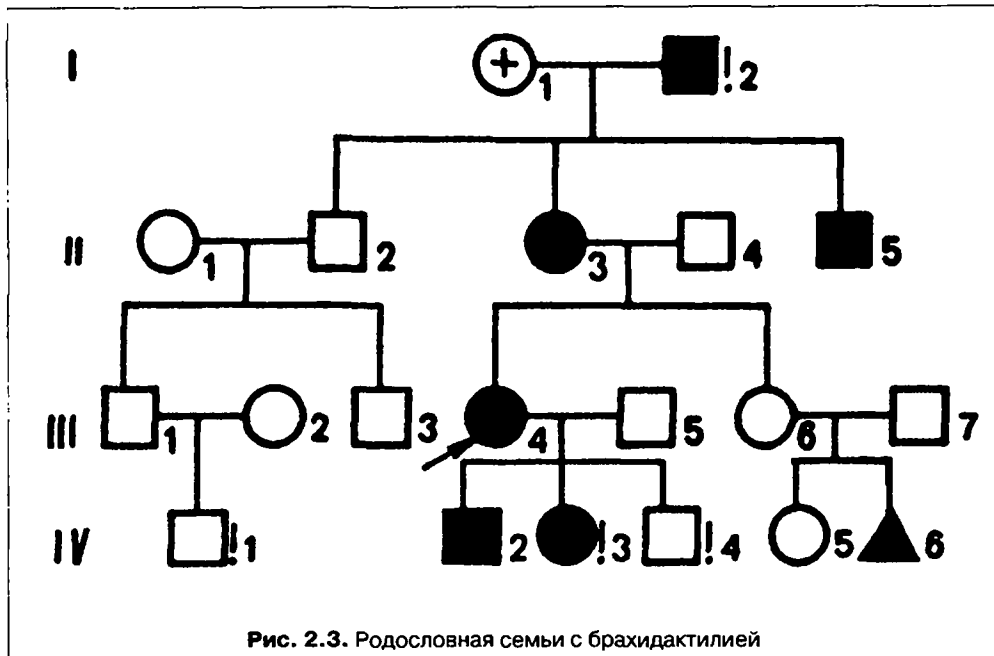


Рис. 2.3. Родословная семьи с брахидактилией

4) есть ли в родословной семье, в которых у обоих здоровых родителей рождались больные дети, или у обоих больных родителей рождались здоровые дети;

5) какая часть потомства имеет наследуемый признак в семьях, где болен один из родителей.

В зависимости от типа наследования общая картина родословной выглядит по-разному

Аутосомно-доминантное наследование характеризуется тем, что мутантный ген связан с аутосомой и проявляется как в гомозиготном (AA), так и в гетерозиготном (Aa) состояниях. В силу этого прослеживаются следующие особенности наследования:

1) передача патологии от больных родителей к детям;

2) оба пола поражаются в равных пропорциях;

3) здоровые члены семьи обычно имеют здоровое потомство;

4) отец и мать одинаково передают мутантный ген дочерям и сыновьям. Возможна передача болезни от отца к сыну.

Клинические проявления болезни могут значительно варьировать в зависимости от экспрессивности и пенетрантности гена. Экспрессивностью называется степень выраженности гена (в нашем случае — тяжесть заболевания). При высокой экспрессивности гена развивается тяжелая, часто с летальным исходом форма заболевания, при низкой — внешне человек здоров. Под пенетрантностью понимается частота проявления мутантного гена среди его носителей. Она определяется отношением числа особей, имеющих данную болезнь (или признак), к числу особей, имеющих данный ген, выраженным в процентах. Например, пенетрантность атеросклероза 40%, синдрома Марфана 30%, ретинобластомы 80% и т.д.

Экспрессивность и пенетрантность колеблются в широких пределах (от 0 до 100%) и сильно зависят от условий внешней среды. По аутосомно-доминантному типу наследуется полидактилия (шестипалость), брахидактилия (короткопалость), ахондроплазия (карликовость), синдром Марфана ("паучьи пальцы") и другие заболевания (рис. 2.3).

При доминантном типе наследования, если один из родителей болен (Aa), вероятность рождения больного ребенка равна 50% при условии полной пенетрантности гена. В случае гетерозиготности обоих родителей ($Aa \times Aa$) больные дети могут родиться с вероятностью 75%. Многие аутосомно-доминантные заболевания в гомозиготном состоянии протекают в более тяжелой форме, чем у гетерозигот. Однако в практике нередки случаи, когда носители доминантного гена остаются фенотипически здоровыми. В результате вид родословной изменяется и появляются пропуски поколений.

Носительство доминантного гена без фенотипического проявления можно заподозрить у одного из родителей, если среди его потомков появились больные с такой же доминантной патологией. Когда у здоровых родителей появился больной ребенок и в родословной есть другие случаи этой болезни, то правомочно предполагать, что у одного из родителей больного был дефектный ген, который не пенетрировал, но был передан потомку.

Доминантный ген может обладать разной степенью экспрессивности, что затрудняет установление аутосомно-доминантного типа наследования. Рассмотрим это на примере наследственной патологии соединительной ткани — синдрома Марфана. Встречаются тяжелые формы заболевания с классиче-

ским поражением костной системы (сколиоз или кифосколиоз, деформация грудины, высокий рост), нарушением зрения (двусторонний вывих хрусталика) и сердечно — сосудистой системы (расширение аорты). Наблюдаются и стертые формы синдрома Марфана, которые не диагностируются (астеническое телосложение, арахнодактилия, небольшая миопия). Слабо выраженные клинические формы болезни могут легко пропускаться, тогда родословная также теряет свой "классический" вид, то являются пропуски поколений. Поэтому важно проводить личное обследование всех членов семьи.

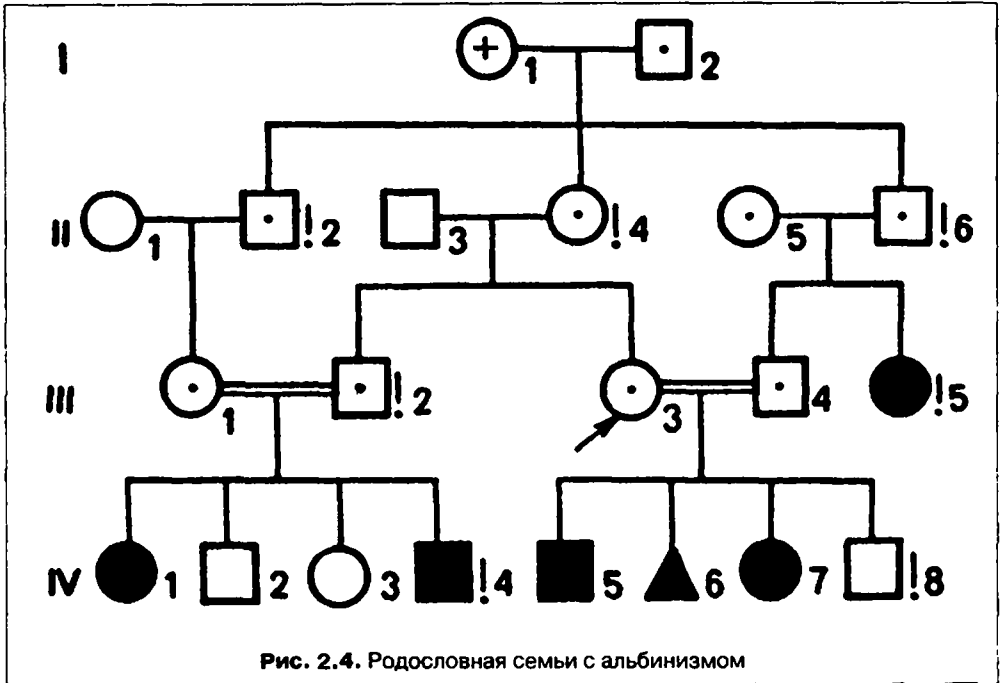
При аутосомно-рецессивном типе наследования мутантный ген проявляет свое действие только в гомозиготном состоянии. По этой причине в гетерозиготном состоянии он может существовать во многих поколениях, не проявляясь фенотипически.

При данном типе наследования заболевание встречается в родословной редко и не во всех поколениях. Вероятность заболевания у девочек и мальчиков одинакова. Признак может проявиться у детей, родители которых были здоровы, но являлись гетерозиготными носителями мутантного гена. Возможны несколько вариантов таких браков:

1) мать aa х отец aa — у таких родителей все дети будут больными (aa);

2) мать Aa х отец aa — 50 % детей будут больными (генотип aa) и 50 % фенотипически здоровыми (генотип Aa), но будут являться гетерозиготными носителями дефектного гена;

3) мать Aa х отец Aa — 25 % детей будут больными (генотип aa), 75 % фенотипически здоровыми (генотипы AA и Aa), но 50 % из них будут носителями мутантного гена (генотип Aa).



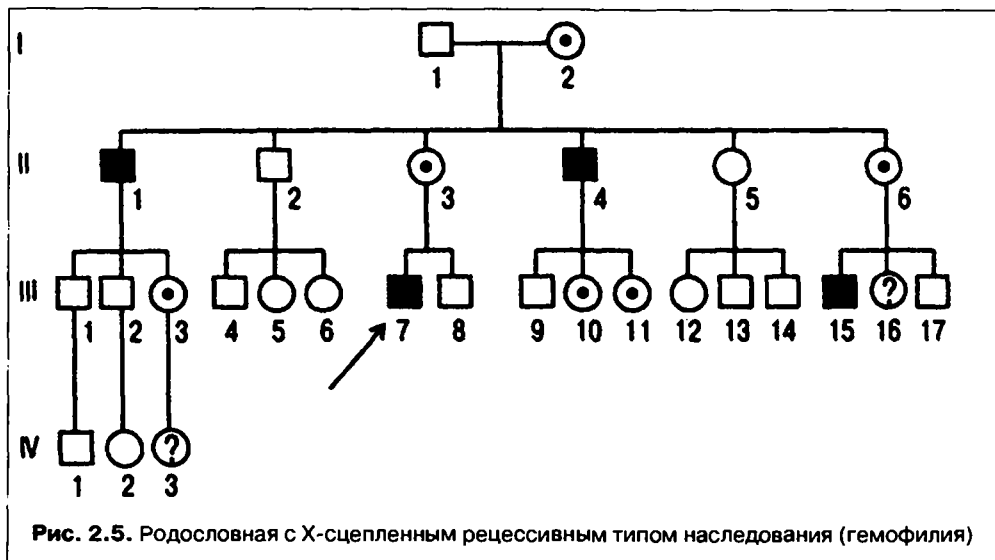
Известно, что частота возникновения наследственных рецессивно-аутосомных болезней находится в прямой зависимости от степени распространения мутантного гена среди населения. Частота таких болезней особенно повышается в изолятах и среди населения с высоким процентом кровнородственных браков. Такие браки отрицательно влияют на потомство, на это указывает тот факт, что умственная отсталость среди детей от родственных браков в 4 раза выше, чем в семьях с неродственными браками.

При аутосомно-рецессивном типе наследования (как и при аутосомно-доминантном) возможны различная степень экспрессивности и пенетрантности признака. К заболеваниям с аутосомно-рецессивным типом наследования относятся многие болезни обмена веществ, среди которых фенилкетонурия, галактоземия, альбинизм

(рис.2.4), муковисцидоз и др. Установлено, что рецессивные заболевания чаще диагностируются в раннем возрасте.

Наследование заболеваний, сцепленных с полом, определяется тем, что мутантный ген расположен в X или Y-хромосоме. Известно, что у женщин имеются две X-половые хромосомы, а у мужчин — одна X- и одна Y-хромосома. У человека в X-хромосоме локализовано более 200 генов. Гены, расположенные в хромосоме X, могут быть рецессивными или доминантными.

У женщин мутантный ген может находиться в обеих X-хромосомах или только в одной из них; в первом случае она гомозиготна, во втором — гетерозиготна. Мужчины, являясь гемизиготными (имеют только одну хромосому X), передают ее только дочерям и никогда — сыновьям. Любой ген, как доминантный, так и рецессивный, ло-



кализованный в его X-хромосоме, обязательно будет проявляться. В этом главная особенность X-сцепленного наследования.

Для X-сцепленного рецессивного наследования характерны следующие особенности:

1) заболевание встречается чаще у лиц мужского пола;

2) от здоровых родителей могут родиться больные дети (если мать гетерозиготна по мутантному гену);

3) больные мужчины не передают заболевание своим сыновьям, но их дочери становятся гетерозиготными носителями болезни;

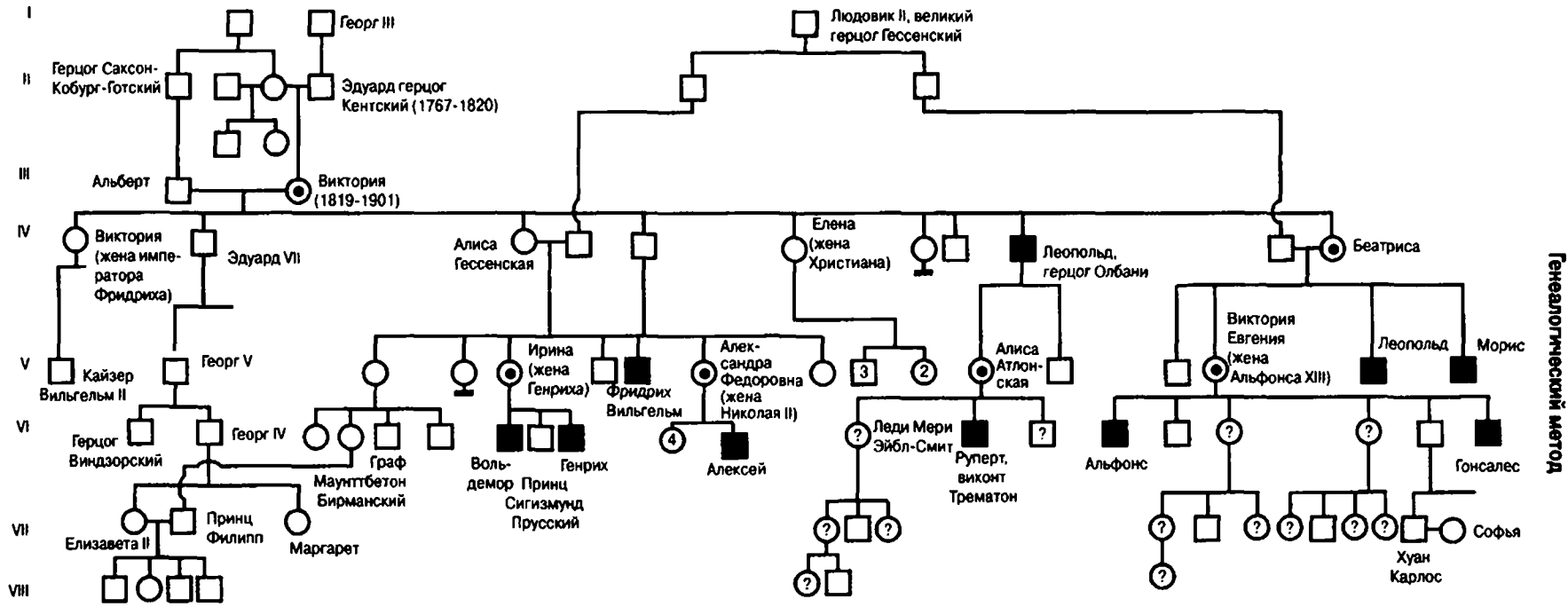
4) больные женщины могут родиться только в семьях, где отец болен, а мать гетерозиготна по мутантному гену.

Рассмотрим несколько примеров, когда в X-хромосоме локализован рецессивный ген. Если в брак вступает здоровая женщина и больной мужчина, то в такой семье все дети будут здоровыми, а дочери получают от отца одну X-хромосому с мутантным геном и бу-

дут гетерозиготными носителями (т.к. вторую нормальную X-хромосому они получают от матери). В том случае, если в брак вступают здоровый мужчина и женщина — носительница патологического гена, то вероятность рождения больного мальчика составит 50% от всех мальчиков и 25% — от всех детей.

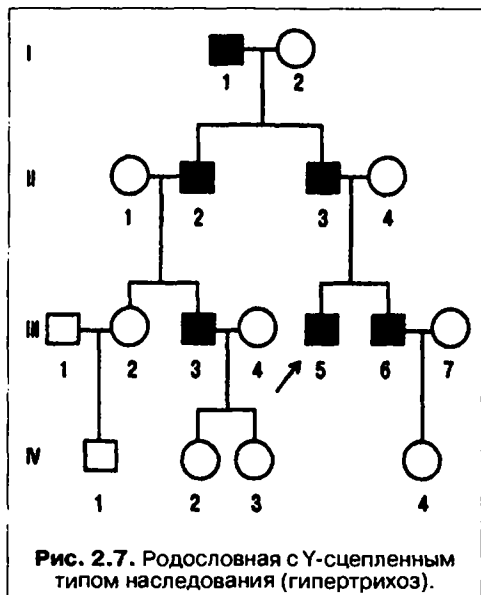
Вероятность рождения больных девочек очень низка и возможна лишь, если отец болен, а мать гетерозиготна по мутантному гену. В такой семье половина мальчиков будут больными. Среди девочек болезнь проявится у половины, а другая половина будет нести дефектный ген.

Классическим примером рецессивного, сцепленного с полом наследования, может служить гемофилия. Больные страдают повышенной кровоточивостью. Причина — недостаточное содержание в крови факторов свертывания крови. На рис. 2.5 изображена родословная семьи с гемофилией. Анализ родословной показывает, что болеют только мальчики. (II — 1,4; III — 7,15). Отсюда можно предположить,



Генеалогический метод

Рис. 2.6. Наследование, сцепленное с полом



что ген гемофилии сцеплен с полом. Больные дети чаще рождаются от здоровых родителей и, следовательно, ген болезни рецессивный.

Известно, что гемофилия широко распространена в королевских семьях Европы. Это связано с заключением близкородственных браков. В результате возникшие мутации сохранялись внутри семьи. Королева Виктория в Англии была носительницей гена гемофилии. Ее сын Леопольд родился гемофиликом. Через своих дочерей и внуков королева Виктория передала ген гемофилии Вольдемару и Генриху Прусским, Фридриху Гессенскому, царевичу Алексею Романову, Рупрехту Тех-Атлонскому, двум баттенбергским и двум испанским принцам (рис 2.6). Кроме гемофилии, в X-хромосоме локализованы рецессивные гены, обуславливающие миопатию Дюшенна, некоторые формы дальтонизма и др. заболевания.

При локализации в хромосоме X доминантного гена тип наследования на-

зывается X-сцепленным доминантным. Для него характерны следующие признаки:

1) болеют как мужчины, так и женщины, однако больных женщин в два раза больше, чем больных мужчин;

2) заболевание прослеживается в каждом поколении;

3) если болен отец, то все его дочери будут больными, а все сыновья здоровыми;

4) если мать больна, то вероятность рождения больного ребенка равна 50% независимо от пола;

5) больными дети будут только тогда, если болен один из родителей;

6) у здоровых родителей все дети будут здоровы.

По X-сцепленному доминантному типу наследуются фосфатемия (недостаток фосфата в крови), коричневая окраска эмали зубов и др.

Имеет свои особенности и Y-сцепленное наследование.

В Y-хромосоме у мужчин локализовано немного генов. Они передаются только сыновьям и никогда дочерям (голандрическое наследование). С Y-хромосомой у мужчин наследуются такие признаки, как гипертрихоз (наличие волос по краю ушных раковин), кожные перепонки между пальцами ног, развитие семенников, интенсивность роста тела, конечностей и зубов. Характерные особенности наследования с Y-хромосомой можно видеть на рис. 2.7.

Близнецовый метод

Это метод изучения генетических закономерностей на близнецах. Впервые он был предложен Ф. Гальтоном в 1875 г. Близнецовый метод дает возможность определить вклад генетических (наследственных) и средовых факторов (климат, питание, обучение, воспитание и др.) в развитии конкрет-

ных признаков или заболеваний у человека.

При использовании близнецового метода проводится сравнение :

1) монозиготных (однойяйцевых) близнецов — МБ с дизиготными (разнойяйцевыми) близнецами — ДБ;

2) партнеров в монозиготных парах между собой;

3) данных анализа близнецовой выборки с общей популяцией.

Монозиготные близнецы образуются из одной зиготы, разделившейся на стадии дробления на две (или более) части. С генетической точки зрения они идентичны, т.е. обладают одинаковыми генотипами. Монозиготные близнецы всегда одного пола.

Особую группу среди МБ составляют необычные типы близнецов: двухголовые (как правило нежизнеспособные), каспофаги (“сиамские близнецы”). Наиболее известный случай — родившиеся в 1811 г. в Сиаме (ныне Таиланд) сиамские близнецы — Чанг и Энг. Они прожили 63 года, были женаты на сестрах-близнецах; Чанг произвел на свет 10, а Энг — 12 детей. Когда от броихита умер Чанг, спустя 2 часа умер и Энг (рис. 2.8) Их связывала тканевая перемычка шириной около 10 см от грудины до пупка. Позднее было установлено, что соединявшая их перемычка содержала печеночную ткань, связывающую две печени. Любая хирургическая попытка разделить братьев вряд ли в то время была бы успешной. В настоящее время разъединяют и более сложные связи между близнецами.

Дизиготные близнецы развиваются в том случае, если одновременно две яйцеклетки оплодотворены двумя сперматозоидами. Естественно, дизиготные близнецы имеют различные генотипы. Они сходны между собой не



Рис. 2.8. Сиамские близнецы Чанг и Энг

более, чем братья и сестры, т.к. имеют около 50 % идентичных генов. Общая частота рождения близнецов составляет примерно 1 %, из них около 1/3 приходится на монозиготных близнецов. Известно, что число рождений монозиготных близнецов сходно в разных популяциях, в то время как для дизиготных эта цифра существенно различается. Например, в США дизиготные близнецы рождаются чаще среди негров, чем белых. В Европе частота появления дизиготных близнецов составляет 8 на 1000 рождений. Однако в отдельных популяциях их бывает больше. Самая низкая частота рождения близнецов присуща монголоидным популяциям, особенно в Японии (Табл. 2.1). Отмечается, что частота врожденных уродств у близнецов, как правило, выше, чем у одиночно рожденных.

Таблица 2.1. Частота многоплодных рождений

Страна	Период времени	ДЗ/10000 рождений	МЗ/10000 рождений
Испания	1951-1953	59	32
Португалия	1955-1956	56	36
Франция	1946-1951	71	37
Австрия	1952-1956	75	34
Швейцария	1943-1948	81	36
ФРГ	1950-1955	82	33
Швеция	1946-1955	86	32
Италия	1949-1955	86	37
Англия и Уэллс	1946-1955	89	36
США (белые)	?	67	39
США (негры)			
(Калифорния)	1905-1959	110	39
США (китайцы)	?	22	48
США (японцы)	?	21	46
Япония	1955-1962	24	40

Полагают, что многоплодие генетически обусловлено. Однако это справедливо лишь для дизиготных близнецов. Факторы, влияющие на частоту рождения близнецов, в настоящее время мало изучены. Есть данные, показывающие, что вероятность рождения дизиготных близнецов повышается с увеличением возраста матери, а так же порядкового номера рождения. Влияние возраста матери объясняется, вероятно, повышением уровня гонадотропина, что приводит к учащению полиовуляции. Имеются также данные о снижении частоты рождения близнецов почти во всех индустриальных странах.

Близнецовый метод включает в себя диагностику зиготности близнецов. В настоящее время используются следующие методы для ее установления.

1. Полисимптомный метод. Он заключается в сравнении пары близнецов по внешним признакам (форма бровей, носа, губ, ушных раковин, цвет волос, глаз и т.п.). Несмотря на очевидное удобство, это метод до извест-

ной степени субъективный и может давать ошибки.

2. Иммуногенетический метод. Более сложный, он основывается на анализе групп крови, белков сыворотки крови, лейкоцитарных антигенов, чувствительности к фенилтиокарбамиду и др. Если у обоих близнецов по этим признакам различий нет, их считают монозиготными.

Для монозиготных близнецов вероятность сходства по всем показателям равна. Вероятность того, что данная пара близнецов является дизиготной, равна:

$$P_d = \frac{P_d}{1 + P_d},$$

а вероятность того, что близнецы монозиготные, равна $P_m = 1 - P_d$, где P_m — вероятность монозиготности, P_d — вероятность дизиготности. Предположим, что $P_d = 0,00389$, а $P_m = 0,99611$. Эти данные позволяют заключить, что данная пара близнецов является монозиготной.

3. Достоверным критерием зиготности близнецов является приживляемость

кусочков кожи. Установлено, что у dizygотных близнецов такая пересадка всегда заканчивается отторжением, в то время как у monozygotных пар отмечается высокая приживляемость трансплантатов.

4. Метод дерматоглифики заключается в изучении папиллярных узоров пальцев, ладоней и стоп. Эти признаки строго индивидуальны и не изменяются в течение всей жизни человека. Не случайно, что эти показатели используются в криминалистике и в судебной медицине для опознания личности и установления отцовства. Сходство дерматоглифических показателей у monozygotных близнецов значительно выше, чем у dizygотных.

5. Близнецовый метод включает также сопоставление групп mono- и dizygотных близнецов по изучаемому признаку.

Если какой-либо признак встречается у обоих близнецов одной пары, то она называется конкордантной, если же у одного из них, то пара близнецов называется дискордантной. (конкордантность — степень сходства, дискордантность — степень различия).

При сопоставлении mono- и dizygотных близнецов определяют коэффициент парной конкордантности, указывающий на долю близнецовых пар, в которых изучаемый признак проявился у обоих партнеров. Коэффициент конкордантности (K_n) выражается в долях единицы или в процентах и определяется по формуле :

$$K_n = \frac{C}{C+D}$$

где C — число конкордантных пар, D — число дискордантных пар.

Сравнение парной конкордантности у mono- и dizygотных близнецов дает ответ о соотносительной роли наследственности и среды в развитии того или

иного признака или болезни. При этом исходят из предположения о том, что степень конкордантности достоверно выше у monozygotных, чем у dizygотных близнецов, если наследственные факторы имеют доминирующую роль в развитии признака (табл. 2.2).

Если значение коэффициента конкордантности примерно близко у monozygotных и dizygотных близнецов, считают, что развитие признака определяется главным образом негенетическими факторами, т.е. условиями среды.

Если в развитии изучаемого признака участвуют как генетические, так и негенетические факторы, то у monozygotных близнецов наблюдаются определенные внутриварные различия. При этом различия между mono- и dizygотными близнецами по степени конкордантности будут уменьшаться. В этом случае считают, что к развитию признака имеется наследственная предрасположенность.

Для количественной оценки роли наследственности и среды в развитии того или иного признака используют различные формулы. Чаще всего пользуются коэффициентом наследуемости, который вычисляется по формуле:

$$H = \frac{K_{MB} - K_{DB}}{100 - K_{DB}}$$

(в процентах) и:

$$H = \frac{K_{MB} - K_{DB}}{1 - K_{DB}}$$

(в долях единицы), где H — коэффициент наследуемости. K — коэффициент парной конкордантности в группе monozygotных (МБ) или dizygотных (ДБ) близнецов.

В зависимости от значения H судят о влиянии генетических и средовых факторов на развитие признака. Например, если значение H близко к 0, считают, что развитие признака обусловлено только факторами внешней

Таблица 2.2. Примеры конкордантности по некоторым признакам и заболеваниям у МБ и ДБ, %

Признаки	МБ	ДБ
Цвет глаз, волос	99,5	28,0
	97,0	23,0
Форма губ, ушей	100,0	65,0
	98,0	20,0
Папиллярные линии	92,0	40,0
Маниакально-депрессивный психоз	73,1	15,2
Шизофрения	67,0	12,1
Эпилепсия	60,8	12,3
	(37,2)	(1,8)
Сахарный диабет	84,0	37,0
	(58,0)	(20,0)
Туберкулез	66,7	23,0
Ревматизм	47,3	17,3
Воспаление среднего уха	30,1	9,8
Косолапость	45,5	18,2
Врожденный вывих бедра	41,4	2,8
Корь	97,4	95,7
Коклюш	97,7	92,0
Ветряная оспа	92,8	89,2
Скарлатина	56,4	41,2

среды. При значении H от 1 до 0,7 — наследственные факторы имеют доминирующее значение в развитии признака или болезни, а среднее значение H от 0,4 до 0,7 свидетельствует о том, что признак развивается под действием факторов внешней среды при наличии генетической предрасположенности (табл. 2.3).

Рассмотрим несколько примеров. Как уже было отмечено, группы крови у человека полностью обусловлены генотипом и не изменяются под влиянием среды. Коэффициент наследуемости равен 100 %. По некоторым морфологическим признакам (форме носа, бровей, губ и ушей, цвету глаз, волос и кожи) монозиготные близнецы конкордантны в 97-100 %, а дизиготные в зависимости от признака — в 70-20 % случаев. Конкордантность МБ по заболеваемости шизофренией равна 70 %, а у ДБ — 13 %. Тогда:

$$H = \frac{(70 - 13)}{(100 - 13)} = 0,65, \text{ или } 65 \%$$

В данном случае преобладают генетические факторы, но существенную роль играют и условия среды.

С помощью близнецового метода было выявлено значение генотипа и среды в патогенезе многих инфекционных болезней. Так, при заболевании корью и коклюшем ведущее значение имеют инфекционные факторы, а при туберкулезной инфекции — существенное влияние оказывает генотип. Исследования, проводимые на близнецах, помогут ответить на такие вопросы как: влияние наследственных и средовых факторов на продолжительность жизни человека, развитие одаренности, чувствительность к лекарственным препаратам и др.

В настоящее время близнецовый метод в генетике человека используется в

сочетании с другими методами генетического анализа.

Популяционно-статистический метод

Одним из важных направлений в современной генетике является популяционная генетика. Она изучает генетическую структуру популяций, их генофонд, взаимодействие факторов, обуславливающих постоянство и изменение генетической структуры популяций. Под популяцией в генетике понимается совокупность свободно скрещивающихся особей одного вида, занимающих определенный ареал и обладающих общим генофондом в ряду поколений. (Генофонд — это вся совокупность генов, встречающихся у особей данной популяции).

В медицинской генетике популяционно-статистический метод используется при изучении наследственных болезней населения, частоты нормальных и патологических генов, генотипов и фенотипов в популяциях различных местностей, стран и городов. Кроме того, этот метод изучает закономерности распространения наследственных болезней в разных по строению популяциях и возможность прогнозировать их частоту в последующих поколениях.

Популяционно-статистический метод используется для изучения :

- а) частоты генов в популяции, включая частоту наследственных болезней;
- б) закономерности мутационного процесса;
- в) роли наследственности и среды в возникновении болезней с наследственной предрасположенностью;
- г) влияния наследственных и средовых факторов в создании фенотипического полиморфизма человека по многим признакам и др.

Таблица 2.3. Наследуемость некоторых признаков человека, определенная близнецовым методом

Признак	Наследуемость
Телосложение	0,81
Рост в положении сидя	0,76
Вес	0,78
Головной индекс	0,75
Ментальный возраст по Бине	0,65
IQ по Бине	0,68
IQ по Отису	0,80
Вербальные способности	0,68
Арифметические способности	0,12
Способности к естественным наукам	0,34
Способности к истории и литературе	0,45
Орфографические способности	0,53
Скорость постукивания ногой	0,50

Использование популяционно-статистического метода включает правильный выбор популяции, сбор материала и статистический анализ полученных результатов.

В основе метода лежит закономерность, установленная в 1908 г. английским математиком Дж. Харди и немецким врачом В. Вайнбергом для идеальной популяции. Обнаруженная ими закономерность получила название закона Харди — Вайнберга.

Для идеальной популяции характерны следующие черты: большая численность, свободное скрещивание (панмиксия) организмов, отсутствие отбора и мутационного процесса, отсутствие миграций в популяцию и из нее. В идеальной популяции соотношение частоты доминантных гомозигот (AA), гетерозигот (Aa) и рецессивных гомозигот (aa) сохраняется постоянным из поколения в поколение, если никакие эволюционные факторы не нарушают это равновесие. В этом основной смысл закона

Харди-Вайнберга. При изменении любой из перечисленных черт соотношение численности генотипов в популяции нарушается. Факторы, стимулирующие сдвиг равновесия, — родственные браки, мутации, дрейф генов, отбор, миграции и другие. Закон Харди-Вайнберга является основой при рассмотрении генетических преобразований, происходящих в естественных и искусственно созданных популяциях растений, животных и человека.

Соотношение численности разных генотипов и фенотипов в панмиктической популяции определяется по формуле бинома Ньютона:

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2; (p+q) = 1,$$

где p — частота доминантного аллеля A , q — частота рецессивного аллеля a , p^2 — частота генотипа AA (гомозигот по доминантному аллелю), q — частота генотипа aa (гомозигот по рецессивному аллелю)

И, следовательно, в соответствии с законом Харди-Вайнберга частота доминантных гомозигот (AA) равна квадрату вероятности встречаемости доминантного аллеля, частота гетерозигот (Aa) — удвоенному произведению вероятности встречаемости доминантного и рецессивного аллелей. Частота встречаемости рецессивных гомозигот (aa) равна квадрату вероятности рецессивного аллеля.

Таким образом, популяционно-статистический метод дает возможность рассчитать в популяции человека частоту нормальных и патологических генов-гетерозигот, доминантных и рецессивных гомозигот, а также частоту нормальных и патологических фенотипов, т.е. определить генетическую структуру популяции.

Рассмотрим конкретный пример:

В одном из городов при обследовании на резус-фактор 16 % людей оказалась резус-отрицательными и 84 % — резус-положительными. Известно, что резус-положительный фактор обусловлен доминантным аутосомным геном C , а резус-отрицательный фактор — рецессивным геном c . Носители резус-положительного фактора могут иметь генотип CC или Cc . Чтобы определить, какая часть из них гомо- и гетерозиготна, используем формулу Харди-Вайнберга:

$$p^2CC : 2pq Cc : q^2cc = 1$$

Гомозиготы по рецессивному аллелю составляют 16% или 0,16; отсюда $q = \sqrt{0,16} = 0,40$ (или 40 %). Итак, частота рецессивного аллеля в популяции составляет 40%. Как определить частоту доминантного аллеля? Исходя из того, что $p + q = 1$, а $q = 0,40$, то $p = 1 - 0,40 = 0,60$ или 60 %. Процент в популяции зигот CC и Cc вычисляем следующим образом:

$$CC = p^2 = (0,60)^2 = 0,36 \text{ или } 36\%; Cc = 2pq = \text{или } 2 \times 0,60 \times 0,40 = 0,48 \text{ или } 48\%.$$

Следовательно, среди обследованного населения положительный резус-фактор имели 36 % с генотипом CC и 48 % с генотипом Cc . В итоге 84 % населения были резус-положительными, а 16% — резус-отрицательными (cc).

Подобные расчеты широко используются в медико-генетических исследованиях популяций. Вместе с тем следует отметить, что в малочисленных популяциях человека закон Харди-Вайнберга не применим, т.к. статистические закономерности, на которых он основан, не имеют значения в случае малых чисел.

Важным фактором, влияющим на частоту аллелей в малочисленных по-

пуляциях и в изолятах являются **генетико-автоматические процессы или дрейф генов**. Это явление было описано в 30-х гг. Н.П. Дубининым и Д.Д. Ромашовым (СССР) и С.Райтом и Р.Фишером (США). Оно выражается в случайных изменениях частоты аллелей, не связанных с их селекционной ценностью и действием естественного отбора. Из-за дрейфа генов адаптивные аллели могут быть элиминированы из популяции, а менее адаптивные и даже патологические (в силу случайных причин) могут сохраниться и достигнуть высоких концентраций. В результате в популяции может происходить быстрое и резкое возрастание частот редких аллелей.

Генетико-автоматические процессы наиболее интенсивно протекают при неравномерном размножении особей в популяции. Колебания численности популяции нередко наблюдается у насекомых, грызунов и других животных в виде т.н. "волн жизни". В отдельные благоприятные годы численность их сильно возрастает, а затем резко падает. Причинами могут быть развитие эпидемических заболеваний, нехватка пищи, понижение температуры и др. В результате спада численности (или в изолированных популяциях) уменьшается гетерозиготность и возрастает генетическая однородность популяции.

Примером действия дрейфа генов в человеческих популяциях может служить "эффект родоначальника". Он наблюдается, если структура популяции формируется под влиянием аллелей ограниченного числа семей. В таких популяциях нередко наблюдается высокая частота аномального гена, сохранившегося в результате случайного дрейфа генов. Возможно, что следствием дрейфа генов является разная

частота рецессивных отрицательных людей в Европе (14 %) и в Японии (1 %), неравномерное распространение наследственных болезней по разным группам населения земного шара. Например, в некоторых популяциях Швеции широко распространен ген ювенильной амавротической идиотии, в Южной Африке — ген порфирии, в Швейцарии — ген наследственной глухоты и др.

Близкородственные браки (инбридинг) значительно влияют на генотипический состав популяции. Такие браки чаще всего заключаются между племянницей и дядей, между двоюродными братом и сестрой. Близкородственные браки запрещены во многих странах из-за высокой вероятности рождения детей с наследственной патологией: родственники, имея общее происхождение, могут быть носителями одного и того же рецессивного патологического гена, и при браке двух здоровых гетерозигот вероятность рождения больного ребенка становится высокой.

Новые гены могут поступать в популяцию в результате **миграции (потока генов)**, когда особи из одной популяции перемещаются в другую и скрещиваются с представителями данной популяции. Реальные популяции редко бывают полностью изолированными. Всегда происходит некоторое передвижение особей из одной популяции в другую. Такое передвижение может быть не только активным, но и пассивным (перенос семян птицами). Иногда человек умышленно перемещивает популяции. Например, в Сибири для улучшения местных соболей в их популяции выпускают баргузинских соболей с очень темной окраской меха, более ценимой в меховой промышленности. Это приводит к изменению час-

тоты аллелей в основной популяции и среди “иммигрантов”. В локальных популяциях частота аллелей может изменяться, если у “старожилов” и пришельцев исходные частоты аллелей различны. Аналогичные процессы происходят и в человеческих сообществах.

В США потомство от смешанных браков между белыми и неграми относится к негритянскому населению. По данным Ф. Айала и Дж. Кайгера (1988) частота аллеля, контролирующего резус-фактор у белого населения, составляет 0,028. В африканских племенах, от которых происходит современное негритянское население, частота этого аллеля равна 0,630. Предки современных негров США были вывезены из Африки 300 лет (около 10 поколений) назад. Частота аллеля у современного негритянского населения Америки составляет 0,446. Таким образом, поток генов от белого населения к негритянскому шел со скоростью 3,6 % за 1 поколение. В результате через 10 поколений доля генов африканских предков составляет сейчас 0,694 общего числа генов современного негритянского населения США. Около 30 % генов американские негры унаследовали от белого населения. Очевидно, поток генов между белым и негритянским населением был значительным.

Наконец, следует рассмотреть кратко, как влияют на генетическую структуру популяций **мутационный процесс и отбор**. Мутации, как фактор эволюции, обеспечивают приток новых аллелей в популяцию. По изменению генотипа мутации подразделяют на генные (или точковые), внутривхромосомные и межхромосомные, геномные (изменение числа хромосом.). Генные мутации могут быть прямыми

($A > a$) и обратные ($a > A$). Частота возникновения прямых мутаций значительно выше обратных. Одни и те же гены могут мутировать многократно. Кроме того, один и тот же ген может изменяться в несколько аллельных состояний, образуя серию множественных аллелей ($A > a_1, a_2, a_3, \dots, a_k$). Изучение частоты мутаций у человека, обуславливающих такие тяжелые болезни, как гемофилия, ретинобластома, пигментная ксеродерма и др. дают основания полагать, что частота возникновения патологических мутаций отдельного гена составляет около 1-2 на сто тысяч гамет за поколение. Учитывая общее количество генов у человека (около 100 тыс.), суммарная мутабельность — величина немалая.

Частота мутаций может значительно возрасти при действии на организм некоторых физических и химических факторов — мутагенов. Химические мутагены обнаружены среди промышленных ядов, инсектицидов, гербицидов, пищевых добавок и лекарств. Большинство канцерогенных веществ также обладают мутагенным действием. Кроме того, многие биологические факторы, например, вирусы, живые вакцины, а также гистамины, стероидные гормоны, вырабатываемые в организме человека, могут вызывать мутации. Сильными мутагенами являются различные виды излучений (рентгеновские лучи, гамма — лучи, α и β -частицы, нейтроны и др.), способные продуцировать генные и хромосомные мутации у человека, о чем свидетельствуют последствия аварии на Чернобыльской АЭС (см. главу 6).

К факторам, нарушающим постоянство генетической структуры популяций, относится и естественный отбор, вызывающий направленное изменение генофонда путем элиминации из попу-

ляции менее приспособленных особей или снижения их плодовитости. Рассмотрим влияние отбора на примере доминантной патологии — ахондроплазии (карликовости). Эта болезнь хорошо изучена в популяциях Дании. Больные имеют пониженную жизнеспособность и умирают в детском возрасте, т.е. устраняются естественным отбором из популяции. Выжившие карлики редко вступают в брак и имеют мало детей. Анализ показывает, что около 20 % генов ахондроплазии не передаются от родителей детям, а 80 % этих генов элиминируются из популяции. Из этих данных следует, что ахондроплазия не оказывает существенного влияния на структуру популяции.

Большинство мутантных генотипов имеют низкую селекционную ценность и попадают под действие отбора. По данным В. Маккьюсика (1968) среди мутантов около 15 % плодов погибают до рождения, 3 % — умирают, не достигнув половой зрелости, 20 % умирают до вступления в брак, в 10% случаев брак остается бесплодным.

Однако не каждый мутантный ген снижает селективную ценность признака. В ряде случаев патологический ген в гетерозиготном состоянии может повышать жизнеспособность особи. В качестве примера рассмотрим серповидноклеточную анемию. Известно, что это заболевание распространено в странах Африки и Азии. У людей, гомозиготных по аллелю *HbS*, вырабатывается гемоглобин, отличный от нормального, обусловленного аллелем *HbS*. Гомозиготы *HbSHbS* погибают, не достигнув половозрелости. Гетерозиготы *HbAHbS* более устойчивы к малярии, чем нормальные гомозиготы *HbAHbA* и *HbSHbS*. Поэтому в районах распространения болезни гетерозиготы имеют селективное преимущество.

Отбор работает в пользу гетерозигот. В районах, где не было малярии, гомозиготы *HbAHbA* обладают одинаковой приспособленностью с гетерозиготами. При этом отбор направлен против рецессивных гомозигот. В некоторых районах Африки гетерозиготы составляют до 70 % населения. "Платой" за приспособленность к условиям существования служит т.н. генетический груз, т.е. накопление вредных мутаций в популяции.

Цитогенетический метод

Основа метода — микроскопическое изучение хромосом человека. Цитогенетические исследования стали широко использоваться с начала 20-х гг. XX в. для изучения морфологии хромосом человека, подсчета хромосом, культивирования лейкоцитов для получения метафазных пластинок.

Развитие современной цитогенетики человека связано с именами цитологов Д.Тюо и А.Левана. В 1956 г. они первыми установили, что у человека 46 (а не 48, как думали раньше) хромосом, что положило начало широкому изучению митотических и мейотических хромосом человека.

В 1959 г. французские ученые Д. Лежен, Р.Тюрпен и М. Готье установили хромосомную природу болезни Дауна. В последующие годы были описаны многие другие хромосомные синдромы, часто встречающиеся у человека. Цитогенетика стала важнейшим разделом практической медицины. В настоящее время цитогенетический метод применяется для диагностики хромосомных болезней, составления генетических карт хромосом, изучения мутационного процесса и других проблем генетики человека.

В 1960 г. в г. Денвере (США) была разработана первая Международная

Таблица 2.4. Классификация хромосом человека по размеру и расположению центромеры

Группа хромосом	Номер по кариотипу	Размер, мкм	Характеристика хромосом
A(I)	1,2,3	11-8,3	1 и 3 – метацентрические, 2 – крупная субметацентрическая
B(II)	4,5	7,7	Крупные субметацентрические
C(III)	6-12	7,2-5,7	Средние субметацентрические
D(IV)	13-15	4,2	Средние акроцентрические
E(V)	16-18	3,6-3,2	Мелкие субметацентрические
F(VI)	19-20	2,3-2,8	Самые мелкие метацентрические
X-хромосома (относится к группе III)	23		Средняя субметацентрическая
Y-хромосома	23		Мелкая акроцентрическая

классификация хромосом человека. В ее основу легли размеры хромосом и положение первичной перетяжки – центромеры. Все хромосомы по форме разделены на метацентрические, субметацентрические и акроцентрические и подразделены на 7 групп, обозначенных латинскими буквами А, В, С, D, E, F и G. Каждая пара хромосом была наделена порядковым номером от 1 до 22, выделены отдельно и поименованы латинскими буквами – X и Y половые хромосомы (Табл. 2.4).

В 1971 г. на IV Пражской конференции генетиков в дополнении к Денверской классификации были представлены методы дифференциальной окраски хромосом, благодаря которым каждая хромосома приобретает свой неповторимый рисунок, что помогает точной идентификации.

Основные сведения о морфологии хромосом человека получены при изучении их в метафазах митоза и профазе-метафаза мейоза. При этом важно, чтобы количество делящихся клеток, было достаточно высоко. Важнейшие цитогенетические работы выполнены на лимфоцитах периферической крови, поскольку культивирование лимфоцитов в течение 2-3 суток в присут-

ствии фитогемагглютинина позволяет получить множество метафазных пластинок для хромосомного анализа.

Цитогенетическому анализу подвергают однослойные метафазные пластинки с раздельно лежащими хромосомами. Для этого делящиеся клетки обрабатывают колхицином и некоторыми другими химическими веществами (гипотоническим раствором солей, метанол-уксусным фиксатором и др.).

Важным этапом цитогенетического анализа является окраска полученных препаратов. Ее проводят простыми, дифференциальными и флюоресцентными методами.

Простая окраска обеспечивает групповую идентификацию хромосом. Используется она для количественного учета хромосомных аномалий при определении мутагенности среды (действия радиации, химических мутагенов и др.). С помощью этого типа окраски были открыты многие хромосомные болезни, а также хромосомные aberrации), вызывающие самопроизвольные аборт, врожденные пороки развития, канцерогенез и т.п.

В 70-е гг. XX в. в медицинской практике начали применяться методы диф-

ференциального окрашивания, выявляющие структурную разнородность хромосом по длине, что выражается в виде чередования светлых и темных полос (эу- и гетерохроматических районов). Отмечается, что протяженность и рисунок полос специфичны для каждой хромосомы.

Дифференциальное окрашивание хромосом можно проводить рядом способов. Первоначально использовали акрихин-иприт — флюоресцентное алкилирующее вещество (Q-метод). Действие его основано на способности метафазных хромосом дифференциально связывать флюорохромы. После окрашивания акрихин-ипритом сегменты приобретают яркое флюоресцирующее свечение. Для просмотра таких препаратов используют люминесцентный микроскоп.

В дальнейшем был разработан способ окраски хромосом без флюоресцентных красителей. Это — G-окраска (краситель Гимза). После предварительной инкубации в солевом растворе хромосомы обрабатываются протеазой. В результате они приобретают сегментированный вид благодаря чередованию темного и светлоокрашенных участков. Механизм образования сегментов пока недостаточно ясен. Предполагается, что окрашенные сегменты — это гетерохроматиновые участки с повторяющимися последовательностями ДНК, а неокрашенные — эухроматиновые районы с кодирующими последовательностями ДНК (рис. 2.9).

К разновидностям дифференциального окрашивания по методу Гимзы относятся R-окрашиваемость и C-окрашиваемость. Эти разновидности дифференциального окрашивания получают при определенном изменении времени инкубации препаратов, окрашенных по методу Гимзы. В пер-

вом случае распределение окрашенных и неокрашенных сегментов будет обратным тому, что наблюдается при G и Q-окрашивании. На R-окрашенных хромосомах гетерохроматиновые и околоцентромерные районы остаются светлыми. В случае же C-окраски выявляются районы структурного гетерохроматина, наиболее устойчивого к химическим и физическим повреждениям. В аутосомах и X-хромосомах человека эти районы локализованы в околоцентромерных участках, а в Y-хромосоме — в дистальной половине длинного плеча. Наиболее крупные блоки C-хроматина имеются в аутосомах 1, 9 и 16 в области их вторичных перетяжек, а также в Y-хромосоме. Самыми мелкими центромерными блоками обладают Y-хромосома и аутосома 2 (рис. 2.10).

Одной из особенностей хромосом человека является асинхронность (неодновременность) репликации по длине. В каждой хромосоме есть рано и поздно реплицирующиеся участки. Для выявления последовательности репликации применяется 5-бромдезоксигидин — аналог тимина. Включившие его участки окрашиваются слабо.

Применяется 5-бром-дезоксигидин и для дифференциальной окраски сестринских хроматид, если он вводится на полный клеточный цикл. В этом случае вновь образуемая хроматида, включает этот аналог тимина и будет окрашена слабо, а другая (старая) окрасится интенсивно (рис. 2.11). Этот метод позволяет выявлять участки обмена между сестринскими хроматидами (СХО).

При воздействии различными мутагенными факторами число СХО увеличивается, следовательно, этот метод пригоден для изучения мутационного процесса у человека.

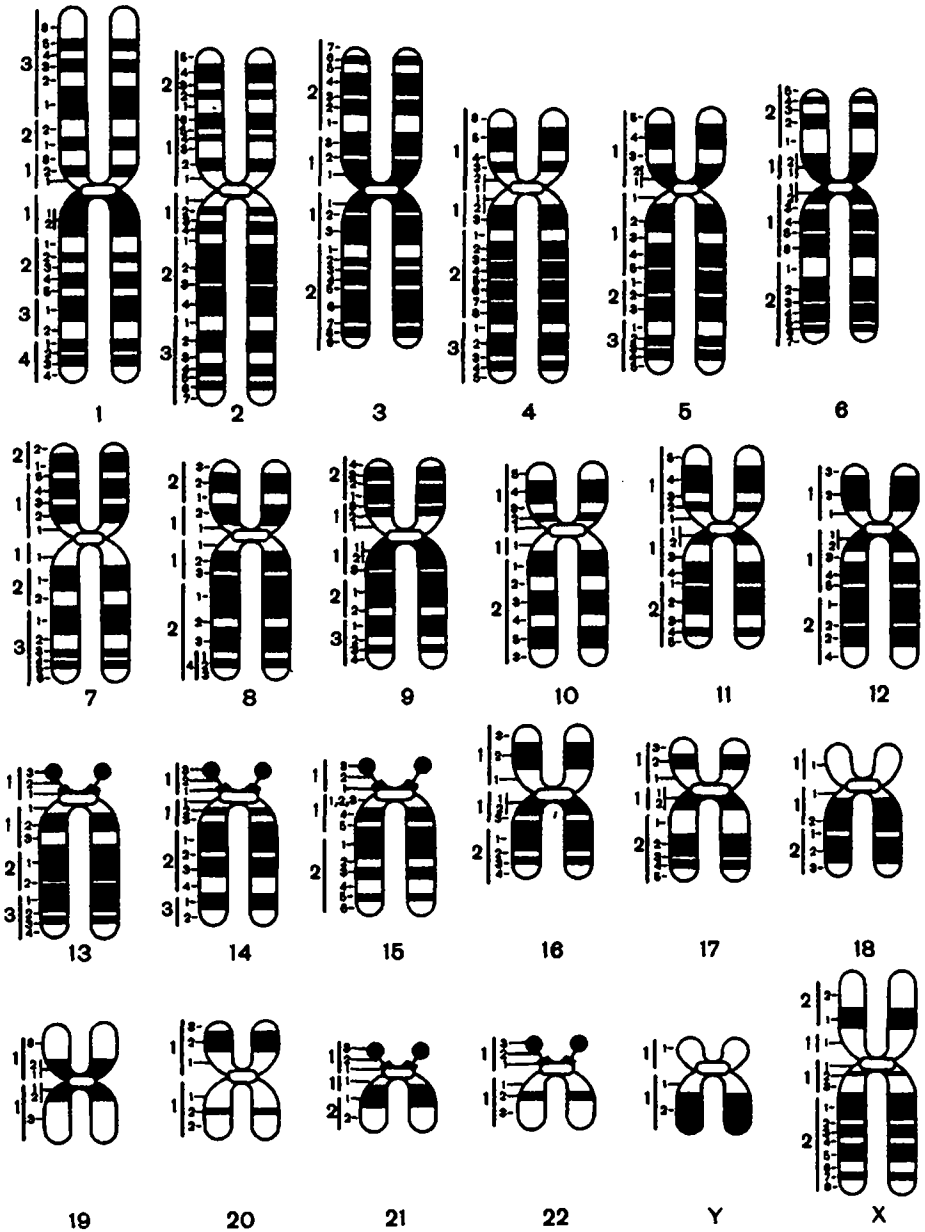


Рис. 2.9. Схематическое изображение хромосом человека при дифференциальной окраске (G-метод)

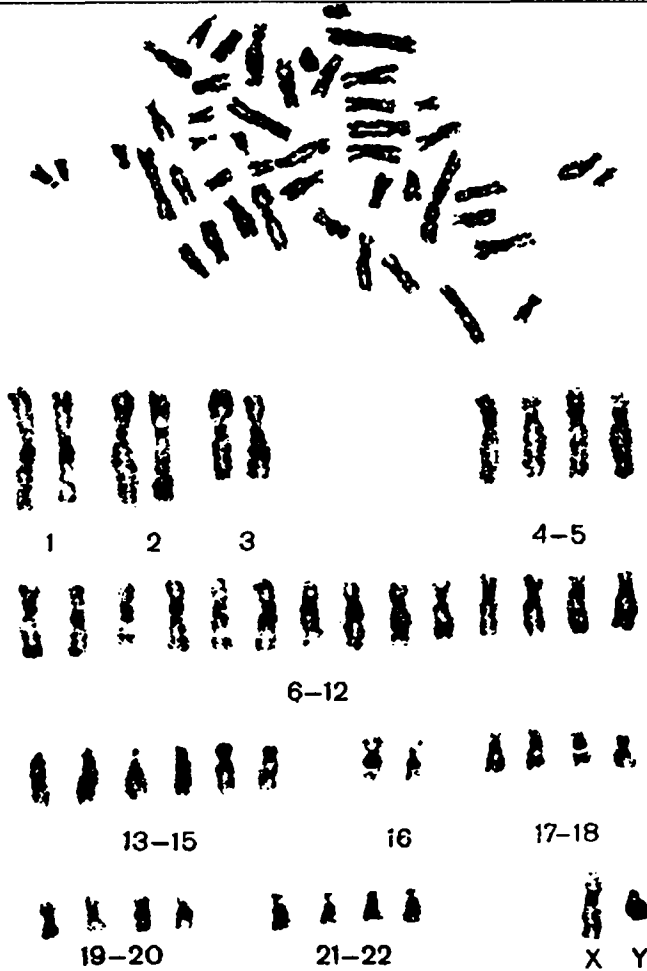


Рис. 2.10. Дифференциальное окрашивание хромосом человека по С – технике

Успехи молекулярной цитогенетики человека позволяют разрабатывать новые методы изучения хромосом. Так, следует отметить метод флюоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), который дает возможность исследовать широкий круг вопросов: от локализации гена до расшифровки сложных перестроек между несколькими хромосомами. Метод FISH может применяться и для диагностики анеуплоидий в интерфазных ядрах (см. главу 6).

Таким образом, соединение цитогенетических и молекулярно-генетических методов в генетике человека делает почти неограниченными возможности диагностики хромосомных аномалий.

Метод генетики соматических клеток

Тот факт, что соматические клетки несут в себе весь объем генетической информации, дает возможность изу-

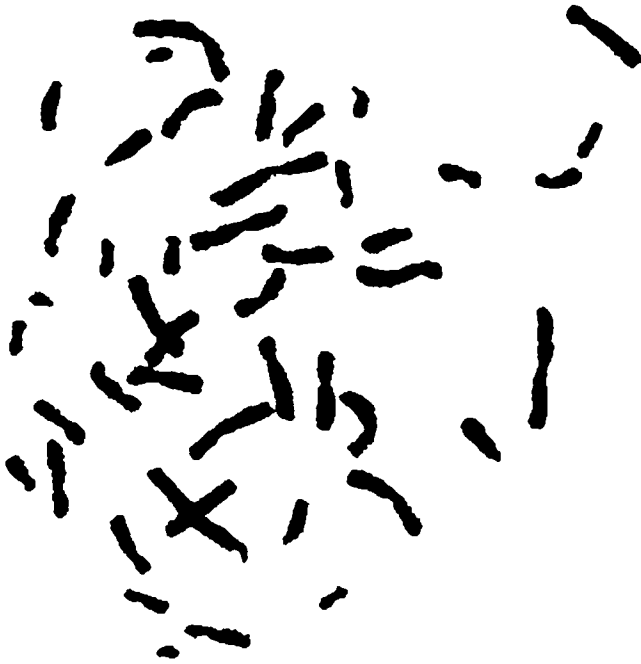


Рис. 2.11. Метафазная пластинка с дифференциальной окраской сестринских хроматид (Метод СХО)

чать на них генетические закономерности всего организма.

Основу метода составляет культивирование отдельных соматических клеток человека и получение из них клонов, а так же их гибридизацию и селекцию.

Соматические клетки обладают рядом особенностей:

- быстро размножаются на питательных средах;
- легко клонируются и дают генетически однородное потомство;
- клоны могут сливаться и давать гибридное потомство;
- легко подвергаются селекции на специальных питательных средах;
- клетки человека хорошо и долго сохраняются при замораживании.

Соматические клетки человека получают из разных органов — кожи, ко-

стного мозга, крови, ткани эмбрионов. Однако чаще всего используют клетки соединительной ткани (фибробласты) и лимфоциты крови.

С помощью метода гибридизации соматических клеток:

- а) изучают метаболические процессы в клетке;
- б) выявляют локализацию генов в хромосомах;
- в) исследуют генные мутации;
- г) изучают мутагенную и канцерогенную активность химических веществ.

В 1960 г. было показано, что совместно культивируемые клетки различных линий могут сливаться, образуя гибриды, содержащие геномы обеих родительских форм. Первые такие гибриды были получены при слиянии клеток

разных линий мышей. Наряду с внутривидовыми получены и межвидовые гибриды, например, между клетками человека и мыши, мыши и хомячка, мыши и курицы и др. Образование гибридных клеток происходит чаще, если в культуру добавлены некоторые вещества (например, полиэтиленгликоль) или инактивированный вирус Сендай.

При гибридизации соматических клеток двух разных линий образуются гетерокарионы — клетки, которые содержат оба родительских ядра. Затем в результате митоза и деления образуются две одноядерные клетки — синкарионы, имеющие хромосомы обоих родительских клеток.

В течение первых делений гибридной клетки, не ясно почему, происходит потеря хромосом одного из видов. Так, у гибридов мышь-хомячок элиминируются хромосомы мыши. Если присутствие продукта изучаемого гена коррелирует с наличием определенной хромосомы в гибриде, то можно предположить, что этот ген локализован в данной хромосоме.

Потеря хромосом в гибридных клетках мышь — человек происходит случайно. Какая хромосома человека сохранится — предугадать невозможно. Через определенное число поколений в гибридной клетке сохраняются все хромосомы мыши и несколько (в среднем 7) хромосом человека. Однако некоторые клетки могут содержать одну-две пары хромосом, другие — 7, а некоторые — до 20 хромосом человека. Вместе с тем из всей популяции гибридных клеток можно отобрать стабильные клоны (клон — потомство одной клетки), содержащие конкретные человеческие хромосомы, и провести в них картирование генов.

Гибридные клетки человека и мыши имеют 43 пары хромосом: 23 от челове-

ка и 20 от мыши. В дальнейшем происходит элиминация хромосом того вида, клетки которого медленнее размножаются. При этом хромосомы мыши сохраняются, а хромосомы человека утрачиваются.

Функционирующие в гибридных клетках хромосомы синтезируют определенные белки. Фенотипически хромосомы мыши и человека отличаются. Нетрудно определить, какие хромосомы присутствуют в гибриде и выяснить, синтез каких белков связан с данными хромосомами человека. Обычно гибридные клетки теряют хромосомы целиком, поэтому, если какие-либо гены присутствуют или отсутствуют вместе, то они могут быть отнесены к одной хромосоме. Это позволяет картировать хромосомы человека. В ряде случаев для картирования используют хромосомные перестройки, что дает возможность установить локализацию генов в определенном участке хромосомы, определить последовательность их расположения, т. е. построить карты хромосом человека.

В настоящее время выяснено, что в X-хромосоме локализовано 95 генов, в 1-й аутосоме — 24 гена. Ген, определяющий группы крови по системе АВО, расположен в 9-й хромосоме, группы крови по системе MN во 2-й хромосоме, а по системе резус-фактора (Rh) — в 1-й хромосоме.

Использование метода гибридизации соматических клеток дает возможность изучать механизмы первичного действия генов и их взаимодействия, что расширяет возможности точной диагностики наследственных болезней на биохимическом уровне.

Использование новых методов и подходов к картированию хромосом позволило обнаружить в геноме человека сверхизменчивые участки ДНК (мини-

сателлиты), характерные для каждого человека. Одновременно были выделены последовательности ДНК, изменяющиеся с повышенной частотой. Они локализованы по всему геному и имеют разное число копий. На основе сверхизменчивых последовательностей ДНК созданы маркеры или зонды ДНК. Эти маркеры метят радиоактивным изотопом и добавляют к ДНК, обработанной специальным образом. Маркеры “узнают” сходные с ними сверхизменчивые участки на ДНК и присоединяются к ним. Эти участки становятся радиоактивными и их можно выявить методом радиоавтографии. Число и распределение таких мест присоединения индивидуально у каждого человека.

Изучение сверхизменчивых последовательностей ДНК позволяет установить место гена на хромосоме. Так, недавно ученые установили, что ген гиперкератоза (патологическое утолщение кожных покровов и образование язв на коже) человека лежит — в 17-й хромосоме, а ген болезни Альцгеймера (старческое слабоумие) — в 21-й хромосоме.

Помимо этого в настоящее время активно изучается наследование сахарного диабета, шизофрении и ряда других заболеваний.

Исследование сверхизменчивых ДНК в клетках опухолей позволяет обнаружить перестройки хромосом на ранних стадиях развития опухоли, что важно для их ранней диагностики.

В последние годы созданы более совершенные генетические карты генома человека с использованием маркерных генов и последних достижений молекулярной генетики.

Биохимический метод

Причиной многих врожденных нарушений метаболизма являются раз-

личные дефекты ферментов, возникающие вследствие изменяющих их структуру мутаций. Биохимические показатели (первичный продукт гена, накопление патологических метаболитов внутри клетки и во всех клеточных жидкостях больного) более точно отражают сущность болезни по сравнению с показателями клиническими, поэтому их значение в диагностике наследственных болезней постоянно возрастает. Использование современных биохимических методов (электрофореза, хроматографии, спектроскопии и др.) позволяют определять любые метаболиты, специфические для конкретной наследственной болезни.

Предметом современной биохимической диагностики являются специфические метаболиты, энзимопатии, различные белки.

Объектами биохимического анализа могут служить моча, пот, плазма и сыворотка крови, форменные элементы крови, культуры клеток (фибробласты, лимфоциты).

Для биохимической диагностики используются как простые качественные реакции (например, хлорид железа для выявления фенилкетонурии или динитрофенилгидразин для выявления кетокислот), так и более точные методы. Например, с помощью тонкослойной хроматографии мочи и крови можно диагностировать нарушение обмена аминокислот, олигосахаридов, мукополисахаридов. Газовая хроматография применяется для выявления нарушений обмена органических кислот и т.д.

Показаниями для использования биохимических методов у больных с наследственным нарушением обмена веществ являются такие симптомы, как судороги, кома, рвота, желтуха, специфический запах мочи и пота, остановка роста, нарушение физическо-

го развития, непереносимость некоторых продуктов и лекарств.

Биохимические методы применяются и для диагностики гетерозиготных состояний у взрослых. Известно, что среди здоровых людей всегда имеется большое число так называемых носителей патологического гена (гетерозиготное носительство). Хотя такие люди внешне здоровы, вероятность появления заболевания у их ребенка всегда существует. В связи с этим, выявление гетерозиготного носительства – важная задача медицинской генетики.

Понятно, что если в брак вступают гетерозиготные носители какого-либо заболевания, то риск рождения больного ребенка в такой семье составит 25%. Шансы на встречу двух носителей одинакового патологического гена выше, если в брак вступают родственники, т.к. они могут унаследовать один и тот же рецессивный ген от своего общего предка.

Предположить гетерозиготное носительство у женщины можно, если:

- ее отец поражен наследственной болезнью;
- у женщины родились больные сыновья;
- женщина имеет больного брата или братьев;
- у двух дочерей женщины родились больные сыновья (или сын);
- у здоровых родителей родился больной сын, а у матери в родословной есть больные мужчины.

Выявление гетерозиготных носителей того или иного заболевания возможно путем использования биохимических тестов (прием фенилаланина для выявления фенилкетонурии, прием сахара – сахарного диабета и т.д.), микроскопического исследования клеток крови и тканей, определения ак-

тивности фермента, измененного в результате мутации.

Известно, что заболевания, в основе которых лежит нарушение обмена веществ, составляют значительную часть наследственной патологии (фенилкетонурия, галактоземия, алкаптонурия, альбинизм и др.). Так, гетерозиготные носители фенилкетонурии реагируют на введение фенилаланина более сильным повышением содержания аминокислоты в плазме, чем нормальные гомозиготы (болезнь обусловлена рецессивным аллелем).

Биохимический метод широко применяется в медико-генетическом консультировании для определения риска рождения больного ребенка. Успехи в области биохимической генетики способствуют более широкому внедрению диагностики гетерозиготного носительства в практику. Еще недавно можно было диагностировать не более 10-15 гетерозиготных состояний, в настоящее время – более 200. Однако следует отметить, что до сих пор имеется немало наследственных заболеваний, для которых методы гетерозиготной диагностики еще не разработаны.

Молекулярно-генетические методы

Конечный итог молекулярно-генетических методов – выявление изменений в определенных участках ДНК, гена или хромосомы. В их основе лежат современные методики работы с ДНК или РНК. В 70-80 гг. в связи с прогрессом в молекулярной генетике и успехами в изучении генома человека молекулярно-генетический подход нашел широкое применение.

Начальным этапом молекулярно-генетического анализа является получение образцов ДНК или РНК. Для этого используют геномную ДНК (вся

ДНК клетки) или отдельные ее фрагменты. В последнем случае, чтобы получить достаточное количество таких фрагментов, необходимо, амплифицировать (размножить) их. Для этого пользуются полимеразной цепной реакцией — быстрым методом ферментативной репликации определенного фрагмента ДНК. С его помощью можно амплифицировать любой участок ДНК, расположенный между двумя известными последовательностями.

Анализировать огромные молекулы ДНК в том виде, в котором они существуют в клетке, невозможно. Поэтому прежде их необходимо разделить на части, обработать разнообразными рестриктазами — бактериальными эндонуклеазами. Эти ферменты способны разрезать двойную спираль ДНК, причем места разрыва строго специфичны для данного образца. Расщепление ДНК рестриктазами дает характерный набор фрагментов (4-6 пар оснований), отличающихся по длине.

Фракционирование (т.е. разделение) фрагментов ДНК по размеру и длине проводится с помощью электрофореза на поверхности агарозного или полиакриламидного геля. Под действием электрического поля фрагменты ДНК начинают перемещаться вниз по гелю со скоростью, зависящей от их длины. (Чем короче фрагменты, тем быстрее они движутся). В результате каждый фрагмент ДНК занимает определенное положение в виде дискретной полосы в конкретном месте геля. Длину каждого фрагмента можно определить путем сравнения расстояния, пройденного им и стандартным (с известными размерами) отрезком ДНК.

Молекулярно-генетическую диагностику наследственных болезней используют и для изучения генома человека. Чтобы выявить необходимые для

этого специфические фрагменты ДНК, используют блот-гибридизацию по Саузерну. Сущность этой методики кратко состоит в следующем: сначала осуществляют денатурацию ДНК с образованием одноцепочечных фрагментов, которые переносят на нитроцеллюлезный или нейлоновый фильтр в буферном растворе.

Агарозный гель с фрагментами ДНК помещают на фильтровальную бумагу, смоченную концентрированным солевым раствором. На гель накладывают нитроцеллюлезный фильтр, а сверху помещают сухую фильтровальную бумагу, в которую впитывается солевой раствор. ДНК переносится вместе с раствором, но задерживается фильтром и практически полностью оказывается на его поверхности. Затем одноцепочечные ДНК фиксируют на фильтре. Расположение фрагментов на фильтре точно соответствует их расположению в геле.

Чтобы выявить нужные фрагменты, проводят гибридизацию ДНК с радиоактивным ДНК-зондом или клонированным фрагментом ДНК. Нуклеотидная последовательность зонда должна быть полностью или частично комплементарна изучаемому участку геномной ДНК.

Результат гибридизации комплементарных цепей радиоактивного ДНК-зонда и фрагмента ДНК обнаруживают с помощью радиоавтографии: каждая комплементарная зонду последовательность ДНК проявляется в виде радиоактивной полосы.

С помощью метода Саузерна можно составить рестрикционную карту генома в участке исследуемого гена и установить, несет ли данный ген какие-либо дефекты. Так, разработаны эффективные методы синтеза искусственных ДНК-зондов, которые используются в

пренатальной диагностике наследственных заболеваний. Для этого из эмбриональных клеток, содержащихся в амниотической жидкости плода, выделяют ДНК и гибридизируют ее с помощью Саузерн-блоттинга с радиоактивным ДНК-зондом. Аномальный эмбрион легко распознается, т.к. его ДНК будет гибридизоваться только с ДНК-зондом, комплементарным мутантной последовательности.

В настоящее время имеются различные методы выявления мутаций. Их делят на прямые и косвенные. Прямая диагностика мутаций включает ряд методов:

1. Определение нуклеотидной последовательности (секвенирование), дающее возможность выявить замены оснований, делеции и вставки в изучаемом фрагменте.

2. Выявление нарушения места рестрикции, с помощью блот-гибридизации по Саузерну. Около 50% нуклеотидных замен ведет к изменению сайта (места) рестрикции. Это делает возможным выявить мутацию путем рестриктоного анализа.

3. Проведение аллелоспецифической гибридизации с синтетическими зондами, что позволяет обнаружить мутации в геномной ДНК. Последовательность оснований в зонде может быть задана по дефектному или нормальному варианту гена. В обоих случаях зонд используется для гибридизации с фрагментами ДНК обследуемого индивида.

4. Химическое и ферментативное расщепление ДНК в местах неправильной сшивки оснований выявляет большую группу мутаций, ведущих к нестабильности ДНК. Метод заключается в электрофорезе двухцепочечной ДНК в нейтральном или равномерно денатурирующем геле.

5. Регистрация изменения электрофоретической подвижности мутантных молекул ДНК.

6. Трансляция белкового продукта осуществляется в системе *in vitro* на основе получения специфической мРНК с добавлением лизата ретикулоцитов. Синтезируемый белок анализируют с помощью электрофореза. Изменение подвижности белка указывает на наличие мутации.

К косвенному выявлению мутаций прибегают в тех случаях, когда нуклеотидная последовательность гена еще не расшифрована, но известно его положение на генетической карте. Технические приемы такие же, как и в прямой диагностике, но добавляется математический анализ.

Диагностике мутаций способствует нахождение в геноме полиморфных по длине рестрикционных фрагментов. Их можно выявить с помощью блот-гибридизации по Саузерну.

Другим типам полиморфизма ДНК являются микросателлиты. Это короткие моно-, ди-, три- и тетра-нуклеотидные tandemно повторяющиеся последовательности ДНК. Они используются в качестве маркерных локусов аллельных вариантов гена или маркеров дефектных мутаций.

В 1993 г. был идентифицирован ген, ответственный за возникновение тяжелого заболевания нервной системы у человека — хореи Гентингтона (ХГ). Болезнь, проявляющаяся после 40 лет, выражается в расстройстве движений, снижении интеллекта, в нарушении эмоционально-волевой сферы и др. Этот недуг наследуется по аутосомно-доминантному типу со 100 % пенетрантностью. Ген локализован в коротком плече 4-й хромосомы.

Оказалось, что ген ХГ содержит область, в которой нуклеотидная после-

Глава 2. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНЕТИКИ ЧЕЛОВЕКА

довательность представлена многократным повторением трех нуклеотидов — ЦАГ (цитозин-аденин-гуанин) геномной ДНК. В норме количество таких повторов колеблется от 11 до 34, а у больных ХГ их 37-86 (в среднем 45). И, следовательно, хорea Гентингтона относится к наследственным заболеваниям, при котором мутация гена состоит в экспансии (многократном увеличении числа копий) тринуклеотидных ЦАГ-повторов.

Установлено, что форма болезни более тяжелая, если ХГ проявляется в молодом возрасте, наследуется по отцовской линии и нарастает в последующих поколениях. Ученые пришли к выводу, что число ЦАГ-повторов тесно связано и со сроком появления первых симптомов, и с тяжестью заболевания.

В 1992 г. экспансия тринуклеотидных ЦТГ-повторов была обнаружена в гене, который вызывает миотоническую дистрофию. Этот ген, названный ДМ-1, был картирован на 19-й хромосоме. Длина последовательности ЦТГ-повторов весьма различна. Если в нормальной популяции она колеблется от 5 до 30, то у больных миотонической дистрофией, количество повторов может достигать многих сотен.

Болезнь наследуется по аутосомно-доминантному типу, обычно начинается в зрелом возрасте и проявляется прогрессирующей мышечной слабостью, а в некоторых случаях задержкой

умственного развития, поражением скелета, сердечно-сосудистой системы и глаз. Для миотонической дистрофии характерно возрастание тяжести болезни на протяжении трех или четырех поколений. Если в первом поколении болезнь возникает в зрелом возрасте и проявляется лишь развитием катаракты или легким нарушением сократимости мышц, то в последующих поколениях болезнь начинается сразу после рождения ребенка, у которого развивается выраженная мышечная слабость, задержка умственного развития.

В последние годы было показано, что подобный механизм мутаций характерен и для ряда других наследственных заболеваний нервной системы человека: болезни Кеннеди, синдрома fragile (ломкой) X-хромосомы и др.

Вопросы для самоконтроля

1. Перечислите методы изучения генетики человека.
2. Какой из методов является наиболее старым и в каких случаях он используется?
3. Что такое конкордантность и дискордантность?
4. Какие задачи решаются популяционно-статистическим методом?
5. Каким методом можно определить наличие хромосомных аномалий?
6. Как выявляется гетерозиготность по ряду белков?
7. Для чего используются молекулярно-генетические методы?

Глава 3. ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Основоположник генетики Грегор Мендель в 1865 г. впервые доказал, что каждый признак организма определяется парой наследственных факторов. В начале XX в. парные наследственные факторы получили название аллельных генов. Примерно в то же время было выдвинуто предположение, что гены расположены в хромосомах, что и положило начало хромосомной теории наследственности. Впервые эта теория получила доказательства в работах Нобелевского лауреата Томаса Ханта Моргана и его учеников в 1910 г. В экспериментах на плодовой мушке *Drosophila melanogaster* была показана взаимосвязь между конкретными генами и конкретными хромосомами.

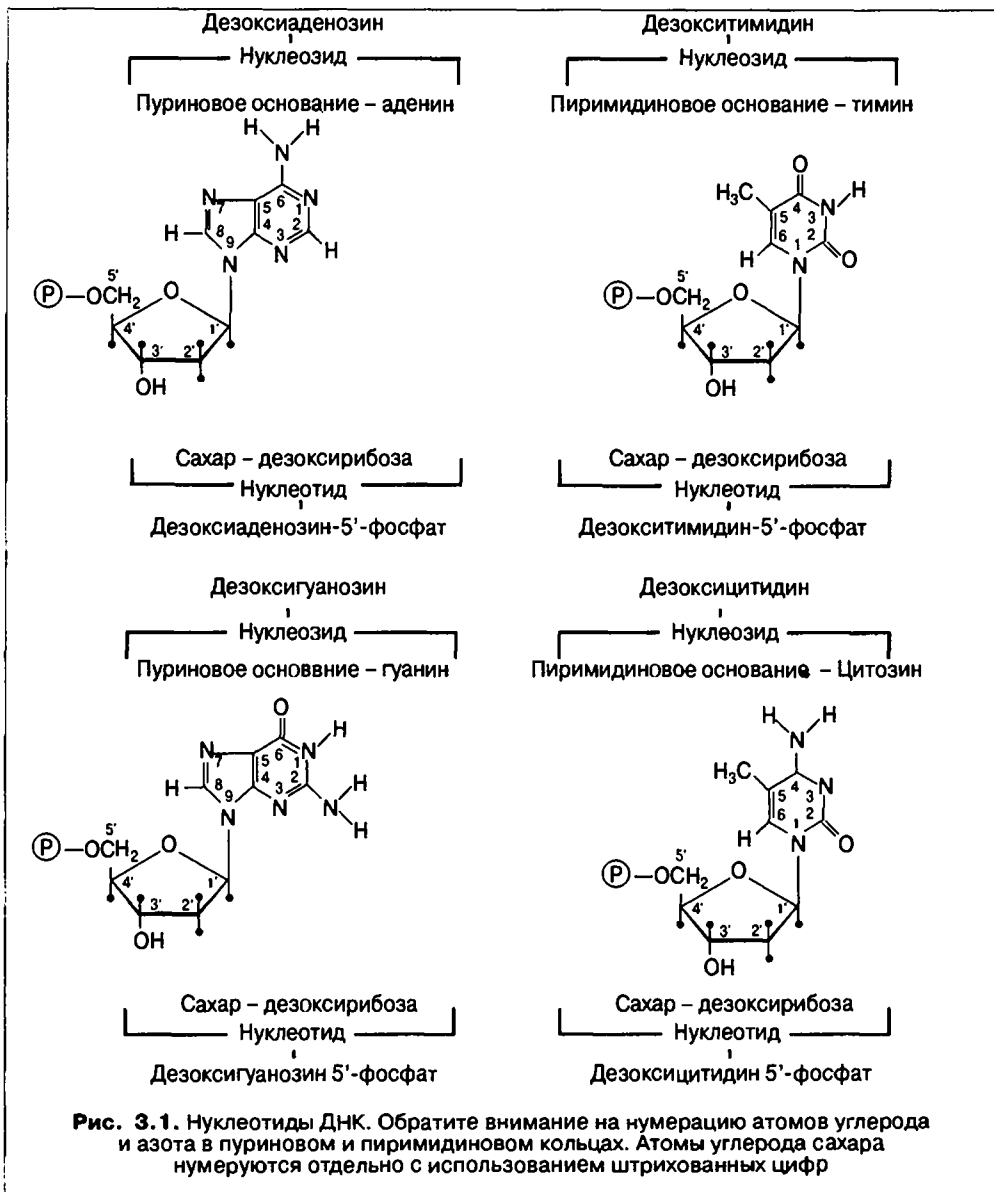
Долгое время оставалось неизвестным, что представляет собой вещество, образующее ген, способное к саморепликации, мутациям и фенотипическому проявлению. Первые сведения о физических и химических основах наследственности были получены при работе с микроорганизмами: бактериями, вирусами и бактериофагами. Эти организмы, ранее изучавшиеся как возбудители болезней человека и домашних животных, оказались удобными объектами для исследования вещества наследственности и природы генетического материала.

В 1928 г. бактериолог Ф. Гриффит изучал пневмококки, вызывающие воспаление легких у мышей, для получения вакцины. Выяснилось, что пневмококки бывают двух типов: бескапсульные и с полисахаридной капсулой, причём возбудителем смертельных форм воспаления легких являются бактерии

с полисахаридной капсулой. Если мышам вводили пневмококки без полисахаридной капсулы, то они справлялись с заболеванием и выживали. При инъекции убитых бактерий, независимо от наличия или отсутствия капсулы на их поверхности, животные вообще не заболели воспалением легких. Если же мышам вводили смесь пневмококков: живых без капсулы и убитых нагреванием, но имеющих капсулу, то животные погибали. В этом случае из организмов погибших мышей удалось выделить бактерии с защитными полисахаридными капсулами. Таким образом, в этих экспериментах бактерии, не имеющие капсул, приобрели способность образовывать ее благодаря веществу наследственности, которое перешло из убитых бактерий в живые. Только в 40-х гг. XX в. в другой лаборатории была выяснена природа этого загадочного вещества наследственности. Фактором, превращающим непатогенные бескапсульные пневмококки в патогенные с полисахаридной оболочкой, оказалась молекула ДНК.

Неопровержимым доказательством того, что носителем наследственной информации вирусов и бактериофагов являются нуклеиновые кислоты, можно считать демонстрацию их инфекционных свойств. Так, было показано, что очищенная ДНК некоторых фагов, из которых наиболее известны фх174 и λ, может заражать бактерии в отсутствие белковой оболочки.

В 1953 г. Джеймс Уотсон и Френсис Крик предложили модель структуры ДНК, которая с тех пор многократно проверялась и признана правильной.



Химический состав и строение молекулы ДНК

Уотсон и Крик предположили, что природная (нативная) молекула ДНК представляет собой две полимерные цепи, соединенные между собой и закрученные в форме двойной спирали.

Основная структурная единица одной цепи — нуклеотид. Он состоит из трех химически различных частей, соединенных ковалентными связями: дезоксирибозы, азотистого основания и фосфатной группы (рис. 3.1). ДНК содержит пуриновые азотистые осно-

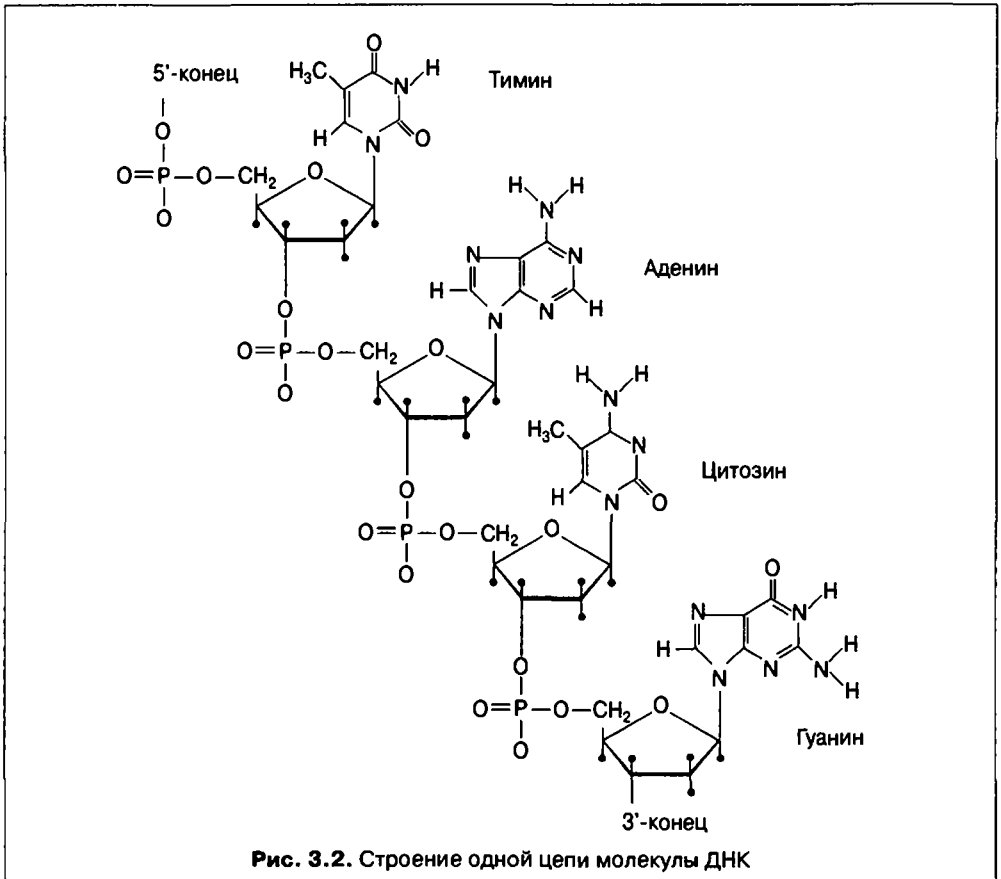
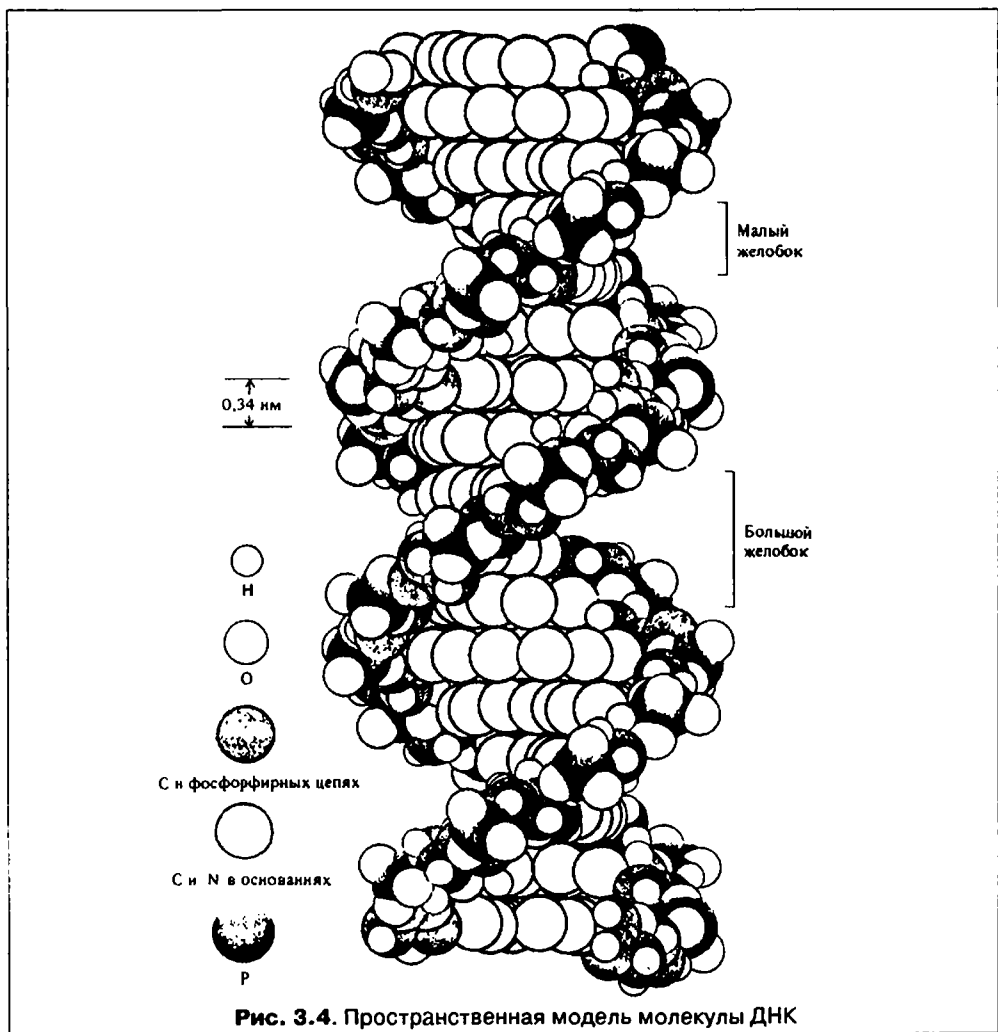
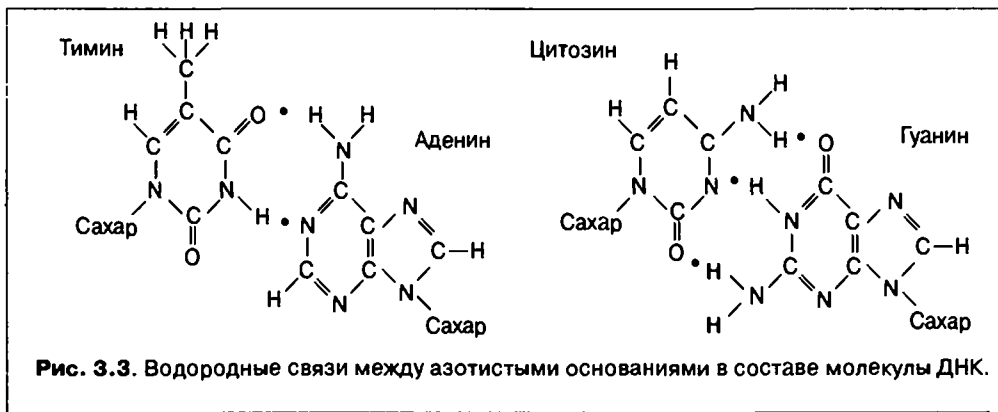


Рис. 3.2. Строение одной цепи молекулы ДНК

вания — аденин (А) и гуанин (Г) — и пиримидиновые основания — цитозин (Ц) и тимин (Т). Азотистое основание ковалентно соединено с первым атомом углерода сахара и формирует структуру, называемую нуклеотидом. Фосфатные группы соединяют соседние нуклеотиды в полимерную цепочку посредством фосфодиэфирных связей между 5'-атомом углерода одного сахара и 3'-атомом углерода другого (рис. 3.2). Сцепление между цепями обеспечивается особыми водородными связями между аденином и тимином и между гуанином и цитозином (рис. 3.3). Водородные связи много слабее ковалентных, соединяющих от-

дельные атомы каждого нуклеотида, но достаточно сильны, чтобы обеспечить специфичность образования пар А-Т, Г-Ц. Такое попарное сопоставление нуклеотидов, при котором А комплементарен Т, а Г комплементарен Ц, было выведено с помощью построения молекулярных моделей, в которых точно воспроизводились в масштабе все межатомные расстояния. Пространственная модель молекулы ДНК показала характер закрученности цепей друг относительно друга и плотность упаковки пар азотистых оснований в двойной спирали (рис. 3.4). Кроме того, построение молекулярной модели гипотетической двойной спирали



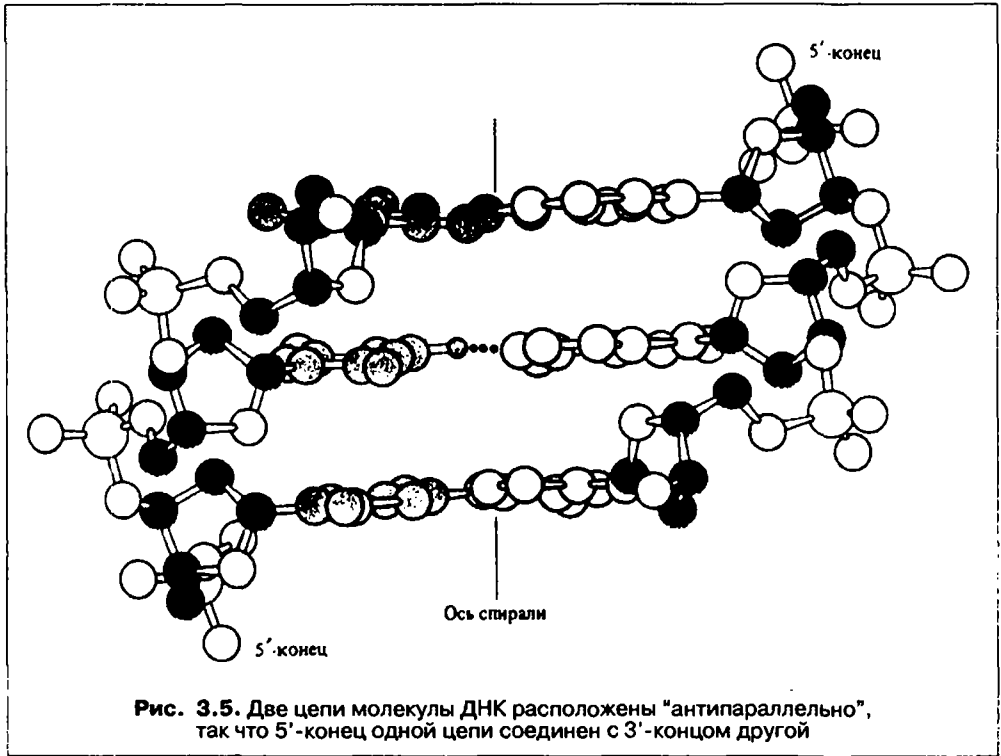


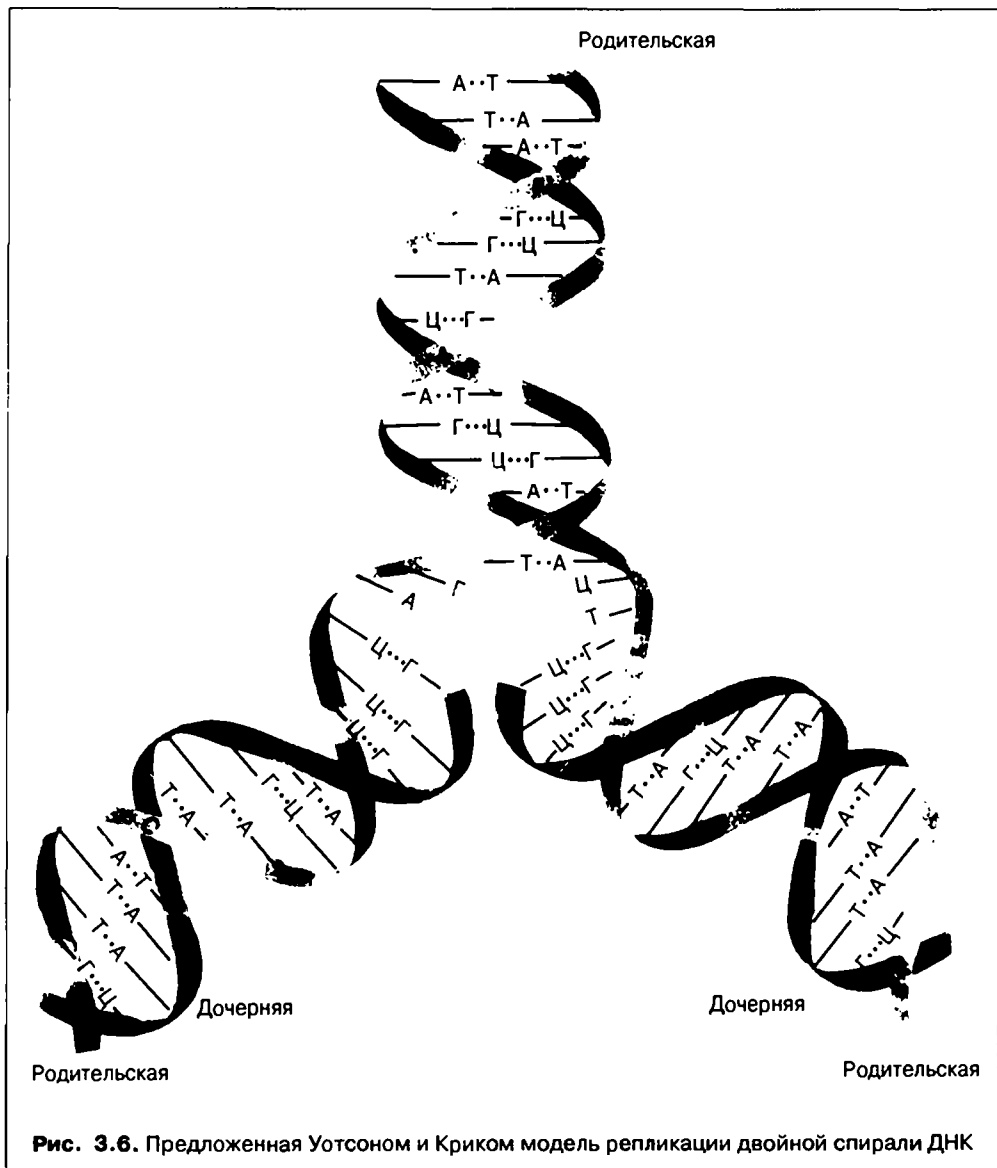
Рис. 3.5. Две цепи молекулы ДНК расположены "антипараллельно", так что 5'-конец одной цепи соединен с 3'-концом другой

потребовало "антипараллельности" нуклеотидных цепочек, как это изображено на рисунке (рис. 3.5).

Нуклеиновые кислоты — это очень длинные полимерные цепочки. Интактные молекулы ДНК содержат в зависимости от вида организмов от нескольких тысяч до многих миллионов нуклеотидов. Для любой последовательности азотистых оснований возможна равная ей по длине комплементарная последовательность, составляющая вторую цепь двойной спирали. Конкретная последовательность пар А-Т и Г-Ц не влияет на структуру молекулы ДНК, образующей двойную спираль. Возможное число различных последовательностей пар оснований в молекуле ДНК практически бесконечно и способно кодировать колоссальное количество информации.

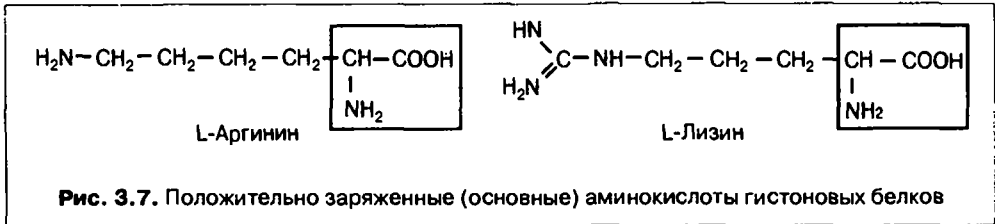
Из модели следует, что физическая структура природной ДНК может сильно изменяться при нагревании или титровании, когда не нарушаются ковалентные, но разрываются водородные связи, в результате чего две цепи отделяются друг от друга.

Поскольку цепи ДНК комплементарны, каждая из них при расплетании двойной спирали способна служить матрицей для синтеза новой комплементарной цепи. Последовательность оснований во вновь синтезируемой цепи будет определяться спецификой водородных связей между азотистыми основаниями родительской и вновь синтезируемой цепи (рис. 3.6). Таким образом, генетическая информация, содержащаяся в последовательности пар оснований родительской молекулы, будет полностью воспроизведена в



двух дочерних молекулах. Более того, если в процессе удвоения ДНК произошла ошибка и какой-либо нуклеотид во вновь образуемой цепи выпал или оказался некомплементарным исходному, то это может изменить информационное содержание молекулы,

причем логично ожидать, что эта ошибка будет передана дочерним молекулам ДНК в следующих поколениях. Такая замена пары нуклеотидов будет обладать свойствами генетических мутаций. Модель структуры ДНК Уотсона и Крика объясняет как способ-



ность генов к самоудвоению (репликации), так и их информационные свойства.

Упаковка ДНК в хромосомах

Молекулы ДНК в эукариотических клетках очень велики. Так, длина молекул ДНК, выделенных из клеток человека, достигает нескольких сантиметров. Принято считать, что каждая эукариотическая хромосома содержит одну — единственную непрерывную молекулу ДНК. Учитывая видовое количество хромосом у млекопитающих, можно сказать, что в среднем у них на интерфазное ядро приходится около 2 м ДНК, находящейся в сферическом ядре диаметром менее 10 мкм. При этом в ядре должен сохраняться определенный порядок расположения молекул ДНК, чтобы обеспечить ее упорядоченное функционирование.

Молекулы ДНК в ядрах эукариотических клеток всегда находятся в комплексе с белками в составе хроматина, который образуется из хромосом после окончания деления ядер в результате сложного процесса раскручивания (деспирализации) хромосом.

На долю белков приходится около 60% сухого веса хроматина. Белки в его составе очень разнообразны. Обычно их разделяют на две группы: гистоны и негистоновые белки. Именно гистоны, характерные только для эукариотических клеток, осуществляют первые этапы упаковки ДНК, очень схожие у большинства изученных объ-

ектов. На долю гистонов приходится до 80% всех белков хроматина. Их взаимодействие с ДНК происходит за счет ионных связей и не зависит от последовательности нуклеотидов в составе молекулы ДНК. Гистоны не отличаются большим разнообразием. Это глобулярные белки, представленные 5-7 типами молекул. Наиболее известны следующие классы гистонов: Н1, Н2А, Н2В, Н3 и Н4. Их основные свойства определяются относительно высоким содержанием основных аминокислот: лизина и аргинина (рис. 3.7). Положительные заряды на аминоклупах указанных аминокислот обеспечивают электростатическую связь гистонов с отрицательными зарядами на фосфатных группах ДНК. Из всех ядерных белков гистоны изучены наиболее хорошо. Их молекулярная масса относительно невелика (максимальная — у гистона Н3 — 153 тыс. дальтон). Практически у всех эукариот они обладают сходными свойствами и подразделяются на одни и те же классы. Из исследованных эти белки наиболее консервативны: их аминокислотные последовательности близки даже у отдаленных видов. Исключение составляют гистоны Н1, для которых характерны значительные межвидовые и межтканевые вариации. В процессе жизнедеятельности клеток гистоны могут подвергаться посттрансляционным модификациям, что изменяет их свойства и способность связываться с ДНК. Гистоны синтезируются в цито-

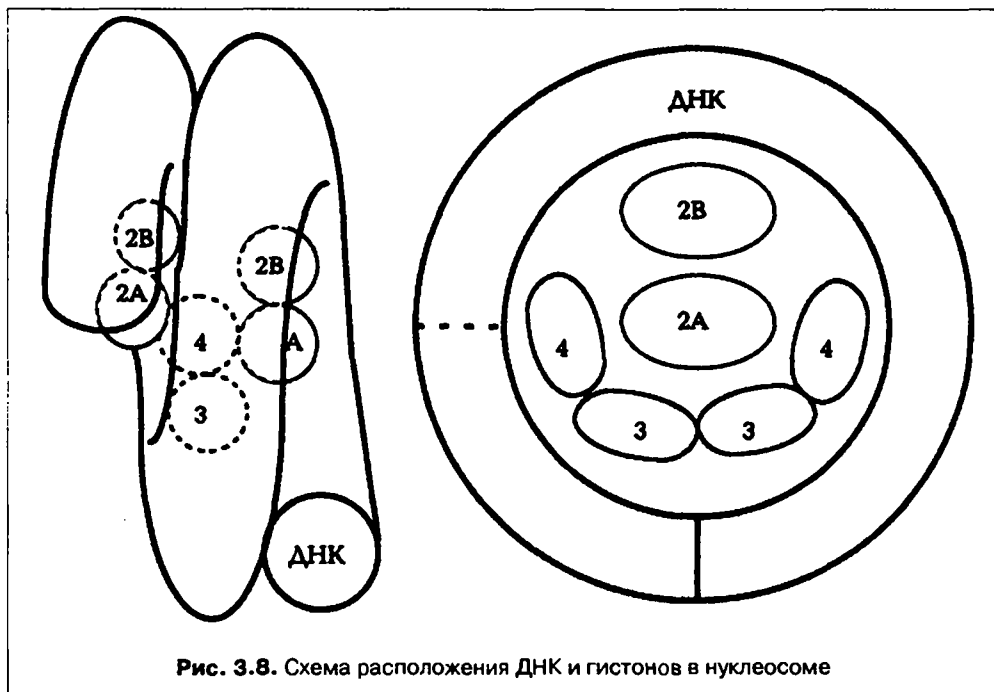


Рис. 3.8. Схема расположения ДНК и гистонов в нуклеосоме

плазме, переносятся в ядро и связываются с ДНК во время ее репликации в S-периоде клеточного цикла. Включившиеся в хроматин гистоны очень стабильны и имеют низкую скорость обмена.

Присутствие гистонов во всех эукариотических клетках, их сходство даже у очень отдаленных видов, обязательность в составе хромосом и хроматина — все это говорит о чрезвычайно важной роли этих белков в жизнедеятельности клеток. Этапным событием в изучении упаковки ДНК в составе хроматина стало открытие нуклеосом — частиц, в которых происходит первый этап упаковки ДНК в хроматине. Сердцевина нуклеосомы всегда консервативна, содержит восемь молекул: по две молекулы гистонов H4, H3, H2A, H2B. По поверхности сердцевины располагается участок ДНК из 146 нуклеотидных пар, образующий 1,75

оборота вокруг сердцевины. Небольшой участок ДНК остается несвязанным с сердцевинной, он называется линкером (рис. 3.8). В разных объектах линкерный участок может варьировать от 8 до 114 нуклеотидных пар на нуклеосому. Рассчитано, что на весь гаплоидный геном человека (3×10^9 пар оснований) приходится $1,5 \times 10^7$ нуклеосом. Общий вид хроматина, представленного молекулой ДНК, упакованной с помощью нуклеосомных структур, можно сравнить с бусами на нитке (рис. 3.9). Нуклеосомы способны к самосборке при наличии в пробирке ДНК и гистонов в определенном соотношении. Первый нуклеосомный уровень компактизации ДНК увеличивает плотность упаковки ДНК в 6-7раз.

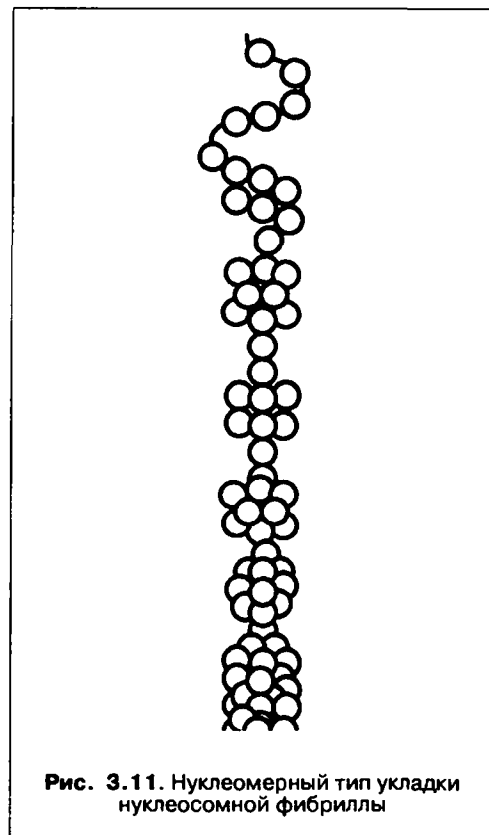
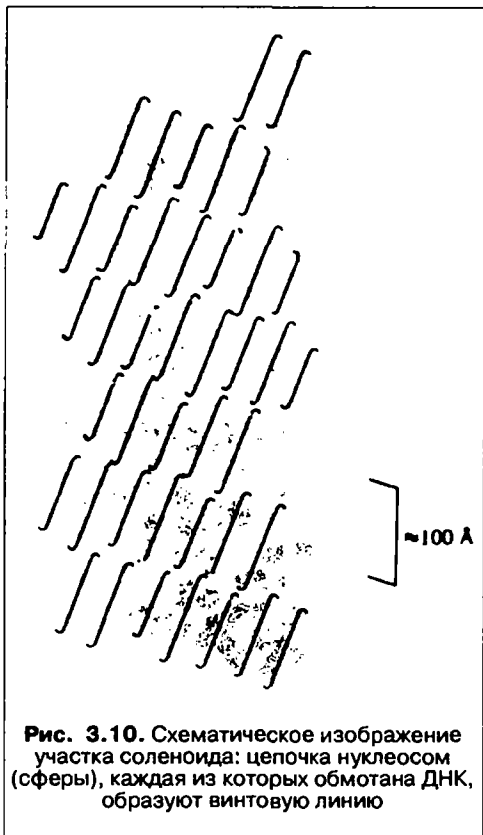
В следующий этап упаковки нуклеосомная структура хроматина вовлекается с помощью гистона H1, кото-



Рис. 3.9. Электронная микрофотография эукариотического хроматина, на которой видны нуклосомы, соединенные тяжами свободной ДНК

рый связывается с линкерной частью ДНК и поверхностью нуклеосомы. Благодаря сложному взаимодействию всех компонентов возникает упорядоченная структура спирального типа, которую часто называют соленоидом (рис. 3.10). Она повышает компактность ДНК еще в 40 раз. Поскольку соленоидная структура имеет снижен-

ную способность связываться с белками, обеспечивающими транскрипцию, то считается, что этот уровень компактизации ДНК может играть роль фактора, инактивирующего гены. Некоторые авторы рассматривают соленоидную структуру как один из возможных вариантов упаковки хроматина с помощью гистона H1 и полагают вероят-



ным существование и других морфологических вариантов, например, нуклеомер, или сверхбусин (рис. 3.11).

Более высокие уровни компактизации ДНК в хроматине связаны с негистоновыми белками. На их долю приходится около 20% всех белков хроматина. Эту сборную группу белков отличает широкий спектр свойств и функций. Всего фракция негистоновых белков объединяет около 450 индивидуальных белков, свойства и конкретные функции которых еще не достаточно изучены. Выяснено, что некоторые из них специфично связываются с определенными участками ДНК, в результате чего фибриллы хроматина в местах связывания ДНК с не-

гистоновыми белками образуют петли. Таким образом, более высокие уровни упаковки ДНК в составе хроматина обеспечиваются не спирализацией нитей хроматина, а образованием поперечной петливой структуры вдоль хромосомы (рис. 3.12). На всех указанных этапах компактизации ДНК хроматин представлен в активной форме, в нем происходит транскрипция, синтез всех типов молекул РНК. Такой хроматин называют эухроматином. Дальнейшая упаковка хроматина ведет к переходу его в неактивное состояние с образованием гетерохроматина. Этот процесс связан со спирализацией групп петель и образованием из фибрилл хроматина розеткоподобных

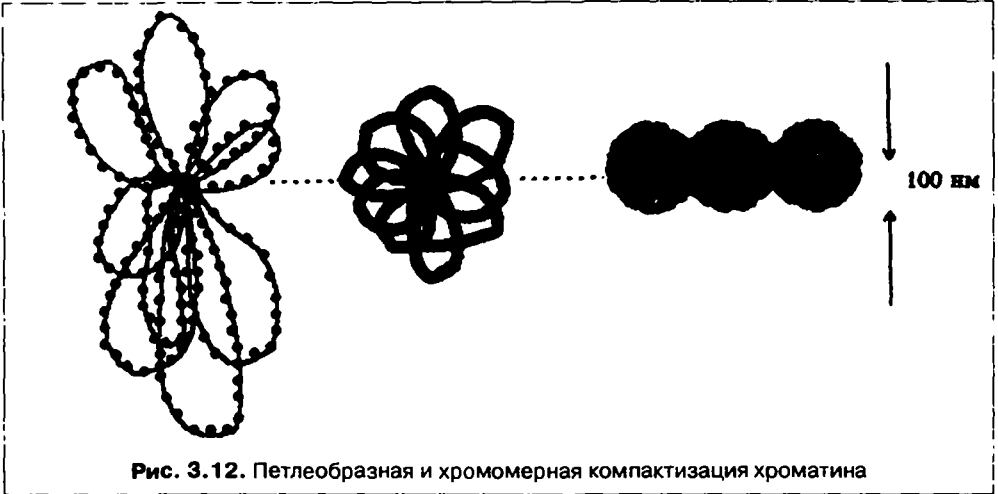


Рис. 3.12. Петлеобразная и хромомерная компактизация хроматина

структур, которые обладают оптической и электронной плотностью и называются хромомерами (рис. 3.12). Предполагается, что вдоль хромосомы расположено большое количество хромомер, соединенных между собой в единую структуру участками хроматина с нуклеосомной или соленоидной упаковкой ДНК. Каждая пара гомологичных хромосом имеет свой хромомерный рисунок, который можно выявить с помощью специальных методов окрашивания при условии спирализации хроматина и перехода его в состояние хромосом.

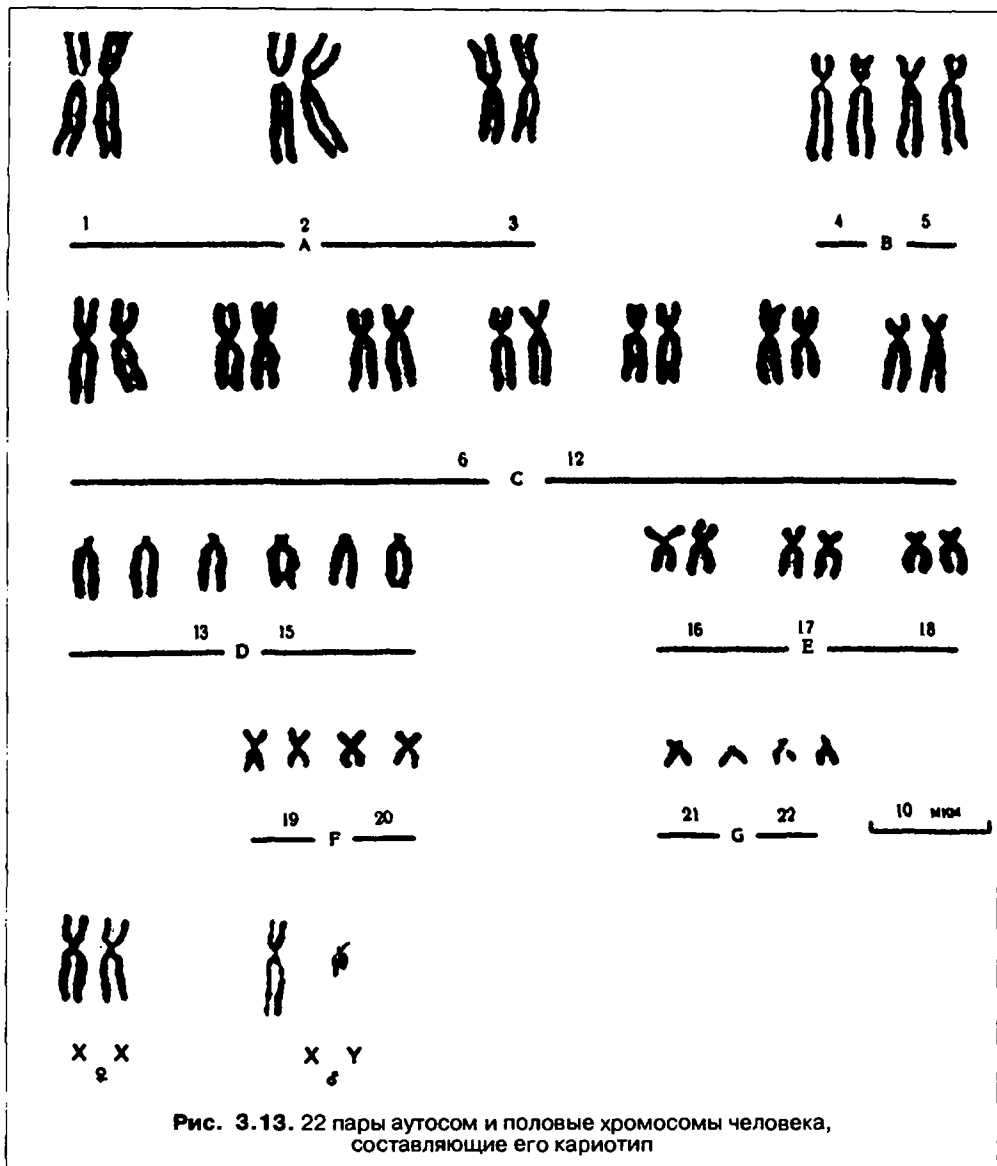
Петельно-розеточная структура хроматина обеспечивает не только упаковку ДНК, но и организует функциональные хромосом, поскольку в своих основаниях петли ДНК связаны с негистоновыми белками, в состав которых могут входить ферменты репликации, обеспечивающие удвоение ДНК, и ферменты транскрипции, благодаря которым происходит синтез всех типов РНК.

Участки ДНК, упакованные в виде гетерохроматина, могут иметь двойную природу. Различают два типа гете-

рохроматина: факультативный и конститутивный (структурный). Факультативный гетерохроматин представляет собой участки генома, временно инактивированные в тех или иных клетках. Примером такого хроматина служит половой гетерохроматин инактивированной X-хромосомы в соматических клетках женщин. Структурный гетерохроматин во всех клетках постоянно находится в неактивном состоянии и, вероятно, выполняет структурные или регуляторные функции.

Организация генетического материала в хромосомах человека

Общая организация хромосом человека традиционна: в метафазе хромосома состоит из двух сестринских хроматид, соединенных между собой в районе первичной перетяжки (центромеры). Центромера делит хроматиду на два плеча. Плечи могут быть равными, тогда хромосома называется метацентрической. Если одно плечо немного короче другого, то хромосомы именуются субметацентрическими. В нескольких парах хромосом человека одно плечо сильно короче другого, такие



хромосомы носят название акроцентрических (рис. 3.13). Тонкая морфология хромосом зависит от фазы митоза. Наиболее сильно спирализованы хромосомы в мета- и анафазе.

Вместе с морфологией хромосом изменяется в ходе митозе и морфология

центромеры. Наиболее четко центромера выражена в виде более тонкого и светлого участка хромосомы к концу профазы. Центромеры выполняют в хромосомах очень важные функции. Они соединяют две сестринские хроматиды, велика также их роль в орга-

низации веретена деления. В районе центромеры в профазе формируется особая белковая структура, имеющая сходство к белкам микротрубочек веретена деления. Микротрубочки веретена деления соединяются с хроматидами в районе центромеры так, что на один центромерный район может приходиться более десяти микротрубочек. Очень важным моментом в прохождении митоза является синхронность одновременного разделения всех хромосом на две хроматиды. Считается, что ведущая роль в регуляции этого процесса также принадлежит центромерам.

Рассматривая общую морфологию хромосом, нельзя обойти вниманием их концевые участки, называемые теломерами. Концы хромосом — теломеры, имеют особенности в первичной и третичной структурах, но об этом речь пойдет несколько позже. Сначала ознакомимся с функциями теломерных районов. Когда деление клетки закончено и формируются новые клеточные ядра, то с помощью теломер хромосомы прикрепляются к внутренней ядерной мембране, в результате чего каждая хромосома в деспирализованном состоянии занимает в ядре строго определенное место. Помимо этого теломерные районы предотвращают слипание хромосом своими концами и препятствуют образованию дицентриков — хромосом с двумя центромерами, наличие которых свидетельствует о патологических картинах митоза. Одновременно теломеры стабилизируют хромосомы, защищая их от деградации клеточными нуклеазами — ферментами, катализирующими гидролиз всех незащищенных ДНК или их фрагментов. В последнее время стало известно еще одно назначение теломерных концов: благодаря им происходит полное

завершение редупликации хромосом при подготовке клетки к делению. Среди ферментов, участвующих в удвоении ДНК, помимо уже известных ДНК-полимеразы, ДНК-лигазы, геликазы, топоизомеразы, а также стабилизирующих белков, особое внимание следует уделить теломеразе, которая помогает завершить репликацию ДНК на отстающей цепи.

Принято считать, что каждая хроматида содержит одну из двух идентичных дочерних молекул ДНК, образующихся в процессе репликации. Молекула ДНК представляет собой непрерывную сверхскрученную двойную спираль, простирающуюся по всей длине хроматиды. Функционально эта нить подразделяется на большое число отрезков, соответствующих отдельным генам. Каждый ген несет информацию о первичной структуре отдельной полипептидной цепи, рибосомной РНК, транспортной РНК или выполняет регуляторную функцию. Кроме того, в составе непрерывной нити ДНК, наряду со смысловыми генами, находятся многократно повторяющиеся одинаковые или сходные по составу нуклеотидные последовательности, выполняющие, вероятно, регуляторные или структурные функции.

Информация о первичной структуре полипептидов (последовательности аминокислот в них) записана в ДНК в виде трехбуквенного кода, составленного из первых букв названий четырех азотистых оснований, входящих в состав ДНК (АТГЦ). Каждой аминокислоте соответствует определенный триплет из трех соседних нуклеотидов. Например, аминокислоте фенилаланин в ДНК соответствует кодон ААА, а аминокислоте серин — АГА. Из 64 возможных триплетов 61 кодирует 20 аминокислот, обнаруженных в составе

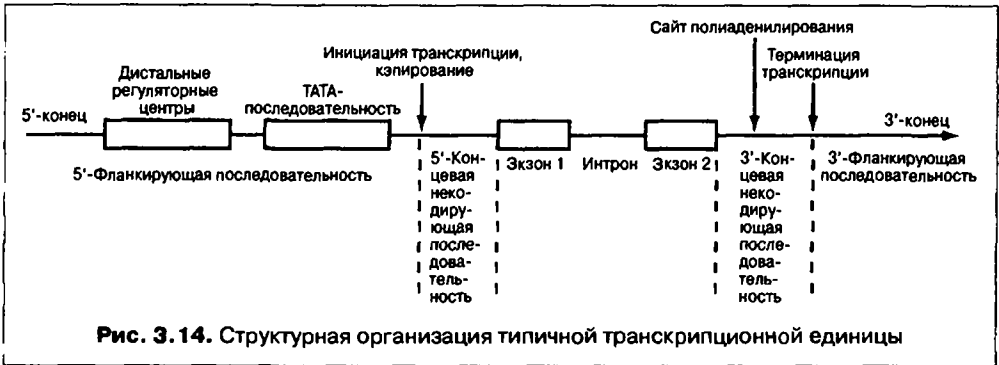


Рис. 3.14. Структурная организация типичной транскрипционной единицы

клеточных белков, а 3 кодона являются стоп-сигналами, прекращающими синтез полипептидной цепи. Если триплет, соответствующий метионину, стоит в начале цепи ДНК, то он выполняет функцию возбуждения считывания. (Кодоны, выполняющие сигнальные функции, называют нонсенс – кодонами). Генетический код вырожден, т. е. каждая аминокислота может кодироваться несколькими вариантами триплетов. Для осуществления синтеза полипептидов генетическая информация, закодированная в ДНК в составе хроматина, переписывается (процесс транскрипции) по принципу комплементарности азотистых оснований на информационную РНК, которая переходит из ядра в цитоплазму, где принимает участие в процессе трансляции: переводе информации с языка нуклеотидов на язык аминокислот, т. е. процессе синтеза белка. Каждому данному кодону соответствует одна и только одна определенная аминокислота. Процесс считывания генетического кода не допускает возможности перекрывания кодонов. Начавшись на определенном кодоне, считывание следующих идет без знаков препинания и пропусков вплоть до нонсенс-кодонов. Положение первого кодона определяет границы рамки считывания. Генети-

ческий код человека не отличается по каким-либо параметрам от генетического кода любых других эукариотических организмов.

В пределах одного гена, который кодирует полипептид, участок молекулы ДНК подразделяется на функционально различные единицы (рис. 3.14). Отличительная черта строения многих генов эукариот – прерывистость структуры смысловой части. Смысловые участки, несущие информацию о последовательности аминокислот в белке – экзоны, чередуются с участками некодирующих последовательностей – интронами. Часто интроны по длине могут превосходить экзоны. Наличие избыточных последовательностей приводит к тому, что длина гена может быть в несколько раз больше, чем требуется для кодирования аминокислот в белке. Гаплоидный набор хромосом человека содержит $3,5 \times 10^8$ нуклеотидных пар, что по количеству соответствует примерно 1,5 млн. пар генов. Однако данные по изучению генома человека показывают, что организм человека имеет не более 100 тыс. генов. Это значит, что в клетках человека только 1% ДНК выполняет кодирующие функции. В отношении оставшихся 99% существуют разные гипотезы, обосновывающие их регуляторные и

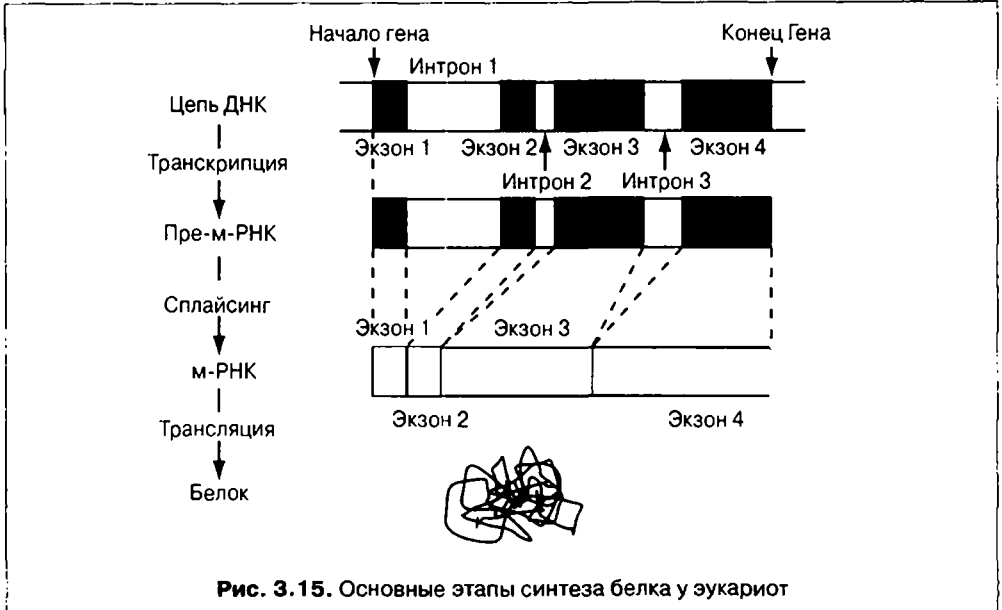
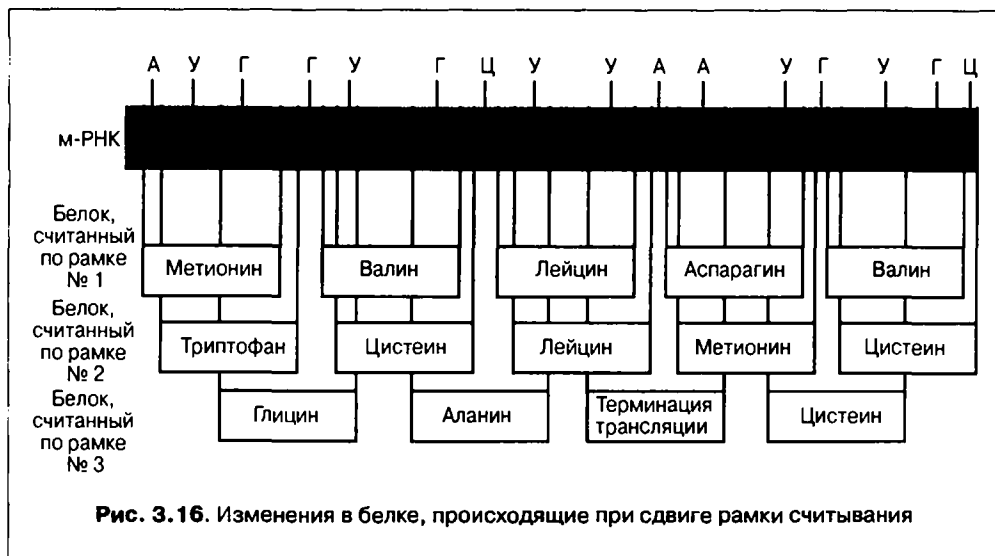


Рис. 3.15. Основные этапы синтеза белка у эукариот

структурные функции. Для человека данные об экзонно-интронном строении генов впервые были получены для гена гемоглобина, а затем и для многих других генов. Это открытие стало возможным в конце 70-х гг. благодаря разработке метода синтеза комплементарных ДНК на матрице м-РНК с помощью обратной транскриптазы, а также благодаря освоению целого ряда методов генно-инженерной техники. В них входит разрезание генома с помощью рестриктаз на последовательности, соответствующие отдельным генам, выделение таких генов, встраивание их в векторные молекулы, внедрение векторов в клетки бактерий и клонирование там таких рекомбинантных молекул, что позволяет получать банки генов.

Процесс транскрипции на ДНК, как на матрице, связан с синтезом комплементарной последовательности РНК, включающей и интроны, и экзоны. Затем в ходе созревания РНК в ядре из

нее удаляются интроны, а концы соседних экзонов сшиваются стык в стык. Процесс удаления последовательностей РНК, соответствующих интронам, и соединение участков с транскрибируемыми последовательностями экзонов называется сплайсингом. Кроме того транскрибируемая молекула модифицируется добавлением метилированного Г-нуклеотида на 5'-конце (кэпирование) и поли-А последовательности на 3'-конце. Модифицированные участки играют важную роль в инициации белкового синтеза, защищают транскрипт т-РНК от деградации. Имеются данные, свидетельствующие о том, что поли-А конец участвует в транспорте зрелой м-РНК из ядра в цитоплазму и продлевает ее функционирование там. Весь суммарный процесс формирования зрелых молекул РНК из предшественников называется процессингом. Созревшая м-РНК выходит в цитоплазму, прикрепляется к рибосоме, где генетичес-



кая информация транслируется в белковую последовательность (рис. 3.15).

Большинство интронных последовательностей, по-видимому, не обладают специфическими функциями. Однако один и тот же транскрипт РНК может подвергаться сплайсингу по-разному, следовательно с одного транскрипта в ходе сплайсинга способны образоваться несколько различных РНК. Такой сплайсинг называется альтернативным. Альтернативный сплайсинг сообщает клетке дополнительную генетическую пластичность. Рассмотрим это явление на примере белка фибронектина.

В плазме крови человека присутствует белок фибронектин. Он синтезируется клетками печени и выделяется в кровь. Этот же белок может синтезироваться клетками соединительной ткани, эндотелиальными клетками, выстилающими кровеносные сосуды, и некоторыми другими типами клеток. В этом случае фибронектин в нерастворимой форме накапливается в межклеточном пространстве. Функции фибронектина многоплановы: он игра-

ет роль в поддержании гомеостаза, в процессах тромбоза, миграции и дифференцировки клеток сосудов, в развитии атеросклеротических бляшек в сосудах. Известно много вариантов фибронектина, он обладает ткане- и возрастной специфичностью. Показано, что варианты фибронектина образуются с одного геномного транскрипта за счет альтернативного сплайсинга. Вариации м-РНК-последовательностей фибронектина связаны с присутствием или отсутствием по крайней мере двух интронов.

Известные вариации иммуноглобулинов также в значительной мере обеспечиваются процессом созревания новосинтезированных гигантских м-РНК в ядре.

В начале каждого гена, до его смысловой части, представленной экзонами, находятся участки, которые обеспечивают регуляцию работы гена. К числу регуляторных участков, одинаковых для всех генов, относятся ТАТА-последовательности (рис. 3.14), где чередуются тимин и аденин ("ТАТА-БОКС"). Этот участок лежит на 30

нуклеотидов левее места начала считывания гена. Установлено, что РНК-полимераза, фермент осуществляющий транскрипцию, так ложится на ДНК, что ее опознающая часть закрывает "ТАТА-БОКС", а ее активный центр оказывается над первым считываемым нуклеотидом. Далее по длине гена следует промоторный участок, который способствует правильной установке рамки считывания нуклеотидов, поскольку процесс считывания генетического кода не допускает возможности перекрывания кодонов. Иногда изменения рамки считывания могут происходить из-за выпадения или добавления одного или нескольких нуклеотидов, тогда при последующей сборке белка в нем будет нарушена последовательность аминокислот. Такая ситуация получила название мутации со сдвигом рамки (рис. 3.16).

За промоторным участком следует палиндром ("перевертыш"), или инвертированный повтор. Этот участок ДНК одинаково читается в обоих направлениях и имеет центральную точку, относительно которой последовательность остается одинаковой в обеих цепях ДНК. Следовательно, такой участок ДНК имеет две оси симметрии: вдоль и поперек. Важное свойство палиндромов — возможность образовывать шпильки в РНК или структуры креста в ДНК за счет комплементарного взаимодействия не между двумя нитями ДНК, а между нуклеотидами каждой цепи. В результате этого палиндром ДНК превращается в крест, что делает невозможным дальнейшее продвижение фермента РНК-полимеразы, и процесс транскрипции прекращается, если рамка считывания установлена неверно.

В последнее время описаны специфические регуляторы работы некото-

рых генов — энхансеры. Они расположены впереди гена на расстоянии в сотни и тысячи нуклеотидных пар от него. У эукариот существуют специальные регуляторные белки, опознающие энхансер и присоединяющиеся к нему, в результате чего происходит активация работы гена.

По данным разных авторов, содержание ДНК в диплоидной клетке человека составляет примерно $7,3 \times 10^{12}$ г, что соответствует $7,1 \times 10^9$ нуклеотидных пар. Каждая молекула ДНК гетерогенна по своему составу. В ней встречаются участки с уникальной последовательностью азотистых оснований, которые несут информацию для большинства белков клетки. В то же время в ней встречаются последовательности нуклеотидов, многократно повторяющиеся в геноме в составе этой же или других молекул ДНК. Такие повторяющиеся последовательности подразделяют на два класса. Первый — умеренно повторяющиеся последовательности с числом повторов от 10^2 до 10^5 на геном. На их долю приходится примерно четверть ДНК, и они представляют собой блоки истинных генов, как, например, гены гистонов (рис. 3.17). К этому же классу умеренных повторов относятся короткие последовательности, которые не кодируют белки, они разбросаны по всему геному, а их длина соответствует примерно 300 н.п. (нуклеотидных пар). Второй класс — часто повторяющиеся последовательности, или сателлитные ДНК, число повторов которых на геном превышает миллион (1×10^6) раз. Это нетранскрибирующиеся участки ДНК, на которых не идет образование РНК.

В работах разных авторов показано, что лишь немногим более 50% ДНК генома человека представлено уникальными фрагментами длиной около 2000

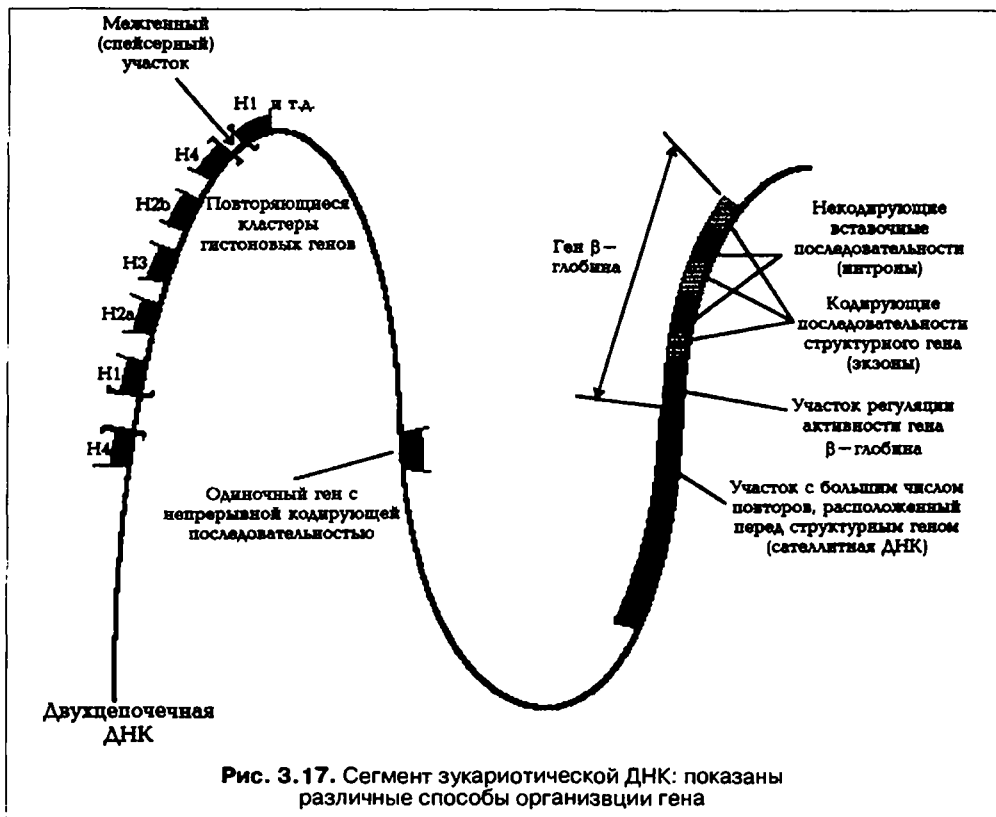


Рис. 3.17. Сегмент эукариотической ДНК: показаны различные способы организации гена

н.п., и далеко не все из них представляют структурные гены. В основном они распределены в составе длинных молекул ДНК между короткими, умеренно повторяющимися последовательностями, длина которых не превышает 300 н.п. Многие из таких умеренных повторов имеют сходное строение. Вероятно, они выполняют структурные и регуляторные функции в составе генов. Умеренные повторы, представляющие гены, встречаются в каждой клетке человека, где есть ядро. Они содержат гены, необходимые всем клеткам в каждой фазе индивидуального развития. Это гены рибосомной РНК, гистонов и транспортной РНК.

Гены рибосомной РНК являются частью района ядрышкового организато-

ра на хромосомах. Они кодируют рибосомные РНК, которые синтезируются в ядрышке. В ядрышке происходит процессинг рибосомных РНК: из одной гигантской новосинтезированной молекулы образуются три разные молекулы рибосомных РНК меньшего размера, а избыточные последовательности удаляются. Зрелые рибосомные РНК участвуют в сборке субъединиц рибосом. Таким образом, ядрышко — это место в ядре, где функционируют рибосомные гены, оно содержит совокупность всех рибосомных РНК, находящихся на разных стадиях процессинга, здесь происходит процесс формирования субъединиц рибосом. У человека район ядрышкового организатора расположен в коротких плечах

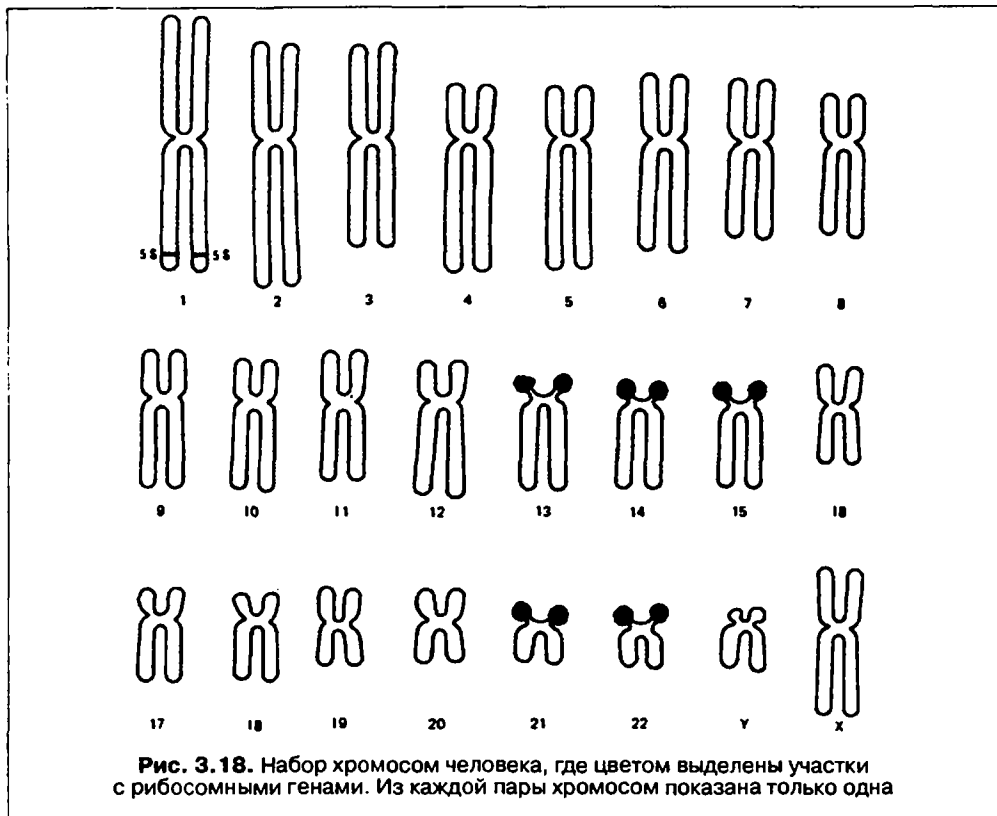


Рис. 3.18. Набор хромосом человека, где цветом выделены участки с рибосомными генами. Из каждой пары хромосом показана только одна

acrocentric chromosomes: 13th, 14th, 15th, 21st and 22nd (fig. 3.18). In the formation of the nucleolus can accept the share of several chromosomes. The average number of copies of ribosomal genes in cells of man according to different authors 416-443 on a diploid genome.

To the class of moderately repeated sequences of man can be attributed the family of numerous genes of variable regions of immunoglobulins, playing a key role in immunity. Moderate repeats are found in all chromosomes of man, where they are localized along the length of the arms.

Frequently repeated sequences occupy approximately ten-

percent of the genome. Regions of DNA with such repeats are revealed in certain places of chromosomes: this is pericentromeric and telomeric regions. On differentially stained chromosomes they are revealed in the form of heterochromatin. In fact this is heterochromatin constitutive — in it does not occur transcription. More than that, constitutive heterochromatin can affect the nearby located genes, suppressing their activity.

Frequent repeats are usually not long. So, telomeric regions of chromosomes of man, limiting chromosomes from both ends, contain 250-1500 repeats of TTAGG. These repeats play a very important role: they prevent the fusion of chromosome ends

цами и их укорачивание при многократных репликациях ДНК в связи с клеточными делениями. Часто повторяющиеся последовательности ДНК иначе называют сателлитной ДНК. Сателлитная ДНК не всегда имеет характер видового признака, как это видно на повторах теломерных районов. Однако у человека выделены и охарактеризованы индивидуальные сателлитные ДНК, расположенные в разных хромосомах. Так, известны несколько типов сателлитной ДНК из Y-хромосомы и 1-й, 9-й и 16-й хромосом. Функции сателлитной ДНК во многом остаются неизвестными. Предполагается, например, что сателлитная ДНК участвует в распознавании гомологичных хромосом во время конъюкации в мейозе, рассматривается также возможность регуляторного участия сателлитной ДНК в функционировании генов.

Пришедшие в генетику новые методы позволили расширить знания о структуре генетического материала. По современным данным, он оказался намного менее статичен, чем представлялось раньше. Так, например, известны описанные Барбарой Мак-Клинтон мобильные контролирующие генетические элементы в геноме кукурузы, способные перемещаться с одного гена на другой, увеличивая их нестабильность. Соматическими мутациями, связанными с присутствием мобильных контролирующих элементов, обусловлена мозаичная окраска початков у кукурузы. Найдены мобильные генетические элементы и у дрожжей. Позже было выявлено несколько классов мобильных генетических элементов у бактерий и показано, что они могут встраиваться во многие участки генома клетки хозяина. В зависимости от структуры мобильного генетическо-

го элемента внедрение бывает строго специфичным или случайным. Установлено, что при внедрении мобильного элемента встраивается не он сам, а его копия, в то время как исходный элемент остается на своем месте. Встраивание мобильного элемента в структурный ген приводит к мутации. Кроме того, перемещение мобильных элементов может стимулировать хромосомные aberrации. Для выявленных у дрозофилы мобильных генетических элементов показано, что они могут образовываться из рассеянных по геному генных элементов, из повторяющихся последовательностей конститутивного гетерохроматина прицентромерных районов хромосом, а также иметь вирусную природу. Все мобильные элементы обладают некоторыми общими чертами структурной организации — в частности инвертированными повторами на концах. Их репликация независима. Кроме того, они способны вызывать мутации с высокой частотой, причем мутации нестабильные, часто ревертирующие к исходному состоянию. Существуют предположения, что перенос генов мобильными элементами является одним из факторов эволюции. Например, последовательности ДНК, гомологичные глобиновому гену человека, были обнаружены у бобовых растений. Функция такой структуры может заключаться в обеспечении кислородом клубеньковых бактерий. А наличие такого гена в растениях может быть объяснено переносом его от насекомых или млекопитающих. Следует, однако, заметить, что у человека подобные элементы в геноме еще не выявлены. Тем не менее в геноме человека обнаружены повторяющиеся последовательности, содержащие палиндромы с инвертированными повторами, которые по

аналогии напоминают мобильные элементы. Первым этапом в транспозиции некоторой последовательности ДНК должно быть образование внехромосомных кольцевых копий этого участка. Подобные кольцевые структуры обнаружены в стареющих фибробластах в клеточных культурах человека. Кроме того для генома человека описано явление конверсии глобиновых генов, когда один аллель модифицируется другим, в результате чего гетерозигота становится гомозиготой.

Новые данные углубляют понимание структурной организации генетического материала и механизмов его работы. Однако по-прежнему верным остается постулат о стабильности генетического аппарата, на котором основаны все закономерности наследования признаков. Благодаря стабильности генома, существует наследственность, обеспечивающая преемственность фенотипических признаков из поколения в поколение.

Хромосомы человека

История развития цитогенетики человека

Впервые митотические хромосомы человека были описаны в работах Дж. Арнольда (1879) и В. Флемминга (1882). В последующие годы различные оценки их количества давали результаты от 47 до 49 хромосом, причем у мужчин и женщин находили разное их число. Эти первые исследования проводились на гистологических срезах тестикул или яичников. В то время техника получения срезов была такова, что митозы в готовых препаратах были, как правило, разрушены. Хромосомы на них накладывались одна на другую, образовывали клубки и плохо поддавались анализу. Эти трудности

удалось преодолеть только к 50-м гг. XX в., когда для получения препаратов хромосом стали использовать суспензии клеток, выращенных в клеточных культурах. Так, первые препараты хромосом человека с хорошим разрешением были получены на клетках фибробластов эмбриона легкого, выращенных *in vitro*. Суспензии клеток промывали гипотоническим раствором, в результате чего клетки набухали и лопались, а хромосомы свободно распределялись на стекле. Позже этот способ был усовершенствован. Перед гипотоническим шоком на клетки воздействовали колхицином — веществом, которое, разрушая нити веретена деления, останавливает митоз на стадии метафазы, когда хромосомы наиболее легко идентифицировать. Это позволило получить большое число клеток в метафазе митоза, и препараты, приготовленные таким образом были более удобны для подсчета хромосом. Пользуясь подобным методическим подходом, в 1955 году А. Леван и Дж. Тио, изучив 261 метафазную пластинку, пришли к выводу, что количество хромосом в клетках человека равно 46, причем как в мужских, так и в женских клетках. Годом позже и другие исследователи на препаратах тестикул трех пожилых мужчин на стадии метафазы мейоза 1 нашли 23 бивалента, что соответствует 46 хромосомам в диплоидном наборе. Эти результаты ознаменовали возникновение новой отрасли исследований — клинической цитогенетики. В настоящее время цитогенетика человека достигла высокого уровня и находится на переднем крае фундаментальной цитогенетики.

Нормальный кариотип человека

Препараты хромосом человека можно приготовить из любых тканей и

клеточных суспензий, но лишь, если в них содержатся делящиеся клетки, т. е. вне деления (во время интерфазы) хромосомы деспирализуются и переходят в состояние хроматина. Чаще всего препараты готовят из клеток костного мозга, кратковременной культуры клеток крови или из перевиваемой культуры фибробластов. Наиболее прост и доступен метод культивирования клеток крови лейкоцитов и лимфоцитов. Митозы в таких культурах стимулируют искусственно. Чтобы остановить жизненный цикл клеток в прометафазе, в них подавляют образование веретна деления, обрабатывая веществами с колхициноподобными свойствами. Для свободного распределения хромосом на стекле клетки обрабатывают гипотоническим раствором, вызывая гипотонический шок. Затем препарат фиксируют смесью этанола и уксусной кислоты, высушивают и окрашивают. Когда с помощью стандартных методов хромосомы окрашиваются целиком, равномерно и интенсивно, их систематизируют согласно Денверской классификации, принятой в 1960 г., нумеруя пары хромосом от 1 до 23.

В кариотипе человека различают метацентрические, субметацентрические и акроцентрические хромосомы. Учитывая относительную длину плечей, положение центромеры и центромерный индекс, который отражает процентное соотношение длин короткого плеча и всей хромосомы, 23 пары хромосом человека разбивают на 7 групп (рис. 3.13). В группу А (№№ 1-3) входят пары наиболее крупных метацентрических аутосом. Группа В (№№ 4-5) объединяет две пары субметацентрических хромосом, неразличимых между собой. Группа С (№№ 6-12) содержит семь пар аутосом средне-

го размера. Размеры и форма этих хромосом неодинаковы, однако стандартные методы окрашивания не позволяют их идентифицировать. В группу D (№№ 13-15) объединены три пары акроцентрических хромосом среднего размера, морфологически сходных между собой. Все хромосомы группы D содержат спутник, который не всегда выявляется, может быть очень большим, а иногда и двойным. Длина короткого плеча этих хромосом также изменчива. К группе E (№№ 16-18) относятся три пары почти метацентрических хромосом, из которых в 16-й паре центромера наиболее близка к середине, а две другие пары неотличимы друг от друга. Группа F содержит мелкие метацентрические аутосомы (№№ 19-20), группа G — мелкие акроцентрические (№№ 21-22). Внутри группы F и G пары хромосом неразличимы. Длина коротких плечей у них изменчива, как и у хромосом группы D. Короткие плечи хромосом групп D и G содержат районы ядрышкового организатора. Перечисленные 22 пары хромосом относятся к аутосомам, одинаковым у мужчин и женщин.

Половые хромосомы составляют 23-ю пару. У женщин — это две X-хромосомы. У мужчин — X- и Y-хромосомы. Половая X-хромосома неотличима от аутосом группы С. При стандартном окрашивании она включается в состав этой группы: №№ 6-12 и X. Мужская половая Y-хромосома является акроцентрической, сходна по морфологии с хромосомами группы G, но ее легко отличить по морфологическим критериям. Длина короткого плеча Y-хромосомы изменчива и индивидуальна, причем варианты длины плеча наследуются от отца к сыну. Y-хромосома, в отличие от хромосом последней группы, не имеет спутников. В ин-

терфазных ядрах концевой участок длинного плеча Y-хромосомы можно выявить в составе хроматина, пользуясь специфическим окрашиванием акрихин-ипритом: в результате этот участок выявляется как яркое пятно диаметром 0,3-1,0 мкм,

Во многих хромосомах человека обнаружены ломкие (фрагильные) участки, подверженные хромосомным и хроматидным разрывам. Такие разрывы легко получить в клеточных культурах, удаляя фолиевую кислоту из питательной среды культивируемых клеток. В настоящее время показано, что одна из форм умственной отсталости человека связана с наличием определенного фрагильного участка в концевом районе длинного плеча X-хромосомы.

Длина одной и той же хромосомы в разных фазах митоза различна, поскольку конденсация хромосом продолжается до конца метафазы. Кроме того их конденсация значительно усиливается в присутствии применяемого для приготовления препаратов колхицина.

Анализ препаратов хромосом человека показал, что в ряде случаев, как уже говорилось выше, на некоторых хромосомах могут существовать вторичные перетяжки. Спутничными перетяжками обладают все акроцентрические хромосомы (пары №№ 13, 14, 15, 21, 22). Вторичная перетяжка бывает также в аутосомах пары № 9. В них она располагается в околоцентромерном районе длинного плеча.

Дифференциальное окрашивание хромосом

Современные цитогенетические методики позволяют идентифицировать по морфологии все пары хромосом на препарате, а в ряде случаев и хромосо-

мы внутри одной пары. Суть этих методов состоит в дифференциальном окрашивании нативных хромосом по длине, что обеспечивается сравнительно простыми температурно-солевыми воздействиями на фиксированные хромосомы или использованием специфических красителей (рис. 3.19). Дифференциальное окрашивание приводит к появлению линейного рисунка по длине хромосомы.

Несмотря на большое разнообразие способов обработки хромосомных препаратов и красителей, выявляемый линейный рисунок хромосомы всегда один и тот же. Он меняется только в зависимости от степени конденсированности хромосомы. Сегмент, видимый как одна полоса в метафазной хромосоме, в менее конденсированной прометафазной хромосоме, может предстать в виде нескольких мелких полос.

Дифференциальное окрашивание в зависимости от используемого метода может охватывать либо всю длину хромосомы, либо ее центромерный район.

Представление о рисунке дифференциально окрашенных по всей длине хромосом можно получить, окрашивая препараты по G-методу с использованием красителя Гимзы. В этом случае хромосомы выглядят состоящими из поперечноисчерченных, по-разному окрашенных сегментов. Каждой паре хромосом присущ индивидуальный рисунок исчерченности за счет неодинаковых размеров сегментов. В мелких хромосомах рисунок образуется единичными сегментами, в крупных хромосомах сегментов много. Общее для нормального хромосомного набора число окрашенных и неокрашенных сегментов в метафазе составляет около 400. В прометафазных хромосомах оно увеличивается до 850 и более.

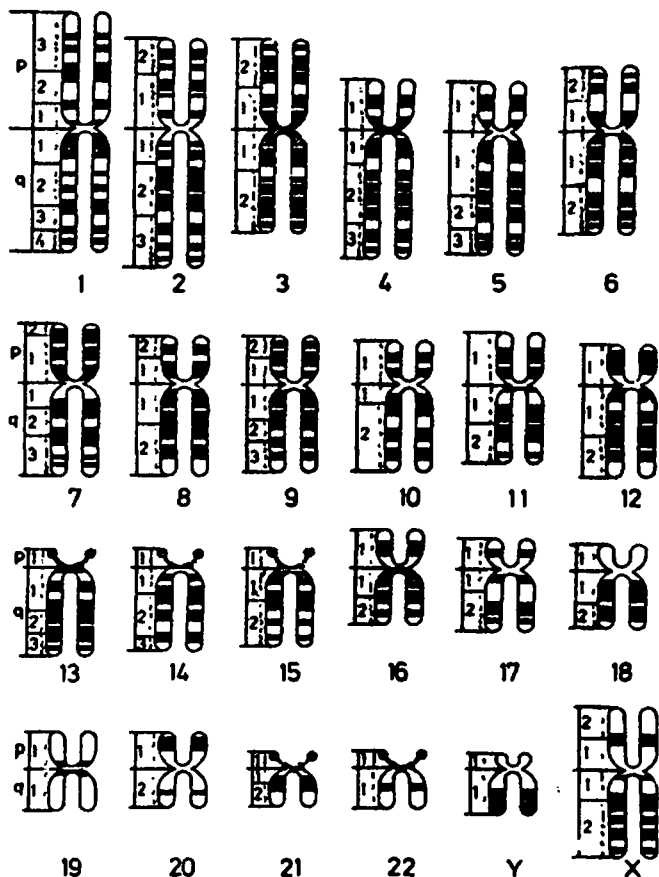


Рис. 3.19. Рисунок сегментации дифференциально окрашенных хромосом в соответствии с Парижской номенклатурой (G-, Q- и R-сегменты). G и Q-сегменты неокрашены, R-сегменты – черные, переменные районы заштрихованы

Разные типы сегментов получили обозначения G-, Q-, R-, C-, и T по названиям методов, с помощью которых они выявляются. Так, для G-сегментов это метод Гимза после предварительной обработки фиксированных хромосом. Q-сегменты после окрашивания акрихин-ипритом приобретают яркое флуоресцирующее свечение. Рисунок Q и G-сегментов полностью идентичен. R-сегменты расположены между Q-сегментами.

Место нахождения C-сегментов можно обнаружить с использованием других методов окрашивания. Эти сегменты связаны с локализацией конститутивного, или структурного гетерохроматина. В разных хромосомах размер C-сегментов неодинаков. Гетерохроматин, обнаруженный по методу C-окраски, содержится во всех хромосомах человека. Он находится в околоцентромерных районах всех хромосом, а также в дистальной части длинного

плеча Y-хромосомы, на длинных плечах 1-й, 9-й и 16-й пар хромосом. Небольшие блоки структурного гетерохроматина выявляются в плечах 2-й пары и X-хромосом. В акроцентрических хромосомах гетерохроматин С-сегментов расположен в коротких плечах. Накопленные сведения говорят, что в разных популяциях человека размеры сегментов гетерохроматина значительно различаются. Морфологические особенности сегментов наследуются по законам Менделя (рис. 3.20). Особенно изменчива величина С-сегментов в аутосомах №№ 1, 4, 9, 13-15, 16, 21-22 и Y-хромосоме. Поскольку у большинства носителей таких особенностей кариотипа отсутствуют фенотипические аномалии, то подобные особенности в строении хромосом можно рассматривать как варианты нормы. Согласно данным общей цитогенетики, значительное количественное изменение гетерохроматина в кариотипе не оказывает сильного отрицательного влияния на развитие организма человека.

Еще один тип сегментов — Т — выявляется также с помощью специфических методов окрашивания и присутствует в теломерных районах всех хромосом.

В метафазе митоза может быть выявлена еще одна характеристика линейной неоднородности хромосом. Она связана с асинхронностью репликации ДНК в их разных участках. Такой тип окрашивания разбирается подробно в главе 4 в разделе, посвященном клеточному циклу.

Индивидуальная совокупность сегментов, различающихся по ширине и интенсивности окрашивания, образует цитологическую карту каждой хромосомы. Основанные на дифференциальном окрашивании хромосом цитологи-



Рис. 3.20. Наследование хромосомы, содержащей особенно большой блок конститутивного гетерохроматина (С-сегмент), от отца к дочери

ческие карты имеют исключительное значение для развития цитогенетики человека. С помощью этих карт стало реальным выяснить происхождение аномальных хромосом, вплоть до точного описания, какие конкретно районы вовлекаются в ту или иную форму хромосомного нарушения. На международных совещаниях по номенклатуре в цитогенетике человека была разработана и введена в практику система обозначения сегментов нормальных хромосом и хромосом, подвергшихся тем или иным структурным перестройкам.

Дальнейшее совершенствование методов окрашивания хромосом позволило выявить до 1000 полос на всех 23-х хромосомах человека, характерных для гаплоидного набора. В среднем на хромосому при этом приходится 50 полос, хотя на некоторых хромосомах их можно обнаружить в несколько раз больше, чем на других. Гаплоидный геном человека состоит из 3×10^9 пар нуклеотидов, соответственно каждая полоса содержит в среднем 3×10^6 пар нуклеотидов, что соответствует нескольким сотням генов.

Половой гетерохроматин

В соматических клетках женщин половой хроматин выявляется в виде гетерохроматина — небольшой хорошо окрашенной округлой структуры, раз-



Рис. 3.21. Микрофотография. Половой гетерохроматин в ядрах клеток слизистой полости рта женщин (а, б)

мером 0,8-1,1 мкм, находящейся возле ядерной мембраны (рис. 3.21). Половой хроматин называют также тельцем Барра, т. к. впервые он был описан этим ученым в нейронах кошки. Позже оказалось, что половой гетерохроматин присутствует в соматических клетках всех млекопитающих женского пола, в том числе и человека. Гомологичные половому хроматину структуры, так называемые “барабанные палочки” были обнаружены в ядрах полиморфноядерных лейкоцитов. Половой гетерохроматин — это одна из X-хромосом, которая находится в неактивном, суперспирализованном состоянии. Известно, что фенотипически пол у человека определяется наличием или отсутствием Y-хромосомы, а не количеством X-хромосом. Если в кариотипе зиготы присутствует хотя бы одна Y-хромосома, а количество X-хромосом превышает единицу, то по

фенотипу формируется мужчина. Количество телец Барра в клетках всегда на одно меньше, чем число X-хромосом. То есть только одна X-хромосома в соматических клетках человека, и мужчины, и женщины, всегда находится в активном состоянии. В норме женщина имеет две, а мужчина одну X-хромосому, в связи с чем инактивация второй X-хромосомы у женщин в виде полового гетерохроматина служит механизмом компенсации различий в дозе генов, не оказывающих влияния на развитие половых признаков и признаков, сцепленных с X-хромосомой. Этот же механизм оказался фактором, благоприятствующим носителям X-хромосомных анеуплоидий. Какое бы количество X-хромосом они не несли, генетически активна только одна. Остальные же X-хромосомы существуют в виде факультативного полового гетерохроматина. Поэтому по ко-

личеству телец Барра в соматических клетках можно диагностировать форму анеуплоидий. Например, у женщин с кариотипом 47, XXX обнаруживаются два тельца Барра, а с кариотипом 45, X0 — ни одного. У мужчин с кариотипом XXY — одно.

Образование полового хроматина из X-хромосомы происходит на ранних стадиях эмбрионального развития. Дробящаяся “женская” зигота млекопитающих имеет две функционально активные X-хромосомы. У человека половой хроматин появляется на стадии развития зародыша в несколько сотен клеток. В трофобласте X-хроматин выявлен на 12-й день развития, а в собственно эмбрионе — на 16-й день. Половой хроматин образуется сразу во всех клетках эмбриона. В настоящее время наиболее приемлемой является гипотеза, согласно которой в разных клетках одного организма могут быть инактивированы разные X-хромосомы: в одних — отцовская, в других — материнская. То есть по X-хромосоме женщины мозаичны. Это положение можно рассмотреть на примере активности фермента глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (Г6ФД), ген которого находится в X-хромосоме. Женщины имеют два аллеля этого гена, а мужчины только один. Тем не менее средний уровень активности этого фермента сходен у представителей обоих полов, следовательно, должен действовать механизм дозовой компенсации. У гетерозиготных женщин с помощью электрофореза в разных клетках можно выявить два аллеля Г6ФД. В ряде работ на эритроцитах *in vivo* и на фибробластах соединительной ткани в клеточных культурах у женщин был выявлен мозаицизм по Г6ФД.

Тельца Барра присутствуют не во всех клетках женщины. Так, обе X-хро-

мосомы активны в ооцитах и в клетках женской половой системы.

Современные методы картирования хромосом

На рубеже 70-х гг. XX в. молекулярная генетика достигла определенной завершенности в своем развитии: были установлены структура и механизм репликации ДНК, провозглашена “центральная догма” экспрессии гена (транскрипция, трансляция), выяснены основные аспекты регуляции активности гена. Главным объектом исследования в то время служили микроорганизмы. Существовавшие в тот период методы не позволяли серьезно продвинуться в изучении строения геномов эукариот, в том числе и генома человека. Стремительный прорыв в молекулярной генетике в 70-е гг. стал возможен благодаря появлению новых экспериментальных подходов — использованию рестрикционных эндонуклеаз и становлению нового направления в молекулярной генетике — геной инженерии. С помощью этих методик были открыты совершенно неожиданные факты, имеющие теоретическое и практическое значение в областях знаний, связанных с действием генов. Это относится к генетическому консультированию, включая пренатальную диагностику, к развитию новых подходов в изучении проблем эволюции и популяционной генетики. Эти же успехи заставили ученых задуматься об этической стороне манипулирования с человеческим зародышем, об опасности возникновения возбудителей в процессе генно-инженерных исследований.

Принципы новых экспериментальных подходов должны быть понятны всем исследователям, однако детали молекулярно-генетических методов,



Рис. 3.22. Клетка *E. coli* с хромосомой и плазмидой

которые привели к внушительному прогрессу генетики человека, изложены в специальных изданиях. Ниже рассматриваются основные принципы этих методов, и в качестве примера описывается анализ β -глобинового генного кластера человека с использованием рестрикционных ферментов, гибридизации нуклеиновых кислот, секвенирования ДНК и сортировки хромосом с помощью цитофлуорометрии.

Анализ β -глобинового гена человека

Гемоглобин взрослого человека HbA_1 состоит из четырех полипептидных цепей: двух α и двух β . Кроме такого гемоглобина, у человека известны и другие типы этой сложной молекулы. Так, у эмбрионов функционирует фетальный гемоглобин, в состав которого входят γ -цепи, у взрослых людей в небольшом количестве обнаружива-

ется гемоглобин HbA_2 , в состав которого входят σ -цепи. β -глобиновый кластер генов в настоящее время полностью идентифицирован и проанализирован молекулярно-генетическими методами.

Этапы анализа.

В начале 60-х гг. был завершен аминокислотный анализ белка гемоглобина. Цепь β состоит из 146 аминокислот. Вся транскрибируемая часть гена должна содержать 438 нуклеотидов, т. к. генетический код триплетен ($146 \cdot 3 = 438$). Этот маленький участок нужно идентифицировать на одной из хромосом, в состав которой входит нить ДНК длиной несколько сантиметров. После того, как этот участок выявлен, его нужно выделить и накопить в большом количестве, чтобы определить последовательность нуклеотидов в составе анализируемого отрезка ДНК-молекулы.

Рестрикционные эндонуклеазы.

Рестрикция (разрезание) выделенной из клеток ДНК осуществляется ферментами — рестрикционными эндонуклеазами (рестриктазами). Эти ферменты вступают в реакцию с определенными участками ДНК, так называемыми сайтами узнавания, которые в клетке обычно бывают защищены специальными группировками (метилированы). После обработки ДНК эндонуклеазами фрагменты имеют так называемые “липкие концы”: рестриктазы разрезают две цепи ДНК не в одном месте, а в двух разных местах, в результате чего одна из цепей оказывается длиннее другой на несколько нуклеотидов. Свободные нуклеотиды могут спариваться с комплементарными нуклеотидами другого фрагмента ДНК с липкими концами. Благодаря этому, ДНК из различных источников может объединяться, образуя рекомбинантные молекулы. Это свойство рестрикционных фрагментов ДНК используется в геномной инженерии для создания искусственных векторов на основе бактериальных плазмид, или фагов.

Помимо своей собственной молекулы ДНК, замкнутой в кольцо, бактерии часто содержат дополнительные маленькие кольцевые двухцепочечные молекулы ДНК (рис. 3.22), называемые плазмидами. Плазмиды реплицируются автономно, независимо от основной молекулы ДНК. Они могут содержать некоторые гены, например, определяющие устойчивость бактерий к антибиотикам или контролирующие синтез некоторых веществ. Плазмидную ДНК можно выделить и расщепить подходящей рестриктазой только в одном месте, при этом кольцевая молекула превращается в линейную с липкими концами. Фрагменты чуже-

родной ДНК с такими же липкими концами, полученные после разрезания аналогичной рестриктазой, можно сшить с плазмидной ДНК с помощью специального фермента — лигазы. Полученную рекомбинантную молекулу, называемую вектором, можно ввести в бактерию, где она начнет многократно реплицироваться. Чужеродный фрагмент ДНК (им может быть и глобиновый ген) будет многократно амплифицирован вместе с плазмидой (рис. 3.23). Такая процедура называется клонированием генов и используется для создания банков генов. Этот методический подход позволяет разбить геном человека на отдельные фрагменты, каждый из которых может быть размножен вне организма человека. Еще одна область применения в молекулярной генетике рестриктаз — идентификация генов. Эти задачи решаются с помощью метода, разработанного Саузерном в 1975 г.

Суммарную ДНК из клеток человека гидролизуют эндонуклеазой примерно на 500 000 фрагментов длиной от 10^2 до 10^5 нуклеотидных пар. Затем фрагменты разделяют по молекулярной массе с помощью гель-электрофореза на пластинках в агарозе. Следующий этап — получение одноцепочечных фрагментов ДНК денатурацией щелочью прямо в геле. С агарозной пластинки получают реплику-отпечаток на нитроцеллюлозном фильтре. Перенесенные на фильтр одноцепочечные фрагменты ДНК можно идентифицировать путем гибридизации с радиоактивными ДНК-зондами. Любой фрагмент, содержащий последовательность зондируемого гена, выявляется в виде темной полосы на радиоавтографе (фильтре, покрытом фотоэмульсией и проявленном после взаимодействия с радиоактивным зондом).

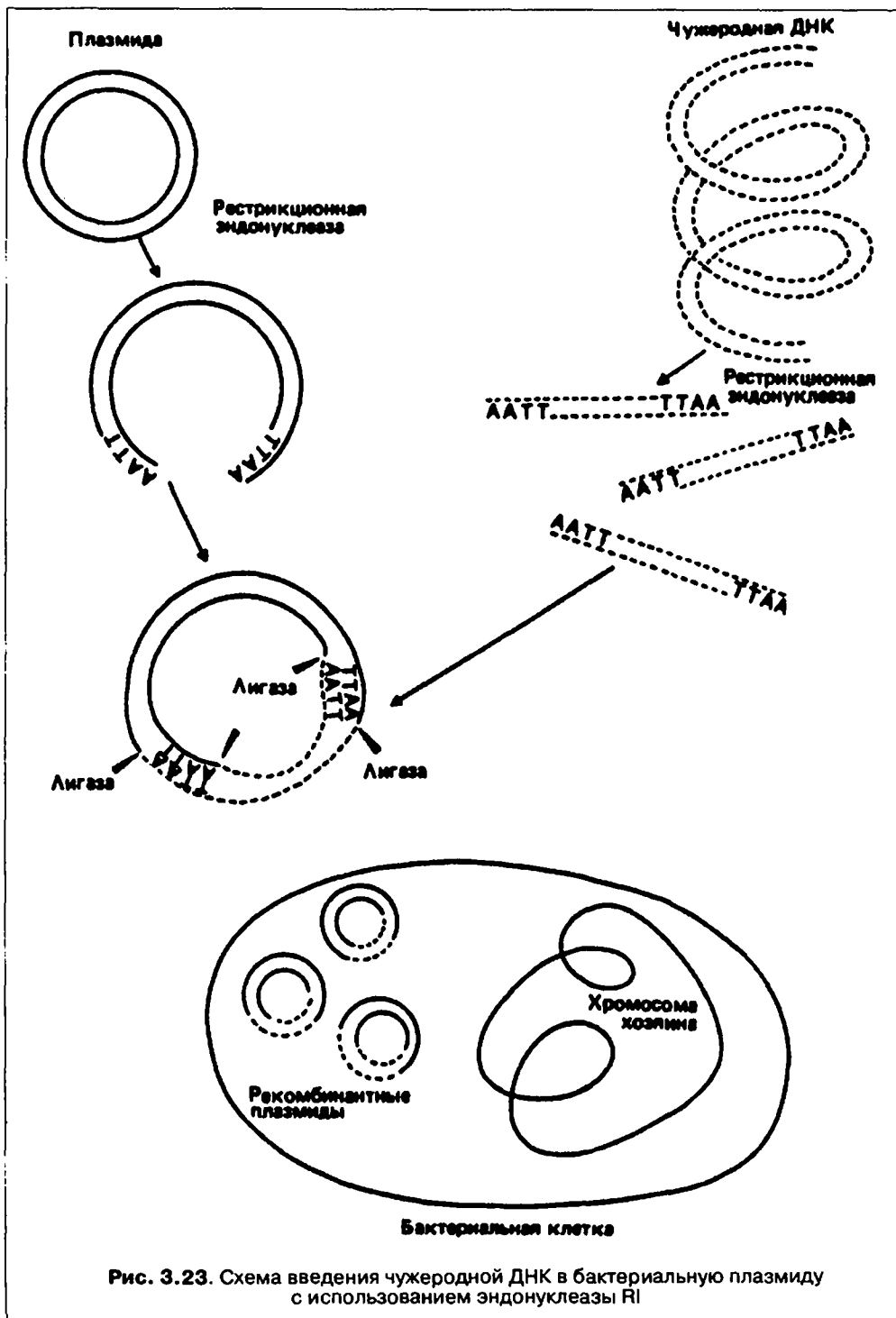


Рис. 3.23. Схема введения чужеродной ДНК в бактериальную плазмиду с использованием эндонуклеазы RI

Главное условие такого анализа — наличие подходящего радиоактивного ДНК-зонда.

Создание зонда для гена β -глобина связано с получением матричной РНК β -глобина из созревающих эритроцитов, где активно синтезируется гемоглобин. Затем с помощью фермента обратной транскриптазы, который обеспечивает считывание нуклеотидной последовательности м-РНК в комплементарную последовательность ДНК, получают так называемую к-ДНК с высокой радиоактивной меткой. В настоящее время созданы библиотеки к-ДНК из разных источников. Имеются геномные библиотеки человека, полученные генно-инженерными методами, а также хромосомно-специфические библиотеки, полученные из отдельных специфических хромосом или их участков. Создание таких библиотек требует выделения отдельных хромосом. В настоящее время это стало возможным благодаря сортировке хромосом цитофлуорометрическим методом. Для синтеза к-ДНК используются также автоматизированные устройства, в том случае, если производится синтез к-ДНК гена определенного белка, аминокислотная последовательность которого известна.

Гибридизация нуклеиновых кислот

Идентификация фрагментов одноцепочечной ДНК на нитроцеллюлозном фильтре происходит с помощью гибридизации цепей ДНК. Большинство природных ДНК встречается в виде двухцепочечных молекул, где азотистые основания двух цепей взаимодействуют по принципу комплементарности с помощью водородных связей. Водородные связи в условиях щелочного гидролиза разрываются, и на фильтре фиксируются одноцепочечные фраг-

менты. При добавлении к-ДНК, если комплементарны отдельные цепи, происходит восстановление двойной спирали (рис. 3.24). Для выявления реассоциированных молекул на фильтр наносят фотоэмульсию. Под действием излучения радиоактивных изотопов в составе к-ДНК, в фотоэмульсионном слое восстанавливаются зерна серебра, которые выглядят после проявления темными участками.

Метод гибридизации нуклеиновых кислот можно использовать на препарате хромосом после их соответствующей обработки. Так, исследуемый ген можно локализовать в специфическом хромосомном сегменте, одном из тех сегментов, которые наблюдаются при дифференциальном окрашивании. Поскольку эксперимент проводится с зондом к-ДНК, синтезированным на м-РНК, можно утверждать, что идентифицированный участок хромосомы содержит активный ген. Известно, что в геноме помимо активных генов, могут находиться псевдогены, такие последовательности ДНК, которые гомологичны активному гену, но не транскрибируются из-за отсутствия каких-то важных последовательностей вне транскрибируемой части.

Метод гибридизации нуклеиновых кислот позволил идентифицировать большое количество генов в хромосомах человека. В настоящее время достоверно картировано около 8000 генов человека. В большинстве случаев к идентифицированным генам найдены альтернативные аллельные формы. Для нескольких тысяч генов один из альтернативных аллелей определяет какое-либо наследственное заболевание или аномалии. Другие известные гены кодируют белки группы крови, различные антигены, иммуноглобулины, ферменты метаболизма и т.д.

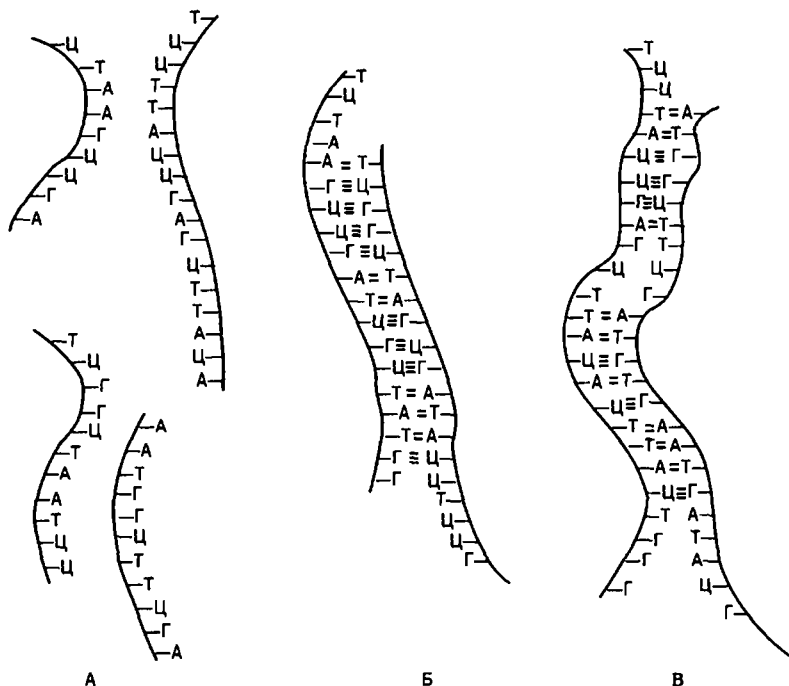


Рис. 3.24. Принцип РНК или ДНК гибридизации, А – нуклеотидные цепи в растворе. Б – гибридизация цепей в соответствии с правилами спаривания: тимин образует пару с аденином, цитозин с гуанином. В – гибридизация может происходить даже при неполной гомологии, важно, чтобы различия были не слишком велики

Секвенирование ДНК

В последние годы разработаны методы быстрого секвенирования ДНК. Для этого длинную молекулу ДНК с помощью рестриктаз разрезают на фрагменты удобного размера. Затем эти фрагменты размножают путем клонирования и специальными методами определяют последовательность нуклеотидов в каждом из фрагментов. Очередность фрагментов восстанавливают, используя перекрывающиеся концы (участки ДНК с одинаковой последовательностью в разных клонах). С помощью секвенирования получают точные сведения и о нетранскрибируемых участках ДНК, важных для контроля транскрипции.

Анализ β-глобинового гена.

Первый этап анализа связан с идентификацией этого гена в суммарной человеческой ДНК. Для этого ДНК выделяют из клеток, с помощью эндонуклеаз получают фрагменты, разделяют их в агарозе с помощью гель-электрофореза, денатурируют на две отдельные цепи и создают реплику с препарата на нитроцеллюлозном фильтре. Следующий шаг состоит в том, чтобы найти среди всех фрагментов β-глобиновый ген. Для этого необходим радиоактивный ДНК-зонд. Его синтезируют на β-глобиновой РНК с помощью обратной транскриптазы. Далее этот к-ДНК зонд используют для двух задач. Первое – идентифицировать фрагменты

ДНК, соответствующие глобиновому гену, прямо на фильтре. Задача вторая — идентифицировать на препарате хромосом место нахождения этого гена. Идентификация в обоих случаях происходит с помощью гибридизации радиоактивной к-ДНК с денатурированной ДНК препарата. Так, ген гемоглобина- β был локализован на коротком плече 11-й хромосомы.

Для более подробной характеристики глобинового гена необходимо получить большое количество его ДНК. Для этого клонируют к-ДНК в каком-нибудь векторе, например, в бактериальной плазмиде. Затем сравнивают фрагменты геномной ДНК, содержащие глобиновый ген, и клонированную к-ДНК, соответствующую м-РНК. Оказалось, что фрагменты геномной ДНК значительно больше, чем к-ДНК. В β -гемоглобиновом гене были выявлены две вставочные последовательности (интроны), которые разделяют три разные кодирующие области — экзоны. (Исследования многих других эукариотических генов, показали, что наличие интронов является правилом для большинства из них). Выяснилось также, что ген β -гемоглобина относится к уникальным последовательностям. Кроме того, были найдены псевдогены, имеющие мутации в кодирующих и фланкирующих, регуляторных участках. Они называются псевдогенами, т.к. с них не идет транскрипция.

Сейчас известны последовательности ДНК различных глобиновых генов. Их изучение позволило решить много общих проблем, касающихся организации и экспрессии генетического материала в клетке.

Полимеразная цепная реакция

В середине 80-х гг. в молекулярной генетике был введен в практику совер-

шенно новый метод, позволяющий очень быстро размножить следовые количества молекул ДНК или РНК. Чувствительность его такова, что позволяет обнаружить в пробе всего одну присутствующую в ней молекулу. Открытие этого метода позволило многократно ускорить исследования по картированию генома человека.

Полимеразная цепная реакция была открыта в 1984 г. К.Б. Мюллисом. Она основана на том, что новосинтезируемые цепи нуклеиновых кислот могут служить матрицами в следующих циклах репликации. Реакция осуществляется последовательными циклами. Каждый из них начинается с разделения двуспиральной молекулы ДНК на две одноцепочечные. В таком состоянии каждая цепочка может служить матрицей для репликации. Затем одноцепочечные нити ДНК инкубируют в присутствии ДНК-полимеразы в растворе со смесью всех четырех нуклеотидов и специфической последовательностью ДНК — праймером. Присоединение праймера к одноцепочечной нити ДНК приводит к образованию небольшого двуцепочечного отрезка, который удлиняется с помощью ДНК-полимеразы. Процедуры многократно повторяются, происходит множественное копирование старых и новых одноцепочечных молекул. Отдельный цикл занимает около 5 мин., клонирование одного фрагмента ДНК происходит всего в течение нескольких часов.

Помимо молекулярной генетики, метод полимеразной цепной реакции широко используется в практических исследованиях: пренатальной диагностике наследственных болезней, выявлении вирусных инфекций, а также в судебной медицине, поскольку этот метод позволяет проводить генетичес-

кую “дактилоскопию” по одной единственной клетке.

Программа “Геном человека”

С развитием новых технологий молекулярных исследований, основанных на быстрых методах работы с ДНК (клонировании фрагментов ДНК генноинженерными способами и с помощью полимеразной реакции, автоматизированном секвенировании), с введением в практику молекулярногенетических исследований компьютерных технологий сравнительного анализа строения геномов представителей разных систематических групп, с развитием техники направленного воздействия на генетический аппарат клетки и организма в целом и возможности создания искусственных ферментов по нуклеотидной последовательности фрагмента ДНК темпы развития молекулярной генетики обрели стремительный характер и привели к возникновению в конце 80-х гг. международной программы “Геном человека”. Этот глобальный проект предполагает к 2005 г. завершить определение полной последовательности всех трех миллиардов нуклеотидных звеньев, составляющих геном человека. Принятие такой программы означает, что характер развития молекулярной биологии достиг совершенно нового уровня. Произошедший качественный скачок в технологии позволяет решать принципиально новые задачи.

Более ранние молекулярногенетические работы проводились с целью исследовать строение генов, идентифицировать их в целом геноме, изучить по возможности функцию гена и уровни его регуляции. Методы современной молекулярной генетики позволяют отследить эффект действия того или иного гена на уровне целого орга-

низма, изучать не отдельные гены, а структуры и функции целых геномов. На сегодняшний день изучены: геномы 141 вируса, более 50 геномов митохондрий из разных объектов, большое количество геномов бактерий. Установлено, что бактериальный геном содержит 5-6 тыс. генов, из представителей эукариот наиболее близки к завершению изучение геномов дрожжей и нематод. Показано, что геном дрожжей имеет в своем составе около 6 тыс. генов.

Суммарная длина нуклеотидных последовательностей генома человека соответствует 3 миллиардам. По данным разных авторов, такая гигантская нуклеотидная последовательность может содержать от 50 до 100 тыс. генов. В настоящее время известна структура около 7 тыс. генов. Изучение структуры генов — не конечная цель программы. Помимо анализа последовательности нуклеотидов, проводится их картирование. Каждый ген приписывается к определенной хромосоме в строго определенное место — локус, устанавливается расстояние между генами, составляется карта хромосом человека. В настоящее время картированы около 8 тыс. генов. Увеличению скорости картирования генов на хромосомах способствует выявление маркерных последовательностей для каждой хромосомы. Эти маркерные последовательности много раз повторяются вдоль хромосомы и как бы делят ее на ограниченные участки. Работа с таким небольшим участком хромосомы облегчает процедуру выделения гена. Благодаря существованию маркерных последовательностей, геном человека разбит на отдельные фрагменты, и каждый фрагмент в случае необходимости может быть легко размножен вне организма.

Помимо задачи картирования генов и установления их структуры, программа "Геном человека" ставит цель определить структурно-функциональную взаимосвязь генов. Для решения этой задачи используются совершенно новые подходы, которые просто невозможно было представить себе несколько лет назад. Так, по дефектному ферменту, который является причиной наследственного заболевания, зная последовательность аминокислот в его составе, можно искусственно синтезировать информационную РНК, а затем соответствующий участок ДНК, идентифицировать его на хромосомной карте, выделить нативный ген и клонировать его вне организма, чтобы установить, в чем причина образования дефектного фермента. Таким способом были изучены гены дистрофии Дюшенна, рака молочной железы, мутантной фенилаланингидроксилазы, являющейся причиной наследственной фенилкетонурии, и ряда других генов.

Еще один новый методический подход в изучении функции генов связан с использованием информационно-компьютерных технологий. Этот путь исследований основан на следующем предположении: если у представителей разных систематических групп имеются одинаковые по структуре гены, то они выполняют одинаковую функцию. Таким образом была установлена причина развития рака толстой кишки у человека. Методами клонирования и картирования была изучена структура генов, отвечающих за развитие рака толстой кишки. Затем был проведен поиск в информационном поле с помощью компьютерных технологий. В процессе этого поиска была предпринята попытка найти в геноме дрожжей, который уже полностью расшифрован, гены, сходные по

структуре с исследуемыми генами человека. И они были обнаружены. Оказалось, что у дрожжей такие же гены отвечают за репарацию ДНК. Таким образом, было установлено, что рак толстой кишки связан с мутациями генов, кодирующих ферменты репарации ДНК.

Важнейшую роль в структурных исследованиях генома человека играет изучение его полиморфизма. Популяционный полиморфизм генома человека является основой для понимания принципов молекулярной эволюции, механизмов возникновения патологических мутаций, для оценки факторов риска при воздействии потенциально токсических агентов окружающей среды на человеческий организм, наконец, для понимания основ различной индивидуальной восприимчивости лекарств. Эти исследования получили новый импульс с открытием полиморфных мини- и макросателлитных последовательностей ДНК, которые используют в качестве маркеров при картировании генома человека.

Новым этапом в изучении структурно-функциональных связей между генами в программе "Геном человека" является возможность клонирования крупных фрагментов генома в специальных векторах, способных размножаться в клетках вместе со встроенными в них фрагментами. В качестве вектора в таких случаях используют искусственные дрожжевые хромосомы, появление которых стало возможным благодаря развитию генетики дрожжей. Использование таких векторов позволяет клонировать фрагменты ДНК длиной до 10^6 пар оснований. Это создает предпосылки для быстрого выделения нужного фрагмента генома и использования его для структурного или функционального анализа.

Использование новых методов в изучении генетики человека позволяет значительно ускорить процесс исследовательской работы и накопить информацию о генах, играющих ключевую роль в регуляции жизнедеятельности клетки. К таким генам относятся гены контроля клеточного цикла, гены, кодирующие компоненты цепи передачи сигнала от клеточной поверхности к аппарату транскрипции в ядре, гены, контролирующие развитие эмбрионов, гены, ответственные за работу защитных систем организма, гены иммунной системы. Активно расширяется представление о генах, повреждение которых приводит к возникновению раковых опухолей, онкогенах, генах-супрессорах, генах клеточной смерти и апоптоза (программируемой гибели клеток). Все более детальным становится знание надмолекулярных уровней организации регуляции экспрессии генов.

Выполнение программы "Геном человека" приближает возможность использования генной терапии для лечения патологий, связанных с изменением наследственной информации. Генная терапия основана на введении в организм больного искусственных генетических конструкций. Лечебный эффект достигается в результате работы введенного гена либо за счет подавления функции "больного" гена. Современная генная терапия делает первые шаги и имеет дело с соматическими клетками в постнатальном периоде жизни человека, но в то же время разрабатываются подходы к генной терапии клеток эмбриона.

Для создания генетических конструкций большей частью используются вирусы. При этом из генома вируса вырезается часть генов, ответственных за формирование инфекционных ви-

русных частиц и разрушение инфицированных клеток. Гены, необходимые для переноса и функционирования генетической информации, сохраняются. К ним добавляются клонированные гены, оказывающие лечебный эффект. Одними из наиболее приемлемых для генной терапии окажутся, видимо, аденовирусные векторы, поскольку аденовирусы не встраиваются в геном клетки хозяина, имеют широкий спектр поражения тканей человека и не индуцируют злокачественный рост.

В настоящее время разрабатываются способы для целевой доставки искусственных векторов к тем или иным органам. Для этого используют локальные инъекции, аэрозольный метод, баллистический метод, основанный на обстреле ткани микрочастицами тяжелых металлов (золота, вольфрама), покрытых векторной ДНК.

Результаты генной терапии можно рассмотреть на конкретном примере. У мальчика, больного гемофилией из-за дефицита девятого фактора свертывания крови, с помощью биопсии были выделены фибробласты кожи и культивированы в клеточной культуре. В эти клетки был введен искусственный вектор, созданный на основе ретровируса и содержащий гены, которые увеличивают активность девятого фактора. Инфицированные клетки были размножены в клеточной культуре и возвращены в организм мальчика подкожно в районе спины и ягодиц. Клетки прижились, в результате была увеличена активность девятого фактора свертывания крови, и симптомы гемофилии у пациента были сглажены. Таким образом, генно-инженерные работы создают подходы к лечению гемофилии человека.

Генная терапия — направление, появившееся на стыке двух наук: биоло-

Программа "Геном человека"

гии и медицины, пока имеет скромные практические успехи, но с этим направлением связано развитие медицины XXI-го столетия.

Перспектива использования достижений программы "Геном человека" многопланова: от идентификации генов, ответственных за возникновение наследственных и приобретенных заболеваний, до развития систем лечения, основанных на введении в организм новой генетической информации, корректирующей генетические дефекты (генная терапия), и интенсивных методов диагностики, основанных на выявлении генетических дефектов, и перехода в диагностике к наиболее полному обследованию популяций для выявления предрасположенности к болезни.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие особенности строения ДНК позволяют этим молекулам кодировать наследственную информацию, самоудваиваться и мутировать?
2. В чем значение упаковки ДНК в хроматине и хромосомах?
3. Чем гены отличаются от псевдогенов?
4. Сформулируйте понятия: гомологичные и половые хромосомы, аутосомы.
5. Укажите практическое значение выявления полового хроматина.
6. Перечислите современные методы картирования хромосом. Поясните значение каждого метода.
7. В чем преимущество полимеразной цепной реакции?
8. Назовите новые подходы в изучении структурно-функциональных связей между генами в программе "Геном человека". В чем их практическое значение?

Глава 4. ПЕРЕДАЧА ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Материальной основой биологической преемственности поколений у человека является процесс оплодотворения: слияние гамет — яйцеклетки и сперматозоида — с образованием зиготы. Каждая из гамет приносит равное количество хромосом. Если число хромосом в гамете обозначить буквой n (гаплоидный набор), то число хромосом в зиготе будет равно $2n$ (диплоидный набор). Образовавшаяся зигота многократно делится митозом и дает начало новому организму. В результате каждого митотического деления из одной клетки образуются две дочерние. Число хромосом в них идентично их числу в родительской клетке, равно как и качественный набор генетического материала. Образование гамет у человека, как и у других многоклеточных эукариотических организмов, связано с мейотическим делением. В результате этого деления количество хромосом в половых клетках уменьшается в 2 раза и становится гаплоидным (n). Равные по числу хромосом, образовавшиеся гаметы отличаются друг от друга по качеству генетического материала в результате двух видов генетической рекомбинации: независимого распределения гомологичных хромосом к полюсам деления и обмена участками между гомологичными хромосомами в процессе кроссинговера.

Рассмотрим процессы, лежащие в основе передачи генетического материала, с учетом особенностей их протекания у человека.

Митоз. Клеточный цикл

Общепризнано, что митоз — это самый древний способ клеточного раз-

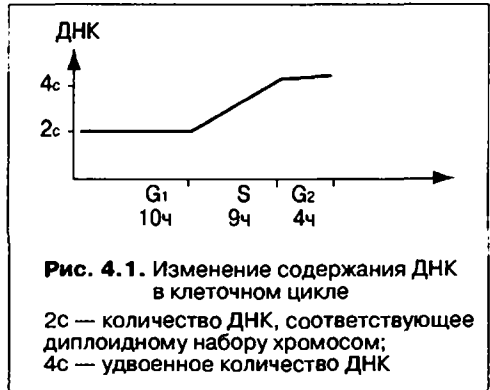
множения, а все остальные формы деления возникли в процессе эволюции как его регуляторные или патологические изменения. В основе этого взгляда лежит представление о митозе как надежном способе распределения наследственного материала между дочерними клетками. Характерной чертой митоза является авторегуляция, проявляющаяся в цикличности протекания событий, связанных с подготовкой клеток к митозу и самим процессом деления. Эта цикличность послужила основанием для возникновения понятия о митотическом цикле.

Известно, что делящаяся клетка, а вместе с ней и ядро, могут находиться в двух состояниях: в митозе (деление) и интерфазе (состояние между двумя митозами). Во время митоза наследственная информация, упакованная в хромосомах, поровну распределяется между дочерними клетками. В интерфазе, когда геном находится в “рабочем состоянии”, наследственная информация реализуется. При этом хромосомы переходят в состояние хроматина. Суперспирализованная с помощью специальных белков ДНК, частично раскручивается, сохраняя структуру двойной спирали.

На молекулах ДНК как на матрицах, по принципу комплементарности, синтезируются все три типа молекул РНК: информационная, транспортная и рибосомная. Новосинтезированные молекулы РНК в комплексе с белками созревают и покидают ядро, попадая в цитоплазму, где с их участием происходит синтез белков.

Интерфаза подразделяется на три периода: G_1 , S и G_2 . В период G_1 дочерние клетки вступают после митоза. Количество хромосом в них диплоидное, каждая хромосома состоит из одной хроматиды. Соответственно у человека количество двуспиральных молекул ДНК равно 46, по одной нитевидной молекуле на хромосому, перешедшую в состояние хроматина. Объем же клеток, общее содержание органелл, белков и РНК вдвое меньше, чем в исходной родительской клетке. В это время начинается рост клеток за счет накопления клеточных белков, мембранных структур и органелл. Продолжительность периода G_1 непостоянна, и, в отличие от других фаз клеточного цикла, может изменяться от нулевых значений до многих часов, (в некоторых случаях даже месяцев) в зависимости от сроков эмбрио- и онтогенеза, от особенностей ткани и ряда других факторов.

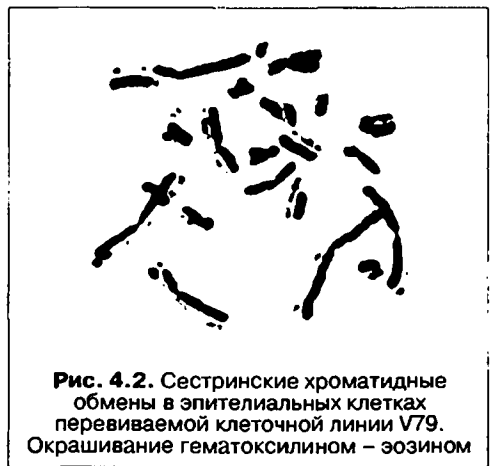
В S-периоде удваивается ДНК каждой хроматиновой нити, при этом общее количество ДНК возрастает в 2 раза (рис. 4.1). В клетках человека, как и в эукариотических клетках других организмов, репликация ДНК происходит одновременно на множестве отдельных участков вдоль каждой хромосомы с последующим соединением концов, образовавшихся соседних отрезков. За счет того, что репликация происходит в сотнях точек, сокращается время, необходимое для удвоения молекул ДНК, длина которых у человека измеряется в сантиметрах. По данным разных авторов продолжительность S-периода у млекопитающих варьирует в пределах от 7 до 9 ч. Во время и после репликации сестринские хроматиды могут обмениваться сегментами: идет процесс сестринских хроматидных обменов. Так что обе хроматиды митотической хромосомы содержат участки другой хро-

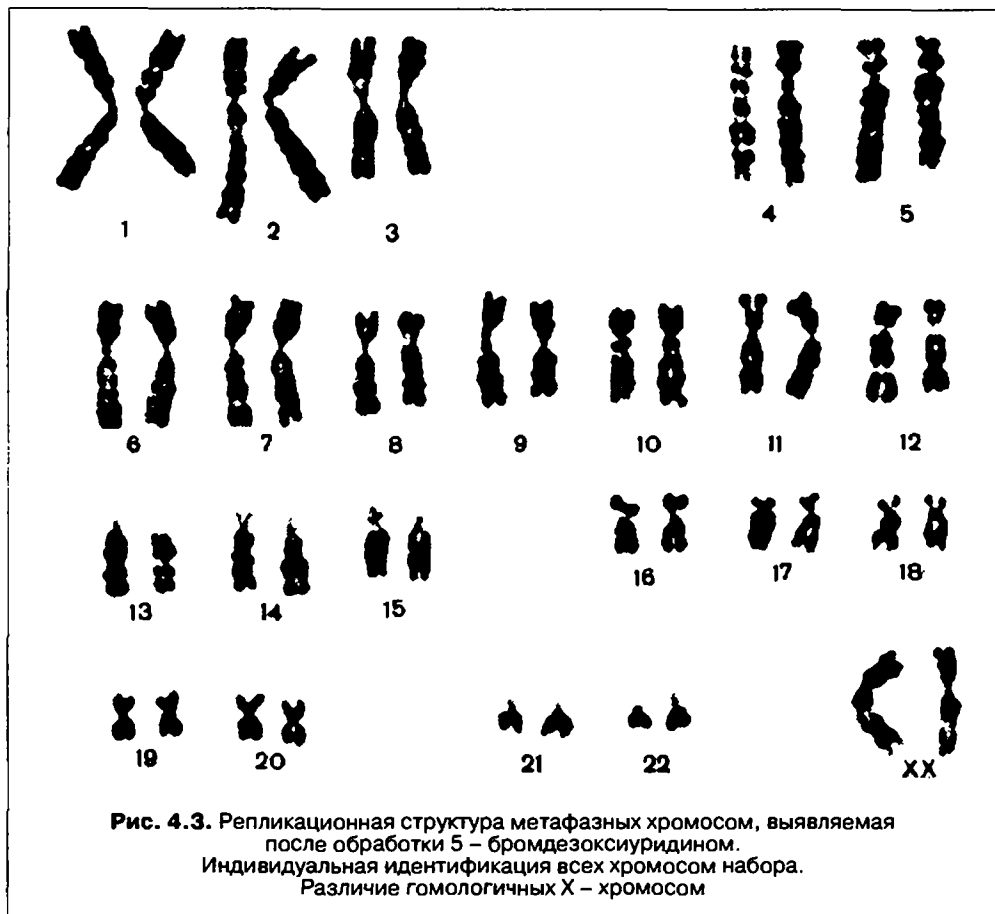


матиды. В этом можно убедиться с помощью специального окрашивания хромосом (рис. 4.2).

Количество сестринских хроматидных обменов в клеточных культурах человека часто используют в качестве индикатора мутагенности среды: чем больше межхроматидных обменов, тем она выше.

В результате репликации образуются две идентичные молекулы ДНК, упакованные с помощью белков в хроматине. Эти молекулы отделены друг от друга, но остаются соединенными в центромерном районе хромосом. Центромера располагается внутри гетерохроматического района. Предполага-





ется, что гетерохроматин обеспечивает ее стабильность. В районе центromеры расположена сателлитная ДНК, представленная кластерами высокоповторяющихся последовательностей. Кроме того, внутри центromеры находятся уникальные последовательности ДНК, которые, как полагают, несут информацию о расхождении хромосом к противоположным полюсам клетки.

Наличие множества точек начала репликации ДНК на каждой хромосоме не означает одновременного начала этого процесса в каждой точке. Для репликации в клетках человека характерна асинхронность его в разных уча-

стках хромосом. В то же время порядок репликации участков каждой хромосомы строго постоянен, поэтому воспроизведение его последовательности служит важнейшей характеристикой каждой хромосомы человека.

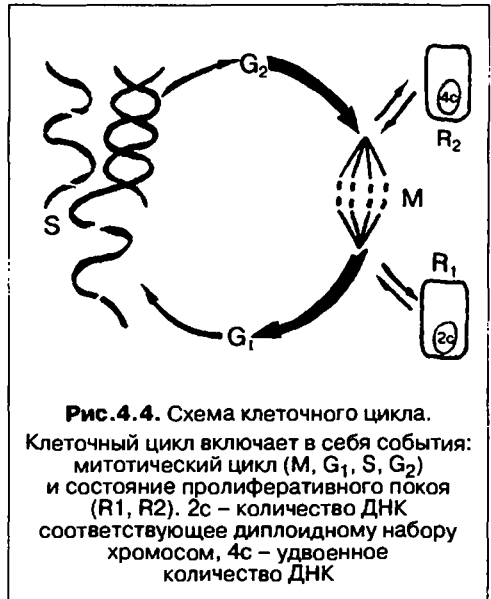
Первоначально репликацию ДНК в хроматине клеток человека изучали с помощью метода автордиографии на клеточных культурах, предварительно меченых радиоактивным ^3H -тимидином. Выяснилось, что таким способом можно легко различить морфологически сходные хромосомы №№ 4 и 5, 17 и 18, а также акроцентрические хромосомы №№ 13, 14 и 15. Методом автора-

диографии было также показано, что в женских клетках одна из двух X-хромосом отличается поздним началом репликации и поздним окончанием синтеза ДНК. Аналогичными характеристиками отличаются районы гетерохроматина в X хромосоме человека, что подтверждает идентичность этих структур. Кроме того, метод автордиографии позволил улучшить идентификацию хромосомных аномалий и помог выявить несколько новых синдромов, связанных с патологией в строении хромосомы.

Новый этап в изучении последовательности синтеза ДНК по длине каждой хромосомы человека начался с использованием в качестве предшественника синтеза ДНК аналога тимидина — 5-бромдезоксимуридина. Включившие его вместо тимидина участки хромосом окрашиваются значительно слабее, следовательно, в светлых участках репликация ДНК начинается раньше. Таким образом, цитогенетики получили возможность изучать хронологию репродукции хромосом (рис. 4.3).

Каждая хромосома состоит из участков, реплицированных в разное время. Районы с ранней и поздней репликацией четко чередуются. В метафазной хромосоме расположение светлых и темных участков можно видеть с помощью светового микроскопа. Строгая специфичность картины позволяет уверенно идентифицировать хромосомы в норме, а также при изменении кариотипа в целом, равно как и отдельной хромосомы.

В G_2 -периоде число молекул ДНК — удвоенное. Количественное содержание ДНК соответствует тетраплоидному ($4n$) набору хромосом. Уровень синтеза РНК и белка достигает максимума. Клетки готовятся к вступлению в митоз, поэтому иначе эта часть клеточного



цикла называется преемительным периодом. Продолжительность G_2 -периода у млекопитающих около 4 ч.

В настоящее время клеточный цикл рассматривают как последовательность хронологически связанных событий, происходящих после завершения митоза в исходной клетке (R_1) вплоть до завершения митоза в ее дочерней клетке (R_2) (рис. 4.4).

В начале 90-х гг. произошел прорыв в изучении регуляторных механизмов размножения клеток. В нормальных условиях координация событий клеточного цикла обусловлена регуляцией трех переходов: вступления в митоз, выхода из митоза и прохождения через пункт ограничения в периоде G_1 , после которого клетки ориентируются на синтез ДНК, то есть готовятся вступить в S-период. Так, идентифицирован продукт активности гена, которому принадлежит центральная роль в регуляции деления. Это белок $p34^{cdc2}$, отличающийся высокой степенью филогенетической консерва-

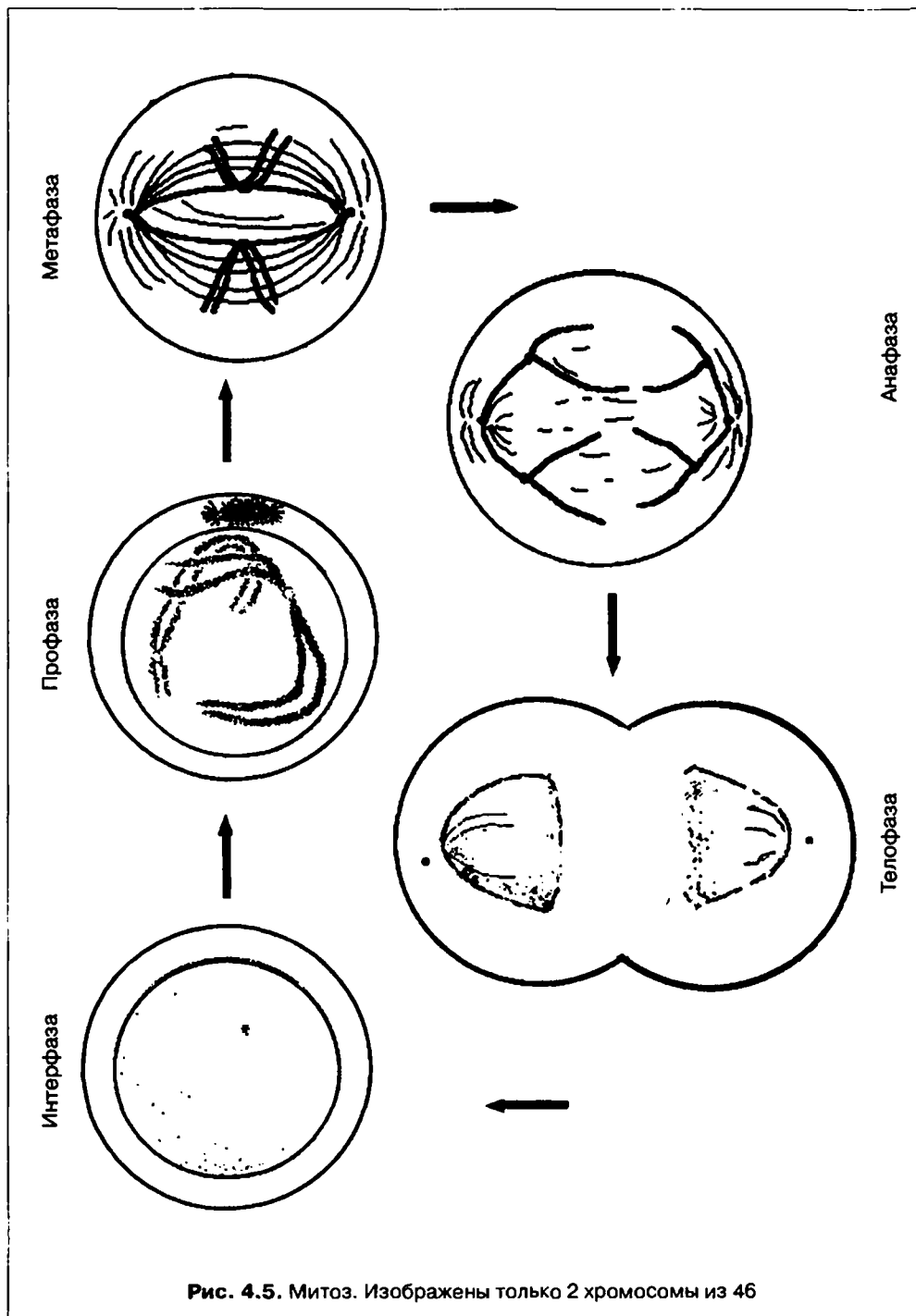


Рис. 4.5. Митоз. Изображены только 2 хромосомы из 46

тивности в клетках эукариотических организмов. Показано, что и клетки человека содержат продукт активности данного гена или очень близкий его гомолог. Наиболее вероятно, что функциональная роль этого белка связана с фосфорилированием гистона H_1 , участвующего в упаковке ДНК в составе хроматина.

Процесс митоза в соматических клетках человека идет стандартно (рис. 4.5). К концу *профазы* хромосомы становятся отчетливо видимыми, причем каждая состоит из двух хроматид. Обе сестринские хроматиды прилегают одна к другой. Центромера во всех хромосомах представлена небольшой светлой кольцеобразной зоной. Она удерживает две сестринские хроматиды вместе. Ядрышко исчезает, ядерная оболочка распадается на фрагменты. Хромосомы располагаются в цитоплазме центральной части клетки, оттесняя все органоиды к периферии.

Во время *метафазы* центромеры всех хромосом располагаются в экваториальной плоскости между двумя полюсами клетки. В это время они утрачивают вид четко выраженной перетяжки. Хроматиды каждой хромосомы начинают отделяться одна от другой, оставаясь соединенными только в центромерной области. В районе же центромер с противоположных сторон прикрепляются нити веретена деления. Их количество может достигать нескольких десятков в районе каждой центромеры.

Анафаза начинается с одновременного разделения всех центромер и расхождения сестринских хроматид каждой хромосомы к противоположным полюсам. Утрата синхронности этого процесса может привести к неправильному их расхождению. Центромеры с

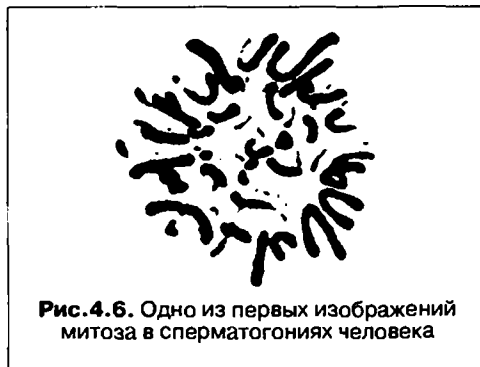


Рис. 4.6. Одно из первых изображений митоза в сперматогониях человека

помощью специальных белков связываются с нитями веретена деления, которые и увлекают за собой дочерние хроматиды к противоположным полюсам. Анафаза заканчивается с прекращением движения хроматид, которые становятся хромосомами. У каждого полюса клетки должно оказаться по 46 состоящих из одной хроматиды таких хромосом.

Телофаза связана с образованием ядерных оболочек вокруг хромосом на двух полюсах клетки и началом перехода хромосом в состояние хроматина. Завершается телофаза возникновением перетяжки в центральной части делящейся клетки, которая завершает деление клетки надвое.

Самые ранние описания митоза в клетках человека сделаны О. Винивортером в 1912 г. Его рисунок с гистологического препарата семенников можно увидеть на иллюстрации (рис. 4.6). На нем изображен митоз в сперматогонии, и количество хромосом оценивалось автором как 48. Прошло более 50 лет, прежде чем появились методы, позволившие уточнить, что их число в клетках человека равно 46.

Для эукариот известно, что прохождение митоза может быть заблокировано, физиологически или экспериментально, что приводит к развитию полиплоидных клеток. Системная по-

липлоидия не характерна для человека. Так, полиплоидные эмбрионы погибают на ранних стадиях развития, и это — одна из причин спонтанного прерывания беременности на ранних сроках. В то же время наличие полиплоидных клеток в некоторых органах человека не является патологией. Они встречаются в сердечной мышце, особенно в предсердиях, в печени и ряде желез. При этом клетки могут быть одноядерными и двоядерными, а уровень их полиплоидии невысок: обычно в пределах 4 — 8n.

Мейоз

Мейоз — это особый тип клеточного деления, возникший с появлением полового размножения, при котором два родителя — отец и мать — дают начало новому организму. В процессе оплодотворения сливаются гаплоидные ядра половых клеток родителей, что вдвое увеличивает количество хромосом в зиготе. Следовательно, при образовании половых клеток должно в два раза уменьшаться количество хромосом, но таким образом, чтобы совокупность генетического материала обеспечивала преемственность поколений. Закономерное чередование репликации ДНК (а соответственно и хромосом), митозов и мейозов обеспечивает сохранение видоспецифического кариотипа как в индивидуальном развитии — онтогенезе, так и в череде поколений организмов.

При мейозе из одной диплоидной клетки образуется 4 гаплоидных. Кроме того, в ходе этого деления происходит два вида перегруппировки генетического материала хромосом, т.е. два вида генетической рекомбинации: 1) независимое распределение гомологичных хромосом к полюсам деления; 2) кроссинговер — обмен участками

между гомологичными хромосомами. Эти процессы обеспечивают широчайший спектр наследственной изменчивости и генетическую неповторимость индивидов даже среди потомков одной пары родителей.

Изучение мейоза у человека связано с определенными методическими трудностями из-за недоступности экспериментального материала. Обычно мейоз изучают, культивируя *in vitro* яйцечники эмбриона женского пола старше трех месяцев из материала аборта. Кроме того, используют материал биопсии семенников и яйчников, полученный при хирургическом вмешательстве по медицинским показаниям, а также трупный материал.

Мейотическое деление у человека не имеет коренных отличий от мейоза других эукариот. Есть, однако, некоторая специфика протекания мейоза в ходе сперматогенеза и оогенеза у лиц мужского и женского пола. Эта специфика затрагивает нюансы процесса, касающиеся большей частью временных характеристик и тонкостей дифференцировки. Мы рассмотрим процессы сперматогенеза и оогенеза позже. Сначала вспомним характерные этапы мейоза.

Мейоз состоит из двух делений, следующих друг за другом, между которыми, что важно, не происходит удвоение ДНК, а следовательно, и хромосом. Перед мейозом обязательно проходит интерфаза, в S-периоде которой ДНК реплицируется. Следовательно, в профазе I мейотического деления нитевидные хромосомы состоят из двух хроматид. Каждое из двух делений мейоза состоит из про-, мета-, ана- и телофазы с индексами I или II (рис. 4.7).

Первое мейотическое деление протекает значительно дольше, чем второе.

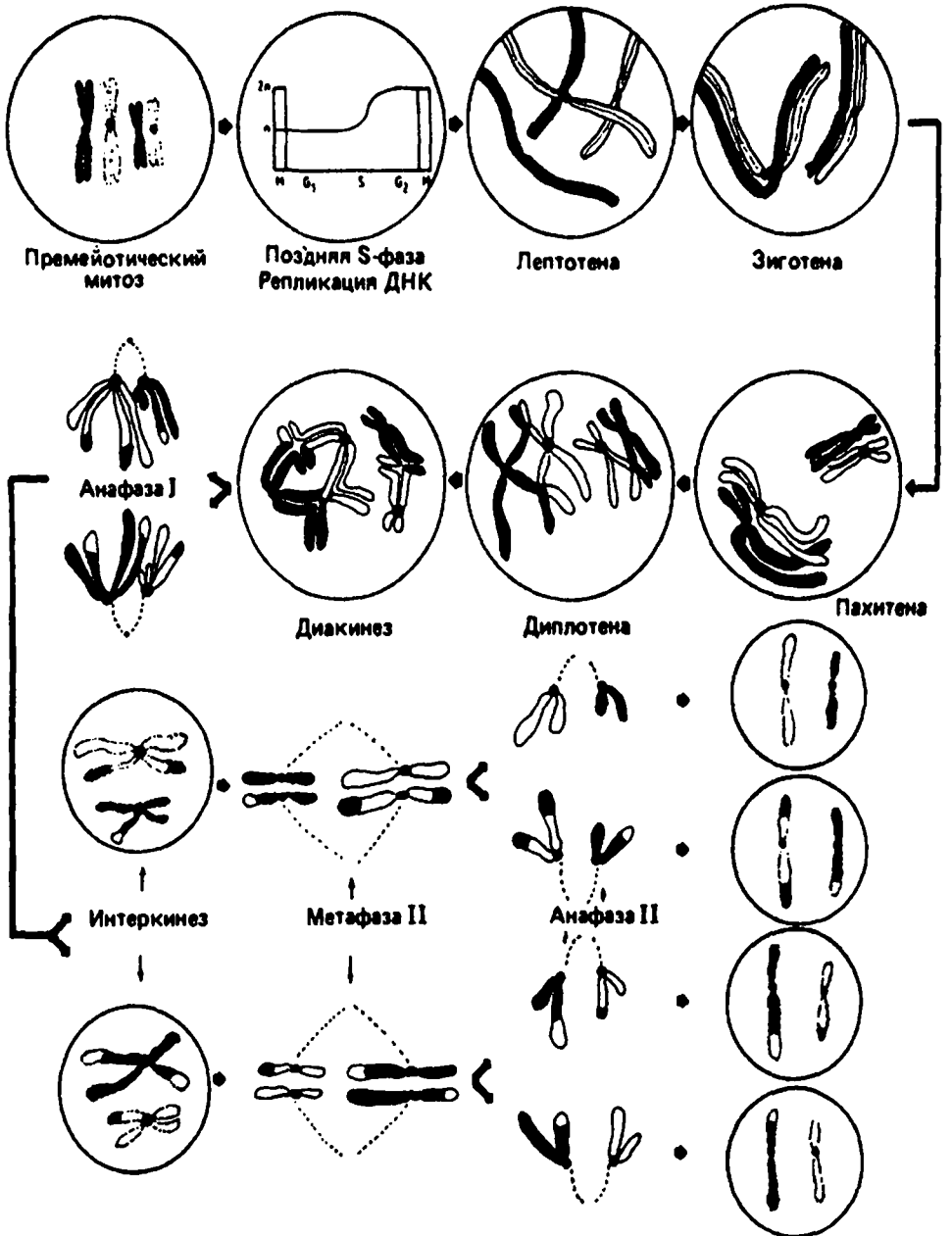


Рис. 4.7. Стадии мейоза. Поведение хромосом. Отцовские хромосомы окрашены в черный цвет, материнские – в белый



Рис. 4.8. Синаптонемный комплекс сперматоцита человека.

К — центромера. Стрелки указывают на плотные участки. Верхняя и нижняя врезки: параллельные оси синаптонемного комплекса. Изгибы могут соответствовать местам рекомбинации

Самой длительной фазой первого мейотического деления является профазы, так как именно в ней происходят такие сложные процессы как образование бивалентов из гомологичных хромосом и кроссинговер. У женщин профазы мейоза I активно протекает в течение нескольких месяцев в период внутриутробного развития, а полностью завершается к моменту овуляции в половозрелом возрасте. Длительность этого периода у женщин объясняется также одновременным протеканием процесса дифференцировки и созревания цитоплазмы будущей яйцеклетки. У мужчин длительность профазы мейоза I составляет 20 — 25 суток.

Профаза мейоза I подразделяется на 5 подфаз: лептотена, зиготена, пахитена, диплотена и диакинез.

Лептотена — стадия тонких нитей. Ядра клеток, вступающих в мейоз, значительно крупнее других. В этих ядрах вместо хроматина выявляются столь тонкие и длинные нитевидные хромосомы, что их трудно проследить по всей длине. Для лептотены характерно также появление на тонких хромосо-

мах особых структур, напоминающих бусины. Это хромомеры — участки более сильно конденсированного хроматина. Число, размер и расположение хромомер специфичны для каждой хромосомы. Появление хромомерных структур отражает постепенный процесс конденсации хромосом из хроматина. Каждая хромосома состоит из двух сестринских хроматид, но их далеко не всегда удается различить под световым микроскопом, настолько близко они прилегают друг к другу.

Зиготена — стадия сливающихся нитей. На этой стадии гомологичные хромосомы находят друг друга и сливаются (конъюгируют) с образованием бивалента. 46 хромосом человека конъюгируют в 23 пары гомологичных хромосом, следовательно, количество бивалентов равно 23 и соответствует гаплоидному хромосомному набору.

Бивалент — это стабильная структура из двух гомологичных хромосом и, соответственно, из 4 хроматид. Стабильность этой структуры поддерживают специфические белки синаптонемного комплекса (рис. 4.8). Объединение гомологов чаще всего начинается на концах хромосом — в теломерах, а также в центромерных районах. Позднее внутри бивалента по длине соединяющиеся хромосомы формируются сближающиеся их белковые тяжи синаптонемного комплекса.

В настоящее время выявлена специфичность хромомерного строения индивидуальных бивалентов человека в мужском и женском мейозе, т.е. по рисунку хромомер можно определить, какая пара хромосом образует тот или иной бивалент, даже если по размеру и общей морфологии биваленты одинаковы. Конъюгация гомологичных хромосом с образованием бивалентов обязательна для всех хромосом человека,

включая короткие и половые хромосомы. Известно, что конъюгация происходит не только между половыми хромосомами X и X, но также между X и Y хромосомами, несмотря на значительное превосходство в размерах X-хромосомы.

В процессе сперматогенеза образование полового бивалента из X и Y хромосом начинается раньше других. При этом конъюгируют между собой часть короткого плеча X- и короткое плечо Y-хромосом (рис. 4.9). Эксперименты по гибридизации ДНК показали, что эти районы гомологичны между собой. Негомологичные участки X и Y хромосом остаются свободными.

Зиготена заканчивается образованием 23 бивалентов.

Пахитена — стадия прохождения кроссинговера. В пахитене хромосомы выявляются в виде толстых нитей, поскольку они представлены бивалентами. Именно в бивалентах и происходит кроссинговер: взаимный обмен идентичными участками по длине гомологичных хромосом. Генетическим следствием кроссинговера является рекомбинация сцепленных генов, что обеспечивает широкую генетическую изменчивость гамет. Морфологически этот процесс в пахитене уловить нельзя. Для умозрительного восприятия он изображен на схеме (рис. 4.10). Процесс обмена участками между ДНК несестринских хроматид в бивалентах можно представить следующим образом. По длине хромосомы разбросаны зоны повторяющихся последовательностей ДНК. С помощью ферментов-рестриктаз целостность их может легко нарушаться, при этом однонитевые участки молекул ДНК соседних несестринских хроматид могут образовывать короткие двунитевые гибриды. Другие, репарирующие ферменты способны восста-

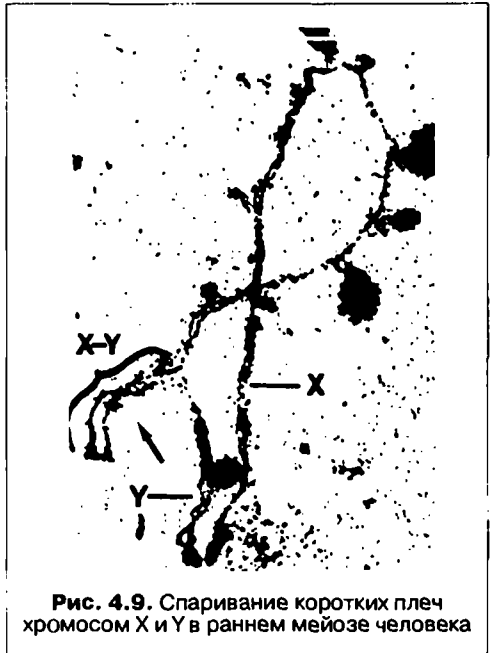
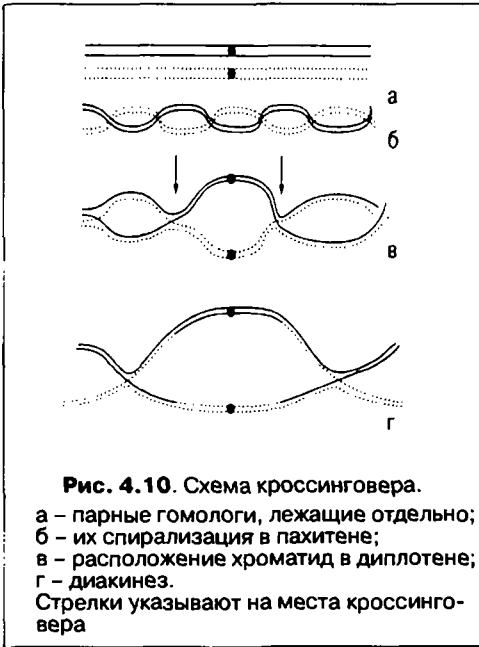


Рис. 4.9. Спаривание коротких плеч хромосом X и Y в раннем мейозе человека

навливать целостность поврежденных участков. Таким образом, кроссинговер — это процесс, происходящий со сложными пространственными изменениями суперспирализованных участков молекул ДНК несестринских хроматид с использованием целого комплекса ферментов, возможно, объединенных в специализированную структуру.

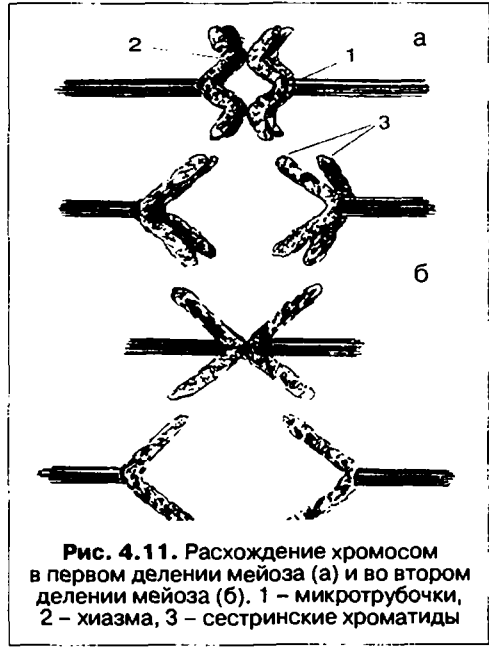
Кроссинговер обязательно происходит в каждом биваленте. Не исключено, что отсутствие кроссинговера в каком-то из бивалентов может быть фактором, прекращающим течение мейоза.

Позже, в следующей стадии, когда гомологичные хромосомы в бивалентах начинают расходиться, выявляются места, где происходил процесс кроссинговера. В них гомологичные хромосомы во время разрушения бивалентов соединены дольше всего. Поскольку морфологически они напоминают греческую букву "X", их называют хиазмами (рис. 4.10). В зоне хиазм видно,



что в перекрест вовлекаются только хроматиды из четырех: по одной от каждого гомолога.

Диплотена — стадия двойных нитей. На этой стадии синаптонемный комплекс разрушается, и гомологи отталкиваются друг от друга, оставаясь соединенными только в районе хиазм, где по-прежнему сохраняется структура синаптонемного комплекса. Поскольку каждая хиазма соответствует одному событию кроссинговера, в котором участвуют две несестринские хроматиды, то по количеству хиазм можно судить об интенсивности процесса кроссинговера. По данным равных авторов, общее число хиазм на хромосомный набор человека колеблется от 35 до 66. Некоторые биваленты могут содержать несколько (до 5-6) хиазм. В среднем на бивалент их приходится около двух. Анализ генетического сцепления показал, что кроссинговер у женщин происходит



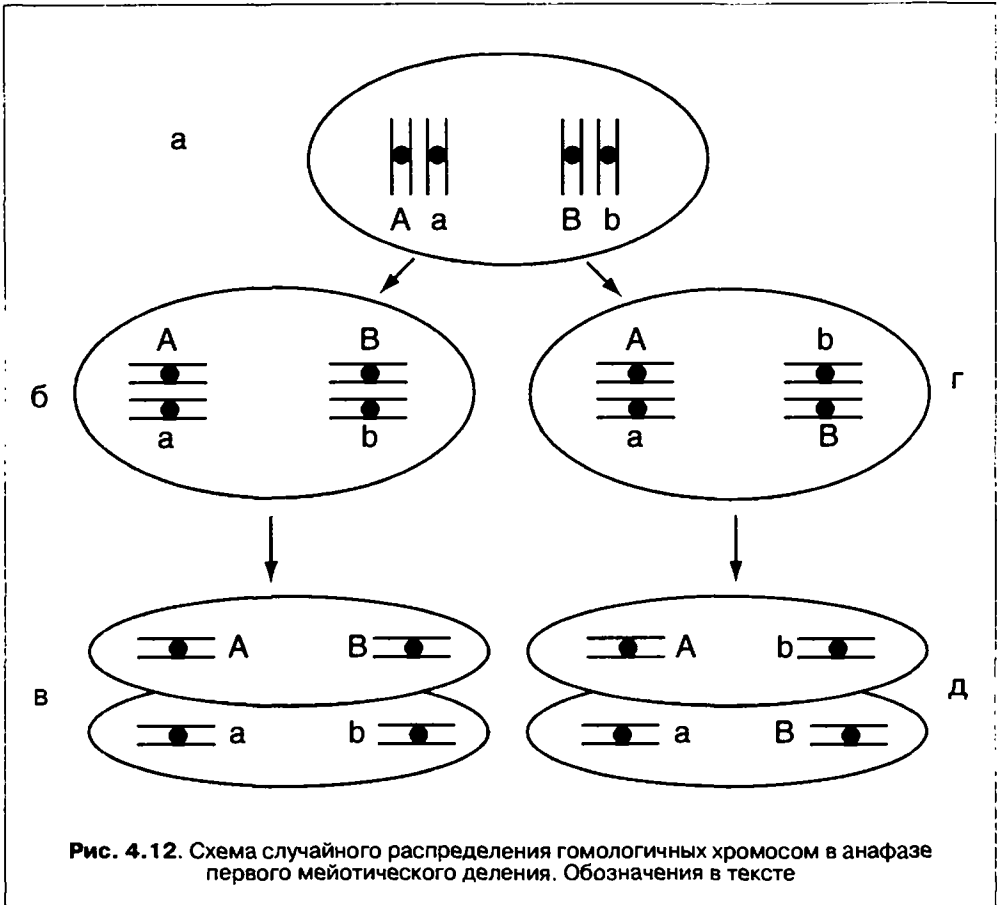
чаще, чем у мужчин, следовательно, и хиазм у женщин должно быть больше.

Диакинез — стадия, завершающая профазу мейоза I. Она является переходной к метафазе. Число хиазм в ней уменьшается, биваленты укорачиваются, разрушается ядро, начинает формироваться веретено деления.

В **метафазе I** биваленты располагаются в экваториальной плоскости, в цитоплазме. Центромеры хромосом лежат на экваторе, к ним прикреплены нити веретена деления. Число выстроившихся бивалентов соответствует гаплоидному набору хромосом и у человека равно 23.

В **анафазе I** происходит расхождение гомологичных хромосом к противоположным полюсам клетки. Каждая хромосома состоит из двух сестринских хроматид (рис. 4.11, а).

Телофаза I. В этой фазе происходит образование двух дочерних ядер каждое из которых содержит гаплоидное



число хромосом, равное 23. Каждая хромосома состоит из двух сестринских хроматид.

Промежуток между двумя последующими делениями мейоза очень невелик. Почти сразу начинается второе мейотическое деление. Оно идет по схеме митоза: 23 хромосомы, состоящие из парных сестринских хроматид, связанных в центромерных участках, в каждом из двух образованных ядер проходят профазу и метафазу. В анафазе они разъединяются и расходятся к противоположным полюсам (рис. 4.11,б), в результате чего образуется четыре гаплоидных ядра (рис. 4.7),

различающихся по качеству генетической информации.

Рекомбинация генетического материала в мейозе осуществляется не только за счет кроссинговера. В анафазе первого мейотического деления происходит случайное по отношению к полюсам клетки распределение гомологичных хромосом из каждого бивалента, что приводит к возникновению большого числа комбинаций отцовских и материнских хромосом в гаметах. Рассмотрим этот процесс подробнее, проанализировав распределение первой и второй пары гомологичных хромосом в анафазе I. Известно, что в каждой паре гомо-

логичных хромосом зиготы одна хромосома приходит из гаметы отца, другая — из гаметы матери. Обозначим заглавными буквами хромосомы отца, а прописными — хромосомы матери (рис. 4.12, а). А и а — первая пара хромосом, В и в — вторая пара. В профазе I образуются биваленты. В метафазе I они выстраиваются в экваториальной плоскости (рис. 4.12, б). В анафазе I гомологичные хромосомы расходятся к противоположным полюсам: к одному полюсу пойдут хромосомы А и В, то есть отцовские, а к другому а и в, то есть материнские (рис. 4.12, в). Но у этого события может быть и другой исход, когда расположение хромосом в метафазе на экваторе будет другим (рис. 4.12, г). Тогда к одному полюсу пойдут хромосомы А и в, а к другому — а и В, то есть сочетание хромосом на полюсах будет: одна отцовская, одна материнская (рис. 4.12, д). Наличие двух пар гомологичных хромосом обеспечивает, как мы видим, образование четырех типов гамет, качественно отличающихся друг от друга сочетанием отцовских и материнских хромосом. У человека 23 пары хромосом, и разнообразие гамет оценивается как 2^{23} , что примерно равно 10 миллионам вариантов сочетаний отцовских и материнских хромосом. При оплодотворении практически равновероятна встреча любого из сперматозоидов с яйцеклеткой. Это увеличивает число возможных генотипов детей до $2^{23} \times 2^{23}$. Частота генетической рекомбинации в результате независимого распределения разных пар гомологов выше, чем частота рекомбинации в результате кроссинговера.

Гаметогенез

Гаметогенезом называется процесс образования зрелых половых клеток-гамет: мужских — сперматозоидов (сперматогенез) и женских — яйцекле-

ток (оогенез). Гаметогенез происходит в половых железах (гонадах). Диплоидные клетки зачаткового эпителия мужских и женских гонад многократно делятся митозом, что приводит к значительному увеличению их количества, — это фаза размножения. Зачатковые клетки, делящиеся митозом, называются гониями: мужские — сперматогониями, женские — оогониями. Напомним, что они имеют диплоидный набор хромосом. Фаза размножения сменяется фазой роста. Ее обязательно проходит каждый гоний. Во время фазы роста гонии увеличиваются в объеме, а также осуществляют определенные этапы дифференцировки, связанные с изменением структуры цитоплазмы и ядра. Дифференцировка сперматогониев и оогониев идет различными путями. В течение фазы роста обязательно имеется S-период, в котором удваиваются все молекулы ДНК. В результате каждая хромосома, находящаяся в состоянии хроматина, по завершению S-периода будет состоять из двух хроматид, соединенных между собой центромерой. Фаза роста заканчивается, когда гонии преобразуются в качественно новые клетки: сперматоциты или ооциты I порядка, готовые вступить в мейоз. Начало мейоза открывает новую фазу гаметогенеза — фазу созревания. Во время фазы созревания происходят первое и второе деления мейоза. Из одной диплоидной клетки образуется 4 гаплоидные, отличающиеся друг от друга по качеству генетической информации. Помимо мейоза, в фазе созревания происходит дифференцировка гаплоидных клеток и формирование зрелых гамет.

Половая дифференцировка у эмбриона человека начинается очень рано, в возрасте 5 недель, когда эмбрион



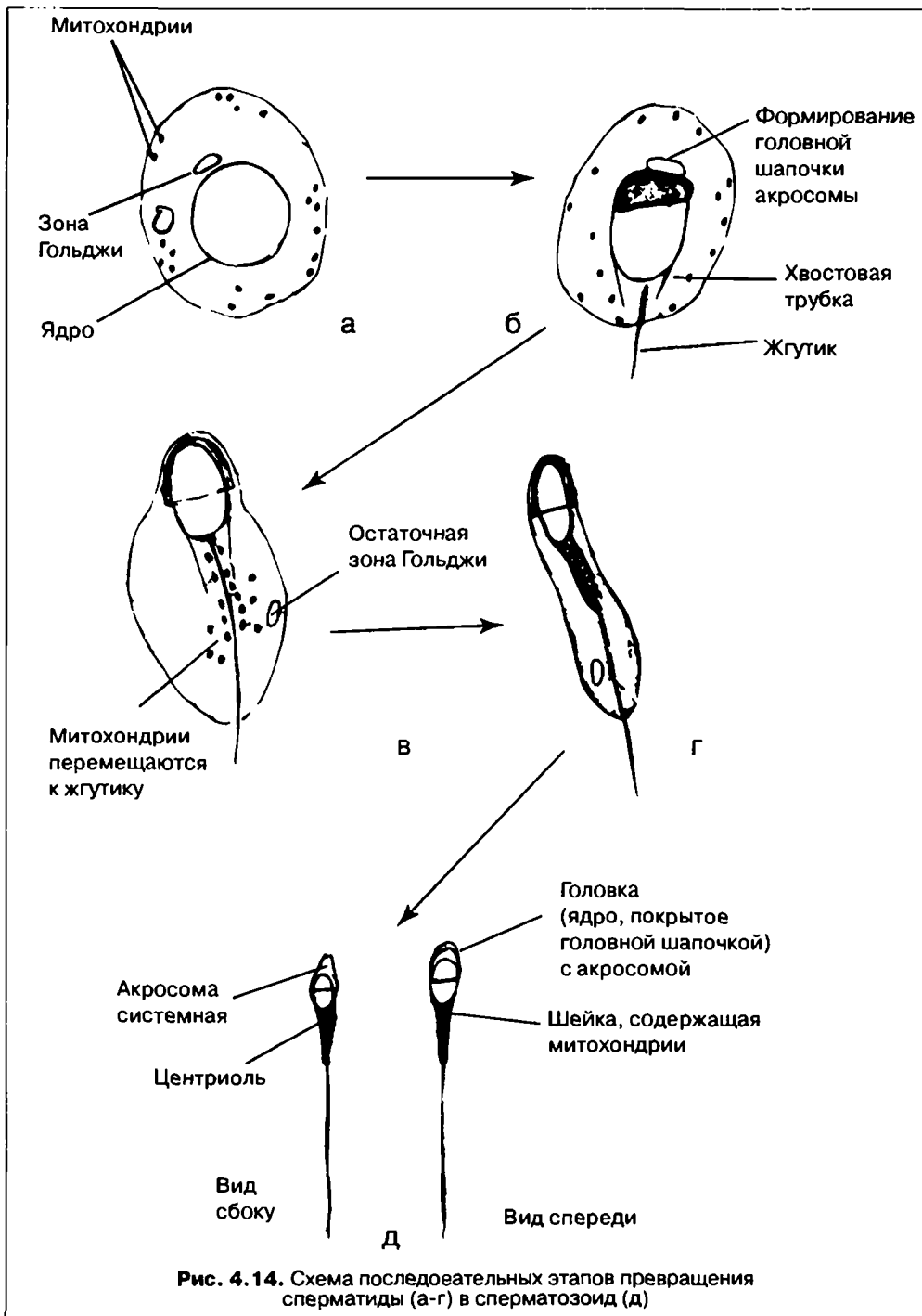
имеет размер 2-3 см. В это время закладываются зачатки половых органов. Развитие яичников у женщин и у мужчин основано на митотическом делении клеток и дифференцировке морфологических структур. Начало дифференцировки половой системы у пятинедельного эмбриона связано с миграцией клеток из желточного мешка в яичники у девочек и в яички у мальчиков. Именно мигрирующие клетки дают начало гониям. Таким образом, первая фаза — фаза размножения — начинается у эмбриона человека на пятой неделе развития. Сперматогенез и оогенез у человека идут по-разному. Рассмотрим эти виды гаметогенеза в отдельности.

Сперматогенез

Сперматогенез происходит в извитых семенных канальцах яичка. Оттуда продукты сперматогенеза поступают в семявыводящий проток, и далее — в семяизвергательный канал.

Эпителий зрелого семенного канальца состоит примерно из 6 слоев клеток (рис. 4.13). Самый наружный слой — клетки зачаткового эпителия, которые делятся митозом. Образовавшиеся в результате этого деления клетки перемещаются внутрь канальца, образуя второй слой. В нем клетки также сохраняют способность к делению митозом. Они будут являться сперматогониями. Фаза размножения в процессе сперматогенеза связана именно с этими двумя слоями клеток. Перемещение размножающихся сперматогониев в третий слой связано с началом фазы роста и превращения сперматогониев в более крупные сперматоциты I порядка. В этом слое клеток происходит первое мейотическое деление, и из одного сперматоцита первого порядка образуются две клетки с гаплоидным набором хромосом, которые становятся сперматоцитами второго порядка.

Любой этап клеточного деления сопровождается перемещением клеток



из более наружного слоя в более внутренних. Изменяется окружение клеток, соответственно изменяется и дифференцировка. Каждый сперматоцит второго порядка проходит второе мейотическое деление и дает начало двум сперматидам с гаплоидным набором хромосом. Вначале сперматиды являются небольшими клетками с округлым ядром. Вскоре ядро удлиняется и располагается у того конца клетки, который обращен к стенке канальца. В каждой сперматиде одна из двух центриол образует жгутик, конец которого обращен к центру канальца (рис. 4.14). Созревание сперматид происходит в самых внутренних слоях семенного канальца. Здесь же сперматиды превращаются в зрелые сперматозоиды, способные к движению с помощью жгутика и покидают семенной каналец.

У человека длительность фазы роста, составляет 14 дней. Мужские половые клетки не развиваются поодиночке. Они растут в клонах и объединены между собой цитоплазматическими мостиками. Контакты между клетками разрушаются лишь при формировании зрелых сперматозоидов. Вспомогательную функцию выполняют клетки Сертоли.

Таким образом, в результате процесса сперматогенеза из одного диплоидного сперматоцита I порядка получают 4 зрелых сперматозоида. Общая схема процесса сперматогенеза представлена на рисунке (рис. 4.15).

В детстве (от рождения до 10 лет) семенные канальцы развиты слабо. Они состоят из клеток зачаткового эпителия, покрывающих каналец и сперматогониев. В подростковом возрасте (от 10 до 14 лет) сперматогонии начинают активно делиться, и процесс сперматогенеза активизируется. В даль-

нейшем сперматогенез происходит непрерывно, в течение всей жизни мужчины.

Семенники расположены вне брюшной полости, и поэтому спермии развиваются при температуре на 2-3°С ниже температуры внутренних областей тела. У мужчин, принимающих очень горячие ванны или носящих слишком тесные трусы, образование спермиев снижается, что в конечном счете может привести к бесплодию. В норме процесс образования спермиев занимает около 70 суток. На 1 г веса яичка образуется 10⁷ спермиев в сутки.

Сперматозоиды, или спермии, — это очень мелкие подвижные клетки. В головке сперматозоида находится ядро, содержащее гаплоидный набор хромосом (23). К периферии от ядра лежит особая структура — акросома. Функционально акросому можно рассматривать как увеличенную лизосому, т.к. к эта органелла ограничена одной мембраной и наполнена гидролитическими ферментами, помогающими проникновению спермия в ооцит. Округлая головка сперматозоида сужается и переходит в шейку, где под прямым углом другу к другу располагается пара центриолей. Микротрубочки одной из центриолей являются местом образования осевой структуры жгутика так, что система микротрубочек жгутика проходит от самого начала шейки сперматозоида до кончика его хвоста. Более нижняя часть шейки расширена за счет многочисленных митохондрий, уложенных в виде спирали вокруг жгутика. Митохондрии обеспечивают энергией движение сперматозоида. Заканчивается спермий жгутиком, имеющим типичное строение.

У человека максимальная дневная продуктивность составляет 10⁶ сперматозоидов. Продолжительность су-

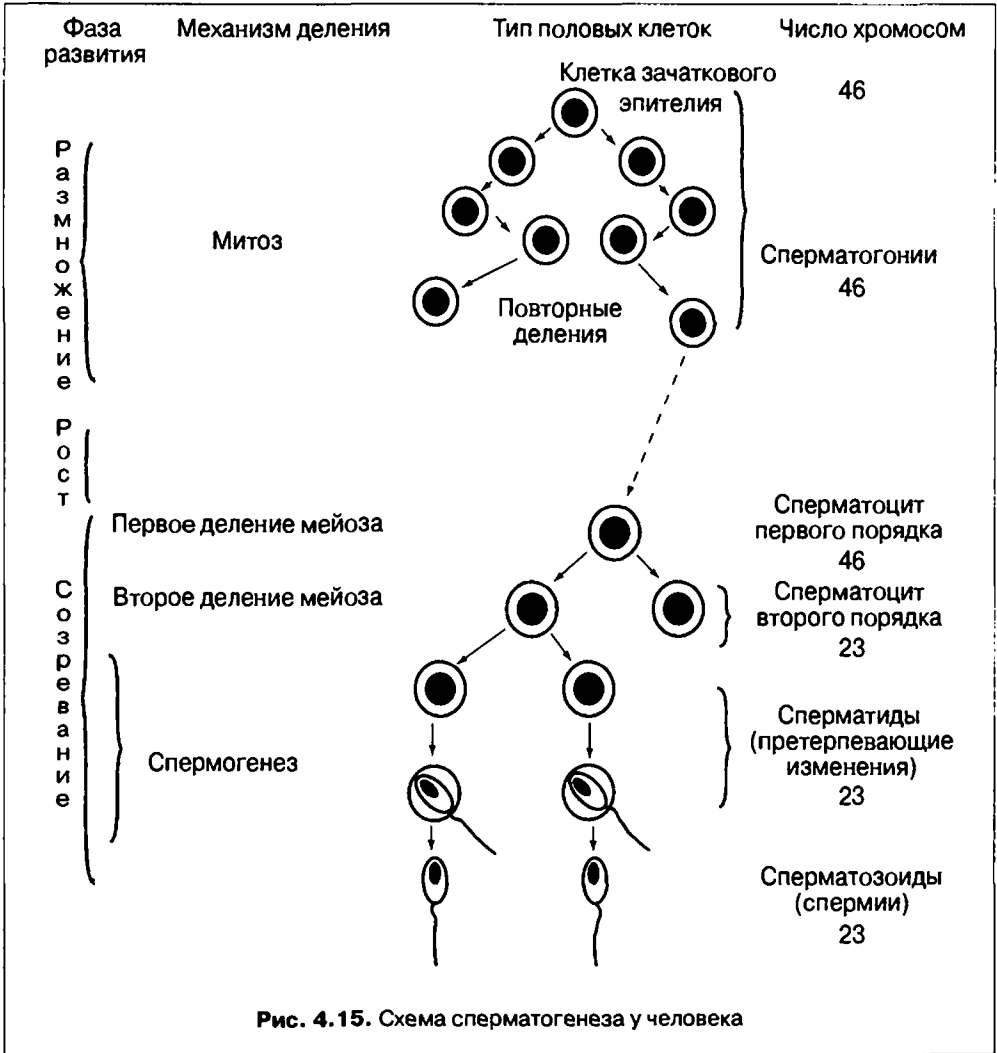


Рис. 4.15. Схема сперматогенеза у человека

ществования спермия во влагалище достигает 2,5 ч, а в шейке матки — 48 ч.

Функция яичек человека не ограничена сперматогенезом. Велика их роль и в обеспечении организма гормонами. В специальных клетках, находящихся между семенными канальцами яичка, синтезируется главный андрогенный гормон — тестостерон. Он необходим для образования жизнеспособных спермиев, а также для развития и под-

держания вторичных половых признаков. К этим признакам относятся: образование наружных мужских половых органов и придаточных желез репродуктивной системы, усиленное развитие мускулатуры, увеличение гортани и соответственно более низкий голос, рост и распределение волосяного покрова, особенности поведения, связанные с половой жизнью и родительскими заботами.

Оогенез

Оогенез происходит в яичниках. У половозрелой женщины они представляют собой уплощенные овальные тела длиной 2,5-5,0 см, шириной 1,5-3,0 см. Яйцеклетки расположены в корковом слое яичника в эпителиальных пузырьках, называемых фолликулами. Вне беременности примерно каждые 28 дней в одном из яичников созревает очередной фолликул, который лопается, высвобождая ооцит второго порядка. Этот процесс называется овуляцией.

Развитие яичников у эмбриона начинается, как было показано выше, в возрасте 5 недель. Примерно в то же время, когда закладываются яичники, среди клеток коркового слоя выявляются первичные половые клетки. Они мигрируют в развивающийся яичник из эндодермы желточного мешка. Женские половые клетки, мигрирующие в яичник и располагающиеся в его строме, называют оогониями. В начале развития яичников эти клетки размножаются митозом, и число их возрастает. Однако еще в пренатальном периоде большинство первичных половых клеток погибает. В момент рождения девочки их количество равно примерно 2 млн. в обоих яичниках. К моменту полового созревания большинство из них дегенерирует, так что в яичниках их остается только около 40000. Лишь примерно 450 из них достигают стадии ооцитов второго порядка и выходят из яичника в процессе овуляции.

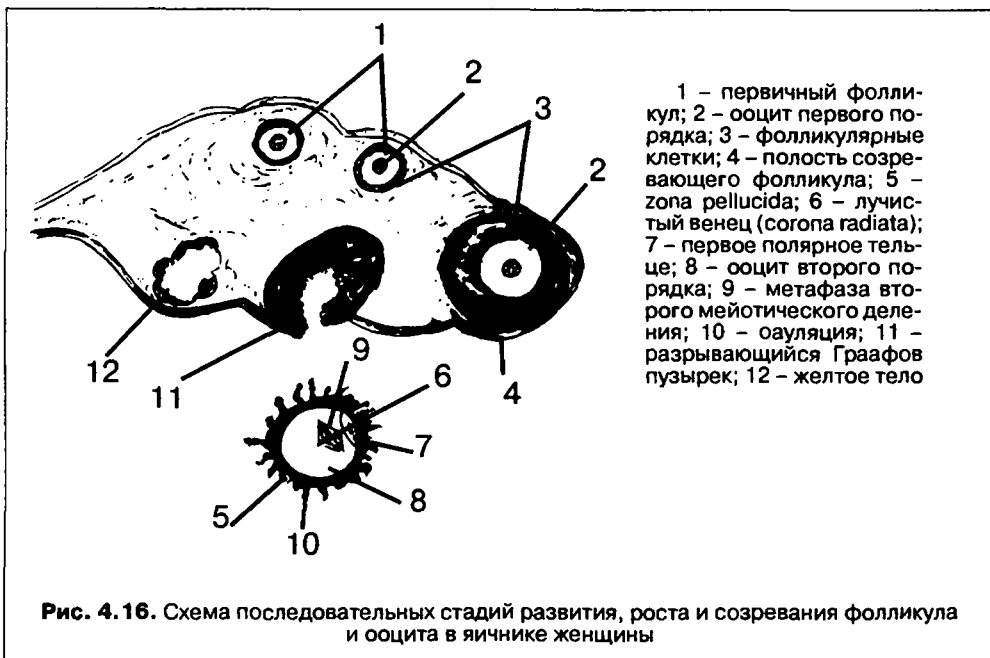
В развивающемся яичнике первичные половые клетки покрываются тонким слоем эпителиальных клеток, образуя фолликулу (рис. 4.16). Клетки, окружающие ооцит одним слоем, называются фолликулярными. До третьего месяца жизни плода происходят только митотические деления. При-

мерно к концу третьего месяца оогонии, находящиеся в фолликуле, начинают активно расти и дифференцироваться, в результате чего каждый оогоний превращается в ооцит первого порядка. Ооциты первого порядка вступают в мейоз. Первое редукционное деление мейоза в ооцитах первого порядка начинается в пренатальном периоде к концу третьего месяца жизни плода. Число ооцитов, вступивших в это время в мейоз, невелико. На препаратах их идентифицируют по лептотене и зиготене. Начиная с седьмого месяца в мейоз вступают новые ооциты первого порядка. Первые пахитены и диплотены наблюдаются у семимесячного плода.

Ооциты первого порядка вступают в профазу первого деления мейоза, но не завершают его. Мейоз задерживается в конце профазы, и клетки вступают в "фазу покоя" – *диктиотену*. Ко времени рождения девочки ооциты первого порядка продолжают находиться на этой стадии. Их деление завершается только после наступления половой зрелости.

Между рождением и наступлением половой зрелости яичник увеличивается в размере, но лишь отдельные фолликулы начинают расти и развиваться. Изменения, которые происходят в организме женщины в период полового созревания, обусловлены половой функцией яичников, которые стимулируются гонадотропными гормонами гипофиза.

Каждый из нескольких тысяч первичных фолликулов, расположенных в корковом веществе яичника, ко времени полового созревания состоит из ооцита первого порядка диаметром 25-30 мкм, окруженного одним слоем фолликулярных клеток. Ядро ооцита первого порядка остается в профазе первого



деления мейоза: ядрышко хорошо выражено, хромосомы вытянуты в тонкие нити. В таком виде они остаются, пока, спустя годы, не завершится мейоз. В цитоплазме ооцита можно наблюдать желточные зерна. В электронном микроскопе в цитоплазме ооцита видны обычные органеллы.

Примерно каждые 28 дней в яичнике половозрелой небеременной женщины развивается несколько фолликулов. Они увеличиваются в размере и приближаются к поверхности. Однако обычно только один из них созревает, прорывает поверхность яичника и высвобождает ооцит второго порядка.

Развитие зрелого фолликула связано с двукратным увеличением размеров ооцита и образованием блестящей оболочки (zona pellucida) вокруг него.

Стадия роста ооцита сопровождается активным делением фолликулярных клеток и накоплением фоллику-

лярной жидкости внутри фолликула. Когда фолликул разрывается, находящийся в нем ооцит второго порядка окружен фолликулярными клетками. Эти клетки формируют вокруг ооцита лучистый венец (corona radiata).

Период роста ооцита сопровождается образованием большого количества разных типов РНК. Для этого в клетке существуют разнообразные механизмы. Накопление рибосомной РНК и образование множества ядрышек, где происходит сборка и созревание субъединиц рибосом, обеспечивается механизмом *амплификации* генов. Амплификация рибосомных генов представляет собой процесс множественной редупликации участков ДНК, кодирующих рибосомную РНК. В результате такой локальной редупликации ДНК количество копий рибосомных генов увеличивается до 1-2 тысяч, и каждая из них является районом ядрышкового

организатора. В результате образуется более тысячи дополнительных ядрышек, где синтезируются и созревают рибосомные РНК, необходимые для сборки рибосом. Рибосомы, в свою очередь, необходимы для синтеза белка.

Быстрое увеличение количества разнообразных информационных РНК происходит за счет активации транскрипции в локально деспирализованных участках хромосом, когда хромосомы приобретают структуру "ламповых щеток". Такая структура характерна для созревающих ооцитов у многих видов животных (рис. 4.17). Известно, что начинается она проявляться в пахитене, а наиболее выражена в диплотене и диктиотене.

Увеличение количества разнообразных РНК обеспечивает накопление питательных веществ в цитоплазме ооцитов. Этому же процессу способствуют и фолликулярные клетки, образующие несколько слоев вокруг ооцита первого порядка.

Процесс овуляции предваряется быстрым завершением первого мейотического деления в ооците первого порядка. В результате образуются две гаплоидные клетки, окутанные лучистым венцом. Распределение цитоплазмы между ними происходит неравномерно: одна из дочерних клеток — ооцит второго порядка, — получает почти всю цитоплазму материнской клетки, тогда как на долю второй — первого полярного тельца — не достается почти ничего. Ооцит второго порядка вступает во второе мейотическое деление, но оно доходит только до стадии метафазы и останавливается до тех пор, пока не произойдет оплодотворение. (Отметим, что вероятность этого мала). Поскольку во время первого деления мейоза число хромосом сокращается вдвое, ооцит второго порядка, а



Рис. 4.17. Микрофотография хромосом типа "ламповых щеток"

следовательно, и яйцеклетка несет гаплоидный набор хромосом. Такой же набор хромосом имеет и первое полярное тельце. Общая схема оогенеза представлена на рисунке (рис. 4.18).

Таким образом, в отличие от образования спермиев, которое начинается у мужчин только при наступлении полового созревания, образование яйцеклеток у женщин начинается еще до рождения и завершается для каждой яйцеклетки только после ее оплодотворения. Созревающие ооциты пребывают в профазе первого мейоза долгие годы. Кроме того, у мужчин из одного диплоидного сперматоцита первого порядка образуется 4 гаплоидных сперматозоида, а у женщин — из одного диплоидного ооцита первого порядка образуется лишь одна зрелая гаплоидная яйцеклетка. То обстоятельство, что полярные тельца почти не получают цитоплазмы, позволяет ооциту снабдить зиготу полным набором цитоплазматических компонентов, таких, как митохондрии и расположенные определенным образом информационные РНК.

Оплодотворение

Оплодотворение — это сложный процесс, приводящий к слиянию яйцеклетки и сперматозоида, объедине-

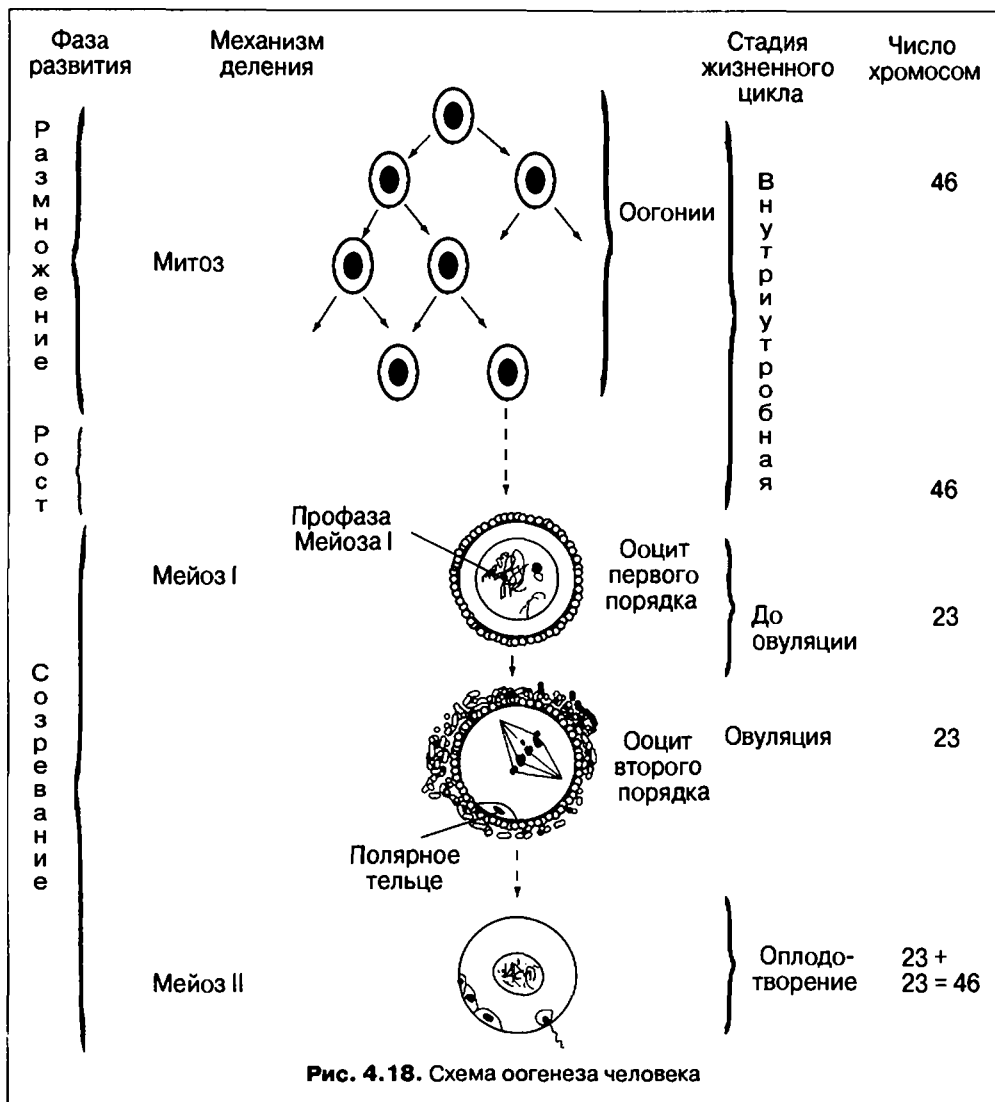


Рис. 4.18. Схема оогенеза человека

нию их ядер и образованию диплоидной зиготы, из которой впоследствии будет развиваться новый организм. Генетическое значение процесса оплодотворения состоит в объединении гаплоидных наборов хромосом отцовских и материнских гамет. Отличающаяся их высокая степень генетического разнообразия (несмотря на количе-

ственное постоянство хромосомного набора), обеспечивает генетическое разнообразие особей. В результате процесса оплодотворения восстанавливается диплоидность зиготы, что становится толчком к последующим митотическим делениям. У человека, как и у других млекопитающих, процесс оплодотворения, начинающийся

с проникновения сперматозоида в ооцит второго порядка, запускает механизм созревания яйцеклетки. Как уже говорилось выше, в ооците второго порядка второе мейотическое деление останавливается на стадии метафазы, а завершение развития яйцеклетки происходит только после оплодотворения.

Оплодотворение подразделяется на три последовательных этапа: в первом сперматозоид и яйцеклетка сближаются для возникновения контакта. Второй этап начинается с прикрепления сперматозоида к поверхности яйцеклетки и осуществления контактных взаимодействий между ними. События третьего периода разворачиваются после проникновения сперматозоида в яйцеклетку и завершается объединением их ядер.

Оплодотворение происходит в верхних концах фаллопиевых труб, куда сперматозоиды проходят из влагалища всего за несколько минут. Столь высокой скорости их движения способствуют активные сокращения матки и труб, инициируемые биологически активными соединениями, выделяющимися во время полового акта. Кроме того, на направленность движения сперматозоидов сильно влияет градиент pH среды в женских половых путях.

Жизнеспособность внутри организма сперматозоиды сохраняют в течение 1-3 суток, но период высокой фертильности длится лишь 12-24 часа. Сама способность к оплодотворению ооцита появляется только после того, как он проведет несколько часов в половых путях. За это время изменяются структура акросомы и свойства мембраны, ее ограничивающей.

Когда спермии скапливаются вокруг ооцита второго порядка, в головке одного из них происходит очень

быстрая (не более 20 секунд) акросомальная реакция. Она состоит в том, что мембраны головки спермия и акросомы разрываются, так что излившиеся наружу ферменты акросомы "переваривают" клеточные слои, окружающие ооцит, включая zona pellucida. Затем внутренняя мембрана акросомы выворачивается наизнанку, и спермий проникает внутрь ооцита. У человека сперматозоид входит в ооцит целиком (рис. 4.19).

После того, как один спермий проник в яйцеклетку, под ее мембраной разрываются многочисленные вакуоли, освобождая вещество, под действием которого zona pellucida утолщается и образует поверх яйцеклетки непроницаемую для спермиев преграду — оболочку оплодотворения. Так предотвращается проникновение в ооцит других спермиев. У человека проникновение сперматозоида в ооцит является сигналом для завершения второго мейотического деления, ведущего к образованию гаплоидной яйцеклетки и сопутствующих клеток — полярных телец, впоследствии дегенерирующих. В это же время в цитоплазме ооцита рассасывается хвост сперматозоида. Следующий этап процесса оплодотворения связан с объединением генетического материала яйцеклетки и сперматозоида в одно диплоидное ядро.

Высококонденсированное ядро сперматозоида начинает набухать, его хроматин разрыхляется, и ядро превращается в структуру, называемую мужским пронуклеусом. Аналогичные изменения происходят в женском ядре, что приводит к образованию женского пронуклеуса. В процессе формирования пронуклеусов и в мужском, и в женском ядре, происходит синтез ДНК ($1n\ 2C$), в результате чего каждая хромосома удваивается и состоит из

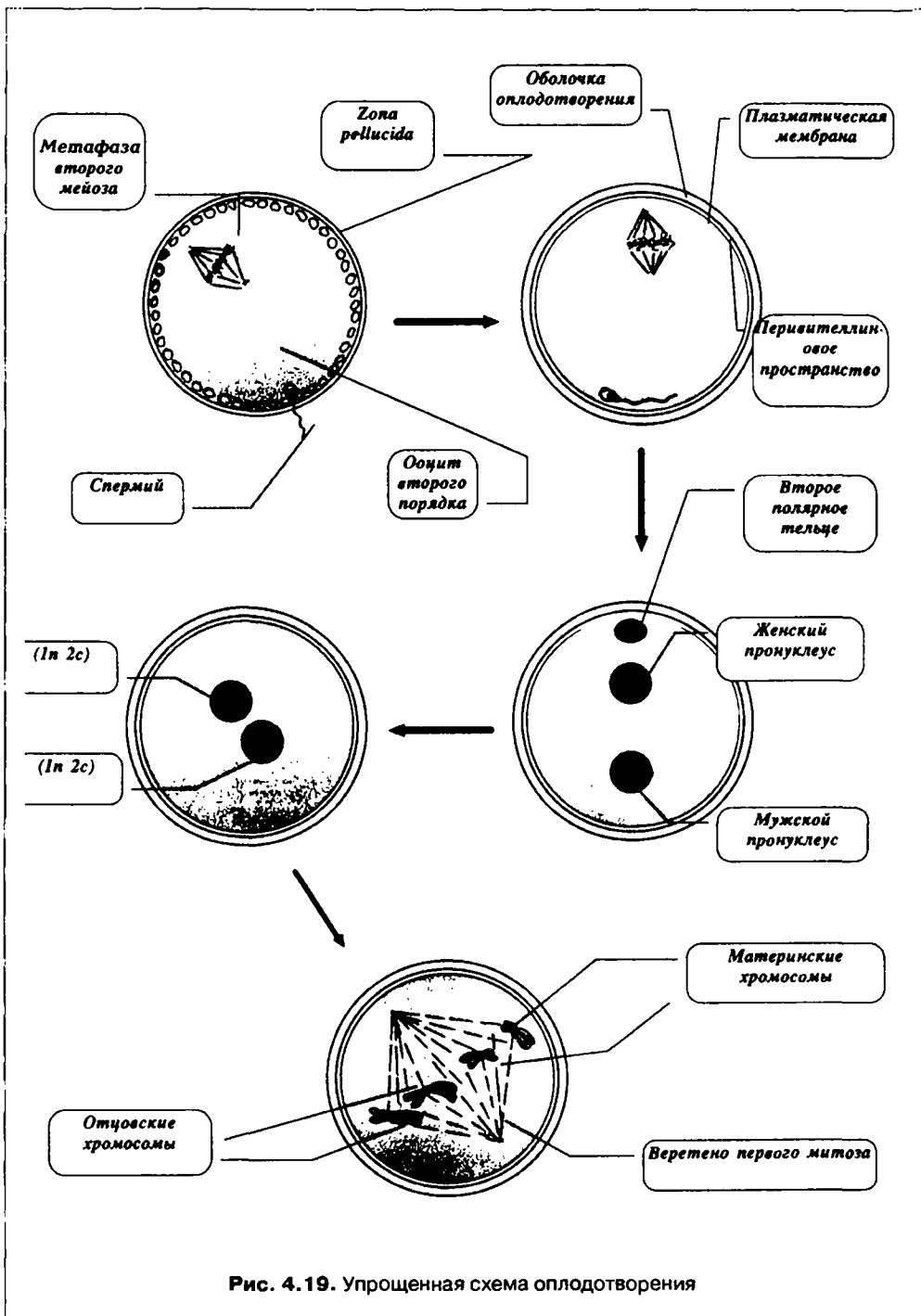


Рис. 4.19. Упрощенная схема оплодотворения

двух сестринских хроматид. После того, как репликация ДНК закончена, пронуклеусы перемещаются к центру яйцеклетки (рис. 4.19). Постепенно мембраны пронуклеусов разрушаются, а отцовские и материнские хромосомы, состоящие каждая из двух хроматид, прикрепляются к нитям сформировавшегося веретена деления. Затем хромосомы выстраиваются по экватору веретена, создавая характерную для метафазы митоза картину.

Объединение отцовских и материнских хромосом в общем митозе переводит оплодотворенную яйцеклетку в качественно новое состояние — зиготу. Зигота проходит стадии анафазы и телофазы и завершает свое первое митотическое деление. В результате образуются две дочерние диплоидные клетки — два бластомера. Генетический материал бластомеров представляет собой совокупность хромосом отца и матери: в каждой паре гомологичных хромосом одна хромосома отцовская, а другая — материнская.

Внехромосомное цитоплазматическое наследование

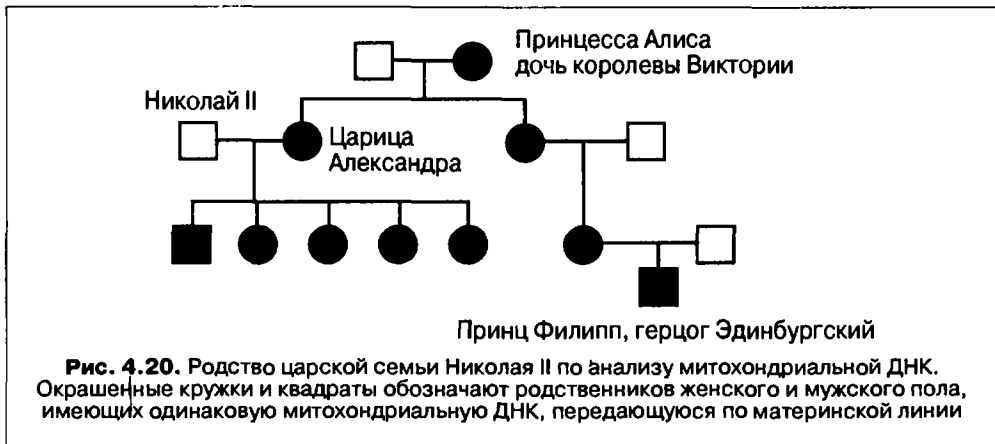
Хромосомная теория наследственности Т. Моргана — одна из основополагающих теорий генетики, но постепенно накапливающиеся факты приводили к представлению о существовании генов и вне хромосом, в цитоплазме. Такими носителями внехромосомной последовательности оказались митохондрии. Выяснилось, в частности, что цитоплазматическое наследование человека связано прежде всего с митохондриальной ДНК.

В организме человека митохондрии обеспечивают дыхание всех клеток, за исключением эритроцитов. Это самовоспроизводящиеся полуавтономные органеллы содержат кольцевые моле-

кулы ДНК. Имеют митохондрии и собственный аппарат белкового синтеза в виде рибосом, транспортных РНК и информационных РНК. Установлено, что аппарат белкового синтеза митондрий отличается от цитоплазматического: он более близок к аппарату белкового синтеза прокариот.

Как уже говорилось выше, в процессе оплодотворения человека участвуют две клетки: яйцеклетка и сперматозоид. Яйцеклетка — это крупная клетка с большим объемом цитоплазмы, в которой с помощью электронного микроскопа обнаруживают все органеллы, в том числе и множество митохондрий. Сперматозоид же, хотя и имеет упакованные специальным образом в области шейки четыре митохондрии, утрачивает их вскоре после того, как проникает внутрь яйцеклетки, поскольку его хвостовая часть быстро растворяется. Практически, в процессе оплодотворения принимает участие только ядро сперматозоида. Таким образом, диплоидная зигота, дающая начало новому организму, несет митохондрии, полученные только от яйцеклетки, т.е. все митохондрии во всех клетках любого индивида имеют материнское происхождение. Следовательно, генетический материал, локализованный в кольцевых молекулах митохондриальной ДНК, наследуется по материнской линии.

В настоящее время полностью расшифрована последовательность ДНК и выяснена организация генов в митохондриях человека. Геном митондрии представлен кольцевой молекулой ДНК, содержащей 16569 нуклеотидов. В его состав входят гены 12 S- и 16 S-рибосомной РНК, 22 различных тРНК, субъединицы I, II и III оксидазы цитохрома C, шесть субъединиц АТФ-синтетазы, цитохрома b и девять



других, пока неизвестных белков. В транскрибируемых и транслируемых областях цепей митохондриальной ДНК по сравнению с ядерной ДНК выявлено мало некодирующих участков. Установлено также, что по ряду характеристик генетический код митохондриальной ДНК человека отличается от универсального.

ДНК в митохондриях является материнской основой наследственности. Известно, что генетический материал в молекулах ДНК, способен мутировать. В митохондриях окислительные процессы, связанные с синтезом АТФ, сопровождаются образованием большого количества свободных радикалов, которые могут вызывать мутации в митохондриальной ДНК, а процесс репарации митохондриальной ДНК развит, вероятно, не так хорошо, как ДНК ядерной. Так, частота мутаций в митохондриальной ДНК примерно в 10 раз выше, чем в ядерной. Для митохондриальной ДНК известны точечные мутации, делеции, вставки и выпадения.

Встает естественный вопрос: может ли мутация в митохондриальной ДНК быть причиной наследственных заболеваний? Отличительным признаком

такой патологии должна служить ее передача от матери всем ее детям. Одни авторы считают, что подобный тип наследования маловероятен, поскольку каждый ооцит содержит множество митохондрий, и если в одной из них произошла мутация, то все другие остаются немутантами, и, следовательно, не должно быть никакого фенотипического эффекта. Но этот вопрос рассматривается учеными и с другой стороны. Один из подходов к изучению генома митохондрий основан на обработке их ДНК рестриктазами и исследовании полученных рестриктов — фрагментов кольцевой молекулы ДНК. В результате было показано, что митохондрии одного индивида генетически однородны. Кроме того, они способны с большой скоростью обмениваться между собой своими митохондриальными ДНК. Причина этого явления пока до конца не выяснена. Некоторыми исследователями установлено, что для митохондрий характерен динамический процесс слияния и дробления. Как, однако, при фрагментации митохондрий митохондриальная ДНК распределяется между фрагментами, неизвестно. На основе новейших исследований митохондриальной ДНК в ме-

дицине ныне формируется целая новая область — митохондриальная медицина. Ее основатели считают, что мутации в митохондриальной ДНК являются причиной более ста болезней: диабета, некоторых видов миопатии, кардиомиопатии, энцефаломиопатии, кислотного ацидоза, динамического нарушения мозгового кровообращения, эпилепсии и др.

Недавно обнаружено, что в редких случаях встречается отцовская наследственность митохондриальной ДНК. По-видимому, это возможно тогда, когда, после оплодотворения яйцеклетки, содержащий митохондрии хвост сперматозоида не лизируется.

Анализ рестриктов митохондриальной ДНК показал, что различные человеческие популяции отличаются друг от друга их составом. Это явление получило название полиморфизма митохондриальных ДНК в популяциях человека. Использование еще одного нового метода в исследованиях митохондриальной ДНК — ДНК-полимеразной реакции, — позволило использовать параметры митохондриальной ДНК для характеристики популяций человека и изучения филогенетически закономерностей в процессах развития. Оказалось также, что митохондриальная ДНК способна сохраняться в ископаемых останках на протяжении многих веков. В этом случае ее характеристики могут служить веским научным доказательством родства, как между популяциями, так и между индивидами. Так, идентификация царской семьи Николая II по ископаемым останкам была осуществлена на базе анализа именно митохондриальной ДНК (рис. 4.20). В процессе исследования установили общность митохондриальной ДНК из клеток крови здравствующего принца Филиппа гер-

цога Эдинбургского и митохондриальной ДНК, выделенной из останков царицы Александры Федоровны и трех ее дочерей. Все перечисленные лица являются родственниками по материнской линии — потомками принцессы Алисы, дочери королевы Виктории. Родословная этой семьи представлена на рисунке (рис. 4.20).

Тератология

Индивидуальное развитие организма начинается с момента оплодотворения. Сначала зигота делится митотически, затем следуют этапы пренатального развития: бластула, гаструла, нейруляция, имплантация в стенку матки, закладка и формирование органов и их систем, рост плода. Пренатальный период смеяется перинатальным, который начинается с 28 недели беременности, включает роды и заканчивается через 7 дней после рождения. Далее идет постнатальный период, вмещающий в себя всю жизнь человека до смерти.

В процессе индивидуального развития имеется ряд критических периодов, когда организм наиболее уязвим по отношению к действию различных факторов. В литературе, посвященной оценке токсического воздействия окружающей среды на человека, достаточно редко рассматривается проблема возникновения пороков развития, связанных с *тератогенными* факторами. Так называются факторы, которые, действуя в период беременности, приводят к возникновению врожденных пороков развития у детей, не вызывая нарушения наследственных структур.

По современным данным, не менее 182 тыс. веществ, искусственно введенных в окружающую среду человеком, в том числе и лекарственные препараты, обладают токсическим эффек-

том. Все исследователи единодушны в том, что беременным женщинам следует очень осторожно принимать медикаменты, поскольку большинство лекарственных препаратов и их метаболитов могут проходить через барьер плаценты. Уникальная особенность системы мать-плацента-плод заключается в одновременной циркуляции лекарственных веществ как в организме беременной женщины, так и в организме плода. Наиболее нежелательно использование лекарств в первой трети беременности, когда формируются зачатки органов. Возникновение врожденных пороков — это результат отклонений от нормального развития. Оно имеет клеточные основы. Развитие особи в эмбриогенезе сопряжено с активным делением клеток, морфогенетическим движением зародышевых листков, с дифференцировкой и органогенезом. Тератогенные факторы могут изменять способность клеток к размножению и перемещению, нарушать процесс обретения клетками определенной специализации. Основными механизмами развития пороков на тканевом уровне являются: гибель отдельных клеточных масс, замедление распада и рассасывания отмирающих клеток, нарушение взаимодействия между тканями. В результате тот или иной орган недоразвивается или развивается неправильно. Примерами могут служить смещение устья аорты, ведущее к врожденному пороку сердца, целая группа уродств, связанных с незакрытием нервной трубки.

Для ранних стадий эмбриогенеза известны так называемые критические периоды, в которых тот или иной развивающийся орган особо чувствителен к определенным воздействиям. Краснуха женщины между 3-й и 9-й неделями беременности резко повышает

вероятность развития у плода порока сердца, катаракты, глухоты. В более поздние сроки эта болезнь таких последствий не дает. Сходное тератогенное действие предполагается у других вирусных инфекций: гриппа, оспы, паратита.

Относительно недавно был выявлен новый тератоген: — 13-цис-ретиновая кислота (аналог витамина А). Этот препарат широко использовался для лечения угрей. Ранее было показано, что аналоги витамина А могут вредно влиять на беременность лабораторных животных, поэтому этикетка препарата предупреждала, что им не должны пользоваться беременные женщины. Однако не все будущие мамы вняли предупреждению, в результате из 59 обследованных в группе риска беременностей 26 плодов родились здоровыми, 12 были спонтанно абортированы и 21 из новорожденных имели уродства. Последующие исследования показали, что критическим периодом для ретиновой кислоты являются 20-35 сутки после оплодотворения.

Другим, пожалуй, самым известным примером лекарственного химического тератогена стал талидомид — широко используемый как успокоительное средство в 60-х гг. XX в. транквилизатор. Для него тератогенным является период от 20 до 36 суток после оплодотворения. В зависимости от срока, на котором принимался талидомид, возникали такие уродства, как отсутствие или деформация ушей или больших пальцев на руках, отсутствие или резкое укорочение рук, ног, смещение бедра. Трагедия с талидомидом привела к рождению более 7000 искалеченных детей. Только после этого жестокого урока началась разработка схемы проверки лекарственных препаратов на

Тератология

тератогенный эффект. Тем не менее в интересах здоровья будущего ребенка следует проявлять крайнюю осторожность и, по возможности, вообще отказаться от приема лекарственных препаратов, особенно в первом триместре беременности.

К препаратам, способным вызывать врожденные пороки развития, относятся транквилизаторы, противосудорожные, гормональные и противоопухолевые средства. Стероидные гормоны, входящие в состав многих контрацептивов, которые женщины могут принимать, не зная о наличии беременности, также относятся к факторам риска для развивающегося плода.

Использование лекарств на более поздних сроках развития плода обычно не вызывает уродств, но может нарушить процессы приспособления новорожденного к новым для него условиям среды.

Широко применяемые в промышленности и сельском хозяйстве бензол, фенолы, хлоропрен, формальдегид, ядохимикаты, а также свинец и пары ртути обладают выраженным токсиче-

ским действием. Они могут вызвать самопроизвольный аборт, внутриутробную смерть плода или рождение ослабленного ребенка.

Тератогенными могут стать не только химические и биологические, но и физические факторы. В том числе различные излучения, гипо- и гипертермия, гипо- и гипероксия.

Поскольку тератогенные факторы не нарушают генетических структур, то такие пороки развития не наследуются. Риск повторного рождения больного ребенка с аналогичным пороком предельно мал.

Вопросы для самоконтроля

1. В чем значение митоза в передаче наследственной информации?
2. Назовите две причины генетической рекомбинации в мейозе.
3. Укажите отличия спермато- и оогенеза.
4. Поясните значение процесса оплодотворения.
5. Что такое внехромосомная цитоплазматическая наследственность? В чем ее материальная основа?
6. Что вы знаете о тератогенных факторах? Почему они наиболее опасны в критические периоды развития эмбриона?

Глава 5. КЛАССИЧЕСКИЕ ТИПЫ НАСЛЕДОВАНИЯ У ЧЕЛОВЕКА

Менделирующие признаки

Всем эукариотическим организмам присущи открытые Г. Менделем общие закономерности наследования признаков. Для их изучения необходимо вспомнить основные термины и понятия, используемые в генетике. Главный постулат Менделя, который он доказал в своих известных экспериментах на горохе огородной, состоит в том, что каждый признак определяется парой наследственных задатков, позже получивших название аллельных генов. С развитием хромосомной теории наследственности выяснилось, что аллельные гены находятся в одинаковых локусах гомологичных хромосом и кодируют один и тот же признак. Пара аллельных генов может быть одинакова (AA или aa), тогда говорят, что особь гомозиготна по данному признаку. Если же аллельные гены в паре разные (Aa), то особь по данному признаку гетерозиготна. Совокупность генов данного организма называется генотипом. Правда часто под генотипом понимают одну или несколько пар аллельных генов, которые отвечают за один и тот же признак. Совокупность признаков данного организма называют фенотипом, фенотип формируется в результате взаимодействия генотипа с внешней средой.

Г. Мендель ввел понятия доминантных и рецессивных генов. Аллель, который определяет фенотип гетерозиготы, он назвал доминантным. Например, ген A в гетерозиготе Aa . Другой аллель, не проявляющий себя в гетерозиготном состоянии, назван им рецессивным. В нашем случае это ген a .

Основные закономерности наследования признаков по Менделю (законы единообразия гибридов первого поколения, расщепления на фенотипические классы гибридов второго поколения и независимого комбинирования генов) реализуются благодаря существованию закона чистоты гамет. Суть последнего состоит в том, что пара аллельных генов, определяющая тот или иной признак: а) никогда не смешивается; б) в процессе гаметогенеза расходится в разные гаметы, то есть в каждую из них попадает один ген из аллельной пары. Цитологически это обеспечивается мейозом: аллельные гены лежат в гомологичных хромосомах, которые в анафазе мейоза расходятся к разным полюсам и попадают в разные гаметы.

Генетика человека опирается на общие принципы, полученные первоначально в исследованиях на растениях и животных. Как и у них, у человека имеются менделирующие, т.е. наследуемые по законам, установленным Г. Менделем, признаки. Для человека, как и для других эукариот, характерны все типы наследования: аутосомно-доминантный, аутосомно-рецессивный, наследование признаков, сцепленных с половыми хромосомами, и за счет взаимодействия неаллельных генов. Разработал Г. Мендель и основной метод генетики — гибридологический. Он основан на скрещивании особей одного вида, обладающих альтернативными признаками, и количественном анализе полученных фенотипических классов. Естественно, этот метод не может использоваться в генетике человека.

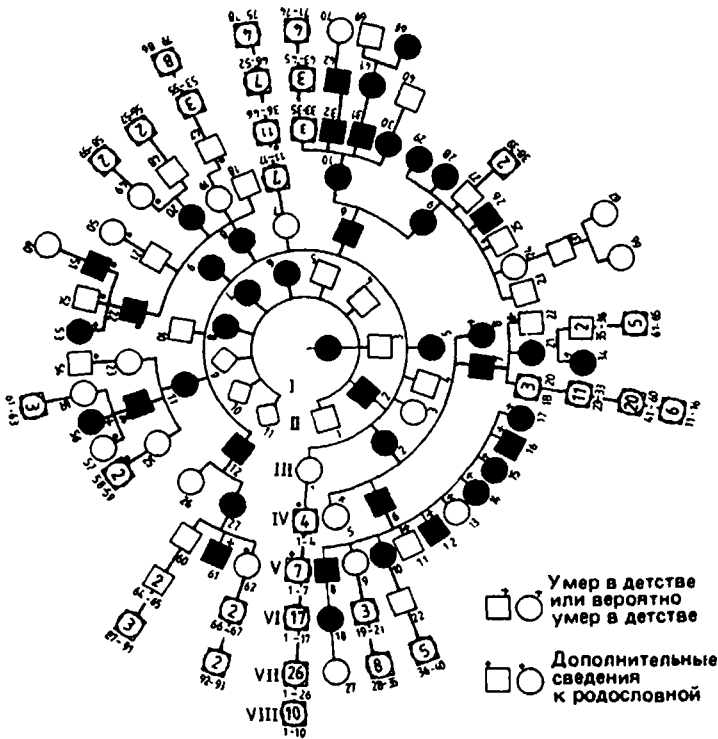


Рис. 5.1. Родословная с брахидактилией. Обозначения: черные фигуры – пораженные женщины и мужчины; римские цифры – номера поколений; арабские цифры: под фигурами – последовательные номера в родословной, внутри фигур – количество детей

Отчасти в противовес ему в генетике человека существуют наиболее давний ее метод – клинико-генеалогический анализ наследственности (см. главу 2).

Первое описание **аутосомно-доминантного** наследования аномалий у человека дано в 1905 г. Фараби. Родословная была составлена для семьи с короткопалостью (брахидактилией). У больных укорочены и частично редуцированы фаланги пальцев рук и ног, кроме того, в результате укорочения конечностей, для них характерен низкий рост. На рис. 5.1 показана родословная с 44 пораженными, на рис. 5.2 – фенотипическое

проявление признака. Признак передается от одного из родителей примерно половине детей, независимо от пола. Анализ родословных других семей свидетельствует, что брахидактилия отсутствует среди потомства родителей, не являющихся носителями данного гена. Поскольку признак не может существовать в скрытом виде, следовательно, он является доминантным. А его проявления, независимо от пола, позволяют заключить, что он не сцеплен с полом. На основании изложенного можно сделать вывод, что брахидактилия определяется геном, находящимся в аутосомах, и является доминантной патологией.



Рис. 5.2. Фенотипическое проявление брахидактилии у одной из представительниц родословной Фараби

Использование генеалогического метода позволило выявить доминантные, не сцепленные с полом признаки у человека. Это — темный цвет глаз, вьющиеся волосы, переносица с горбишкой, прямой нос (кончик носа смотрит прямо), ямочка на подбородке, раннее облысение у мужчин, праворукость, способность свертывать язык в трубочку, белый локон надо лбом, “габсбургская губа” — нижняя челюсть узкая, выступающая вперед, нижняя губа отвислая и полуоткрытый рот. По аутосомно-доминантному типу наследуются также некоторые патологические признаки человека: полидактилия или многопалость (когда на руке или ноге имеется от 6 до 9 пальцев), синдактилия (сращение мягких или костных тканей фаланг двух и более пальцев), брахидактилия (недоразвитость дистальных фаланг пальцев, приводящая к короткопалости), арахнодактилия (сильно удлиненные “паучьи” пальцы, один из симптомов синдрома Марфана), некоторые формы близорукости. Большинство носителей ауто-

сомно-доминантной аномалии являются гетерозиготами. Иногда случается, что два носителя одной и той же доминантной аномалии вступают в брак и имеют детей. Тогда четверть из них будут гомозиготами по мутантному доминантному аллелю (AA). Многие случаи из медицинской практики указывают на то, что гомозиготы по доминантным аномалиям поражены тяжелее, чем гетерозиготы. Например, в браке между двумя носителями брахидактилии родился ребенок, у которого не только не доставало пальцев на руках и ногах, но и имелись множественные уродства скелета. Он умер в возрасте одного года. Другой ребенок в этой семье был гетерозиготным и имел обычные симптомы брахидактилии.

Аутосомно-рецессивные менделирующие признаки у человека определяются генами, локализованными в аутосомах, и могут проявиться у потомства в браке двух гетерозигот, двух рецессивных гомозигот или гетерозиготы и рецессивной гомозиготы. Исследования показывают, что большинство браков, среди потомков которых наблюдаются рецессивные заболевания, происходит между фенотипически нормальными гетерозиготами ($Aa \times Aa$). В потомстве такого брака генотипы AA, Aa и aa будут представлены в соотношении 1:2:1, и вероятность того, что ребенок окажется пораженным, составит 25%. По аутосомно-рецессивному типу наследуются мягкие прямые волосы, курносый нос, светлые глаза, тонкая кожа и резус-отрицательная первая группа крови, многие болезни обмена веществ: фенилкетонурия, галактоземия, гистидинимия и др., а также пигментная ксеродерма.

Пигментная ксеродерма — одно из рецессивных заболеваний — относительно недавно привлекла внимание

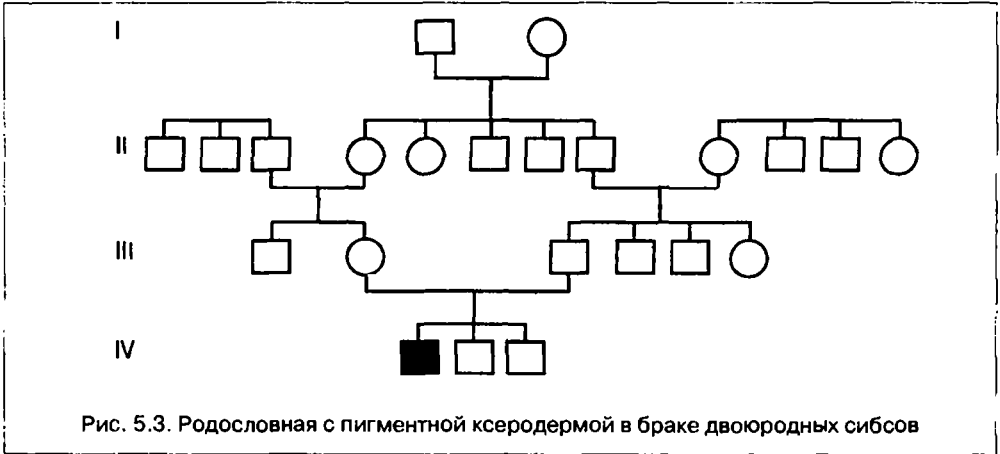


Рис. 5.3. Родословная с пигментной ксеродермой в браке двоюродных сибсов

молекулярных биологов. Эта патология обусловлена неспособностью клеток кожи больного репарировать повреждения ДНК, вызванные ультрафиолетовым излучением. В результате развивается воспаление кожи, особенно на лице, с последующей атрофией. Наконец, развивается рак кожи, приводящий в отсутствие лечения к летальному исходу. На рис. 5.3 представлена типичная родословная, в которой родители являются двоюродными сибсами. У больных редким рецессивным заболеванием степень кровного родства между родителями обычно значительно выше среднего уровня в популяции. Как правило, родители наследуют этот ген от общего предка и являются гетерозиготами. Подавляющее большинство больных аутосомно-рецессивными заболеваниями — это дети двух гетерозигот.

Помимо аутосомно-доминантного и аутосомно-рецессивного типов наследования у человека выявляются также **неполное доминирование, кодоминирование и сверхдоминирование.**

Неполное доминирование связано с промежуточным проявлением признака при гетерозиготном состоянии аллелей (Aa). Например, большой нос

определяется двумя аллелями AA , маленький нос — аллелями aa , нормальный нос средних размеров — Aa . По типу неполного доминирования у человека наследуются выпуклость губ и размеры рта и глаз, расстояние между глазами.

Кодоминирование — это такое взаимодействие аллельных генов, при котором в гетерозиготном состоянии оказываются и работают вместе два доминантных гена одновременно, то есть каждый аллель детерминирует свой признак. Наиболее удобно рассмотреть кодоминирование на примере наследования групп крови.

Группы крови системы АВО определяются тремя аллелями: А, В и О. Причем аллели А и В являются доминантными, а аллель О — рецессивным. Парное сочетание этих трех аллелей в генотипе дает четыре группы крови. Аллельные гены, определяющие группы крови, находятся в девятой паре хромосом человека и обозначаются соответственно: I^A , I^B и I^O . Первая группа крови определяется наличием в генотипе двух рецессивных аллелей $I^O I^O$. Фенотипически это проявляется наличие в сыворотке крови антител α и β . Вторая группа крови может опреде-

ляться двумя доминантными аллелями I^A , если человек гомозиготен, или аллелями $I^A i$, если он гетерозиготен. Фенотипически вторая группа крови проявляется наличием на поверхности эритроцитов антигенов группы А и присутствием в сыворотке крови антител β . Третья группа определяется функционированием аллеля В. И в этом случае генотип может быть гетерозиготен ($I^B i$) или гомозиготен ($I^B I^B$). Фенотипически у людей с третьей группой крови на поверхности эритроцитов выявляются антигены В, а фракции белков крови содержат антитела α . Люди с четвертой группой крови сочетают в генотипе два доминантных аллеля АВ ($I^A I^B$), причем оба они функционируют: поверхность эритроцитов несет оба антигена (А и В), а сыворотка крови во избежание агглютинации соответствующих сывороточных белков α и β не содержит. Таким образом люди с четвертой группой крови являют примеры кодоминирования, поскольку у них одновременно работают два доминантных аллельных гена.

С развитием методов генетического анализа на уровне белков у человека было открыто множество примеров кодоминирования. Первые случаи описаны при изучении групп крови системы MN. В ходе обследования сотен семей проводился статистический анализ наследования этих групп крови. Оказалось, что у родителей с группами крови М рождаются дети только с такой же группой крови. Аналогичны закономерности для семей с группой крови N: дети в них повторяют группу крови родителей — N. То есть обладатели групп крови М и N могут быть только гомозиготными: MM и NN. В семьях же, где родители имеют группы крови М и N, у всех детей группа кро-

ви — MN, причем оба доминантных аллеля М и N функционируют вместе.

По такому же типу наследуются многие функциональные белки и ферментные системы человека. Наследование по типу кодоминирования тесно связано с проблемой множественного аллелизма. Фенотипическое проявление каждого менделирующего признака основано на взаимодействии в генотипе двух аллельных генов. Однако количество аллелей в человеческих популяциях далеко не всегда равно двум. Для групп крови системы MN их два, а для групп крови системы ABO существует не два, а три аллеля: А, В и О. По несколько аллелей известно для гемоглобина и для многих ферментных систем. Сколько бы аллелей ни существовало в популяции, признак в конкретном организме определяется сочетанием только двух из них. В генотипе они могут взаимодействовать между собой по типу полного доминирования; неполного доминирования или кодоминирования. Явление множественного аллелизма определяет фенотипическую гетерогенность человеческих популяций, это одна из основ разнообразия генофонда человека. В основе этой множественности лежат генные мутации, изменяющие последовательность азотистых оснований молекулы ДНК в участке, соответствующем данному гену. Эти мутации могут быть нейтральными, полезными, или вредными. Последние являются причиной наследственных патологий, связанных с множественным аллелизмом. Например, известна мутация, изменяющая структуру одной из цепей белка гемоглобина за счет того, что код глутаминовой кислоты в конечном участке гена трансформируется в код аминокислоты валин. Эта замена становится причиной возникновения на-

следственной патологии — серповидноклеточной анемии.

Явление сверхдоминирования связано с тем, что в ряде случаев доминантные гены в гетерозиготном состоянии проявляются сильнее, чем в гомозиготном. Это понятие коррелирует с эффектом гетерозиса и связано с такими сложными признаками, как жизнеспособность, общая продолжительность жизни и др.

Таким образом, у человека, как и у остальных эукариот, известны все типы взаимодействия аллельных генов и большое количество менделирующих признаков, определяемых этими взаимодействиями. Используя менделевские законы наследования, можно рассчитать вероятность рождения детей с теми или иным моделирующими признаками.

Наиболее удобным методическим подходом к анализу наследования признаков в нескольких поколениях является генеалогический метод, основанный на построении родословных.

Взаимодействие генов

До сих пор мы рассматривали только признаки, контролируемые моногенно. Однако на фенотипическое проявление одного гена обычно влияют другие гены. Зачастую признаки формируются при участии нескольких генов, взаимодействие между которыми отражается в фенотипе.

Примером сложного взаимодействия генов могут служить закономерности наследования системы резус-фактор: резус плюс (Rh^+) и резус минус (Rh^-). В 1939 г. при исследовании сыворотки крови женщины, родившей мертвый плод и имевшей в анамнезе переливание совместимой по АВО группе крови мужа, были обнаружены особые антитела, сходные с получае-

мыми при иммунизации экспериментальных животных эритроцитами макаки-резус. Выявленные у большой антитела получили название резус-антител, а ее группа крови — резус-отрицательной. Группа крови резус-положительная определяется присутствием на поверхности эритроцитов особой группы антигенов, кодируемых структурными генами, несущими информацию о мембранных полипептидах. Гены, определяющие резус-фактор, находятся в первой паре хромосом человека. Резус-положительная группа крови является доминантной, резус-отрицательная — рецессивной. Резус-положительные люди могут быть гетерозиготными (Rh^+/Rh^-) или гомозиготными (Rh^+/Rh^+). Резус-отрицательные — только гомозиготными (Rh^-/Rh^-).

Позже выяснилось, что антигены и антитела резус фактора имеют сложную структуру и состоят из трех компонентов. Условно антигены резус-фактора обозначают буквами латинского алфавита С, D, Е. На основе анализа генетических данных о наследовании резус-фактора в семьях и популяциях была сформулирована гипотеза о том, что каждый компонент резус-фактора определяется своим геном, что эти гены сцеплены вместе в один locus и имеют общий оператор или промотор, который регулирует их количественную экспрессию. Поскольку антигены обозначаются буквами С, D, Е, то такими же строчными буквами обозначают гены, отвечающие за синтез соответствующего компонента. Генетическая структура Rh-комплекса показана на рис. 5.4, где известные к настоящему времени антигены обозначены буквами (антиген d пока не обнаружен).

Генетические исследования в семьях показывают возможность кроссинго-

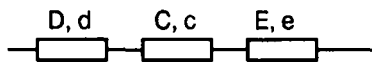


Рис. 5.4. Гипотетическое расположение генов, определяющих резус-фактор

вера между тремя генами в локусе резус-фактора у гетерозигот. Популяционные исследования выявили разнообразные фенотипы: CDE, CDe, cDE, cDe, Cde, cDE, cde. Взаимодействия между генами, определяющими резус-фактор, сложные. По всей видимости, главным фактором, определяющим резус-антиген, является антиген D. Он обладает гораздо большей иммуногенностью, чем антигены C и E. Решающая роль D-антигена в формировании фенотипического проявления резус-фактора хорошо видна при анализе родословных (рис. 5.5). Отрицательный резус-фактор выявляется у людей с генотипом d/d, положительный — у людей с генотипом DD и D/d. У гетерозигот CDe/Cde и Cde/cDe с сочетанием генов Cde в резус-локусе экспрессия фактора D изменяется, в результате чего формируется фенотип D^u со слабой реакцией в ответ на введение резус-положительных антигенов. Следовательно, работа генов в резус локусе может регулироваться ко-

личественно, и фенотипическое проявление резус-фактора у резус-положительных людей бывает различным: большим или меньшим.

Несовместимость по резус-фактору плода и матери способна стать причиной развития патологии у плода или самопроизвольного выкидыша на ранних сроках беременности. С помощью специальных чувствительных методов удалось выявить, что во время родов около 1 мл крови плода может попадать в кровоток матери. Если мать — резус-отрицательная, а плод — резус-положительный, то после первых родов мать будет сенсibilизирована к резус-положительным антигенам. При последующих беременностях резус-несовместимым плодом титр анти-Rh-антител в ее крови может резко возрасти, и под влиянием их разрушающего действия у плода возникает характерная клиническая картина гемолитической патологии, выражающейся в анемии, желтухе или водянке.

В классической генетике наиболее изученными являются три типа взаимодействия неаллельных генов: эпистаз, комплементарность и полимерия. Они определяют многие наследуемые признаки человека.

Эпистаз — это такой тип взаимодействия неаллельных генов, при котором одна пара аллельных генов подавляет действие другой пары. Различают эпистаз доминантный и рецессивный. Доминантный эпистаз проявляется в том, что доминантный аллель в гомозиготном (AA) или гетерозиготном (Aa) состоянии подавляет проявление другой пары аллелей. При рецессивном эпистазе ингибирующий ген в рецессивном гомозиготном состоянии (aa) не дает возможность проявиться эпистатируемому гену. Подавляющий ген называют супрессором или ингибито-

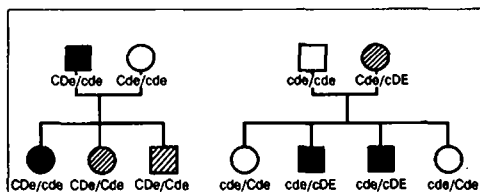


Рис. 5.5. Родословные по резус-фактору. Обозначения: незакрашенные фигуры — D — отрицательная кровь; черные фигуры — D — положительная кровь; заштрихованные фигуры — слабая реакция (D^u — вариант)

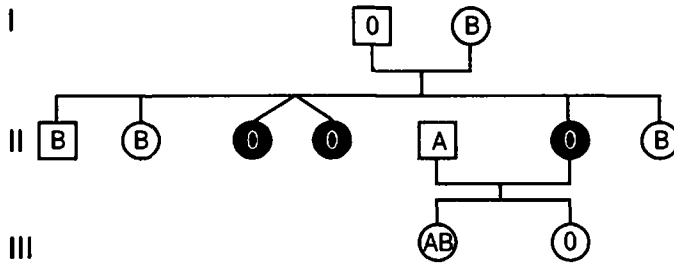


Рис. 5.6. Родословная по “бомбейскому феномену”. Обратите внимание, что мать (II,6) с группой крови 0 имеет ребенка с группой крови АВ (III, 1)

ром, а подавляемый — гипостатическим. Этот тип взаимодействия наиболее характерен для генов, участвующих в регуляции онтогенеза и иммунных систем человека.

Примером рецессивного эпистаза у человека может служить “бомбейский феномен”. В Индии была описана семья, в которой родители имели вторую (АО) и первую (ОО) группу крови, а их дети — четвертую (АВ) и первую (ОО) (рис. 5.6). Чтобы ребенок в такой семье имел группу крови АВ, мать должна иметь группу крови В, но никак ни О. Позже было выяснено, что в системе групп крови АВО имеются рецессивные гены-модификаторы, которые в гомозиготном состоянии подавляют экспрессию антигенов на поверхности эритроцитов. Например, человек с третьей группой крови должен иметь на поверхности эритроцитов антиген группы В, но эпистатирующий ген-супрессор в рецессивном гомозиготном состоянии (h/h) подавляет действие гена В, так что соответствующие антигены не образуются, и фенотипически проявляется группа крови О. Описанный локус гена-супрессора не сцеплен с локусом АВО. Гены-супрессоры наследуются независимо от генов, определяющих группы крови

АВО. Бомбейский феномен имеет частоту 1 на 13 000 среди индусов, говорящих на языке махарати и живущих в окрестностях Бомбея. Он распространен также в изоляте на острове Режуньон. По-видимому, признак детерминирован нарушением одного из ферментов, участвующих в синтезе антигена.

Комплементарность — это такой тип взаимодействия, при котором за признак отвечают несколько неаллельных генов, причем разное сочетание доминантных и рецессивных аллелей в их парах изменяет фенотипическое проявление признака. Но во всех случаях, когда гены расположены в разных парах хромосом, в основе расщеплений лежат цифровые законы, установленные Менделем.

Так, чтобы человек имел нормальный слух, необходима согласованная деятельность нескольких пар генов, каждый из которых может быть представлен доминантными или рецессивными аллелями. Нормальный слух развивается только в том случае, если каждый из этих генов имеет хотя бы один доминантный аллель в диплоидном наборе хромосом. Если хотя бы одна пара аллелей представлена рецессивной гомозиготой, то человек будет глухим. Поясним сказанное простым

примером. Предположим, что нормальный слух формирует пара генов. В этом случае людям с нормальным слухом присущи генотипы $AABB$, $AABb$, $AaBB$, $AaBb$. Наследственная глухота определяется генотипами: $aabb$, $Aabb$, $Aabb$, $aaBb$, $aaBB$. Используя законы Менделя для дигибридного скрещивания, легко рассчитать, что глухие родители ($aaBB$ x $AAbb$) могут иметь детей с нормальным слухом ($AaBb$), а нормально слышащие родители при соответствующем сочетании генотипов ($AaBb$ x $AaBb$) с высокой долей вероятности (более 40%) — глухих детей:

P: $AaBb$ x $AaBb$

F₁: $9A-B- : 3A-bb : 3aaB- : 1aabb$

слышащие

глухие

9

7

Полимерия — обусловленность определенного признака несколькими парами неаллельных генов, обладающих одинаковым действием. Такие гены называются полимерными. Если число доминантных аллелей влияет на степень выраженности признака, полимерия именуется кумулятивной. Чем больше доминантных аллелей, тем более интенсивно выражен признак. По типу кумулятивной полимерии обычно наследуются признаки, которые можно выразить количественно: цвет кожи, цвет волос, рост.

Цвет кожи и волос человека, а также цвет радужной оболочки глаз обеспечивает пигмент меланин. Формируя окраску покровов, он предохраняет организм от воздействия ультрафиолетовых лучей. Существует два типа меланинов: эумеланин (черный и темно-коричневый) и феумеланин (желтый и рыжий). Меланин синтезируется в клетках из аминокислоты тирозина в

несколько этапов. Регуляция синтеза осуществляется многими путями и зависит, в частности, от скорости деления клеток. При ускорении митозов клеток в основании волоса образуется феумеланин, а при замедлении — эумеланин. Описаны некоторые формы злокачественного перерождения клеток кожного эпителия, сопровождающиеся накоплением меланина (меланомы).

Все цвета волос, за исключением рыжих, составляют непрерывный ряд от темного до светлого (соответственно уменьшению концентрации меланина) и наследуются полигенно по типу кумулятивной полимерии. Считается, что эти различия обусловлены чисто количественными изменениями в содержании эумеланина. Цвет рыжих волос зависит от наличия феумеланина. Окраска волос обычно меняется с возрастом и стабилизируется с наступлением половой зрелости.

Цвет радужной оболочки глаз определяют несколько факторов. С одной стороны, он зависит от присутствия гранул меланина, а с другой — от характера отражения света. Черный и коричневый цвета обусловлены многочисленными пигментными клетками в переднем слое радужной оболочки. В светлых глазах содержание пигмента значительно меньше. Преобладание голубого цвета в свете, отраженном от переднего слоя радужной оболочки, не содержащей пигмента объясняется оптическим эффектом. Различное содержание пигмента, определяет весь диапазон цвета глаз.

По типу кумулятивной полимерии наследуется также пигментация кожи человека. На основе генетических исследований семей, члены которых имеют разную интенсивность кожной пигментации, предполагается, что цвет

кожи человека определяют три или четыре пары генов.

Полимерные гены, как правило, обозначают одинаковыми буквами, чтобы подчеркнуть однонаправленность их действия. При формировании признака не важно, какой паре генов принадлежат доминантные аллели, важно их количество. В таком случае генотип негра условно можно записать АААААА, а генотип белого — аааааа. Светлокожие негры будут иметь генотип АААААа, АаАААА, или другие сочетания А и а. Мулатам соответствует генотип АаАаАа, причем, чем больше количество а, тем светлее их кожа. Если упростить задачу и обозначить генотип, определяющий цвет кожи человека не тремя парами генов, а двумя, то легко убедиться, что в браке людей с противоположным цветом кожи все дети будут мулатами:

Р: АААА х аааа

Г₁: АаАа — мулаты

В браке двух мулатов АаАа х АаАа вероятно рождение детей с разным цветом кожи

- негры (АААА), 1\16
- светлокожие негры (АААа), 4\16
- мулаты (АаАа), 6\16
- светлокожие мулаты (Аааа), 4\16
- белые (аааа), 1\16.

Таким образом, с определенной долей вероятности родители могут иметь детей с более светлой или более темной, чем у них, кожей, более светлыми или более темными волосами и глазами. Поскольку и рост наследуется по типу кумулятивной полимерии, то дети могут быть и выше, и ниже, чем родители.

Признание принципа взаимодействия генов наводит на мысль о том, что все гены так или иначе взаимосвязаны

в своем действии. Если один ген вызывает влияние на работу других генов, то он может влиять на проявление не только одного, но и нескольких признаков. Такое множественное действие гена называют **плейотропией**. Наиболее ярким примером плейотропного действия гена у человека является синдром Марфана, уже упоминавшаяся аутосомно-доминантная патология. Арахнодактилия (“паучьи” пальцы) — один из симптомов синдрома Марфана. Другими симптомами являются высокий рост из-за сильного удлинения конечностей, гиперподвижность суставов, ведущий к близорукости, подвывих хрусталика и аневризм аорты. Синдром с одинаковой частотой встречается у мужчин и женщин. В основе указанных симптомов лежит дефект развития соединительной ткани, возникающий на ранних этапах онтогенеза и приводящий к множественным фенотипическим проявлениям.

Плейотропным действием обладают многие наследственные патологии. Определенные этапы метаболизма обеспечивают гены. Продукты метаболических реакций, в свою очередь регулируют, а возможно, и контролируют другие метаболические реакции. Поэтому нарушения метаболизма на одном этапе отразятся на последующих этапах, так что нарушение экспрессии одного гена окажет влияние на несколько элементарных признаков.

Наследственность и среда

Фенотипическое проявление признака определяется генами, отвечающими за этот признак, взаимодействием детерминирующих с другими генами и условиями внешней среды. Следовательно, степень фенотипической выраженности детерминированного признака (экспрессивность) может

изменяться: усиливаться или ослабляться. Для многих доминантных признаков характерно, что ген проявляется у всех гетерозигот, но в разной степени. Многие доминантные заболевания обнаруживают значительную индивидуальную изменчивость и по возрасту начала, и по тяжести проявления, и внутри одной семьи, и в разных семьях.

В ряде случаев признак может вообще не выражаться фенотипически, несмотря на генотипическую предопределенность. Частота фенотипического проявления данного гена среди его носителей называется пенетрантностью и выражается в процентах. Пенетрантность бывает полной, если признак проявляется у всех носителей данного гена (100%), и неполной, если признак проявляется только у части носителей. В случае неполной пенетрантности иногда при передаче признака одно поколение пропускается, хотя лишенный его индивид, судя по родословной, должен быть гетерозиготным. Пенетрантность — это статистическое понятие. Оценка ее величины часто зависит от применяемых методов обследования.

Понятия пенетрантности и экспрессивности можно рассмотреть на примере аутосомно-доминантного признака — полидактилии (многопалости). У гетерозигот фенотипическое его проявление варьирует. Пенетрантность может отсутствовать (0%), то есть признак не проявляется, и, несмотря на генетическую предопределенность, количество пальцев на руках и ногах равно 5. В то же время у других гетерозигот признак проявляется, но степень его выраженности у разных лиц различна. Количество пальцев на руках и ногах бывает у разных индивидуумов соответственно: 5,5 — 6,6; 5,6 — 5,7; 6,6 —

6,6 и т.д. В этом случае говорят о варьирующей экспрессивности.

Иногда тяжелое доминантное заболевание проявляется только во время или после репродуктивного периода. Классический пример — хорея Гентингтона, дегенеративное заболевание нервных клеток в базальных ганглиях, приводящее к произвольным движениям, изменениям личности и постепенно нарастающему слабоумию. Исследование 802 случаев хорей Гентингтона в Западной Германии показало, что возраст начала проявления болезни варьирует от 6 до 76 лет, но максимум соответствует возрастным границам от 26 до 60 лет (93,5%). Таким образом, пенетрантность хорей Гентингтона увеличивается с возрастом.

Учитывая экспрессивность и пенетрантность, генетический анализ признака проводят, используя обширные родословные.

Генетика пола

Из 46 хромосом (23 пары) в кариотипе человека 22 пары одинаковы у мужчин и женщин (аутосомы), а одна пара, называемая половой, у разных полов отличается: у женщин — XX, у мужчин — XY (см. главу 3). Половые хромосомы представлены в каждой соматической клетке индивида. При образовании гамет во время мейоза гомологичные половые хромосомы расходятся в разные половые клетки. Следовательно, каждая яйцеклетка помимо 22 аутосом несет одну половую хромосому X (гаплоидный набор хромосом равен 23). Все сперматозоиды также имеют гаплоидный набор хромосом, из которых 22 — аутосомы, а одна — половая. Половина сперматозоидов содержит X, другая половина — Y хромосому.

Поскольку женские половые хромосомы одинаковы и все яйцеклетки не-

сут X-хромосому, то женский пол у человека называют гомогаметным. Мужской же пол из-за различия половых хромосом (X или Y) в сперматозоидах именуется гетерогаметным.

Пол человека определяется в момент оплодотворения. Женщина имеет один тип гамет — X, мужчина — два типа гамет: X и Y, причем, согласно законам мейоза, образуются они в равной пропорции. При оплодотворении хромосомные наборы гамет объединяются. Напомним, что зигота содержит 22 пары аутосом и одну пару половых хромосом. Если яйцеклетку оплодотворил сперматозоид с X-хромосомой, то в зиготе пара половых хромосом будет XX, из нее разовьется девочка. Если же оплодотворение произвел сперматозоид с Y-хромосомой, то набор половых хромосом в зиготе — XY. Такая зигота даст начало мужскому организму. Таким образом, пол будущего ребенка определяет гетерогаметный по половым хромосомам мужчина. Соотношение полов при рождении, по данным статистики, соответствует примерно 1:1.

Хромосомное определение пола — не единственный уровень половой дифференцировки. Большую роль в этом процессе у человека играет гормональная регуляция, происходящая с помощью половых гормонов, которые синтезируются половыми железами.

Закладка половых органов человека начинается у пятидневного эмбриона. В зачатки гонад из желточного мешка мигрируют первичные клетки зародышевого пути, которые, размножаясь митозом, дифференцируются в гонии и становятся предшественниками гамет. У зародышей обоих полов миграция проходит одинаково. Если же в клетках зачатков гонад присутствует Y-хромосома, то начинают разви-

ваться семенники, причем начало дифференцировки связано с функционированием эухроматинового района Y-хромосомы. Если же Y-хромосома отсутствует, то развиваются яичники, что соответствует женскому типу. Предполагается, что Y-хромосома не детерминирует дифференцировку по мужскому типу, а лишь контролирует работу соответствующего аутосомного гена. У индивидов, не имеющих Y-хромосомы, этот структурный аутосомный ген не активируется.

Человек по своей природе бисексуален. Зачатки половой системы одинаковы у зародышей обоих полов. Если активность Y-хромосомы подавлена, то зачатки половых органов развиваются по женскому типу. При полном отсутствии всех элементов становления мужского пола формируются женские половые органы. Их развитие не нуждается в специальных регуляторных механизмах и является "конститутивным".

Тип вторичных половых признаков обусловлен дифференцировкой гонад. Половые органы формируются из мюллеровых и вольфовых каналов. У женщин мюллеровы протоки развиваются в фаллопиевы трубы и матку, а вольфовы атрофируются. У мужчин вольфовы каналы развиваются в семенные протоки и семенные пузырьки. Под влиянием хорионического гонадотропина матери лежащие в эмбриональных семенниках клетки Лейдига синтезируют стероидные гормоны (тестостерон), которые участвуют в регуляции развития особи по мужскому типу. Одновременно в семенниках в клетках Сертоли синтезируется гормон, ингибирующий дифференцировку мюллеровых протоков. Нормальные особи мужского пола развиваются только в случае, если все гормоны,

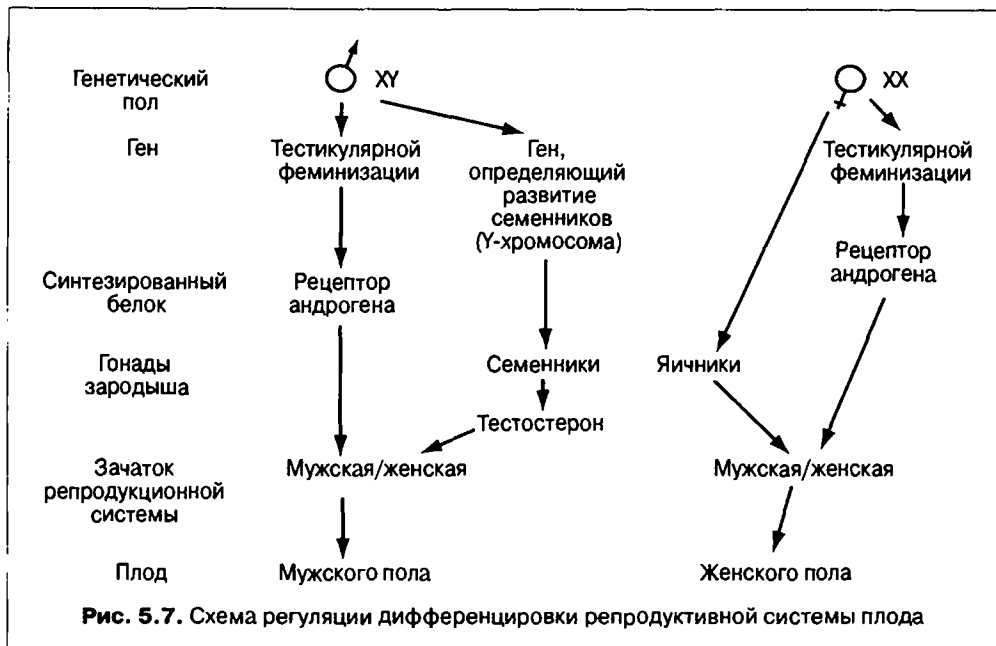


Рис. 5.7. Схема регуляции дифференцировки репродуктивной системы плода

действующие на зачатки внешних и внутренних половых органов, “срабатывают” в определенное время в заданном месте. Схема регуляции развития репродуктивной системы плода представлена на рисунке (рис. 5.7).

В настоящее время описано около 20 разнообразных дефектов генов, которые при нормальном (XY) кариотипе по половым хромосомам приводят к нарушению дифференцировки внешних и внутренних половых признаков, (гермафродитизму). Эти мутации связаны с нарушением: а) синтеза половых гормонов; б) восприимчивости рецепторов к ним; в) работы ферментов, участвующих в синтезе регулирующих факторов и т.д.

Наследование признаков, сцепленных с полом

X- и Y-хромосомы гомологичны, поскольку обладают общими гомологичными участками, где локализованы ал-

лельные гены. Однако, несмотря на гомологию отдельных локусов, эти хромосомы различаются по морфологии (см. рис. 3.13). Ведь, помимо общих участков, они несут большой набор различающихся генов. В X-хромосоме лежат гены, которых нет в Y-хромосоме, а ряд генов Y-хромосомы отсутствуют в X-хромосоме. Таким образом, у мужчин в половых хромосомах некоторые гены не имеют второго аллеля в гомологичной хромосоме. В таком случае признак определяется не парой аллельных генов, как обычный менделирующий признак, а только одним аллелем. Подобное состояние гена называется гемизиготным (рис. 5.8), а признаки, развитие которых обусловлено одиночным аллелем, расположенным в одной из альтернативных половых хромосом, получили название сцепленных с полом. Она преимущественно развивается у одного из двух полов и по-разному наследуются у мужчин и женщин.

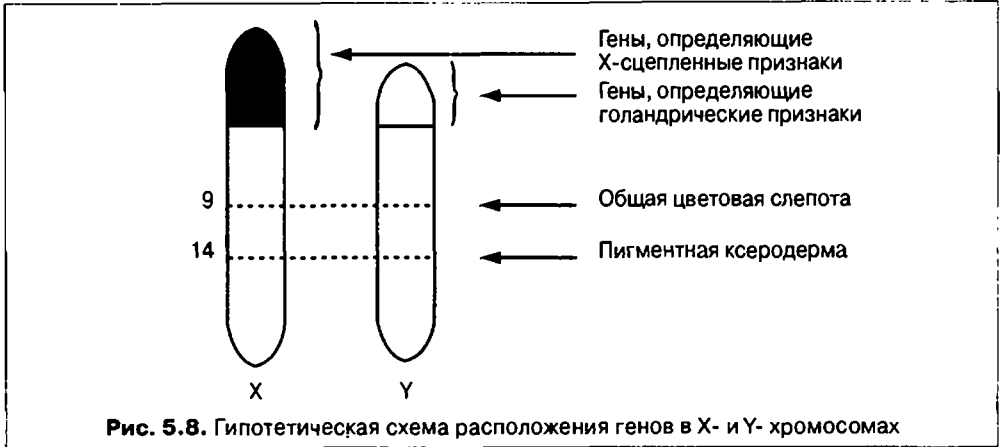


Рис. 5.8. Гипотетическая схема расположения генов в X- и Y- хромосомах

Признаки, сцепленные с X-хромосомой, могут быть рецессивными и доминантными. К рецессивным относятся: гемофилия, дальтонизм (неспособность различать красный и зеленый цвета), атрофия зрительного нерва и миопатия Дюшена. К доминантным — рахит, не поддающийся лечению витамином Д, и темная эмаль зубов.

Рассмотрим наследование, сцепленное с X-хромосомой, на примере рецессивного гена гемофилии. У мужчины ген гемофилии, локализованный в X-хромосоме, не имеет аллеля в Y-хромосоме, то есть находится в гемизиготном состоянии. Следовательно, несмотря на то, что признак рецессивный, у мужчин он проявляется:

N — ген нормальной свертываемости крови,

h — ген гемофилии;

X^hY — мужчина с гемофилией;

X^NY — мужчина здоров.

У женщины признак определяется парой аллельных генов в половых хромосомах XX, следовательно, гемофилия может проявиться только в гомозиготном состоянии:

X^NX^N — женщина здорова.

X^NX^h — гетерозиготная женщина, носительница гена гемофилии, здорова,

X^hX^h — женщина с гемофилией.

Перечислим основные формальные характеристики X-сцепленного рецессивного наследования. Обычно заболевание поражает мужчин. Все их фенотипически здоровые дочери являются гетерозиготными носительницами, поскольку в процессе оплодотворения получают от отца X-хромосому:

гаметы: X^h X^NY и Y

дочерям

сыновьям

Среди сыновей гетерозиготных матерей (X^NX^h) соотношение больных и здоровых составляет 1:1, так как гаметы X^N и X^h образуются с равной вероятностью:

X^NX^N x X^NY
гаметы: X^N, X^h X^N, Y

F_1 :

		Отцовские гаметы	
		X^N	Y
материнские гаметы	X^N	X^NX^N	X^NY
	X^h	X^hX^N	X^hY
		девочки здоровы	мальчики 1 : 1 здоровы больны

Такое наследование получило название крисс-кросс (или крест-на-

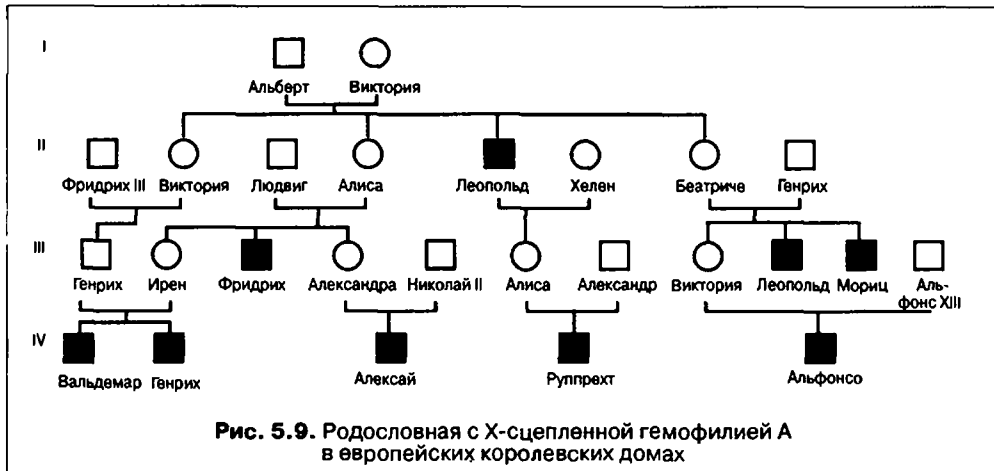


Рис. 5.9. Родословная с X-сцепленной гемофилией А в европейских королевских домах

крест): сыновья наследуют фенотипический признак матери, а дочери — признак отца.

Законы передачи признаков, сцепленных с X-хромосомами, были впервые изучены Т. Морганом.

Наиболее известным примером стало наследование королевской гемофилии А среди потомков английской королевы Виктории (рис. 5.9). Королева Виктория была гетерозиготной и передала мутантный ген сыну гемофилику

и трем дочерям. (Один из потомков королевы царевич Алексей в России также страдал этим недугом). Согласно представленной родословной, как и следует ожидать при рецессивном X-сцепленном наследовании, больны гемофилией мужчины. Однако бывает и по-другому. Описаны семьи, в родословных которых наличествуют близкородственные браки, где гемофилия средней степени выявляется и у женщин (рис. 5.10).

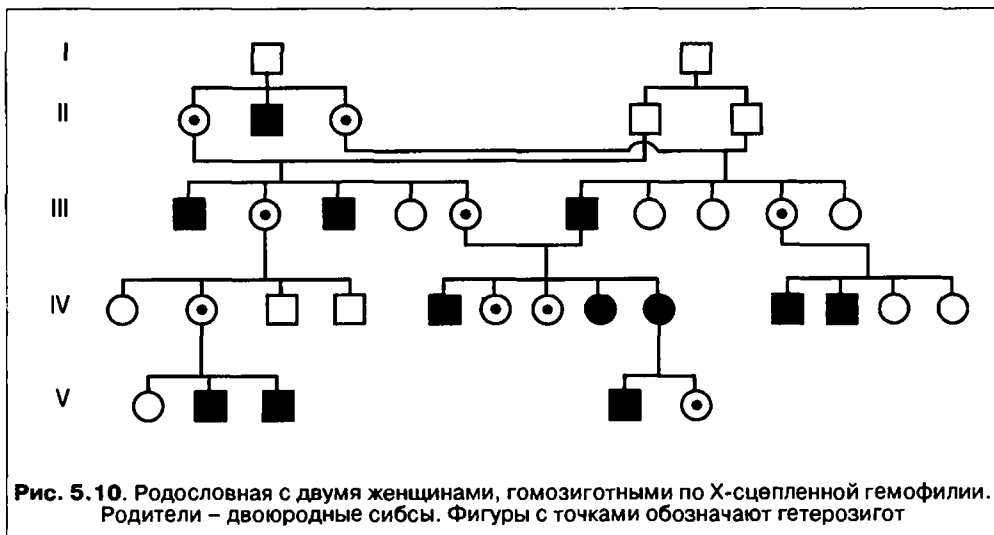


Рис. 5.10. Родословная с двумя женщинами, гомозиготными по X-сцепленной гемофилии. Родители — двоюродные сибсы. Фигуры с точками обозначают гетерозигот

Помимо X-сцепленных, у мужчин имеются Y-сцепленные признаки. Они называются голландрическими. Определяющие их гены локализованы в тех районах Y-хромосом, которые не имеют аналогов в X-хромосомах (рис. 5.8). Голландрические признаки также определяются только одним аллелем, а поскольку их гены находятся только в Y-хромосоме, то выявляются они у мужчин и передаются от отца к сыну, вернее — ко всем сыновьям. К голландрическим признакам относятся: волосатость ушей, перепонки между пальцами ног, ихтиоз (кожа имеет глубокую исчерченность и напоминает рыбью чешую).

Гомологичные районы X- и Y-хромосом содержат аллельные гены, с равной вероятностью встречающиеся у лиц мужского и женского пола.

К числу определяемых ими признакам относятся общая цветовая слепота (отсутствие цветового зрения) и пигментная ксеродерма — заболевание, при котором под влиянием ультрафиолетовых лучей на открытых частях тела появляются пигментированные пятна, которые постепенно преобразуются в папилломы, а затем и в опухоли. Оба эти признака являются рецессивными. Признаки, связанные с аллельными генами, находящимися в X- и Y-хромосомах, наследуются по классическим менделевским законам.

Наследование, ограниченное и контролируемое полом

Признаки человека, наследование которых каким-то образом связано с полом, подразделяются на несколько категорий.

Одна из категорий — признаки, ограниченные полом. Их развитие обусловлено генами, расположенными в аутосомах обоих полов, но проявляю-

щимися только у одного пола. Например, гены, определяющие ширину таза женщины, локализованы в аутосомах, наследуются и от отца и от матери, но проявляются только у женщин. То же касается возраста полового созревания девочек. Среди мужских признаков, ограниченных полом, можно назвать количество и распределение волосяного покрова на теле.

К иной категории относятся признаки, контролируемые полом, или зависящие от пола. Развитие соматических признаков обусловлено генами, расположенными в аутосомах, проявляются они у мужчин и женщин, но по-разному. Например, у мужчин раннее облысение — признак доминантный, он проявляется как у доминантных гомозигот (AA), так и у гетерозигот (Aa). У женщин этот признак рецессивный, он проявляется только у рецессивных гомозигот (aa). Поэтому лысых мужчин гораздо больше, чем женщин. Другим примером может служить подагра, у мужчин ее пенетрантность выше: 80% против 12% у женщин. Значит, чаще подагрой болеют мужчины. Экспрессивность признаков, контролируемых полом, обусловлена половыми гормонами. Например, тип певческого голоса (бас, баритон, тенор, сопрано, меццо-сопрано и альт) контролируется половой копституцией. Начиная с периода полового созревания, признак находится под влиянием половых гормонов.

Сцепление генов и карты хромосом

Хромосомная теория наследственности была сформулирована и экспериментально доказана Т. Морганом и его сотрудниками. Согласно этой теории, гены находятся в хромосомах и расположены в них линейно. Гены, локализованные в одной хромосоме, на-

зываются сцепленными, наследуются вместе и образуют группу сцепления. Количество групп сцепления соответствует числу пар гомологичных хромосом. У человека 46 хромосом: 22 пары аутомосом и одна пара половых хромосом (XX или XY), следовательно, у женщин 23 группы сцепления, а у мужчин — 24, так как половые хромосомы мужчины (XY) не полностью гомологичны друг другу. Каждая из половых хромосом мужчины имеет гены, характерные только для X- и только для Y-хромосомы, которым соответствуют группы сцепления X- и Y-хромосомы.

Гены, локализованные в одной хромосоме и образующие группу сцепления, сцеплены не абсолютно. В зиготе не профазы первого мейотического деления гомологичные хромосомы сливаются вместе с образованием бивалентов, затем в пахитене происходит кроссинговер-обмен участками между хроматидами гомологичных хромосом. Кроссинговер — обязательный процесс. Он осуществляется в каждой паре гомологичных хромосом. Чем дальше друг от друга расположены гены в хромосоме, тем чаще между ними происходит кроссинговер. Благодаря этому процессу, возрастает разнообразие сочетания генов в гаметах. Например, пара гомологичных хромосом содержит сцепленные гены \underline{AB} и \underline{ab} . В профазе мейоза гомологичные хромосомы конъюгируют и образуют бивалент:

$$\begin{array}{c} \underline{AB} \\ \underline{ab} \end{array}$$

Если кроссинговер между генами A и B не произойдет, то в результате мейоза образуется два типа некриссоверных гамет: \underline{AB} и \underline{ab} . Если же кроссинговер состоится, то получатся крисловерные гаметы: \underline{Ab} и \underline{aB} , то есть группы сцепления изменятся. Чем более уда-

лены друг от друга гены A и B, тем больше возрастает вероятность образования и, соответственно число крисловерных гамет.

Если гены в большой хромосоме расположены на достаточном расстоянии друг от друга и между ними в мейозе происходят многочисленные перекресты, то они могут наследоваться независимо.

Открытие кроссинговера позволило Т. Моргану и сотрудникам его школы в первые два десятилетия XX века разработать принцип построения генетических карт хромосом. Явление сцепления было использовано ими для выяснения локализации генов, расположенных в одной хромосоме, и создания генных карт плодовой мушки *Drosophila melanogaster*. На генетических картах гены располагаются линейно друг за другом на определенном расстоянии. Расстояние между генами определяется в процентах кроссинговера, или в морганидах (1 % кроссинговера равен одной морганиде).

Для построения генетических карт у растений и животных проводят анализирующие скрещивания, в которых достаточно просто рассчитать процент особей, образовавшихся в результате кроссинговера, и построить генетическую карту по трем сцепленным генам. У человека анализ сцепления генов классическими методами невозможен, поскольку невозможны экспериментальные браки. Поэтому для изучения групп сцепления и составления карт хромосом человека используют другие методы, в первую очередь генеалогический, основанный на анализе родословных. Рассмотрим на конкретном примере, как можно выявить группу сцепления генов и констатировать кроссинговер, анализируя родословные.

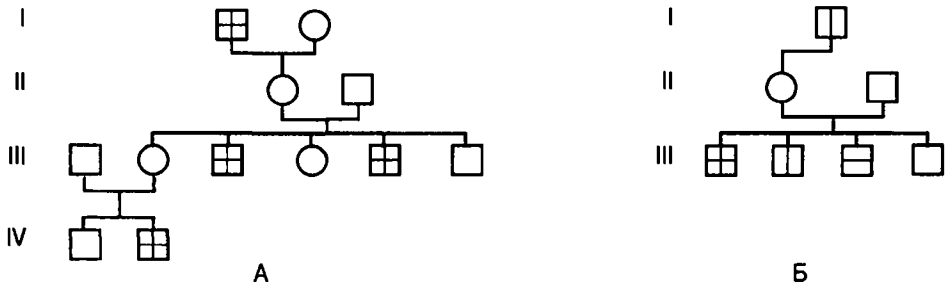


Рис. 5.11. Родословные с цветовой слепотой на красный и зеленый цвет (-), гемофилией (|) и обоими признаками одновременно (+). А – сцепленное наследование двух признаков. Б – Выявление кроссинговера между генами, определяющими гемофилию и дальтонизм

Чтобы выявить кроссинговер, необходимо исследовать либо большую родословную, либо несколько небольших. На рис. 5.11, А приведена родословная, в которой одновременно наследуются красно-зеленая слепота (дальтонизм) и гемофилия. На протяжении трех поколений пораженными оказываются только лица мужского пола, следовательно, признаки являются рецессивными и X-сцепленными. Гетерозиготные женщины (II,1 и III,2) имеют как здоровых, так и страдающих дальтонизмом и гемофилией сыновей. Лица женского пола в данной семье здоровы. Эти факты также подтверждают X-сцепленную природу наследования обоих признаков. Поскольку оба признака определяются генами, находящимися в X-хромосоме, следовательно, гены сцеплены.

Обозначим рецессивные гены, определяющие дальтонизм и гемофилию, а и b соответственно, тогда группа сцепления будет X^{ab} :

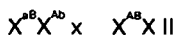
$$P: X^{a+}Y \times X^{Ab}X^{Ab} \text{ I}$$

$$F_1: X^{Ab}X^{ab} \text{ II}$$

Гетерозиготная женщина из поколения F_1 (II) выходит замуж за здорового мужчину ($X^{AB}Y$), и имеет двух здоровых дочерей, одного здорового сына и

двух сыновей со сцепленным наследованием генов гемофилии и дальтонизма, что соответствует законам наследования признаков, сцепленных с X-хромосомой. В этом случае группа сцепления передается из поколения в поколение, и кроссинговер не выявлен.

Если гены, образующие группу сцепления, находятся на достаточном расстоянии друг от друга, то между ними возможен кроссинговер. Известны родословные, в которых выявляются кроссоверные особи. Одна из таких родословных представлена на рис. 5.11, Б. Проведем генетический анализ этой родословной. В поколении II женщина здорова, но является гетерозиготной носительницей гена гемофилии, полученного ею от своего отца вместе с X-хромосомой. Среди сыновей этой женщины есть не только гемофилик, но и дальтоник, следовательно мы вправе предположить, что она является носительницей ген, определяющего дальтонизм, хотя сама здорова. Используя для обозначения генов, определяющих развитие гемофилии и дальтонизма, буквенные символы, указанные выше, можно записать генотипы вступающих в брак гетерозиготной женщины и здорового мужчины (II):



У матери могут образоваться некриссоверные гаметы: X^{aB} , X^{Ab} . Но если между генами, определяющими дальтонизм и гемофилию, в ооцитах матери произойдет кроссинговер, тогда образуются кроссоверные гаметы: X^{Ab} , X^{aB} . При оплодотворении некриссоверных гамет матери гаметами отца X^{Ab} , Y образуются генотипы, которые определяют фенотипическое проявление дальтонизма и гемофилии у сыновей:

$X^{aB}Y$ (III,3)	$X^{Ab}Y$ (III,2)
дальтонизм	гемофилия

При оплодотворении кроссоверных гамет матери образуются кроссоверные генотипы, определяющие у сыновей фенотипическое проявление двух признаков одновременно или здоровый фенотип:

$X^{Ab}Y$ (III,4)	$X^{aB}Y$ (III,1)
здоров	дальтонизм гемофилия

Анализируемая родословная невелика, поэтому нельзя однозначно утверждать, то генотип матери именно таков, каким мы его представили. Вероятен и вариант, что генотип матери $X^{aB}X^{Ab}$. Тогда фенотип сыновей может оставаться точно таким же, но 1 и 4 будут некриссоверными, а 2 и 3 — кроссоверными.

Точное установление генотипов родителей при наборе достаточного количества обследованных семей, позволяет определить частоту кроссоверных генотипов. Разработаны сложные статистические методы для объективной оценки количества кроссоверных особей на основе анализа родословных. Такая оценка дает возможность установить расстояние между генами, участвующими в процессе кроссинговера.

В некоторых случаях сцепление генов может быть выявлено путем обзора обширных родословных. Статистический анализ большого количества родословных конкретизирует параметры сцепления, а компьютерные расчеты уточняют наиболее вероятные частоты рекомбинаций сцепленных генов. Установленные же частоты рекомбинаций в группах сцепления позволяют построить генные карты по группам сцепления.

Пары генов или группы сцепления аутосомных генов невозможно соотнести с конкретными хромосомами, используя только формально-генетический анализ родословных. Для установления конкретной локализации генов использовались морфологические маркеры хромосом. Например, на длинном плече первой хромосомы вблизи центромеры часто обнаруживается вторичная перетяжка. Морфология этой перетяжки бывает различной, а наследуемость определенной морфологии прослеживается в череде поколений. С присутствием слишком тонкой и длинной перетяжки связано наличие некоторых патологий. Анализ родословных в связи с морфологией первой хромосомы выявил группу сцепления из трех локусов: врожденной очаговой катаракты, группы крови Даффи и локуса $Un - 1$.

Маркерами при определении групп сцепления в конкретных хромосомах могут служить и достаточно крупные, выявляемые морфологически делеции.

Другой подход в поисках соответствия групп сцепления конкретным хромосомам связан с исследованием уровня активности метаболических ферментов. Так, у больного с синдромом Дауна, причиной которого стала трисомия по 21-й хромосоме, оказалась повышенной активностью ряда ферментов, что может зависеть от увеличения дозы

генов за счет увеличения количества 21-х хромосом. Предположение, что эти ферменты кодируются генами, локализованными в 21-и хромосоме, позже подтвердилось. Однако проведение грубых аналогий всегда связано с некоторым риском, поскольку хромосомный дисбаланс может приводить к нарушениям регуляции активности генов, локализованных в разных хромосомах.

Накопление данных о группах сцепления генов у человека продвигалось очень медленно. Прорыв в этой области был достигнут с возникновением новых технологий, основанных на гибридизации соматических клеток в клеточных культурах, в частности, метода картирования.

В гибридных клетках человек-мышь, полученных в результате слияния анеуплоидных L-клеток мыши и диплоидных эмбриональных фибробластов человека, 75-95% человеческих хромосом утрачиваются в процессе культивирования, причем их утрата носит случайный характер. Среди множества разнообразных гибридов всегда найдется клетка, сохранившая ту или иную хромосому человека. После размножения этой клетки можно провести анализ ферментов, активность которых связана с наличием именно данной хромосомы. Использование методов дифференциального окрашивания хромосом позволяет связать гены с определенными локусами хромосом, так как в гибридных клетках довольно часты хромосомные разрывы, перестройки, присутствие не целых хромосом, а отдельных фрагментов.

Современные методы картирования развивались на основе молекулярной биологии, генной инженерии, гибридизации на препаратах хромосом с ДНК-зондами. Новые принципы картирования хромосом человека описаны в главе 3. Данные о сцеплении генов в хромосо-

мах, полученные современными методами картирования, достаточно хорошо согласуются с первоначальными результатами, основанными на методах классической генетики. Так, подтверждено расположение в первой хромосоме генов группы крови Даффи, локуса Un-1, и врожденной очаговой катаракты, картированных ранее. К настоящему времени эта самая крупная хромосома человека является наиболее изученной. В ее составе обнаружены гены, кодирующие белки разных классов. Это и ферменты, и белки групп крови резус-фактор, и факторы свертываемости крови. В популяциях людей отмечен полиморфизм генов этой хромосомы. Мутации в некоторых из них вызывают характерные генетические заболевания, например, фенилкетонурию.

В последние годы достигнуты большие успехи в выявлении сцепления и локализации локусов сцепления в определенных хромосомах, изучены все 24 группы сцепления, построены цитологические карты генов хромосом человека, в которых для каждого сегмента дифференциально окрашенной хромосомы показано, какие гены на каком расстоянии друг от друга там находятся. Ожидается, что среднее количество генов, соответствующих одному сегменту, — несколько сотен. Сегодня генная карта человека достаточно насыщена: картировано около 8000 генов, и число это быстро растет. В рамках же международной программы "Геном человека" к 2005 г. будет картировано большинство генов.

Анализ групп сцепления человека показывает, что в ряде случаев локус сцепления объединяет родственные гены. Так, например, сцеплены локусы гемоглобинов человека: γ , δ и β . Иммуноглобулиновый район содержит несколько локусов, ответственных за синтез γ -глобулиновых полипептид-

ных цепей. В первой хромосоме локализовано не менее четырех генов, вовлеченных в контроль процесса гликолиза. Известны и другие функциональные группы сцепления.

Все тесные группы сцепления называются кластерами. Считается, что генные кластеры — результат эволюционного процесса. Их могут порождать генные дупликации, неравный кроссинговер, создавая основу для дальнейшей функциональной специализации генов в ходе эволюции. В отсутствие хромосомных перестроек, разбивающих кластер, гены остаются тесно сцепленными.

Порядок расположения генов в кластере может иметь функциональное значение. Так, в β -глобиновом кластере человека гены гемоглобина расположены в той последовательности, в какой они экспрессируются в онтогенезе человека: ϵ , γ , β и σ .

Родственные гены не всегда сцеплены в один кластер. Гены α -глобиновой группы человека, очевидно, родственные генам β -глобиновой группы, не являются сцепленными. Возможно, причину этого явления следует искать в характере эволюционного процесса, хотя не исключается и функциональная значимость такой локализации.

Частота кроссинговера зависит не только от расстояния между генами. Известны и другие факторы, влияющие на рекомбинацию сцепленных генов. В свое время имела место дискуссия относительно влияния возраста родителей на уровень рекомбинации. Действительно, в ряде локусов частота кроссинговера в мейозе возрастает с возрастом, но для других локусов это утверждение неверно. Обсуждается предположение о том, что у гомогаметного пола (XX) кроссинговер происходит чаще.

До недавнего времени исследования по сцеплению представляли, в

основном, теоретический интерес. Ныне же появилась возможность практически применять полученные знания. Например, если ген А вызывает редкое наследственное заболевание, проявляющееся в позднем возрасте, а ген В тесно сцеплен с геном А и является генетическим маркером, то появление в семье признака, определяемого геном В, заставляет ожидать наследственного заболевания, определяемого геном А. Кроме того, в раннем возрасте можно предсказать вероятность наследственной патологии и скорректировать образ жизни человека, чтобы уменьшить риск развития патологии.

Достоверная информация о группах сцепления важна для дородового генетического консультирования, поскольку точная дородовая диагностика по любой наследственной патологии осуществления только тогда, когда возможно определенное предсказание на основе анализа генотипа родителей.

Вопросы для самоконтроля

1. Приведите примеры всех типов взаимодействия аллельных генов: доминирования полного и неполного, ко- и сверхдоминирования.
2. Укажите примеры всех типов взаимодействия неаллельных генов у человека.
3. Разберитесь на примерах понятия: экспрессивность и пенетрантность.
4. Назовите генетические и физиологические факторы, определяющие пол человека.
5. Как наследуются рецессивные признаки, сцепленные с X-хромосомой? Пример.
6. Что такое голандрические признаки? Пример.
7. О каких признаках говорят, что они ограничены полом?
8. Сколько групп сцепления у мужчин и женщин?
9. Перечислите методы, используемые для определения групп сцепления у человека.

Глава 6. МУТАЦИИ

Классификация мутаций

Термин “мутация” был впервые введен в 1901 г. голландским ботаником, автором мутационной теории Гуго Де Фризом, который занимался изучением наследственности энотеры Ламарка (*Oenothera lamarckiana*). Наблюдая за этим растением в условиях эксперимента, ученый обнаружил стабильные фенотипические изменения, которые назвал мутациями.

Мутации представляют собой внезапные и устойчивые изменения генотипа, возникающие под влиянием факторов внешней и внутренней среды. Процесс образования мутаций носит название **мутагенеза**, а факторы, вызывающие мутации, именуется мутагенами.

Мутации могут возникать в половых клетках (**генеративные мутации**). Такие изменения способны передаваться следующим поколениям организмов при половом размножении и проявляются, как правило, во всех клетках потомков. Следует подчеркнуть, что, хотя эти мутации возникают на уровне половых клеток, в их число входят как аномалии половых хромосом, так и аномалии аутосом в этих клетках.

Мутации, возникающие в соматических клетках (**соматические мутации**), наследуются дочерними клетками, которые образуются в процессе митотических делений. Фенотипические последствия таких изменений проявляются только у самой мутантной особи и только в том случае, если возникшие мутации препятствуют осуществлению специфических функций,

свойственных данной клетке. Соматические мутации могут содержаться не во всех клетках организма, т.е. нормальные и мутантные клетки сосуществуют у одного индивидуума, что приводит к **мозаицизму** — наличию в организме клеток, отличающихся по своему генотипу и его фенотипическим проявлениям от других клеток этого же организма. По способу возникновения различают мутации **спонтанные и индуцированные**.

Спонтанные мутации возникают случайно, т.е. в любой момент любой ген может претерпеть изменения. Причинами спонтанного мутационного процесса являются многочисленные факторы экзогенной и эндогенной природы, в том числе постоянное воздействие на организм человека мутагенов химической, биологической и физической природы (например, естественный фон облучения, действие вирусов); ошибки репликации ДНК, которые копируются и накапливаются в ряду клеточных поколений; нарушение функционирования репаративных систем; действие экзогенных метаболитов; физиологическое состояние и возраст организма. Спонтанные мутации могут возникать как в половых, так и в соматических клетках на генном, хромосомном и геномном уровнях.

Индуцированные мутации возникают в результате направленного воздействия на организм мутагенных факторов различной природы. Различают физические (радиация, температура, давление и т.п.), химические (пестициды, тяжелые металлы и пр.) и биологи-

ческие (вирусы, бактерии) факторы мутагенного действия. Более подробно вопросы индуцированного мутагенеза будут рассмотрены ниже.

Мутации возникают независимо от того, полезны они для организма или вредны, т.к. носят случайный характер. В зависимости от действия на организм принято выделять **отрицательные** мутации (летальные, полублетальные), которые могут приводить либо к гибели организма, либо к снижению его жизнеспособности, **нейтральные** мутации, не оказывающие существенного влияния на процессы жизнедеятельности, и **положительные** мутации, повышающие адаптационные способности организма. Последние встречаются достаточно редко, однако играют существенную роль в процессе биологической эволюции. Следует отметить также, что мутации способны проявлять свои отрицательные или положительные свойства не сами по себе, а только при определенных условиях. Так, например, усиление пигментации может стать полезным признаком для живущих в Африке, поскольку темная кожа защищает организм от интенсивного ультрафиолетового излучения, в северных же странах светлая кожа способствует синтезу витамина Д при действии солнечного света.

По локализации в клетке мутации подразделяют на **ядерные** и **цитоплазматические**. Цитоплазматические мутации возникают в результате изменений генома ДНК-содержащих клеточных органоидов — митохондрий. Принято считать, что митохондриальная ДНК контролирует образование митохондрий, а именно — обеспечивает внутримитохондриальный синтез небольшого набора белков.

Известны мутации митохондриальной ДНК у дрожжей. Большое количе-

ство митохондрий содержится в ооцитах, в то время как в спермиях их только четыре. При оплодотворении митохондрии спермии не попадают в ооцит, поэтому все митохондрии во всех клетках организма имеют материнское происхождение. Можно предположить, что патология, связанная с мутациями в митохондриальной ДНК, должна передаваться от индивидуумов женского пола. Каждый ооцит содержит множество митохондрий и, если мутация произошла только в одной из них, то все остальные остаются нормальными, и, следовательно, фенотипически мутация проявляться не должна. Правда, существует мнение, что один из типов атрофии зрительного нерва обусловлен мутациями в цитоплазматических генах и наследуется, как правило, только по женской линии.

Изменения в генетическом материале могут происходить на разных уровнях. Когда они затрагивают один или несколько нуклеотидов внутри одного гена, то возникают **генные** мутации. Изменения множества нуклеотидов или структуры хромосомы в целом называются **хромосомными** мутациями, а нарушение численности хромосом относятся к **геномным** мутациям.

Рассмотрим классификацию генетических изменений с точки зрения наблюдаемых в результате таких изменений фенотипов — генетических болезней. В настоящее время все генетические болезни человека, учитывая механизмы их возникновения и характер наследования, подразделяют на менделевские, хромосомные, мультифакториальные, генетические болезни соматических клеток и болезни генетической несовместимости матери и плода. Менделевские болезни являются результатом мутаций в отдельных генах

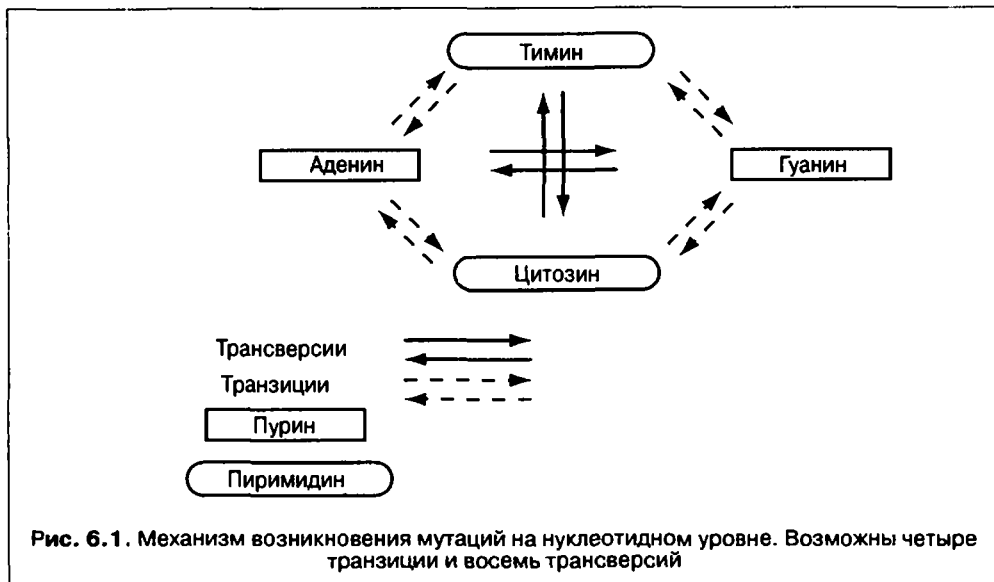


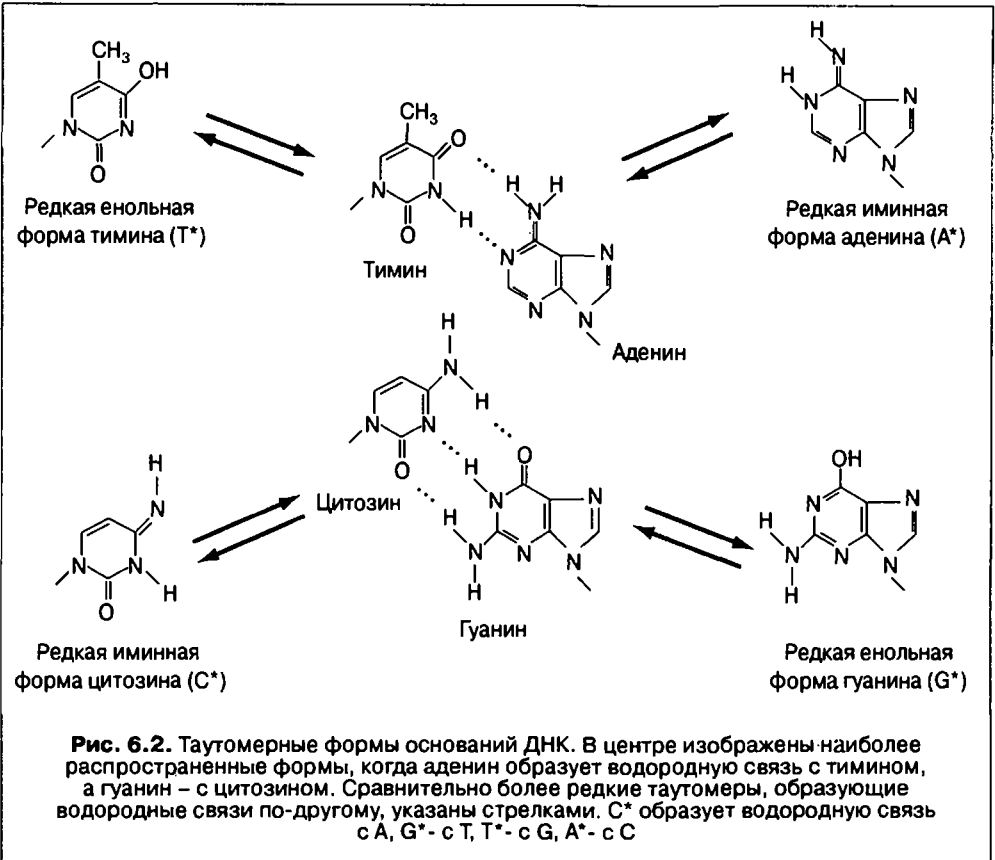
Рис. 6.1. Механизм возникновения мутаций на нуклеотидном уровне. Возможны четыре транзиции и восемь трансверсий

и, соответственно, их наследование подчиняется законам Менделя. Хромосомные наследственные болезни обусловлены изменениями в числе хромосом в геноме человека либо структурными перестройками (абerrациями) в них. Фенотипическое проявление мультифакториальных болезней зависит от комплексного взаимодействия между множественными генетическими факторами и факторами окружающей среды. Генетические болезни соматических клеток выделены в отдельную группу недавно. Их примером могут служить некоторые врожденные пороки развития, являющиеся результатом мутации в соматических клетках в критическом периоде эмбриогенеза. Болезни, возникающие при несовместимости матери и плода по антигенам, развиваются из-за иммунологической реакции матери на антигены плода (например, гемолитическая болезнь новорожденных, возникающая в результате несовместимости матери и плода по Rh-антигену). В неко-

торых популяциях такая патология встречается довольно часто (до 1% новорожденных).

Каждая из групп болезней является сборной и, в свою очередь, подразделяется на несколько подгрупп. Менделевские болезни включают аутосомные доминантные, сцепленные с X-хромосомой и аутосомные рецессивные болезни. Генетические расстройства сложной этиологии — мультифакториальные болезни, объединяют врожденные пороки развития (аномалии), проявляющиеся уже при рождении, и обычные мультифакториальные болезни, наблюдаемые в основном в зрелом возрасте. Для обозначения этих расстройств часто используют определения — “нерегулярно наследуемые”, “полигенные”, “расстройства сложной этиологии”.

Предложенной классификацией генетических изменений у человека мы будем пользоваться при рассмотрении как спонтанного, так и индуцированного мутационного процесса.



Генные мутации

Генные мутации происходят на молекулярном уровне и затрагивают, как правило, один или несколько пуклеотидов внутри отдельного гена. Этот тип мутаций можно разделить на две большие группы. Первую из них обуславливает сдвиг рамки считывания. К второй группе относят генные мутации, связанные с заменой пар оснований. Последние составляют не более 20% спонтанных мутаций, остальные 80% мутаций происходят в результате различных делеций и вставок.

Существуют два типа замены оснований (рис. 6.1):

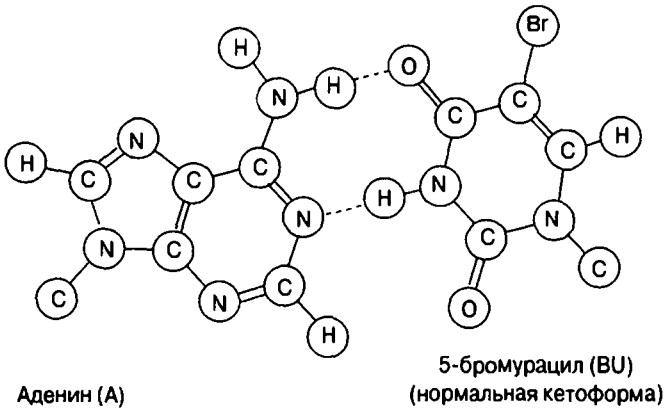
1. **Транзиции** заключаются в замене одного пуринового на пуриновое основание или одного пиримидинового на пиримидиновое основание (А → G; С → Т).

2. **Трансверсии**, при которых пуриновое основание меняется на пиримидиновое или наоборот (А → С; G → Т).

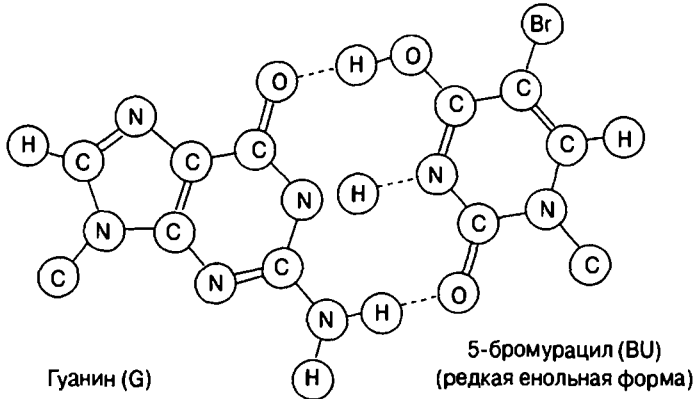
Такие изменения происходят как спонтанно, так и под действием различных мутагенов.

Спонтанные транзиции возможны при репликации ДНК, что обусловлено существованием молекулы ДНК в нескольких **таутомерных** формах (за счет изменения положения протона, меняющего химические свойства мо-

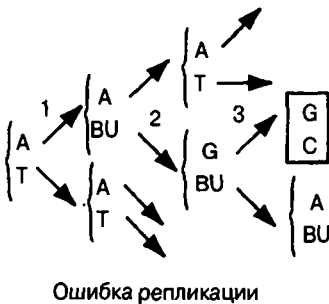
А



Б



В



Г

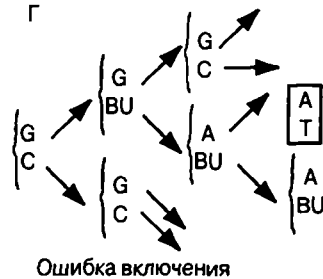
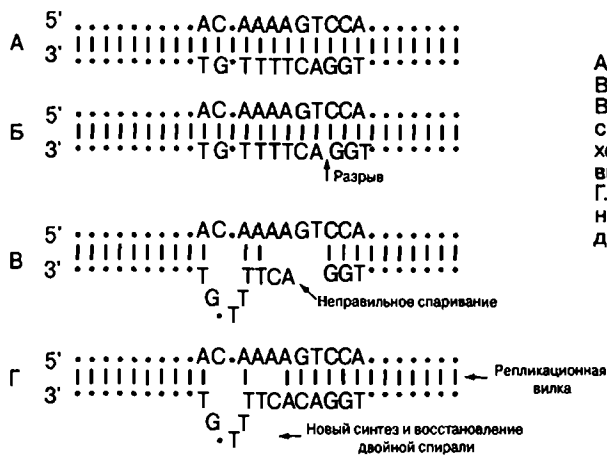


Рис. 6.3. Механизм мутагенного двойствия 5-бромурацила.

А – спаривание 5-бромурацила (BU) с аденином и Б – с гуанином. Внизу – два механизма индукции транзиции; В – ошибка репликации, состоящая в том, что BU включается при репликации в редкой енольной форме, с G (2); в третьем цикле репликации (3) G нормально спаривается с C, и таким образом завершается переход АТ → GC. Г – ошибка включения, состоящая в том, что BU в редкой енольной форме спаривается с G (1), а затем в обычной кетоформе спаривается с А (2); в третьем цикле репликации (3) А нормально спаривается с Т, и таким образом завершается переход GC → АТ



А. Исходная молекула ДНК. Б. Возникновение разрыва. В. Раскручивающий двойную спираль белок вызывает расхождение цепей и их неправильное воссоединение. Г. Репаративный синтез заполняет брешь, возникшую на стадии В.

Рис. 6.4. Несколько модифицированная модель мутации сдвига рамки Стрейзингера

лекул). В результате изменяется способность нуклеотидов образовывать водородные связи, а аденин приобретает свойства гуанина, гуанин — аденина, цитозин — тимина, а тимин — цитозина. При последующей репликации такой таутомерный переход приводит к транзиции. Так, например, в обычной аминной форме аденин взаимодействует с тиминном, а в редкой иминоформе образует пару с цитозинном. При последующей репликации будет иметь место транзиция АТ → ГС (рис. 6.2).

Доказательством связи процесса репликации с мутагенезом стало открытие мутагенного эффекта аналогов оснований ДНК — 5-бромурацила и 2-аминопурина. 5-бромурацил включается в ДНК вместо тимина и образует пары с аденином. В дальнейшем при репликации ДНК возможна мутация за счет ошибочного спаривания 5-бромурацила с гуанином (ошибка считывания) либо за счет ошибки при включении аналога ДНК (ошибка включения). Механизм мутагенного действия 5-бромурацила представлен на рис.

6.3. Аналогичные механизмы лежат в основе мутаций, индуцируемых 2-аминопурином.

Менее ясны механизмы возникновения трансверсий. Одна из причин их возникновения, по-видимому, заключена в механизме репарации. Серповидно-клеточная анемия является ярким примером молекулярной болезни, возникающей из-за наследственного нарушения структуры гемоглобина. У мутантного гена, кодирующего одну из цепей гемоглобина, нарушен всего один нуклеотид, и в матричной РНК происходит замена аденина на урацил (ГАА на ГУА). В результате происходит изменение биохимического фенотипа — в β-цепи гемоглобина глутаминовая кислота замещается на валин. Это замена изменяет поверхность гемоглобиновой молекулы таким образом, что она вступает в реакцию с соседними молекулами и образует длинные линейные тяжи, деформирующие эритроциты. Приобретая серповидно-клеточную форму, эритроциты либо закупоривают мелкие сосуды, либо быстро удаляются из кровообращения,

что может приводить к гемолитической анемии.

Мутации со сдвигом рамки считывания представляют собой вставки или выпадения одной или нескольких пар нуклеотидов (рис. 6.4). В зависимости от места нарушения изменяется то или иное количество кодонов. Соответственно в белке могут появиться дополнительные аминокислоты или измениться их последовательность. Большая часть мутаций этого типа обнаружена в молекулах ДНК, состоящих из одинаковых оснований.

Значимость генных мутаций для жизнеспособности организма неодинакова. Различные изменения в нуклеотидной последовательности ДНК по-разному проявляются в фенотипе. Некоторые "молчащие мутации" не оказывают влияния на структуру и функцию белка. Примером такой мутации может служить замена нуклеотидов, не приводящая к замене аминокислот.

По функциональному значению генные мутации можно разделить на 3 класса:

- 1) ведущие к полной потере функции;
- 2) в результате которых происходят количественные изменения мРНК и первичных белковых продуктов;
- 3) доминантно-негативные, изменяющие свойства белковых молекул таким образом, что они оказывают повреждающее действие на жизнедеятельность клеток.

Наибольшим повреждающим действием обладают так называемые **ионсенс-мутации**, связанные с появлением кодонов-терминаторов, вызывающих остановку синтеза белка. Причем, чем ближе мутации к 5'-концу гена (к началу транскрипции), тем короче будут белковые молекулы. Делеции или инсерции (вставки), некротные трем

нуклеотидам и, следовательно, вызывающие сдвиг рамки считывания, могут также приводить к преждевременному окончанию синтеза белка или к образованию бессмысленного белка, который быстро деградирует.

Миссенс-мутации связаны с заменой нуклеотидов в кодирующей части гена. Фенотипически проявляется в виде замены аминокислоты в белке. В зависимости от природы аминокислот и функциональной значимости нарушенного участка, наблюдается полная или частичная потеря функциональной активности белка.

Сплайсинговые мутации затрагивают сайты на стыке экзонов и интронов и сопровождаются либо вырезанием экзона и образованием делетированного белка, либо вырезанием интронной области и трансляцией бессмысленного измененного белка. Как правило, такие мутации обуславливают тяжелое течение болезни.

Регуляторные мутации связаны с количественным нарушением в регуляторных областях гена. Они не приводят к изменениям структуры и функции белков. Фенотипическое проявление таких мутаций определяется пороговым уровнем концентрации белка, при котором еще сохраняется его функция.

Динамические мутации или мутации экспансии представляют собой патологическое увеличение числа тринуклеотидных повторов, локализованных в кодирующих и регуляторных частях гена. Многие тринуклеотидные последовательности характеризуются высоким уровнем популяционной изменчивости. Фенотипическое нарушение проявляется в случае превышения определенного критического уровня по числу повторов. Классическим примером мутации экспансий является синдром ломкой

хромосомы (Fга ХА), при которой является область CGG повторов в регуляторной области FMR-1 гена (Xq 27.3). В норме в этом гене число повторов варьирует от 6 до 42. Хромосомы, содержащие 50-200 повторов, считаются “премутацией”. В следующем поколении число повторов может увеличиться до 1000 и более, что и обуславливает выраженную клиническую картину заболевания. Генные мутации идентифицируют с помощью различных методов молекулярно-генетического анализа, в том числе с использованием техники гибридизации *in situ* (FISH), методов PCR (полимеразной цепной реакции), СМС (химического расщепления некомплементарных сайтов), SSCP (анализа конформационного полиморфизма однонитевой ДНК), DGGE (денатурирующего гель-электрофореза).

Хромосомные мутации

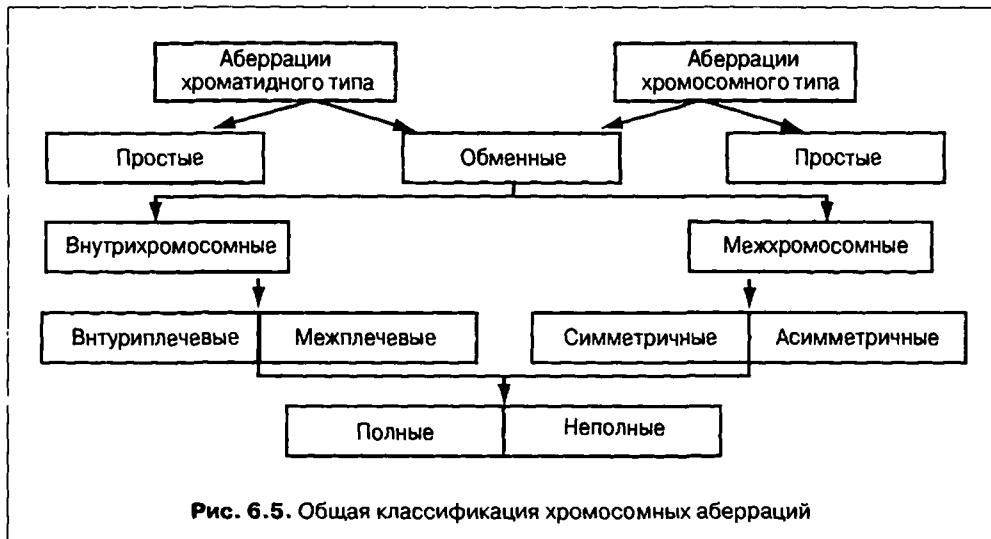
Этот тип мутаций объединяет хромосомные нарушения, связанные с изменением структур хромосом. В данном разделе будут рассмотрены мутации, наблюдаемые в соматических клетках на стадии метафазы клеточного цикла. Такие мутации в научной литературе обычно именуют **хромосомными aberrациями**, подчеркивая при этом их отличие от перестроек, происходящих в гаметах (хромосомные мутации). Однако следует заметить, что принципиальных морфологических отличий между перестройками в клетках разного происхождения не имеется.

Классификация хромосомных aberrаций

Хромосомные aberrации можно классифицировать, используя различные подходы. В зависимости от того, в какой момент клеточного цикла — до или после репликации хромосом воз-

никли перестройки — выделяют aberrации **хромосомного и хроматидного** типов. Aberrации хромосомного типа возникают на предсинтетической стадии — G₁ фазе, когда хромосома представлена однонитевой структурой. Aberrации хроматидного типа возникают после репликации хромосом в фазах S и G₂ и затрагивают структуру одной из хроматид. В результате хромосома на стадии метафазы содержит одну измененную и одну нормальную хроматиды. Если же перестройка произошла после репликации и затронула обе хроматиды, является **изохроматидная** aberrация. Морфологически она неотличима от aberrаций хромосомного типа, хотя по происхождению относятся к хроматидному типу. Среди aberrаций хромосомного и хроматидного типов выделяют **простые** и **обменные** aberrации. В их основе лежат нарушения одной или нескольких хромосом. Простые aberrации — фрагменты (делеции) — возникают в результате простого разрыва хромосомы. В каждом случае при этом образуется 2 типа фрагментов — центрические и ацентрические. Различают терминальные (концевые) и интерстициальные (средних участков хромосом) делеции или фрагменты.

Обменные aberrации очень разнообразны. В их основе лежит обмен участками хромосом (или хроматид) между разными хромосомами (межхромосомный обмен) или внутри одной хромосомы (внутрихромосомный обмен) при перераспределении генетического материала. Обменные перестройки бывают двух типов: симметричные и асимметричные. Асимметричные обмены приводят к образованию полицентрических хромосом и ацентрических фрагментов. При симметричных же обменах происходит соединение ацентрических фрагментов с центри-



ческими, в результате чего хромосомы, вовлеченные в обменную aberrацию, остаются моноцентрическими.

Внутрихромосомные обмены могут происходить как внутри одного (внутриплечевой обмен), так и между обоими плечами хромосомы (межплечевой обмен). Кроме того, обмены могут быть простыми и сложными, когда в процесс вовлечены несколько хромосом. В результате могут образоваться необычные и достаточно сложные конфигурации хромосом. Любой обмен (симметричный и асимметричный, межхромосомный и внутрихромосомный) может быть **полным (реципрокным)** или **неполным (нереципрокным)**. При полном обмене происходит соединение всех поврежденных участков, а при неполном обмене часть из них может остаться с открытым поврежденным участком. На рис. 6.5 представлена классификация основных типов хромосомных aberrаций.

Некоторые хромосомные aberrации получили название стабильных, поскольку они способны передаваться из одного клеточного поколения в другое.

Это связано с тем, что при перераспределении генетического материала произошло полное соединение центрических и ацентрических фрагментов. Лишенная центромера или, напротив, включающая в себя две или более центромеры, часть хромосомных aberrаций может теряться в процессе клеточного деления. Такие структурные aberrации именуется нестабильными. Важное значение имеет идентификация хромосомных aberrаций по принадлежности к хромосомному или хроматидному типу, при изучении индуцированного мутагенеза, т.к. мутагенные факторы различной природы (химической, физической, биологической) могут вызывать разные типы нарушений. В связи с этим более подробно рассмотрим основные типы хромосомных aberrаций.

Аберрации хромосомного типа

При цитогенетическом анализе можно различить, в зависимости от применяемых методов исследования, несколько типов aberrаций этой группы:

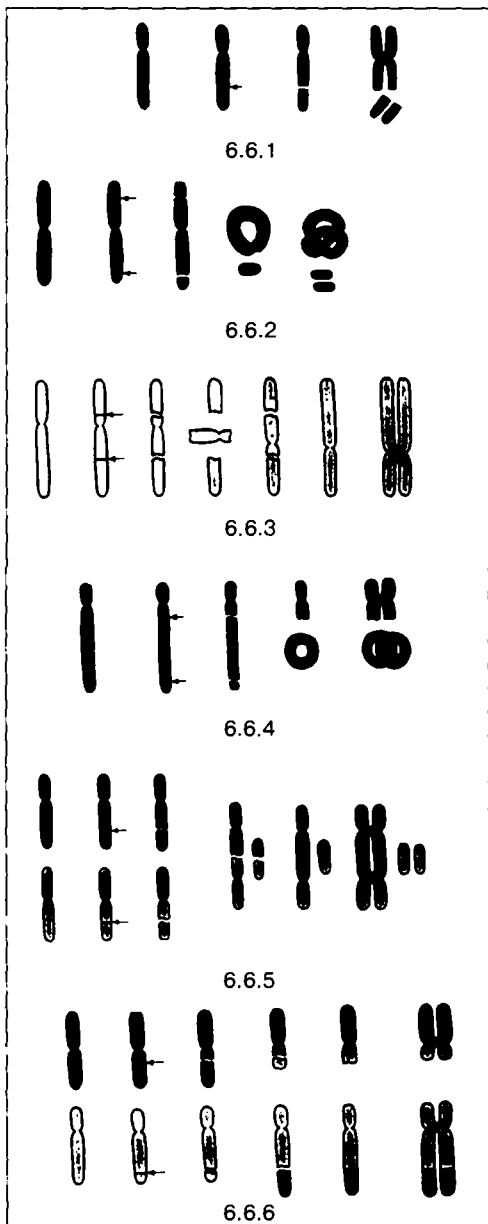


Рис. 6.6. Аберрации хромосомного типа

6.6.1. Образование парных фрагментов;
 6.6.2. Образование центрических колец;
 6.6.3. Образование перичентрической инверсии;
 6.6.4. Образование ацентрических колец;
 6.6.5. Образование дивцентрической хромосомы;
 6.6.6. Образование реципрокной транслокации

1. Парные (терминальные или интерстициальные) фрагменты, которые образуются в результате одного или двух разрывов хромосомы в фазе G_1 . Величина их различна — от очень длинных, захватывающих почти все хромосомное плечо, до точечных. Парные фрагменты без труда регистрируются при анализе метафаз. Эти аберрации относятся к нестабильным. Как правило, они не проходят через митоз, т.к., лишенные центромера, не могут правильно ориентироваться относительно веретена деления (рис. 6-6.1).

2. Кольцевые хромосомы (центрические кольца) — внутрихромосомные обмены, при которых интерстициальный фрагмент хромосомы замкнут в кольцо. Для образования центрического кольца необходимы два разрыва по обеим сторонам центромеры, в результате чего свободные концы центрического фрагмента соединяются между собой. О полноте обмена можно судить по числу парных фрагментов, сопровождающих кольцевую хромосому. Один фрагмент характерен для полного обмена, т.к. концевые фрагменты соединяются между собой. Достаточно редко кольцевая хромосома сопровождается двумя парными фрагментами (неполный обмен) — рис. 6-6.2.

3. Инверсии — внутрихромосомные обмены, при которых может происходить переворот сегмента, содержащего центромеру, на 180° . Такая аберрация возникает в результате двух разрывов либо на разных расстояниях от центромеры, либо на одинаковых (перичентрические инверсии). В результате инверсии сегмента хромосомы внутри одного плеча хромосомы образуется парацентрическая инверсия. При цитогенетическом анализе перичентрическую инверсию достаточно легко обнаружить, если разрывы произошли на

разных расстояниях от центромеры. Другие инверсии (в том числе парацентрические) с помощью стандартных цитогенетических методов не регистрируются (рис. 6-6.3).

4. Ацентрические кольца — внутрихромосомные обмены, представляющие собой замкнутые в кольцо спаренные участки хроматид, не содержащие центромер и сопровождаемые появлением делетированной хромосомы (рис. 6-6.4).

5. Дицентрические и полицентрические хромосомы — это асимметричные транслокации, возникающие при межхромосомном обмене. Такие хромосомные aberrации имеют две (дицентрики) или более (полицентрики) центромер. Наиболее часто встречаются дицентрики, образующиеся в результате одиночных разрывов в двух хромосомах и последующего объединения двух центромерных фрагментов. Дицентрик обычно сопровождается одним, реже — двумя, парным фрагментами, что свидетельствует о неполном обмене. Дицентрические хромосомы легко распознаются с помощью стандартных цитогенетических методов. Наряду с центрическими кольцами, этот тип хромосомных aberrаций широко используется для количественного изучения мутаций в работах по индуцированному мутагенезу (рис. 6-6.5).

Симметричные транслокации (рис. 6-6.6) — межхромосомные обмены, которые возникают без нарушения в распределении центромер (взаимный обмен ацентрическими участками между двумя хромосомами). Различают **реципрокные**, когда две хромосомы обмениваются участками и **нереципрокные** транслокации, когда участок одной хромосомы переносится на другую хромосому. Для осуществления нереципрокной транслокации необходимо

наличие трех разрывов (двух — в одной хромосоме и одного — в другой) и последующие соединения разорванных концов. В особый тип выделяют так называемые **Робертсоновские транслокации** или слияния, которые приводят к изменению числа хромосом. Они образуются при слиянии двух акроцентрических хромосом в области центромеры, в результате чего образуется одна метацентрическая хромосома. Этот тип транслокаций получил свое название по имени исследовавшего механизм такого слияния У.Р. Робертсона.

Стандартное цитогенетическое исследование позволяет увидеть только те из симметричных транслокаций, которые образовались в результате обмена неравными по длине участками. При этом морфология хромосом изменяется: удлинение одной хромосомы происходит за счет укорочения другой.

Аберрации хроматидного типа

Как и aberrации хромосомного типа, различают простые (одиночные фрагменты или делеции) и обменные хроматидные aberrации.

1. **Одиночные фрагменты** или **хроматидные делеции** образуются при повреждении одной хроматиды. В зависимости от места разрыва они бывают различной длины (рис. 6-7.1).

Хроматидные обмены характеризуются многообразием форм, что определяется рядом хромосомных факторов: числом и величиной участков, вовлеченных в обмен хромосом и хроматид, гомологичностью хромосом, участвующих в обмене, симметричностью и полнотой обмена (рис. 6-7.2).

Довольно часто межхромосомные обмены происходят между хроматидами двух хромосом. Их морфология очень разнообразна. Из-за характерной

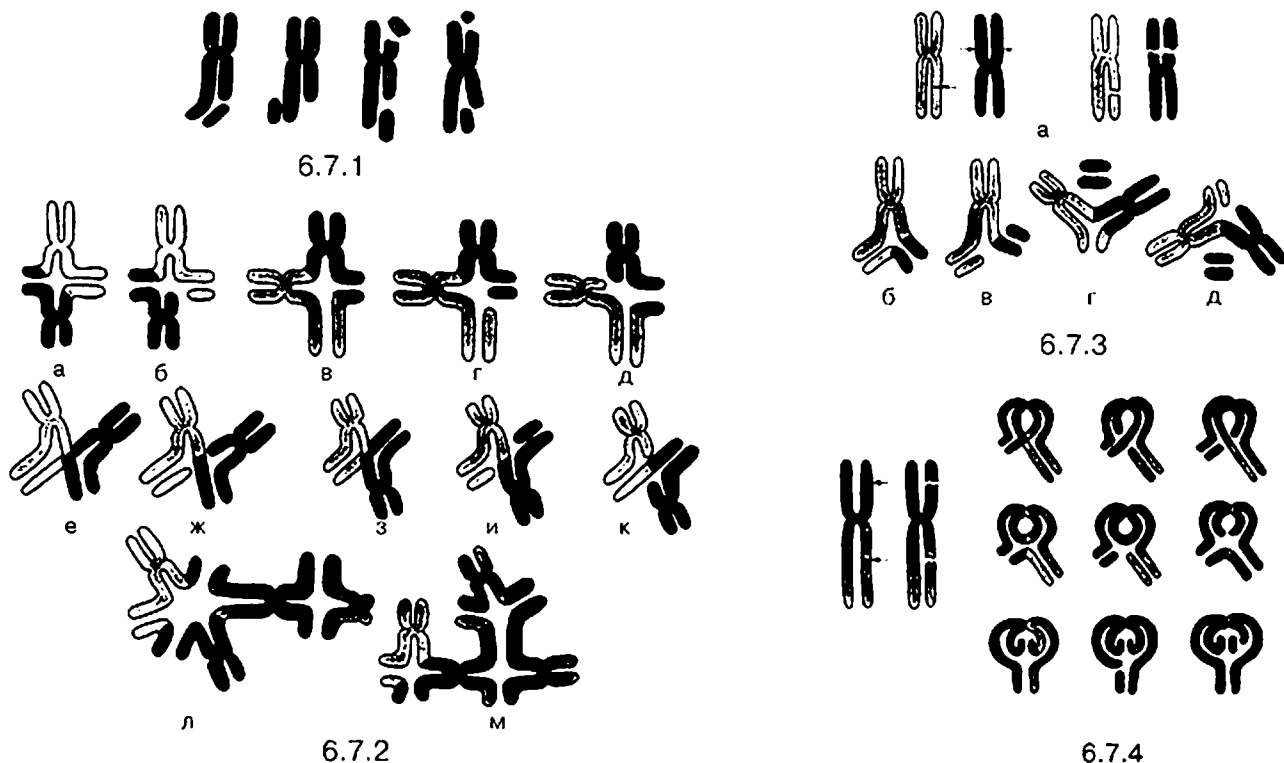


Рис. 6.7. Аберрации хроматидного типа

6.7.1. Одиночные фрагменты; различные типы хроматидных обменов: 6.7.2. Межхромосомные хроматидо-хроматидные обмены. Полные (а, в, е, з) и неполные (б, г, д, ж, и, к), симметричные (а, б, е, ж) и асимметричные (в, г, д, з, и, к). Сложные межхромосомные хроматидные обмены: в обоих случаях вовлечены четыре хромосомы в результате пяти (л) или шести (м) разрывов. 6.7.3. Хромати-до-изохроматидные обмены. Локализация точек разрывов (а), конфигурация симметричных (б, в) и асимметричных (г, д) обменов. 6.7.4. Внутрихромосомные межплечевые хроматидные обмены

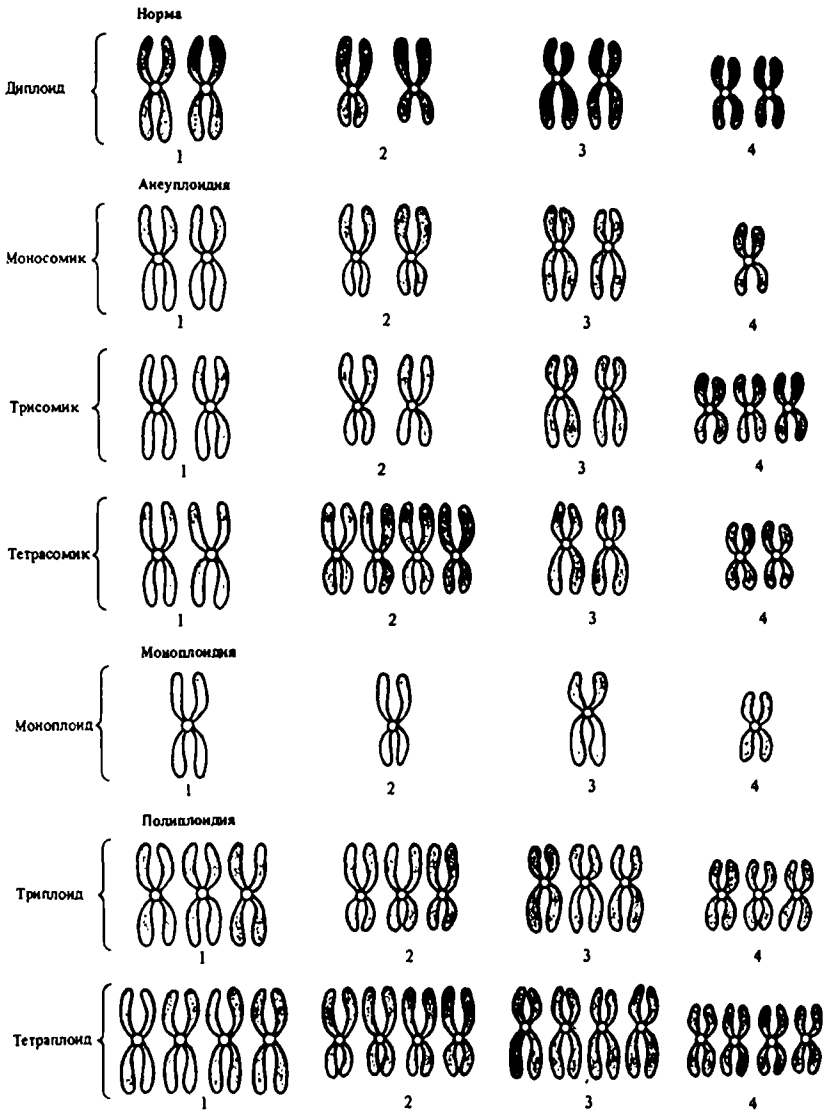


Рис. 6.8. Типы геномных мутаций

конфигурации такие обмены часто называют "квадриадными" (рис. 6.7.2). Как правило, большинство aberrаций хроматидного типа достаточно легко идентифицировать с помощью стандартных цитогенетических методов.

Геномные мутации

Геномные мутации изменяют число хромосом. Такие изменения возникают обычно при нарушении распределения хромосом по дочерним клеткам.

Различают два основных типа генных мутаций (рис. 6.8):

1. Полиплоидия и моноплоидия.
2. Анеуплодия.

При **полиплоидии** число наборов негомологичных хромосом в кариотипе отличается от двух ($3n$; $4n$ и т.д.). Это результат нарушений в митотическом цикле, когда удвоение хромосом происходит без последующего деления ядра и клетки. Одной из причин подобного феномена может быть эндомитоз, при котором происходит блокирование ахроматического аппарата в клетке и сохранение ядерной мембраны в течение всего митотического цикла. Разновидностью эндомитоза является эндоредупликация — редупликация хромосом, происходящая вне клеточного деления. При эндоредупликации как бы повторяются два следующих друг за другом S периода митотического цикла. В результате этого в последующем митозе будет наблюдаться двойной (тетраплоидный) набор хромосом. Такие мутации чаще всего приводят к гибели плода еще в эмбриогенезе. Триплоидия обнаруживается в 4%, а тетраплоидия приблизительно в 1% всех выкидышей. Для индивидуумов с такими кариотипами характерны многочисленные пороки развития, в том числе асимметричное телосложение, слабоумие, гермафродитизм. Тетраплоидные эмбрионы погибают на ранних сроках беременности, эмбрионы же с триплоидными клетками изредка выживают, но только если одновременно с триплоидными содержат клетки с нормальным кариотипом. Впервые синдром триплоидии (69, ХХУ) был обнаружен у человека в 60-х гг. XX в. В литературе описано около 60 случаев триплоидии у детей. Максимальная продолжительность их жизни составила 7 дней.

Анеуплодия — некротное гаплоидному уменьшение или увеличение числа хромосом ($2n+1$; $2n+2$; $2n-1$ и т.д.) — возникает в результате ненормального поведения гомологических хромосом в мейозе или сестринских хроматид в митозе.

При нерасхождении хромосом на одной из стадий гаметогенеза в половых клетках могут оказаться лишние хромосомы. В результате при последующем слиянии с нормальными гаплоидными гаметами образуются зиготы $2n+1$ - или **трисомии** по какой-либо из хромосом. Если же в гамете оказывается на одну хромосому меньше, то при последующем оплодотворении образуется зигота $2n-1$, или **моносомия** по одной из хромосом. Нерасхождение может затронуть не одну, а несколько пар хромосом, что ведет к трисомии или моносомии по нескольким хромосомам. Часто лишние хромосомы обуславливают депрессию развития или гибель особи, их несущей.

Впервые анеуплоидию у человека обнаружили в 1959 г. Дж. Леже и Р. Турпин. Это была трисомия по хромосоме 21 у больных с синдромом Дауна — одним из наиболее распространенных тяжелых наследственных заболеваний (см. главу 8).

Нерасхождение хромосом в мейозе может затрагивать любую из 23 пар хромосом. У человека описаны полные трисомии по хромосомам №№ 8, 9, 13, 14, 18, 21, X, Y. За редким исключением (например, трисомия по 21 хромосоме), аутомсомные трисомии приводят к гибели организма на ранних стадиях эмбриогенеза или в первые дни после рождения. Особенно тяжелыми случаями гетероплоидии считаются моносомии, при которых происходит утрата целой группы сцепления генов. Примерно 20% случаев моносомии приво-

Таблица 6.1. Частота геномных мутаций

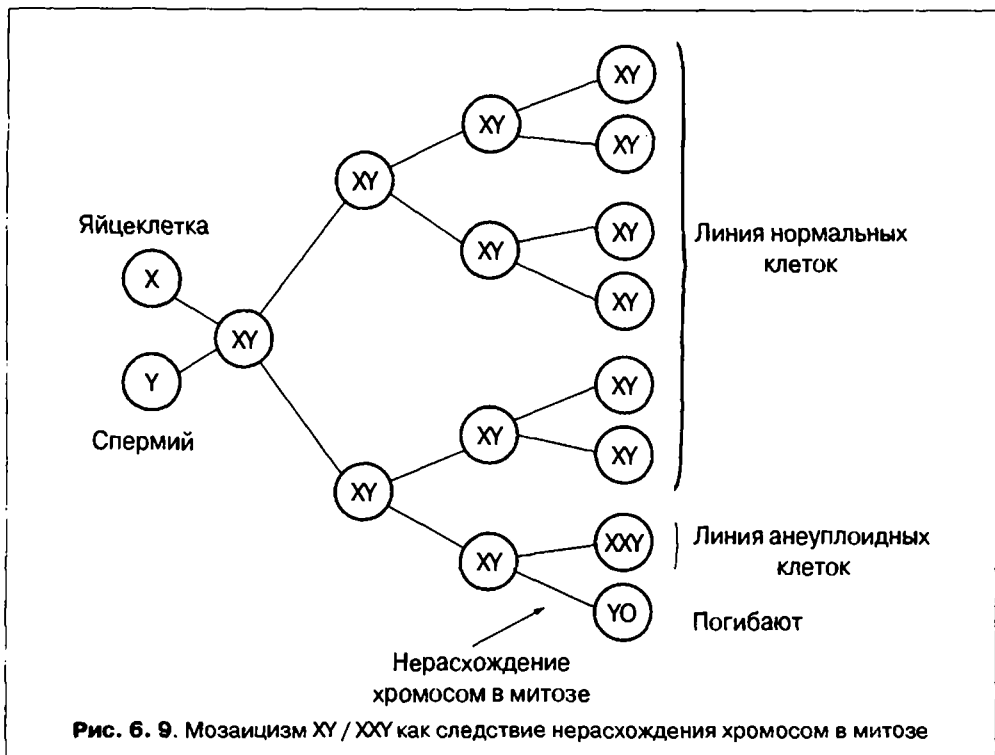
Хромосомы	Синдром	Частота среди новорожденных
Аутосомы		
Трисомия 21	Дауна	1/700
Трисомия 13	Патау	1/5000
Трисомия 18	Эдвардса	1/10000
Половые хромосомы (женщины)		
XO, моносомия	Тернера	1/5000
XXX трисомия	Пониженная плодовитость	1/700
XXXX, тетрасомия		
XXXXX, пентасомия		
Половые хромосомы (мужчины)		
XYY трисомия	Норма	1/1000
XXY трисомия	Клайнфельтера	1/500
XXYY, тетрасомия		
XXXY, тетрасомия		
XXXXY, пентасомия		
XXXXXY, гексасомия		

дят к летальному исходу еще в первые дни эмбрионального развития или заканчиваются гибелью зародыша на более поздних стадиях. Лишь моносомия по X-хромосоме совместима с жизнью. Например, это больные с синдромом Шерешевского-Тернера, при котором $2n = 45$ (44XO). Поскольку половые хромосомы определяют пол, оказывая влияние на дифференцировку гонад, индивидуумы XO — женщины с характерными нарушениями в развитии первичных и вторичных половых признаков (см. главу 8).

При полисомиях по половым хромосомам встречаются различные комбинации X и Y-хромосом, а число их с сохранением при этом жизнеспособности организма может доходить до пяти. Все подобные изменения кариотипа объединяют под общим названием синдром Клайнфельтера. Больные мужчины с недоразвитыми мужскими гонадами, слаборазвитым волосным покровом на теле и увеличенными молочными железами, обычно стерильные. Некоторые из них страдают умственной отсталостью, причем с увели-

чением числа X-хромосом ее вероятность растет.

Неправильное расхождение хромосом в митозе приводит к возникновению **мозаи́ков** — особей, у которых разные клетки несут различный генотип. Фенотипически проявление мозаицизма зависит от доли клеток различных типов, т.е. от того, на какой стадии произошло нарушение в митозе, и от жизнеспособности возникающих линий клеток (рис. 6.9). При недостатке числа хромосом клетки чаще всего нежизнеспособны. У людей с мозаицизмом влияние нормальных клеток может преобладать настолько, что несущие избыточные хромосомы клетки могут вообще не находить выражения в фенотипе или проявляются лишь в виде отдельных симптомов. Так, около 2% больных с синдромом Дауна обнаруживают мозаицизм трисомных и нормальных клеток (47,XX+21/46XX). При достаточно большой доле нормальных клеток психическое развитие больных нередко выше, чем при чистой трисомии по 21 хромосоме. Чаще всего встречается мозаицизм по поло-



вым хромосомам. Многие индивидуумы, несущие признаки обоих полов, являются мозаиками, в клетках которых половые хромосомы содержатся в разных комбинациях, вплоть до кариотипа 46,XX/46,XY. Причины такого мозаицизма различны: оплодотворение ооцита двумя различными спермиями, слияние до 4-х оплодотворенных яйцеклеток или последующие ошибки в митозе при первом делении зиготы. У многих женщин с признаками синдрома Шерешевского-Тернера кариотип некоторых клеток — 45,X, а остальных — 47,XXX. Подобный тип мозаицизма, по-видимому, связан с нерасхождением X-хромосомы нормальной зиготы в первом после оплодотворения митотическом делении. Аналогичен механизм возникновения из зиготы мозаицизма XO/XYU.

Известно также довольно много случаев мозаицизма, при котором в организме содержится три клеточных клона — 46,XX/45,X/47,XXX, образованные в результате нерасхождения хромосом в поздней стадии клеточного деления.

Приведенные примеры хромосомных болезней человека позволяют в некоторой степени оценить тяжесть генетического груза человечества и сложность организации генома человека. В целом, по данным Научного Комитета ООН по действию атомной радиации за 1988 г., частота естественно встречающихся хромосомных болезней, связанных с абберациями хромосом, составляет 400 случаев на 1 млн. новорожденных. Геномные мутации (изменение числа хромосом) встречаются с частотой 3400 на 1 млн.

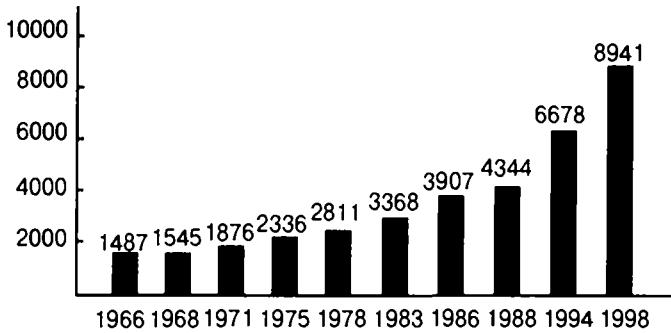


Рис. 6.10 Число менделевских наследственных болезней, идентифицированных с 1966 по 1998 г.

новорожденных. Вместе такие наследственные болезни встречаются у 0,38% новорожденных.

Связь между генотипом и фенотипом

Мутационные изменения в любом из генов человека, равно как и изменения структуры любой из хромосом, приводят к тем или иным изменениям в фенотипе человека. Степень этих изменений зависит от важности для организма вовлеченных в мутагенез генов, от масштабов нарушения генетического материала и от характера наследования возникших мутационных изменений.

Большинство экспертов в области генетики человека считают, что число генов в геноме человека составляет от 50 000 до 100 000. Размер генов варьирует в широких пределах — от 2 до 2000 килобаз (тысяч оснований молекулы ДНК — kb). Например, согласно сведениям 1994 г., распределение по размерам среди 253 генов следующее: 23% генов — менее 10 kb, 36% — между 10 и 25 kb, 20% — между 25 и 50 kb, 13% — между 50 и 100 kb, 7% — между 100 и 500 kb и 1% — более 500 kb.

Успехи в реализации международной программы “Геном человека” и ин-

тенсивное изучение наследственных болезней в клиниках многих стран к 1998 г. увеличило их число заболеваний до 8941. Поистине стремителен прогресс в этой области: в 1966 г. было известно 1487 наследственных болезней, в 1982 г. — около 4000, а в 1994 — 6678 (рис. 6.10).

Для многих из этих недугов изучена локализация мутантных генов и проведен молекулярный анализ продуктов их деятельности. В специфических сайтах различных хромосом человека локализованы более 3900 генов с хорошо известными функциями. С другой стороны, в определенных участках хромосом картировано более 1100 клинических болезней.

Для многих менделевских наследственных болезней характерно большое число различных аллельных вариантов. Например, для гена β -глобина их известно более 400, для трансмембранного регулятора кистозного фиброза (CFTR) — более 500, для гена α -глобина (HBA) — более 100.

Наиболее простую взаимосвязь между мутациями и обусловленными ими болезнями представляет концепция “одна мутация — одна болезнь”. Постулируя унитарную генетическую

Таблица 6.2.

Молекулярная природа мутаций, приводящих к менделевским болезням

Категории	Число менделевских болезней связанных с			Всего
	Точковыми мутациями а)	Точковыми и протяженными мутациями б)	Протяженными мутациями и микроделеционными синдромами	
Аутосомные доминантные	73	18	25	116
Сцепленные с Х-хромосомой	16	24	8	48
Итого	89 (54%)	42 (26%)	33 (20%)	164
Аутосомные рецессивные	111	27	7	145
Всего	200 (65%)	69 (22%)	40 (13%)	309

а — замены оснований

б — преимущественно делеции ДНК

причину для каждой болезни, она нашла подтверждение при описании многих менделевских болезней. Вместе с тем такая простая взаимосвязь наблюдается далеко не всегда. В настоящее время известны примеры других взаимосвязей между генотипом и фенотипом:

- мутации в одних и тех же генах могут быть причиной различных клинических фенотипов (аллельная гетерогенность);

- мутации в различных генах проявляются в сходных или очень близких клинических фенотипах (неаллельная гетерогенность).

При анализе аллельных вариантов 767 генов человека было обнаружено, что 658 генов ассоциированы с какой-либо одной клинической болезнью, 71 ген — с двумя, 30 генов — с тремя, 5 генов — с четырьмя, 1 ген — с пятью, 1 ген — с шестью и 1 — с семью болезнями. В частности, мутации в генах, контролирующих рецептор ростового фактора фибробластов (FGFR) приводят к различным формам скелетных нарушений. Точковые мутации в одном из этих генов, а именно в гене FGFR3 в 4 хромосоме в локусе 4p16.3

были выявлены при изучении случаев ахондроплазии (ACH), гипохондроплазии (HCH) и танатофорной дисплазии (TD).

С другой стороны, показано что 26 болезней обусловлены мутациями в двух различных генах, 11 болезней — в трех, 4 болезни — в четырех, 4 болезни — в пяти, 1 болезнь — в шести и 1 болезнь — в семи и 1 — мутациями в десяти генах. В этих случаях сходные фенотипы возникают в результате влияния мутаций многих генов на общие биохимические процессы либо на одни и те же клеточные структуры. Например, семь синдромов, связанных со скелетными нарушениями, а именно, синдром Аперта (AS), синдром Кроузона (CS), синдром Джексона-Вейса (JWS), синдром Пфайфера (PS), ахондроплазия (ACH), танатофорная дисплазия (TD) и гипохондроплазия (HCH) могут быть результатом мутаций в трех генах, контролирующих рецептор ростового фактора фибробластов (FGFR).

Согласно результатам молекулярно-генетических исследований, менделевские болезни могут быть следствием точковых мутаций, протяженных му-

таций и микроделеций. Различия между этими типами мутационных изменений связаны с размерами охваченных мутацией фрагментов молекулы ДНК. В таблице 6.2 представлены соотношения этих типов изменений, полученные при экспериментальном анализе 309 аутосомно доминантных, сцепленных с X-хромосомой и аутосомно рецессивных менделевских наследственных болезней.

Видно, что большая часть спонтанных менделевских болезней связана с точковыми мутациями, т. е. с заменами отдельных оснований.

В целом частота заболеваний менделевского типа представлена в таблице 6.3.

Необходимо отметить, что такие генетические явления как мозаицизм и экспансия аллелей могут внести дополнительные сложности в понимание процесса фенотипической реализации мутационных изменений в генах. Например, при мозаицизме нормальные и мутантные клетки присутствуют у одного и того же индивидуума. Это может относиться как к соматическим, так и к зародышевым клеткам. В случае, если мозаицизм в зародышевых клетках затрагивает доминантную болезнь, она может не проявиться у данного индивидуума фенотипически вследствие мозаицизма, однако в этом случае сохраняется риск проявления этой болезни у потомков, унаследовавших мутантный ген.

Мультифакториальные болезни

Мультифакториальные болезни объединяют широкий класс заболеваний, в отношении которых известно, что, безусловно имея генетический компонент, они в то же время не подчиняются простому менделевскому наследованию. К ним относятся некоторые врожденные аномалии (напри-

Таблица 6.3.
Частота заболеваний менделевского типа

Типы менделевских болезней	По оценкам 1977	Оценки
	1982, 1986 г.	1998 г.
	%	%
Аутосомные Доминантные	0,95	1,5
Аутосомные Рецессивные	0,25	0,75
Сцепленные с X-хромосомой	0,05	0,15
Всего:	1,25	2,40

мер, анэнцефалия, мышечно-скелетные аномалии, расщелины неба и верхней губы), многие болезни взрослых (диабет, повышенное давление) и большая часть раков. Возникновение этих болезней интерпретируются как результат взаимодействия большого числа факторов генетической природы и окружающей среды. Роль последних наиболее четко прослеживается при анализе коронарных болезней сердца, астмы. В связи с широким распространением в популяциях людей мультифакториальные болезни обуславливают высокую заболеваемость и смертность.

Большинство этих болезней не подчиняются классическим законам наследования, то есть не являются клиническими проявлениями дефектов одиночных генов. В то же время среди родственников больных они встречаются с более высокой частотой, чем в общей популяции. Однако риск заболеть варьирует среди родственников в зависимости от особенностей данной болезни и может быть различным в разных семьях. Для большинства мультифакториальных болезней пока крайне ограничены знания о вовлеченных в генетический контроль этих болезней генов, их числа, типа мутационных изменений и характера воздей-

вующих на их проявление факторов окружающей среды.

С учетом особенностей фенотипического проявления и генотипического контроля группа мультифакториальных болезней может быть подразделена на **врожденные аномалии** и **обычные мультифакториальные болезни**.

Врожденные аномалии представляют собой структурные дефекты той или иной степени тяжести, выявляемые при рождении ребенка. Термин "врожденные" означает лишь присутствие дефектов при рождении и не имеет дополнительного этиологического значения. Врожденные болезни могут быть обусловлены наследственными и ненаследственными факторами. К последним относятся все врожденные пороки, возникающие за счет тератогенного действия внешних факторов, а также врожденные инфекции. Врожденные аномалии являются конечным результатом дисморфогенеза и могут иметь изолированное или множественное проявление. В отношении изолированных врожденных аномалий может быть прослежен путь от какой-либо одной локальной ошибки (мутации) в морфогенезе до наблюдаемого эффекта. В основе множественных врожденных аномалий лежат две или больше различных морфогенетических ошибки, возникающие во время внутриутробного развития ребенка.

Наиболее детально спонтанная изменчивость человека изучалась при проведении трех обширных исследований, предпринятых в 70-80е гг. в Канаде, в США и в Венгрии. О масштабах исследований свидетельствует тот факт, что только в Венгрии было обследовано около 2 млн. рождений. Полученные результаты показывают, что частота появления врожденных аномалий в этих странах сходна и составляет око-

ло 6-7%. Из них 2-3% относятся к крупным врожденным аномалиям, приводящим к весьма серьезным дефектам или к летальному исходу. Частоты врожденных аномалий выше у родственников, носителей этой болезни, чем в целом в популяции. При этом риски появления врожденных аномалий варьируют в зависимости от изучаемой болезни и более высоки у родственников первой степени родства по сравнению с родственниками второй и третьей степени.

Обычные мультифакториальные болезни (такие, как диабет, коронарные болезни сердца, эпилепсия, астма, псориаз и др.) так же, как и рассматриваемые выше врожденные аномалии, не подчиняются менделевским законам наследования. Генетическим базисом обычных мультифакториальных болезней являются генетически восприимчивые индивидуумы, у которых вероятность реализации той или иной болезни зависит от присутствия или отсутствия других факторов риска генетической или средовой природы (таких, как действие других генов, диета, физическая активность, воздействие различных факторов среды и др.)

Как показали исследования, проведенные в Венгрии, общая естественная (спонтанная) встречаемость обычных мультифакториальных болезней в популяции (всего около 30 различных болезней) составляет 60% (включая все возрастные группы). Эти результаты хорошо совпали с материалами исследований в других странах. При этом отдельные индивидуумы могут иметь (и реально имеют) более чем одну мультифакториальную болезнь. Большинство мультифакториальных болезней проявляются в среднем возрасте (за исключением некоторых, таких, как инсулинзависимый диабет

mellitus, эпилепсия). Для большинства болезней их возрастное распределение подчиняется нормальному закону, то есть в молодом возрасте наблюдается низкая частота, наибольшая частота приходится на группу среднего возраста и к старости происходит ее снижение. Исключение составляет астма, проявление которой имеет два пика — первый ранний и второй в среднем возрасте или позже. В большинстве случаев различий в заболеваемости теми или иными мультифакториальными болезнями, например диабет *mellitus*, эпилепсия, повышенное давление, между мужским и женским полом не наблюдается, хотя некоторые заболевания чаще встречаются у мужчин, а другие — у женщин.

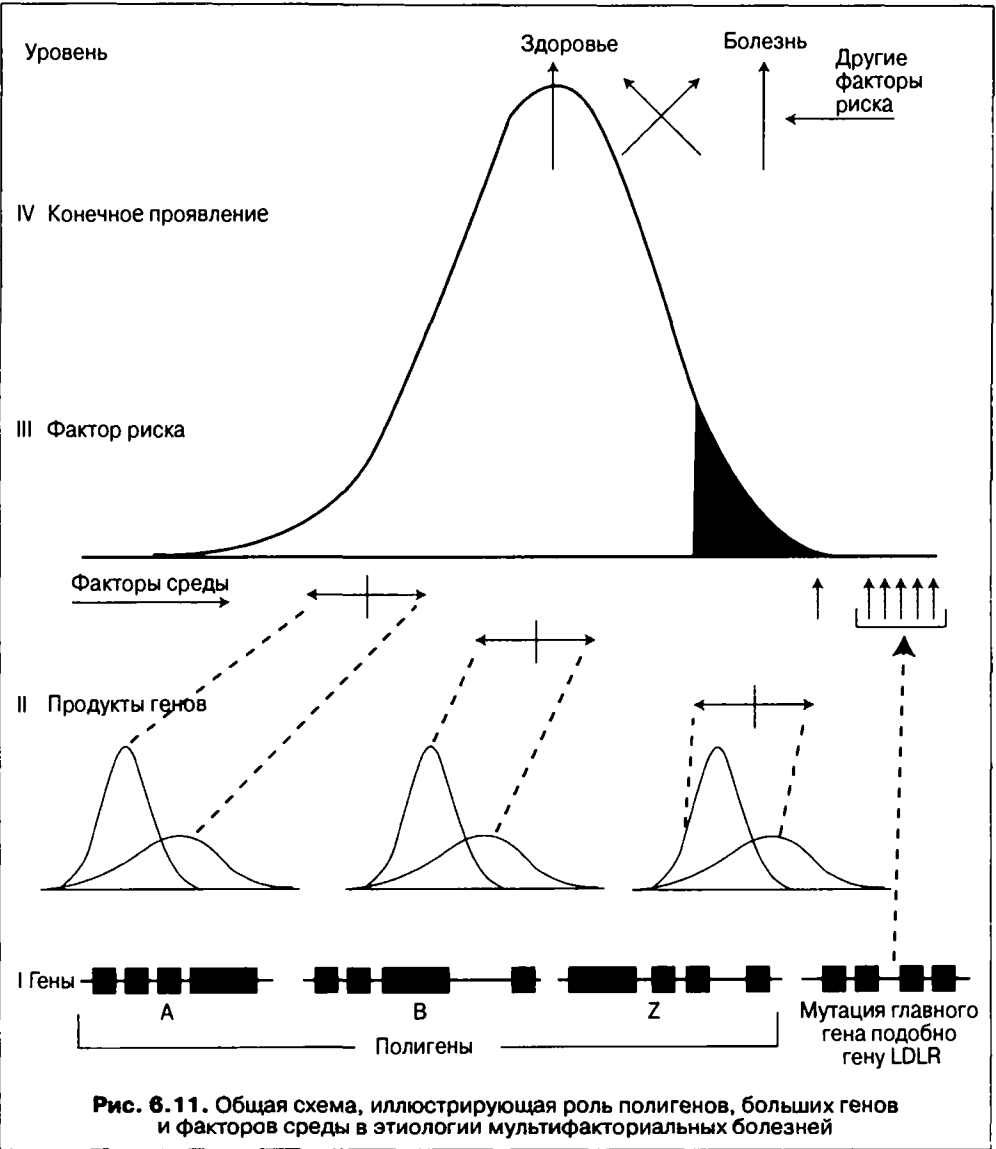
Хотя существует подгруппа мультифакториальных болезней, связанных с мутациями отдельных генов (например, мутации в *LDLR* рецепторном гене, являющиеся причиной аутосомной доминантной формы семейной гиперхолестеремии), для большинства таких болезней характерна генетическая гетерогенность, то есть к одному и тому же конечному клиническому эффекту ведут различные генетические механизмы. Некоторые мультифакториальные болезни возникают в результате появления мутаций во множественных генах (олиго- или полигенах). Более того, у части генетически предрасположенных индивидуумов мультифакториальная болезнь может развиться за счет воздействия факторов окружающей среды, когда возникают так называемые фенокопии.

Таким образом, фенотипическое проявление обычных мультифакториальных болезней зависит от сложного взаимодействия генетических факторов и факторов среды, что наглядно представлено на схеме (рис. 6.11).

Представленная схема основана на материалах исследований генетического контроля коронарной сердечной болезни (CHD). Можно выделить четыре уровня, связывающих генетические изменения с фенотипическим проявлением мультифакториальной болезни. На рисунке 6.11 представлены мутации в сцепленных генах (уровень 1), которые через продукты этих генов (уровень 2) и факторы среды, которые на уровне 3 вносят вклад в количественную вариабельность фактора риска (например, холестерина сыворотки в случае коронарной болезни сердца) и таким образом приводят к проявлению болезни (уровень 4). На уровне 1 выделяют два класса генов: “полигены”, мутантные аллели которых по отдельности только в слабой степени способны влиять на признаки фактора риска (обозначены A, B, Z) и “главные гены”, чьи мутантные аллели обладают сильным эффектом (обозначены как *LDLR* мутации).

Если формирование фактора риска в популяции в целом определяется аллельными вариантами полигенов и факторами среды, то можно ожидать, что “созвездие” полигенных аллелей будет варьировать от одного индивидуума к другому. Индивидуальный риск заболеть данной болезнью определяется в этом случае особой комбинацией аллелей в локусах, продукты которых вовлечены в контроль физиологических процессов, определяющих характеристики фактора риска. Варьирование в риске между индивидуумами того же самого генотипа для этих полигенов происходит за счет воздействия факторов среды.

В противоположность мутациям в полигенах, мутации в главных генах связаны с дискретными фенотипическими категориями, каждая из кото-



рых характеризуется дискретным риском развития болезни и меньшим влиянием средовых факторов (например, мутации LDLR, представленные на рис. 6.11). Такие мутации отдельных генов, приводящие к мультифакториальной болезни, редки. Хотя они и приводят к сильным разрушитель-

ным эффектам у индивидуумов, которые их несут, на популяционном уровне такие мутации вносят небольшой вклад в варибельность характеристик фактора риска и, таким образом, ответственны лишь за небольшую долю данной болезни в популяции.

Становится очевидным, что, в отличие от менделевских болезней, предсказание на основе генетической информации будет ли подвержен тот или иной индивидуум мультифакториальной болезни, представляет собой сложную проблему, поскольку в этом случае наличие генетического дефекта еще не эквивалентно наличию болезни. Более того, в случае мультифакториальных болезней не ожидается, что мутационные дефекты каких-либо отдельных генов послужат причиной для всех или большинства случаев болезни. Исходя из этого можно заключить, что генетическая расшифровка мультифакториальных болезней является сложной задачей и, судя по всему, будет представлять главную проблему медицинской генетики в ближайшем будущем.

Общая частота спонтанных мутаций у человека

Оценки частот спонтанных мутаций основаны, как мы уже указывали, на обширных исследованиях, проведенных в провинции Британская Колумбия в Канаде и в Венгрии. Жители Британской Колумбии являются потомками выходцев из Западной Европы, то есть в силу законов популяционной генетики они в преобладающей степени имеют генотипы, близкие к генотипам современных жителей Западной Европы. Таким образом, представленные выше оценки частот менделевских, хромосомных и мультифакториальных болезней основаны преимущественно на генотипах жителей Западной Европы, которое, конечно, далеко не исчерпывают генетическое разнообразие популяций человека на Земле. Что это действительно так, свидетельствуют результаты обследования ряда других популяций и этнических групп:

амиш в Пенсильвании, финнов, французских канадцев, евреев ашкенази, буров (потомков датчан) в Южной Африке, палестинских арабов, проживающих в Израиле, и ряда других средневосточных популяций. Показано, что несколько менделевских болезней, которые редко встречаются в Западноевропейских популяциях, распространены в указанных популяциях и наоборот. Например, у женщин-евреек ашкенази выявлена высокая частота мутаций BRCA1 и BRCA2, не наблюдаемая в других популяциях. Эти мутации приводят к относительному увеличению частоты рака груди и яичника.

Различия в частотах спонтанных мутаций отдельных локусов в различных популяциях человека (особенно в изолированных) часто связаны с эффектом основателя и с генетическим дрейфом. **Эффект основателя** состоит в том, что маленькая выборка из большой популяции, несущая только небольшую часть генетического разнообразия этой популяции, в условиях изоляции "определяет" генетическую судьбу своих потомков. **Генетическим дрейфом**, который подробно мы будем обсуждать в главе 7, называют явление кумулятивных изменений в генных частотах в результате изменений, связанных с выборками из небольших по численности популяций.

Необходимо указать еще на два дополнительных фактора современной цивилизации, которые потенциально могут изменить спектр и частоту спонтанных генетических изменений (и, соответственно, генетических болезней) в различных популяциях человека. Во-первых, такие изменения могут происходить вследствие увеличения мобильности смешения популяций. Во-вторых, частоту заболеваний может изменить доступность (во всяком

случае, в наиболее развитых странах) генетического скрининга, генетического консультирования и пренатальной диагностики. Как следует из главы 7, посвященной популяционной генетике человека, в последнем случае речь идет, конечно, о воздействии на частоту заболеваний, а не на частоту контролирующих данную наследственную болезнь аллелей генов.

Теперь рассмотрим естественную генетическую изменчивость человека в целом, включая менделевские, хромосомные и мультифакториальные болезни. Необходимо еще раз подчеркнуть, что в этой области за последние годы наблюдается стремительный прогресс. Сегодня известно около девяти тысяч наследственных болезней, и этот список пополняется ежегодно. Длительное время основой для оценки естественной изменчивости человека служили результаты эпидемиологического обследования большой популяции людей в Британской Колумбии (Канада). На основе этих исследований охватывающих возрастную группу от рождения до 21 года было установлено, что в этой возрастной группе наблюдается 10,6 % различных генетических аномалий.

Недавно законченное обширное обследование в Венгрии расширило представления о естественной изменчивости человека. Показано, что в возрасте до 70 лет, т.е. в течение всей жизни человека, выявляется почти на порядок больше наследственных аномалий, причем значительная часть наследственных болезней проявляется в среднем и пожилом возрасте. Преобладающую часть выявленной наследственной отягощенности человека составляют, как мы уже отмечали, мультифакториальные болезни (подагра, язва, диабет, астма и др.) — их абсо-

лютное число равно 600 тыс. на 1 млн. людей (60 %). Таким образом, впервые удалось оценить суммарную (в течение всей жизни) генетическую отягощенность популяций человека.

Естественная генетическая изменчивость человека включает в себя также генетическую отягощенность, выявляемую уже в зародышевых клетках. В последние годы были разработаны методы прямого хромосомного анализа сперматозоидов человека путем оплодотворения яйцеклеток хомячка. Показано, что частота аномалий хромосом в сперматозоидах фертильных мужчин составляет около 7%. Такие хромосомные изменения приводят к раннему прекращению беременности из-за связанных с абберациями хромосом крупных аномалий развития зародыша.

Исследования, проведенные в Европе, Америке и в Японии в 70-80е гг., позволили рассчитать пропорцию цитогенетических нарушений при возникновении аномалий беременности. Показано, что спонтанные выкидыши на сроках от 5 до 28 недель, связанные с хромосомными аномалиями, составляют приблизительно 40% от общего их числа. При этом в ранний период (от 5 до 7 недель) эта частота ниже и составляет 17,5%, далее (с 8 до 15 недель) она повышается приблизительно до 50%, снижается приблизительно до 30% в период от 16 до 19 недель и падает до 10% в период от 20 до 29 недель.

Общее представление об относительном вкладе аномалий хромосом можно получить при анализе соотношения частот их встречаемости, зарегистрированных при исследовании новорожденных, перинатальной гибели и спонтанных аборт (рис. 6.12). В целом уровень естественной изменчивости человека весьма высок — он со-

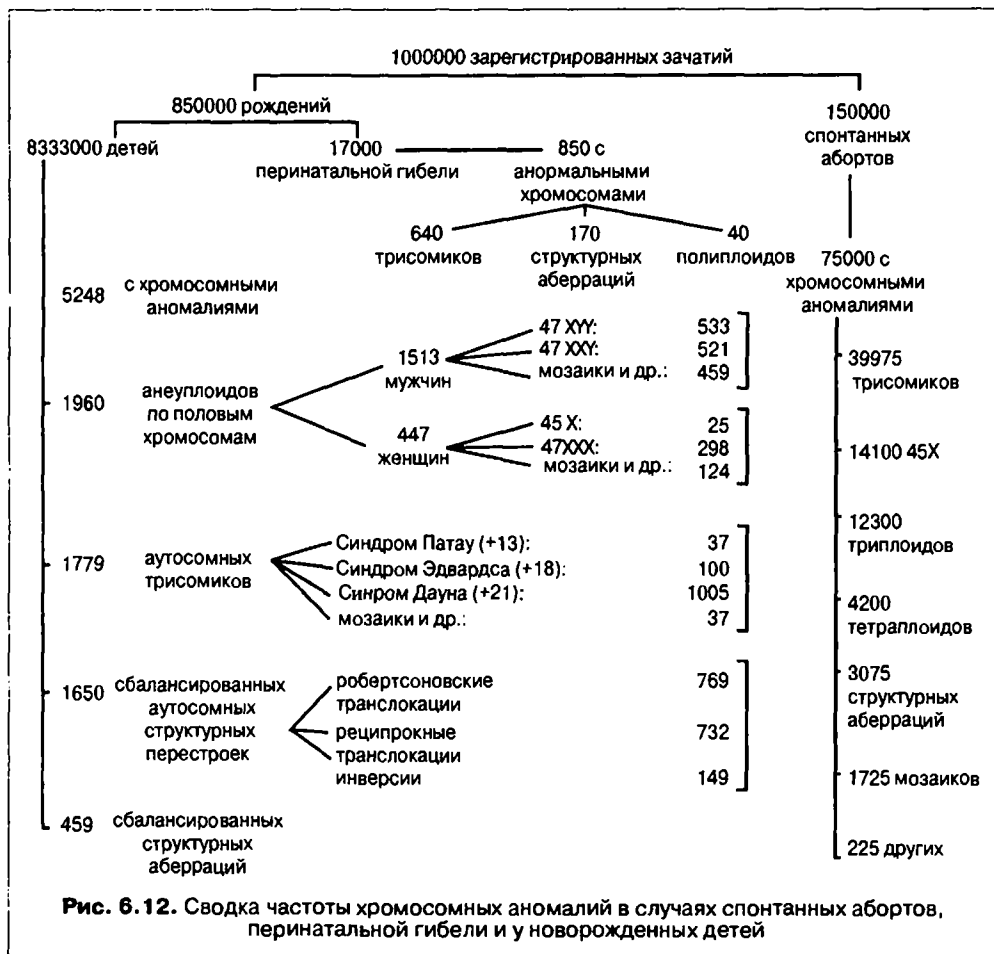


Рис. 6.12. Сводка частоты хромосомных аномалий в случаях спонтанных абортов, перинатальной гибели и у новорожденных детей

ставляет, около 70% различных генетических отклонений от нормы в течение 70 лет жизни человека, принятых условно за среднюю продолжительность жизни. Эта величина складывается из 2,4% менделевских болезней, 0,4% хромосомных болезней, 6% врожденных аномалий и 60% мультифакториальных болезней. Таким образом, у 70% людей в течение их жизни проявляется хотя бы одно серьезное генетически обусловленное отклонение от нормы, снижающее продолжительность жизни человека по сравнению с

нормой, либо мешающее его нормальной работоспособности.

Данные, полученные в Британской Колумбии, США и Венгрии, легли в основу обобщенной оценки уровня естественной изменчивости человека. Научным комитетом ООН по действию атомной радиации, в 1988 г. (см. Табл. 6.4). При составлении данной таблицы эксперты НКДАР неоднократно подчеркивали, что в будущем оценка уровня естественной изменчивости может возрасти за счет уточнений частот отдельных типов наследуемых болезней

Таблица 6.4. Оценка методом удваивающей дозы риска появления генетических болезней на миллион новорожденных в популяции, подвергающейся воздействию генетически значимой дозы, эквивалентной 1 Зиверту на поколение (при воздействии низких доз, при малой мощности дозы излучения)*

Классификация болезней	Естественная частота на миллион новорожденных	Эффект воздействия 1 Зв на поколение		
		Поколения		Равновесный уровень
		I	II	
Аутосомные доминантные и сцепленные с Х-хромосомой	10000	1500	1300	10000
Аутосомные рецессивные	2500	5	5	1500
Хромосомные — вследствие структурных аномалий	400	240	96	400
— вследствие изменения числа хромосом	3400	Возможно очень низкий		
Врожденные аномалии	60000	Не оценивается		
Другие многофакторные болезни	600000	Не оценивается		
Рано проявляющиеся доминантные мутации	Неизвестно	Не оценивается		
Наследуемые раки	Неизвестно	Не оценивается		
Общий оцениваемый риск		1700	1400	12000

* При расчетах принято, что удваивающая доза равна 1 Зв.

и за счет включения некоторых иных типов генетической изменчивости человека, по которым пока не производится количественная оценка, но которые, безусловно, имеют высокую мутационную компоненту (например, наследуемые злокачественные опухоли).

В реальности этого прогноза можно убедиться на примере менделевских наследственных болезней, оценка частоты которых возросла за последние 10 лет от величины 1,25%, указанной в данной таблице до величины 2,4%.

Частоты спонтанных мутаций в популяциях человека, представленные в таблице 4, послужили основой для расчета генетического риска, связанного с воздействием ионизирующих излучений на человека. Эти расчеты, о

которых речь будет ниже, также представлены в этой таблице. Так как оценки генетического риска облучения человека, производимые НКДАР ООН, не претерпели изменений за последние 10 лет, в дальнейших разделах, посвященных рассмотрению индуцированного мутагенеза у человека, мы будем придерживаться этих официальных оценок.

Индукцированный мутагенез

Ныне стало очевидным, что бурное развитие науки и техники приводит к интенсивному накоплению в окружающей среде разнообразных мутагенов, способных наносить вред здоровью не только современного, но и будущих поколений людей.

Воздействие на живой организм различных мутагенных факторов внешней среды, в первую очередь, химических и физических, приводит к накоплению патологических мутаций, которые нередко оказывают неблагоприятное влияние на жизнедеятельность как отдельных клеток, так и организма в целом. При этом мутации, возникающие в половых клетках, могут приводить к спонтанным абортam, врожденным порокам развития, мертворождениям, к увеличению частоты наследственных заболеваний. Мутации, возникающие в соматических клетках, способны инициировать развитие злокачественных новообразований, сокращать продолжительность жизни, вызывать преждевременное старение, а также неблагоприятно воздействовать на целый ряд жизненно важных функций организма. В связи с этим проблемам, связанным с индуцированным мутагенезом, уделяют пристальное внимание. Основные закономерности индуцированного мутационного процесса у человека на генном, хромосомном и геномном уровнях изложены в многочисленных работах, выполненных как в нашей стране, так и за рубежом. Большая часть исследований проводится на соматических клетках, — наиболее доступным и удобным объекте исследования. При изучении индуцированного мутагенеза основное внимание уделяют следующим вопросам: спектру мутаций; количественной зависимости частоты мутаций от дозы мутагена и его качества (т.е. вида); репарации повреждений ДНК; особенностям действия малых доз мутагена; влиянию антимутагенов; индивидуальной чувствительности организма.

Основная масса исследований по индуцированному мутагенезу посвя-

щена радиационному и химическому мутагенезу.

Мутации, индуцированные радиацией

Именно при исследовании радиационного мутагенеза была впервые показана возможность индуцировать мутации при действии факторов внешней среды. Основы радиационной генетики были заложены работами Г.А.Налсона и Г.Т.Филиппова в 1925г. в опытах на плесневых и дрожжевых грибах. Позже, в 1927г. Г.Д.Меллер, используя методы количественного учета мутаций у дрозофилы, обосновал факт мутагенного действия рентгеновских лучей. В 1928г. Л.Д.Стадлер в опытах на ячмене и кукурузе показал, что ионизирующие излучения разных видов способны вызывать мутации. В последние два десятилетия происходило достаточно активное развитие классической радиационной генетики. Основные положения ее изложены в трудах Д.Ли, Д.Кэтчсайда, Н.В.Тимофеева-Ресовского, К.Г.Циммера, А.Холландера, А.С.Серебровского, Н.П.Дубинина, Ядерные взрывы, прогремевшие в Хиросиме и Нагасаки, стимулировали бурное развитие работ по изучению влияния радиации на человека. Усилия ученых многих стран привели к разработке современных представлений о механизмах воздействия ионизирующих излучений. При этом основные закономерности воздействия ионизирующих излучений были вскрыты в исследованиях, проведенных на микроорганизмах, растениях и животных. Используя принципы экстраполяции, результаты, полученные на экспериментальных объектах, широко используют для оценки генетического риска облучения человека. Например, исследования, проведенные

на мышах, в ходе которых изучали частоту индуцированных радиацией катаракт и скелетных аномалий, явились основой для расчета ожидаемой частоты индуцированных доминантных мутаций у человека.

Все радиобиологические эффекты, вызываемые ионизирующими излучениями у различных видов живых существ, могут быть подразделены на стохастические и нестохастические. **Стохастические эффекты** характеризуются линейной беспороговой зависимостью вероятности их появления от дозы ионизирующего излучения. При этом от величины дозы зависит частота рассматриваемых событий, а не их тяжесть. К таким эффектам относятся генетические последствия облучения и радиационный канцерогенез. **Нестохастические эффекты** имеют пороговую (сигмоидную) зависимость от дозы, причем с дозой связана как вероятность эффекта, так и его тяжесть. Примерами нестохастических эффектов являются: лучевая болезнь, сокращение продолжительности жизни, смертность, индуцированные радиацией пороки развития, поражение иммунной системы. Следует заметить, что механизмы возникновения стохастических и нестохастических эффектов совершенно различны, поэтому при оценке рисков появления этих эффектов в результате облучения недопустимо их объединение. В этой книге мы будем рассматривать преимущественно стохастические эффекты радиаций.

Сходство и различие спонтанных и индуцированных мутаций

В повреждающем действии радиации на генетический аппарат клетки есть несколько основных моментов, которые имеют важное значение для оценки последствий облучения.

1. Как показали многочисленные исследования, ионизирующие излучения вызывают все типы мутаций, свойственные спонтанному, мутационному процессу — точковые мутации, абберрации хромосом и генные мутации. Однако следует отметить, что не все типы спонтанных мутаций с одинаковой частотой увеличиваются под действием радиации.

2. Одним из фундаментальных предложений, на которых основаны оценки риска облучения человека, является допущение сходства спонтанных и индуцированных ионизирующими излучениями мутаций. Предполагая такое сходство, можно оценить вред, причиненный воздействием радиации, путем расчета, какую прибавку к спонтанному мутационному процессу дает мутагенез, вызванный облучением. Так производится определение дозы, удваивающей естественный мутационный процесс. Однако экспериментальные данные молекулярной генетики демонстрируют различия между спонтанными и индуцированными мутациями, вызывающими менделевские болезни. Остановимся на этом важном вопросе и рассмотрим различия между этими мутациями: спонтанные мутации — это чаще всего точковые мутации и небольшие делеции; большинство же индуцированных мутаций — делеции, затрагивающие многие гены;

- спонтанные мутации могут вызывать как утрату, так и усиление функции генов, большинство же индуцированных мутаций вызывает потерю функции;

- происхождение спонтанных мутаций связано с организацией генов, т.е. они сайт-специфичны; индуцированные мутации происходят в результате случайного попадания энергии излу-

чения в генетический материал и могут затрагивать несколько генов, имеющих разное значение для выживаемости организма.

Из этих различий между спонтанными и индуцированными мутациями следует важное следствие: вероятность того, что радиация приведет к возникновению мутаций, обладающих такой же специфичностью, какой обладают спонтанные мутации, очень мала. Другими словами, спектры спонтанных и индуцированных радиацией мутаций, как следует из молекулярногенетических исследований, существенно различаются.

Ионизирующие излучения в основном индуцируют микроделеции, поэтому важно проанализировать, какими проявлениями на уровне фенотипа человека сопровождаются такие микроделеционные изменения. Поскольку данные о микроделеционных синдромах, связанных с воздействием ионизирующих излучений на человека, отсутствуют, рассмотрим, к каким последствиям для здоровья человека приводят спонтанные синдромы, связанные с микроделециями. Таких синдромов в настоящее время известно около 30. Все они связаны с микроделециями в разных хромосомах и обычно сопровождаются потерей функции нескольких генов. Фенотипы носителей таких микроделеции зависят от участков хромосом, затронутых микроделециями (например, хромосомы 19 и 22 изобилуют генами, а хромосомы 4 и 13 генами обеднены), но тем не менее разные делеции имеют ряд общих признаков — они вызывают многочисленные нарушения развития, умственную отсталость, замедленный рост, дисморфные черты лица. Очевидно, такие же изменения в фенотипе человека будут вызывать микроделеции, возникающие в результате радиацион-

ного воздействия. Основной особенностью таких микроделеционных фенотипов является несходство с фенотипами большинства спонтанных мутаций, нечеткое, неясное их проявление.

Различия в клинических фенотипах спонтанных и индуцированных ионизирующими излучениями мутаций имеют принципиальное значение для оценки риска облучения человека. Дело в том, что при изучении последствий воздействия ионизирующих излучений на популяции человека обычно проводят анализ социально значимых отклонений от нормы, которое традиционно связывают с отклонениями, подобными фенотипическим проявлениям спонтанных мутаций. Изменения же, связанные с микроделеционными синдромами, практически остаются вне поля зрения исследователей в силу их нечеткого проявления. Таким образом, большая часть фенотипических отклонений, связанных с микроделециями, индуцированными ионизирующими излучениями, практически составляют не учтенный пока компонент генетического риска облучения популяций человека.

Дозовые зависимости частоты мутаций

Частота мутаций зависит от дозы облучения. Основной закономерностью повреждающего действия радиации является беспороговая линейная зависимость от дозы облучения при индукции мутаций, для возникновения которых необходимо только одно первичное событие (рис. 6.13). Эта закономерность радиационной генетики имеет исключительно важное значение, т.к. показывает, что при действии радиации на наследственные структуры не существует генетически неэффективных доз облучения.



Характер дозовых зависимостей хорошо изучен на дрозофиле. На рисунке 6.14 приведен пример рассматриваемой зависимости для точковых мутаций и хромосомных разрывов у *Drosophila*



melanogaster. При увеличении дозы облучения, а именно в диапазоне очень высоких доз, может наблюдаться “эффект насыщения”, приводящий к отклонению зависимости доза — эффект от линейной. Это объясняется тем, что каждое мутационное событие происходит за счет однократного попадания в определенную наследственную структуру, причем вероятность поражения этой структуры будет расти линейно с увеличением дозы до тех пор, пока одна и та же структура не будет поражаться более одного раза. При изучении зависимости частоты индуцируемых мутаций от дозы мутагенного фактора часто наблюдают дозовую кривую с максимумом. На рисунке (рис. 6.15) представлена зависимость частоты соматических мутаций в волосках тычиночных нитей у традесканции клона 02 от дозы рентгеновских лучей. При дозе около 2 Гр. наблюдается максимум числа мутаций.

Более сложная зависимость от дозы облучения установлена в случае мутаций, для возникновения которых необходимо более одного первичного события. Так, для обменных aberrаций, образующихся в результате нескольких разрывов и последующего воссоединения разорванных участков хромосом, были получены экспоненциальные кривые. Такая зависимость эффекта от дозы действительно обнаружена во многих экспериментах. На рисунке 6.16 представлена кривая, полученная для обменных aberrаций у дрозофилы.

Частота индуцированных мутаций зависит от вида ионизирующего излучения (рис. 6.17). Так, если принять генетическую эффективность гамма-излучения за единицу, то рентгеновское излучение при облучении в той же дозе будет в среднем эффективнее в 2 раза, медленные нейтроны — в 5 раз, а альфа-частицы и быстрые нейтроны — в 10 раз.

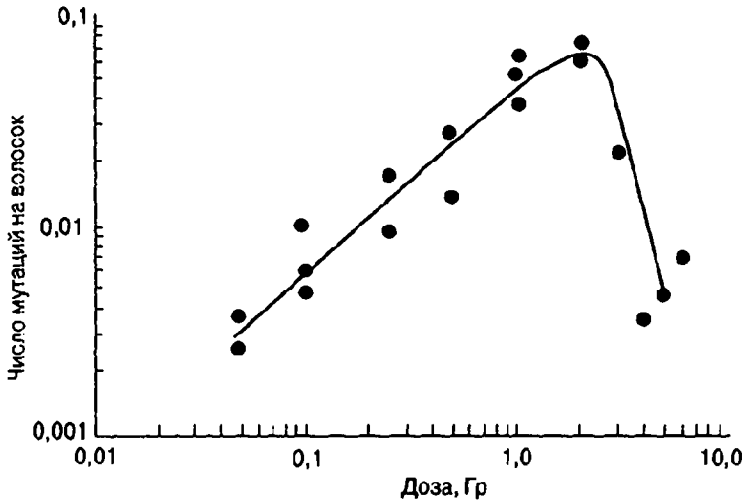


Рис. 6.15. Зависимость частоты соматических мутаций в волосках тычиночных нитей традесканции клона 02 от дозы рентгеновских лучей

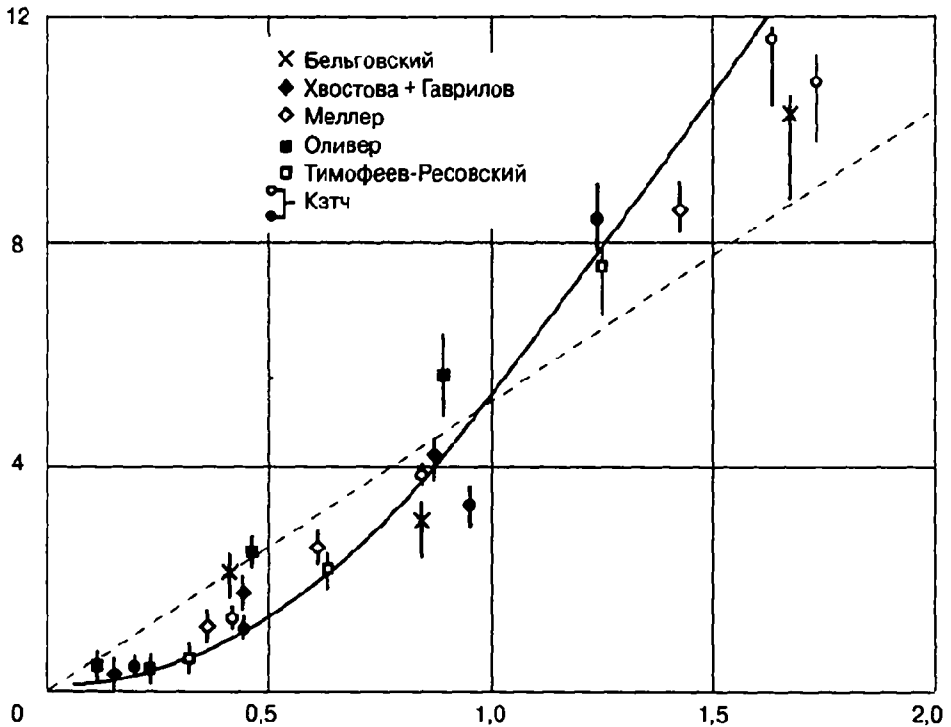


Рис. 6.16. Частота хромосомных aberrаций (события с двумя разрывами) в зависимости от дозы облучения. Данные получены разными авторами. По оси абсцисс – доза (килорентгены). По оси ординат – частота хромосомных aberrаций (%)

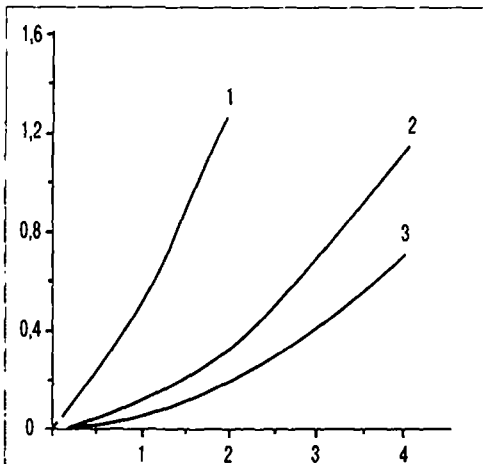


Рис. 6.17. Зависимость частоты дицентриков в лимфоцитах крови человека от вида ионизирующего излучения.

По оси абсцисс — доза (Грей).

По оси ординат — дицентрики на 1 клетку
1 — быстрые нейтроны, 2 — рентгеновское излучение, 3 — гамма-облучение ⁶⁰Co

Частота мутаций, возникающих при облучении, зависит от мощности ионизирующего излучения (рис. 6.18). Одна и та же доза, примененная при относительно низкой мощности, приводит к возникновению меньшего числа мутаций, чем та же доза при более высокой мощности.

Хромосомные нарушения при действии ионизирующих излучений

В классических работах по радиационной генетике мутационный эффект выявляют на фенотипическом уровне, причем большинство работ выполнено на растительных объектах, дрозофиле и других организмах, находящихся в достаточно отдаленном родстве с человеком. Исследования на человеке начали активно проводить только после разработки метода получения препаратов хромосом из лимфоцитов крови. В настоящее время накоплен огромный

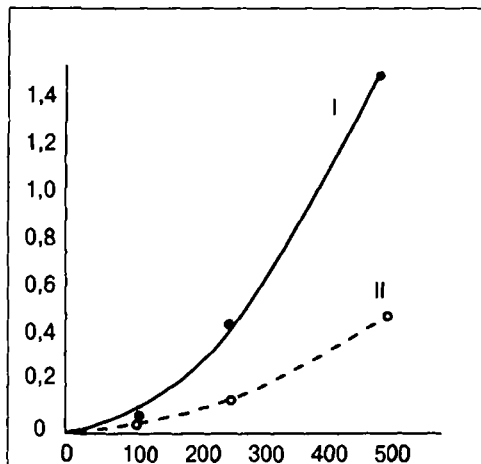


Рис. 6.18. Зависимость частоты дицентриков в лимфоцитах крови человека от мощности ионизирующего излучения.

По оси абсцисс — доза (рад).

По оси ординат — дицентрики на 1 клетку

практический материал по исследованию структурных нарушений хромосом после облучения *in vivo* и *in vitro*. Все основные положения радиационной генетики нашли подтверждение при анализе хромосомных aberrаций в клетках из культуры кожи, костного мозга или лейкоцитов периферической крови. Принципиальных морфологических различий между aberrациями в разных клетках нет, если исследование проводят на одной и той же стадии клеточного цикла. Было показано, что в клетках человека индуцируются те же типы хромосомных aberrаций, что и у других объектов.

Чаще всего при изучении влияния облучения на организм человека используют культуру лимфоцитов периферической крови. Многочисленные исследования по радиационной цитогенетике, проведенные на лимфоцитах крови человека, позволили выявить основные качественные и количественные

закономерности индуцированного мутагенеза. Культура лимфоцитов периферической крови представляет собой достаточно простую и в то же время уникальную по своим возможностям модель для изучения радиационного мутагенеза. Для ее получения достаточно взять всего несколько миллилитров венозной крови и поместить в питательную среду, содержащую стимулятор роста — фитогемагглютинин (ФГА). Следует заметить, что в норме лимфоциты периферической крови, как правило, не делятся, находясь в стадии покоя (интерфазы). Под действием ФГА происходит их иммунологическая трансформация и они начинают активно делиться. Таким образом можно достаточно легко получить большое количество клеток для цитогенетического анализа. С помощью специальных методов обработки и различных способов окраски клеток готовят препараты для исследования структурных и количественных нарушений хромосом.

При индуцированном мутагенезе наблюдаются те же типы хромосомных aberrаций, что и при спонтанном мутационном процессе. Среди хромосомных aberrаций, выявленных при анализе лимфоцитов периферической крови после облучения, выделяют стабильные aberrации (транслокации, инверсии), которые способны нормально проходить через митоз, и нестабильные (дицентрики, центрические кольца, парные фрагменты), элиминирующие при последующих делениях клетки. Особенно наглядным индикатором радиационного воздействия на организм являются дицентрики. В норме такие хромосомные нарушения встречаются достаточно редко — с частотой 3-5 на 10000 проанализированных клеток. Многочисленными исследованиями было показано, что частота возникновения дицентриков

возрастает пропорционально дозе облучения. Установлена также зависимость эффекта от дозы, которая, как правило, является линейной, но при сравнительно высоких дозах приобретает экспоненциальный характер. Увеличение числа хромосомных aberrаций обнаружено при обследовании различных групп облученных людей, а именно, у пациентов после рентгенодиагностических процедур и терапевтического облучения, а также у лиц, связанных с профессиональным облучением (работники предприятий атомной промышленности, врачи-рентгенологи и др.); у людей, облучившихся в результате аварий (например, после аварии на Чернобыльской АЭС); у пострадавших в результате атомной бомбардировки Хиросимы и Нагасаки.

В настоящее время в связи с широким использованием атомной энергии изучение и оценка цитогенетических эффектов облучения у человека, несомненно, является важной задачей. Выявленные количественные зависимости частоты хромосомных aberrаций от дозы облучения стали основой для разработки принципов **биологической дозиметрии**. При облучении лейкоцитов *in vitro* в лабораторных условиях возможно получение кривых доза — эффект, которые могут быть использованы как калибровочные при количественном определении полученной дозы. Многими исследователями была продемонстрирована одинаковая радиочувствительность хромосом при облучении *in vivo* и *in vitro*. Еще в 1966 г. Бендер и Гоч при обследовании людей, облученных в результате аварии гамма-лучами и быстрыми нейтронами, а также при проведении многочисленных экспериментов с облучением крови *in vitro* предложили формулу для оценки доз облучения. В последующих работах эта формула не-

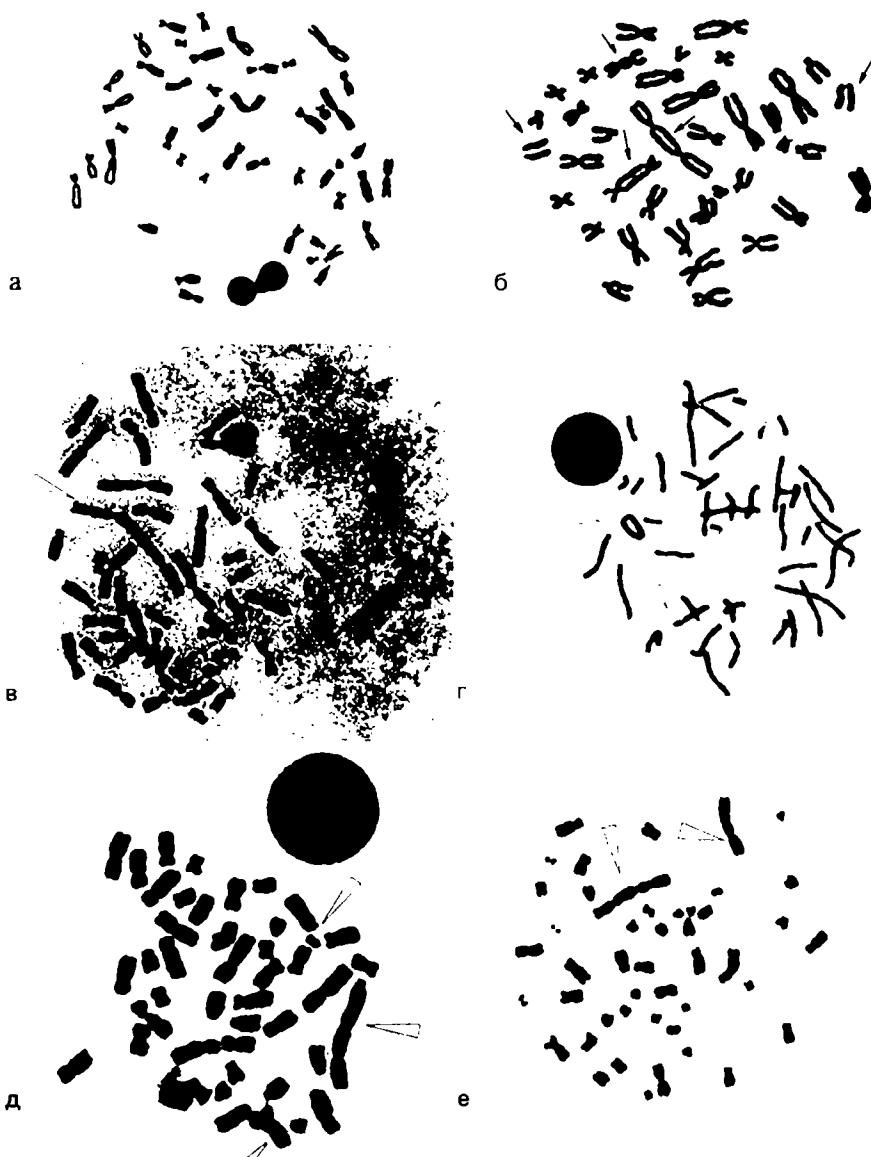


Рис. 6.19. Метафазные пластинки в культуре лимфоцитов крови.
Окраска красителем Гимза

а – норма (46 XX)

б – метафазная пластинка с тремя дицентриками и двумя парными фрагментами (обозначены стрелками)

в – метафазная пластинка с дицентриком

г – метафаза с центрическим кольцом и парными фрагментами

д – метафаза с трицентриком и двумя парными фрагментами

е – мультиаберрантная клетка с тетрацентриком, дицентриком и многими парными фрагментами

однократно уточнялась. Чаще всего для оценки величины поглощенной организмом дозы используют частоту возникновения дицентриков и центрических кольцевых хромосом. Эти хромосомные aberrации легко распознаются при анализе под микроскопом после стандартного окрашивания метафазных препаратов красителем Гимза. На рисунке 6.19 изображена нормальная метафазная пластинка и метафазные пластинки с дицентриками и центрическими кольцами. На рисунке представлены также другие редкие хромосомные aberrации, наблюдаемые у облученных людей: трицентрики, тетрацентрики и мультиабберрантные клетки. К сожалению, для целей биологической дозиметрии использование частоты дицентриков и центрических колец ограничено из-за того, что со временем клетки, несущие такой тип хромосомных aberrаций, элиминируются из кровяного русла. Наиболее эффективен подсчет частоты дицентриков для оценки дозы облучения в ранние сроки (до года) после радиационного воздействия. В более поздние сроки, для ретроспективной оценки дозы облучения, необходима дополнительная информация — условия облучения, время, прошедшее после радиационного воздействия, скорость элиминации клеток с дицентриками и центрическими кольцами.

Более перспективным и эффективным методом оценки доз в этом случае является учет aberrаций стабильного типа — транслокаций, инверсий, частота которых остается постоянной в течение длительного времени после облучения. В отличие от дицентриков, транслокации и инверсии не подвергаются селекции во время клеточного деления. Частота возникновения aberrаций стабильного (транслокации) и нестабильного (дицентрики) типов сразу после облу-

чения приблизительно одинакова. До недавнего времени для анализа частоты транслокаций использовали дифференциально окрашенные препараты (G-окраска). Под дифференциальной окрашиваемостью хромосом понимают их способность к избирательному окрашиванию по длине. При этом каждая хромосома имеет свой рисунок исчерченности, позволяющий выявить хромосомные перестройки (например, симметричные транслокации), которые невозможно идентифицировать при обычном окрашивании из-за кажущейся морфологической однородности хромосом. Этот метод определения стабильных хромосомных aberrаций весьма трудоемкий и требует высокой квалификации специалистов для проведения цитогенетического анализа.

В 1986 г. в Ливерморской национальной лаборатории (США) разработан принципиально новый метод изучения хромосом — метод флюоресцентного выявления ДНК хромосом путем гибридизации *in situ* со специфическими молекулярными зондами (FISH). Он основан на способности хромосомной ДНК связываться при определенных условиях с фрагментами ДНК (ДНК-зонды), которые включают нуклеотидные последовательности, комплементарные хромосомной ДНК (рис. 6.20). ДНК-зонды предварительно метят специальными веществами (например, биотином или дигоксигенином). Меченые ДНК-зонды наносят на цитогенетические препараты подготовленных для гибридизации (денатурированных) метафазных хромосом. Предварительная обработка хромосом необходима для облегчения доступа ДНК-зонда к геномной ДНК. После того, как произошла гибридизация, препараты обрабатывают специальными флюоресцентными красителями, конъюгированными с веществами, спо-

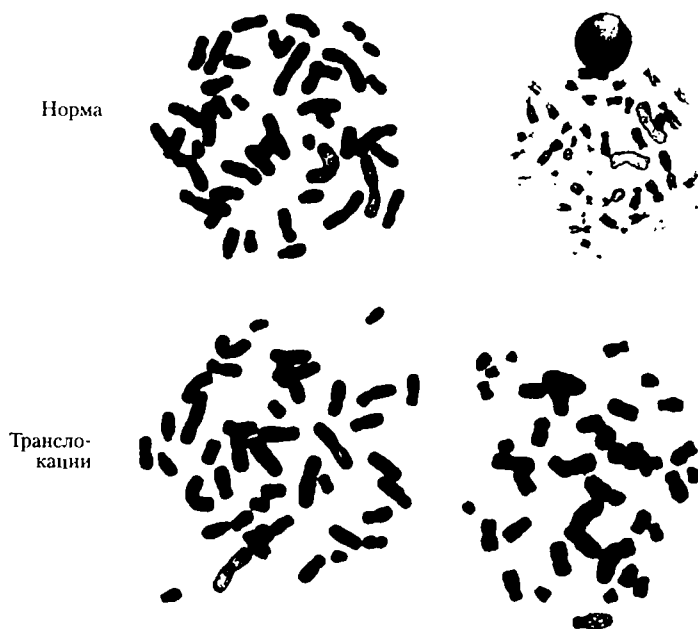


Рис. 6.20. Идентификация транслокаций при помощи FISH метода. Верхний ряд – нормальные клетки с мечеными 1 и 2 хромосомами. Нижний ряд – транслокации с участием меченых хромосом

способными избирательно присоединяться к биотину или дигоксигенину. Для биотина таким веществом является стрептавидин, а для дигоксигенина — антидигоксигенин. В качестве красителей обычно используют флуоресцеин-изотиоцианат- FITC; метил-кумарин-3-уксусную кислоту АМСА и др. (Гибридизация может проводиться также с зондами, имеющими радиоактивную метку).

Цитогенетический анализ проводится под люминесцентным микроскопом в ультрафиолетовом свете. Хромосомные обмены (транслокации и дицентрики) между разноокрашенными хромосомами легко определяются как двухцветные структуры. Для идентификации транслокаций (с одной центромерой) и дицентриков (с двумя центромерами) одновременно с хромосомными

ДНК-зондами используют также ДНК-зонды к центромерным участкам хромосом (панцентромерные пробы). При использовании одного флуоресцентного красителя для ДНК-зондов обычно метят около 20% генома, т.е. не более 3 хромосом, и выявленные таким образом хромосомные нарушения для анализируемой части генома не подсчитывают не весь геном в целом. На рисунке 6.21 изображены метафазные пластинки, обработанные с использованием FISH-метода. Современные методические возможности позволяют увеличить число цветов, что, в свою очередь, дает возможность увеличить долю окрашенных хромосом в геноме и повысить точность исследования.

В настоящее время имеются многочисленные работы по использованию

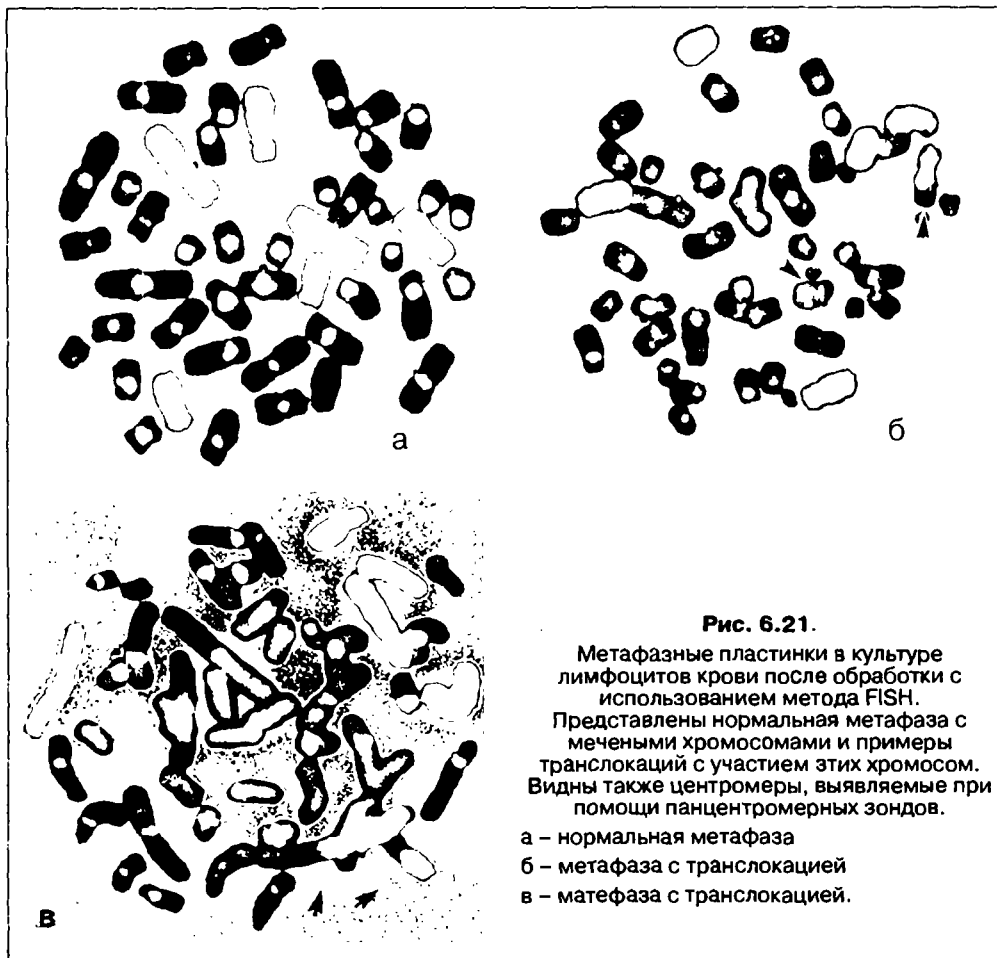


Рис. 6.21.

Метафазные пластинки в культуре лимфоцитов крови после обработки с использованием метода FISH. Представлены нормальная метафаза с мечеными хромосомами и примеры транслокаций с участием этих хромосом. Видны также центромеры, выявляемые при помощи панцентромерных зондов.

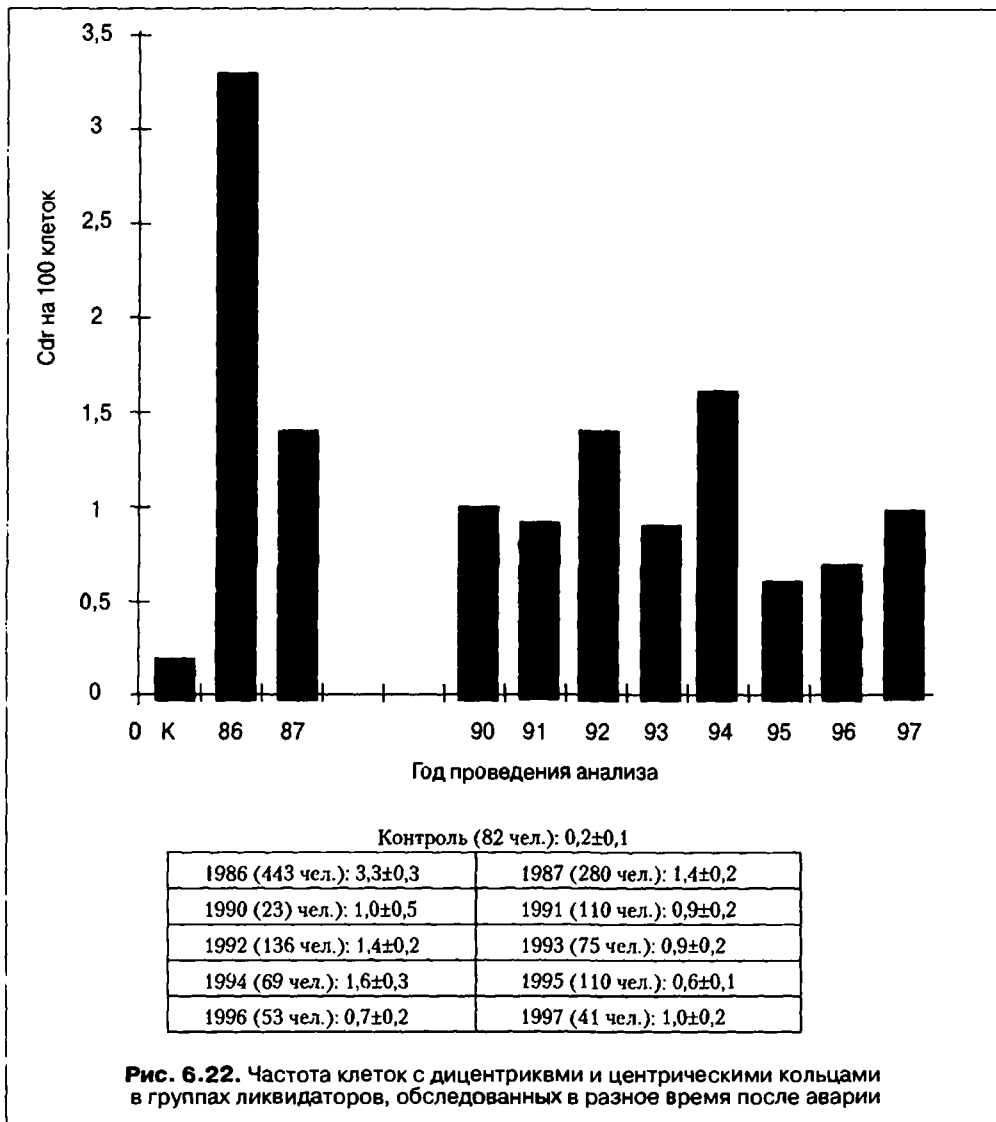
- а – нормальная метафаза
- б – метафаза с транслокацией
- в – метафаза с транслокацией.

традиционных цитогенетических и FISH-метода для определения частоты радиационно-индуцированных aberrаций хромосом в лимфоцитах периферической крови. Опубликованы результаты по ретроспективной биологической дозиметрии, полученные с использованием FISH-метода и других цитогенетических методов при обследовании участников ликвидации аварии на Чернобыльской АЭС, населения, проживающего на радиационно-загрязненных территориях (районы Семипалатинского полигона, Восточ-

но-Уральского радиоактивного следа), а также населения, подвергшегося облучению в результате атомных бомбардировок в Японии. Некоторые результаты этих исследований будут рассмотрены в следующем разделе.

Цитогенетические эффекты воздействия ионизирующих излучений на человека

Анализ частоты aberrаций хромосом в лимфоцитах периферической крови при воздействии различных мутагенных факторов (прежде всего,



ионизирующих излучений) позволяет исследовать закономерности мутагенеза на уровне соматических клеток. Выявленные при этом закономерности мутационного процесса можно в принципе экстраполировать на половые клетки, менее доступные для прямого цитогенетического анализа. В генетических исследованиях

разработаны соответствующие подходы, поэтому изучение закономерностей воздействия ионизирующих излучений на соматические клетки человека создает основу для анализа последствий облучения людей в будущих поколениях. Кроме того, анализ хромосомных aberrаций в лимфоцитах, как отмечено выше, позво-

ляет оценить дозу ионизирующих излучений, полученную человеком в результате аварийного воздействия радиации.

Крупномасштабные цитогенетические исследования были проведены в связи с аварией на Чернобыльской АЭС. Цитогенетические обследования участников ликвидации последствий аварии на ЧАЭС были начаты сразу после аварии в 1986 г. и продолжаются по 1999 г. В общей сложности было обследовано около 2000 человек – сотрудников атомной станции, врачей, дозиметристов, строителей, жителей г. Припять. Показано, что частота aberrаций хромосом у обследованных в 1986 г. людей значительно (до 17 раз) превышает контрольный уровень. В последующие годы частота aberrаций хромосом у обследуемых групп постепенно снижалась (рис. 6.22). На протяжении всего времени обследования (свыше 10 лет) уровень клеток с нестабильными aberrациями хромосом – дицентриками и центрическими кольцами (признанными маркерами радиационного воздействия), достоверно отличался от контроля. Таким образом, несмотря на длительность периода, прошедшего с момента облучения, в периферической крови обследованных людей сохранялся высокий уровень клеток с нестабильными aberrациями.

Проведено также цитогенетическое обследование населения Алтайского края, подвергшегося воздействию высоких доз ионизирующих излучений в связи с проведением ядерных испытаний в атмосфере на Семипалатинском полигоне в 1949-1962 гг. Изучение генетических последствий ядерных взрывов для населения Алтайского края начато лишь через несколько десятков лет после радиационного воздействия. Обследование 226 жителей 7

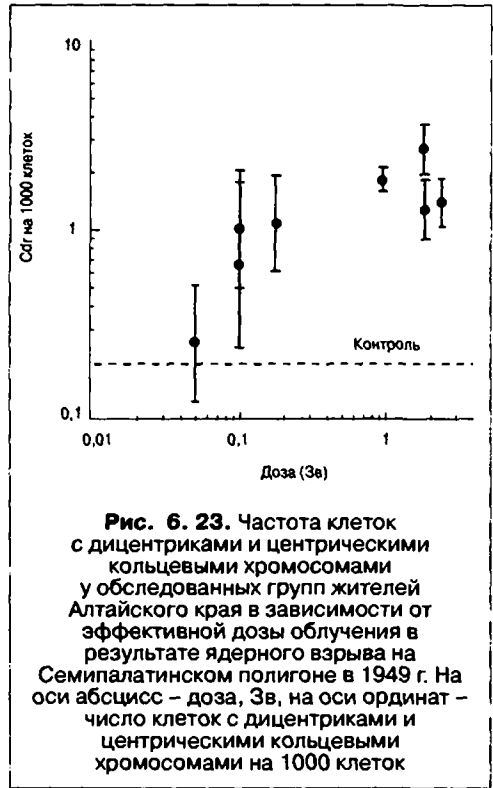


Рис. 6.23. Частота клеток с дицентриками и центрическими кольцевыми хромосомами у обследованных групп жителей Алтайского края в зависимости от эффективной дозы облучения в результате ядерного взрыва на Семипалатинском полигоне в 1949 г. На оси абсцисс – доза, Зв, на оси ординат – число клеток с дицентриками и центрическими кольцевыми хромосомами на 1000 клеток

населенных пунктов Алтайского края показало, что частота aberrаций хромосом у подвергшихся облучению людей достоверно превышает контрольный уровень. На рисунке 6.23 представлена частота клеток с дицентриками и центрическими кольцевыми хромосомами у жителей различных населенных пунктов в зависимости от величины поглощенных доз. Наблюдается статистически достоверная зависимость частоты aberrаций хромосом от поглощенной дозы ($P < 0,05$). Результаты исследования наглядно демонстрируют, что даже через несколько десятилетий после радиационного воздействия в периферической крови обследуемых жителей наблюдается повышенная частота клеток с нестабильными aberrациями хромосом, уровень

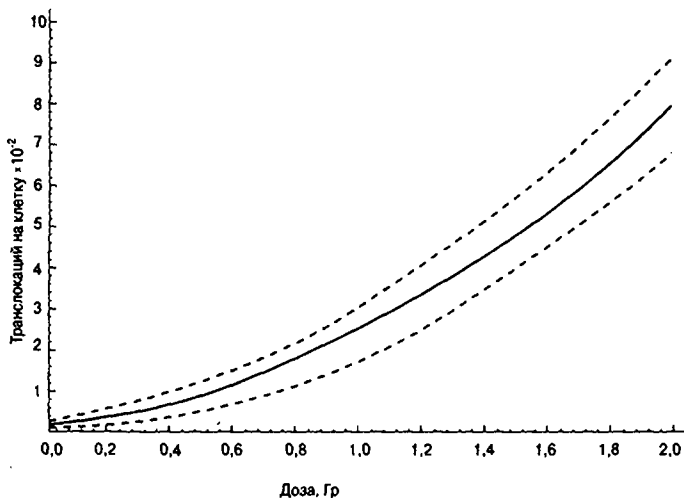


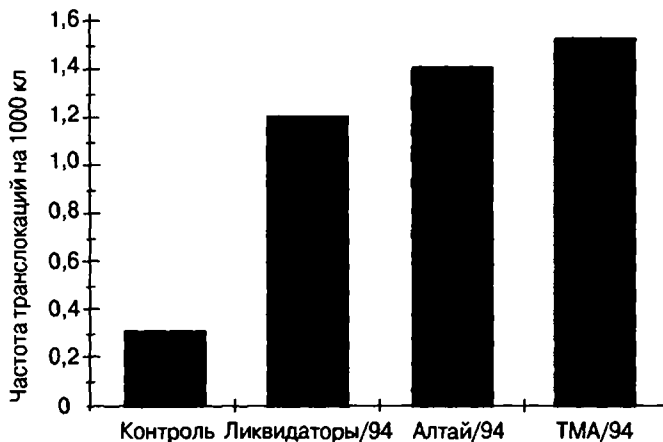
Рис. 6.24. Зависимость частоты транслокаций на 100 клеток от дозы гамма-излучения цезия-137. Приведены 95%-ные доверительные интервалы

которых зависит от величины эффективной дозы. Можно предположить, что источником таких клеток, несущих дицентрики и центрические кольцевые хромосомы, являются радиационно пораженные стволовые клетки кровеносной ткани.

У обследуемых жителей Алтайского края, подвергшихся облучению, наряду с аберрантными клетками, содержащими 1-2 аберрации хромосом, выявлены также *мультиаберрантные клетки*, содержащие 3 и более аберраций хромосом (5 и более разрывов хромосом). Среди мультиаберрантных клеток выявлены клетки, содержащие дицентрики, транслокации, центрические кольца и даже трицентрики. Последние практически никогда не встречаются в контрольном материале. Появление таких клеток скорее всего связано с воздействием плотниоизирующих излучений, в первую очередь альфа-частиц плутония-239 и других радионуклидов, входящих в состав смеси продуктов ядерного взрыва,

поступивших в организм человека после проведения ядерных испытаний.

Мультиаберрантные клетки были выявлены также у жителей села Муслюмово Челябинской области, расположенного на берегу Теча, загрязненной радионуклидами в связи с деятельностью предприятия по производству плутония "Маяк". Наиболее интенсивный период загрязнения этой реки относится к начальному периоду работы предприятия — 1949-1951 гг. Несколько тысяч жителей этого села получили среднюю дозу облучения на костный мозг около 0,25 Гр, а приблизительно у 5% средняя доза на костный мозг составила 1 Гр. Цитогенетическое обследование более 100 человек этого села, проведенное в 1994 г., показало, что уровень нестабильных аберраций хромосом (дицентриков и центрических кольцевых хромосом) в 5-10 раз выше, чем в контроле. Наиболее высокий уровень аберраций хромосом отмечен у лиц, родившихся до 1949 г. или в период наиболее высокого за-



Группы	Число обследованных людей	Число проанализированных метафаз	Транслокации	Частота транслокаций на геном ($F_G \pm m$) $\times 10^2$
“Ликвидаторы”	53	45007	166	1,17 ± 0,05
Алтайский край	24	13001	58	1,42 ± 0,10
ТМА (США)	6	3468	17	1,54 ± 0,21
Контроль	12	13586	13	0,32 ± 0,05

Рис. 6.25. Частота транслокаций, выявляемых при помощи метода FISH, в лимфоцитах периферической крови ликвидаторов последствий Чернобыльской аварии, у жителей Алтайского края, пострадавших от ядерных испытаний на Семипалатинском полигоне, и у жителей, проживающих в районе атомной станции Три Майл Айленд, США

грязнения р. Теча радионуклидами (1949-1956 гг.). У этих жителей также были выявлены мультиаберрантные клетки. Наряду с дицентриками, были обнаружены также трицентрики и тетрацентрики.

Необходимо отметить, что, наряду с хромосомными aberrациями, у людей, проживающих вдоль р. Теча, наблюдаются и другие эффекты, свидетельствующие о значительном повреждающем действии радиации. Облучение населения в верховьях этой реки привело к возникновению хронической лучевой болезни (особенно в селе

Метлино, где хроническая лучевая болезнь в 1956 г. диагностирована у 64,7% взрослых и 63,2% осмотренных детей), которая была выявлена у 935 человек. Установлено также увеличение заболеваемости лейкозами у наблюдаемого населения. За 33 года зарегистрировано 52 случая гемобластозов, в том числе 37 случаев лейкозов среди 17,2 тыс. человек, наблюдаемых с 1950 г., что на 15 случаев больше ожидаемого числа заболеваний без облучения. Отмечено также существенное увеличение заболеваемости раком кожи, кишечника, печени, желчного

пузыря, шейки матки. Эти эффекты связаны с тем, что жители 20 сел по р. Теча (7,5 тыс. человек из этих сел были переселены) получили средние эффективные эквивалентные дозы от 3,5 до 170 сЗв. Наибольшие дозы получили жители выселенного села Метлино (170 сЗв, численность населения — 1,2 тыс. человек).

Как отмечено выше, частота стабильных аберраций хромосом, выявляемых методом FISH, позволяет оценить поглощенные дозы ионизирующих излучений, полученные облученными людьми в отдаленные сроки. При этом для оценки дозы используют калибровочные кривые, построенные в тщательных лабораторных экспериментах в ходе изучения зависимости частоты транслокаций от дозы излучения (кривые “доза — эффект”). Пример такой калибровочной кривой представлен на рисунке 6.24. Зная частоту выявленных аберраций хромосом у того или иного человека, можно показать с определенной степенью достоверности (на рисунке приведены 95%-ые доверительные интервалы) полученную им дозу ионизирующих излучений.

Анализ частоты стабильных аберраций хромосом (транслокаций) с использованием метода FISH проведен у участников ликвидации последствий аварии на Чернобыльской АЭС через 8-9 лет после аварии. В обследованной группе частота клеток с транслокациями превышает этот показатель в контрольной группе в 4 раза (рис 6.25). На основе полученных данных с помощью калибровочной кривой доза — эффект рассчитана поглощенная доза облучения, составившая в среднем 200 мГр. Для отдельных ликвидаторов поглощенные дозы достигали 1 Гр.

Применение FISH-метода позволило оценить поглощенные дозы для жи-

телей Алтайского края, подвергшихся воздействию радиации в связи с испытанием ядерного оружия. Средняя частота транслокаций для жителей трех сел более чем в 5 раз превышает контрольный уровень (рис. 6.25). Средняя доза для обследованной группы населения, рассчитанная на основе данных цитогенетического анализа, составила около 1 Гр. Такие же результаты получены при помощи FISH метода при обследовании жителей штата Пенсильвания в США, подвергшихся облучению в результате аварии на атомной станции Три Майл Айленд в 1979 г. (рис. 6.25). Расчетная доза для обследованной в 1994 г. группы жителей составила 0,6-0,9 Гр.

Таким образом, анализ аберраций хромосом в лимфоцитах периферической крови людей, пострадавших от воздействия ионизирующих излучений в рассмотренных ситуациях, позволил выявить повышенные в несколько раз уровни нестабильных и стабильных аберраций хромосом по сравнению контролем. Уровень нестабильных аберраций хромосом снижается во времени. Принято считать, что в лимфоцитах периферической крови он уменьшается вдвое в течение 3-4 лет. Однако наблюдаемый через 8 лет после аварии на ЧАЭС и через 45 лет после ядерных взрывов на Семипалатинском полигоне повышенный уровень таких аберраций может быть связан с постоянным поступлением в кровь клеток с аберрациями хромосом вследствие деления несущих аберрации хромосом стволовых клеток кроветворной ткани, тоже пораженной радиацией.

Истинное представление о масштабах первичного поражения клеток, даже десятилетия спустя после облучения, дает анализ частоты стабильных

аббераций хромосом (транслокаций) при помощи FISH-метода. Использование FISH-метода для реконструкции поглощенных доз дает вполне удовлетворительные результаты, совпадающие с оценками произведенными методами физической дозиметрии. Применение FISH-метода для целей биологической дозиметрии особенно перспективно в тех случаях, когда физическая дозиметрия ограничена. Другим важным направлением использования цитогенетических методов является оценка генетического риска облучения популяций человека на основе данных биологической дозиметрии. Действительно, если анализ частоты аббераций хромосом у облученных людей позволяет определить поглощенную дозу, то далее, на основе методологии, разработанной Научным Комитетом ООН по действию атомной радиации, могут быть произведены расчеты ожидаемых генетических аномалий у потомков облученных людей.

Оценка генетического риска облучения человека

Под генетическими рисками облучения человека понимают ожидаемые генетические эффекты у потомков облученных людей — у детей, внуков, правнуков и т.д. Для того, чтобы оценить эти эффекты в первых поколениях после воздействия излучений используют подходы, основанные на применении двух методов: метода удваивающей дозы и прямого метода. **Метод удваивающей дозы** базируется на определении дозы, вызывающей такой же генетический эффект, какой наблюдается в результате естественного мутационного процесса (удваивает его). При применении этого метода надо иметь в виду, что уровень естественного мутационного процесса в популя-

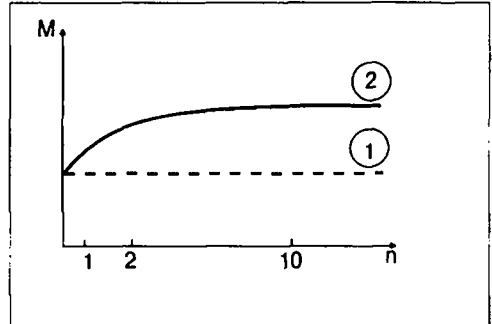


Рис. 6.26. Динамика мутационного процесса (M) в хронически облучаемых популяциях человека в ряде поколений (n). 1 — уровень естественного мутационного процесса 2 — хроническое облучение

циях человека — это исторически сложившийся равновесный уровень, зависящий от интенсивности естественного мутационного процесса, с одной стороны, и интенсивности отбора против возникших мутаций, с другой. Интенсивность отбора в популяциях человека в условиях современной цивилизации сильно снижена, что и обуславливает в значительной мере высокий уровень естественной изменчивости человека.

При длительном (в течение нескольких поколений) хроническом облучении популяций человека равновесный уровень мутагенеза за счет вызванных радиацией наследственных изменений установится лишь через семь-десять поколений после начала облучения (рис. 6.26). При этом индуцированные ионизирующим излучением мутационные изменения составят определенную дополнительную к естественной изменчивости человека компоненту, величина которой зависит от мощности дозы.

При удваивающей дозе равновесный уровень мутагенеза от ионизирующих излучений сравняется с равновесным уровнем естественной измен-

чивости человека и общий уровень мутагенеза удвоится (рис. 6.26). По оценке экспертов НКДАР ООН удваивающая доза для человека при остром воздействии ионизирующих излучений составляет 0,35 Зв на поколение и при хроническом воздействии редко ионизирующих излучений при низких мощностях доз равна 1 Зв на поколение. В первом поколении наблюдается приблизительно 1/10 часть тех мутаций, которые составят через 7-10 поколений равновесный уровень.

Необходимо отметить, что все расчеты, связанные с оценкой динамики мутационного процесса в облучаемых популяциях человека, получены на основе экспериментов, проведенных с хронически облучаемыми популяциями модельных объектов исследований — дрозофилы и лабораторных мышей. До настоящего времени в мировой научной литературе отсутствуют данные, позволяющие корректно оценить динамику мутационного процесса непосредственно в облучаемых популяциях человека, несмотря на наличие популяций, реально подвергшихся облучению в местах, загрязненных радионуклидами.

При оценке ожидаемых генетических эффектов облучения в первом поколении экспертами НКДАР, как следует из таблицы 6.4 (стр. 152), произведен расчет в отношении не всех категорий естественной генетической отягощенности человека, а только их части: доминантных и сцепленных с X-хромосомой, рецессивных и хромосомных болезней. Их суммарная ожидаемая частота в первом поколении составляет 17 во втором поколении — 14 и в равновесном состоянии — 120 случаев на 1 млн. новорожденных при дозе 0,01 Зв. Нетрудно установить, что категории болезней, по которым

производится оценка риска облучения человека, составляют лишь 2,4 % от всей выявленной в настоящее время естественной наследственной отягощенности человека. По состоянию вопроса на 1988 г. не была произведена оценка риска в отношении врожденных аномалий и мультифакториальных болезней, на которые приходится 97,6% всей наследственной отягощенности человека.

Это не было сделано в связи с тем, что пока неизвестно, можно ли к болезням сложной этиологии (мультифакториальным и врожденным порокам развития) применять удваивающую дозу в 1 Зв, и какую величину мутационной компоненты в отношении этих болезней надо использовать для расчетов риска облучения. Однако, если принять, что мутационные компоненты для этих болезней колеблются в пределах 5-50 %, как это предполагают эксперты НКДАР, то в итоге такого расчета при дозе 0,01 Зв на миллион новорожденных в первом поколении ожидается дополнительно к естественному уровню изменчивости, равному, как мы уже отмечали 67,6 % (т.е. 676 000 на миллион новорожденных), 50 случаев наследственных аномалий, если мутационная компонента для мультифакториальных болезней будет равна 5%. В случае, если мутационная компонента будет равна 50 %, то число ожидаемых наследственных аномалий резко возрастет — до 350 случаев.

При хроническом облучении многих поколений ожидаемый равновесный уровень, как следует из расчетов, составляет в таком случае 450-3400 наследственных аномалий при дозе 0,01 Зв на поколение и на один миллион новорожденных.

Таким образом, в зависимости от того, в какой степени генетические изме-

нения, приводящие к мультифакториальным болезням и врожденным аномалиям, могут индуцироваться ионизирующими излучениями, будет изменяться и ожидаемый генетический риск в следующих поколениях. Если допустить, что болезни, составляющие преобладающую часть естественной наследственной отягощенности популяций человека, не будут индуцироваться радиацией (что весьма маловероятно), то генетический риск в первом поколении составит 17 случаев наследственных болезней на 1 млн. новорожденных при дозе 0,01 Зв. Если же допустить, что такие болезни сложной этиологии (или подобные им) будут реально индуцироваться радиацией, то тогда генетический риск облучения популяций человека составит гораздо большую величину — от 50 до 350 случаев на 1 млн. новорожденных при дозе 0,01 Зв.

Все вышеизложенное касалось оценки риска облучения человека методом удваивающей дозы. Возможна оценка риска облучения человека и с применением **прямого метода** — путем анализа частоты индуцированных мутаций отдельных генов, анализа частоты аббераций хромосом и изменения числа хромосом у человека и экспериментальных объектов. Например, зная частоту мутаций отдельных генов в расчете на 0,01 Зв и зная число структурных генов в геноме человека (около 100 тыс.) можно оценить суммарную ожидаемую частоту появления генных мутаций при той или иной дозе. С использованием прямых методов оценки генетического риска в настоящее время экспертами НКДАР ООН производится оценка частоты индуцированных доминантных мутаций и реципрокных транслокаций. При этом величины риска для этих типов генети-

ческой изменчивости в принципе совпадают с теми оценками, которые произведены методом удваивающей дозы. Несмотря на кажущуюся простоту подхода, при практическом применении прямых методов оценки возникает не меньше сложностей, чем при использовании метода удваивающей дозы, что связано с ограниченностью наших знаний относительно структуры генома человека и частот индуцированных мутаций.

Следует отметить, что при использовании прямых методов, так же, как и в случае с методом удваивающей дозы, основные результаты по частотам индуцированных мутаций у человека рассчитаны путем экстраполяции с данных, полученных на экспериментальных животных. В частности, для расчета частоты индуцированных доминантных мутаций у человека использованы данные по частоте доминантных мутаций у мышей, приводящих к аномалиям скелета, и мутаций, приводящим к катарактам. В результате применения ряда переходных коэффициентов при экстраполяции данных на человека, получена частота доминантных мутаций у мальчиков равная 10-20 случаям, а для девочек — 0-9 случаев на 1 млн. новорожденных при дозе 0,01 Зв.

Приведенные количественные показатели риска относятся к числу ожидаемых случаев серьезных генетических болезней. Термин “серьезная генетическая болезнь”, используемый в документах НКДАР ООН, означает плохое состояние здоровья, мешающее нормальной трудоспособности, физические и умственные недостатки или нетрудоспособность генетического происхождения, которые могут появиться в любом возрасте от рождения до старости. Разработано

несколько критериев оценки генетического ущерба от ионизирующих излучений, которое позволяют взвесить и количественно оценить действительный груз, налагаемый генетическими болезнями на индивидуальные, социальные и общественные показатели здоровья. Для оценки генетического ущерба могут быть использованы показатели неполноценной жизни (пребывание в больницах, домашняя изоляция и т.д.) и сокращение продолжительности жизни.

При допущении, что средняя ожидаемая продолжительность жизни составляет 70 лет (и, таким образом, на 1 млн. новорожденных составляет 70 млн. лет) было оценено, что все возникающие спонтанно генетические болезни вызывают около 2,3 млн. лет неполноценной жизни на 1 млн. новорожденных и около 3 млн. лет сокращения продолжительности жизни на 1 млн. новорожденных. Для популяции, подвергшейся действию ионизирующих излучений в дозе 1 Зв на поколение, индуцированные дополнительные случаи генетических болезней будут причиной около 50 000 лет неполноценной жизни и такого же количества сокращения продолжительности жизни на 1 млн. новорожденных. Эти оценки произведены без учета болезней сложной этиологии — врожденных аномалий и мультифакторных болезней. При учете последних ожидаемый генетический ущерб возрастает в 3-20 раз в зависимости от величины мутационной компоненты этих болезней, равной, как мы выше отмечали 5-50%.

Представленные оценки генетического риска достаточно приблизительны, поскольку они не учитывают ряд важных моментов, способных еще увеличить предполагаемую опасность облучения (см. таблицу 6.4). К не решен-

ным вопросам генетики человека относится оценка влияния на жизнеспособность человека “малых” мутаций (мутаций, в незначительной степени затрагивающих фенотип человека), которые при взаимодействии с другими мутациями могут существенно влиять на здоровье человека. Роль таких мутаций в жизнеспособности популяции показана в экспериментах с дрозофилой, однако пока полностью отсутствуют подходы к оценке роли таких мутаций у человека.

Многое не ясно и в проблеме наследуемых раковых заболеваний. В этой связи важными являются появившиеся в последние годы сообщения о росте злокачественных заболеваний (в основном, лейкозы) среди групп населения, проживающих вблизи от ядерных установок. В частности, появились сведения о росте заболеваемости лейкозом среди детей в деревне Сискейл, находящейся вблизи от Селлафилда, где расположено основное предприятие Соединенного Королевства Великобритании по переработке плутония. Отмечено девятикратное увеличение заболеваемости лейкозом у детей, матери которых проживали в этой деревне. Последующие исследования вокруг 15 основных ядерных установок Соединенного Королевства позволили выявить, что в радиусе 16 км от них смертность от лейкозов всех видов увеличена на 15% ($p=0,01$), от лимфоцитарного лейкоза — на 21% ($p=0,01$) и от болезни Ходжкина среди молодежи в возрасте до 25 лет — на 25% ($p=0,05$) по сравнению с другими районами. Анализ полученных результатов позволил исследователям сделать вывод, что наблюдаемый эффект можно объяснить профессиональным облучением по месту работы отцов этих детей, в результате чего

происходит воздействие ионизирующих излучений на мужские гонады с последующим возникновением мутаций в постмейотических половых клетках. Другими словами, речь идет о злокачественных заболеваниях, появляющихся у потомков облученных людей. Такие наследственные заболевания составляют часть генетического груза, возникающего при воздействии радиации в последующих поколениях.

Важно отметить, что под воздействием высоких доз ионизирующих излучений популяции могут претерпеть серьезные изменения генетической структуры, влияющие на формирование последующих поколений. При обследовании населенных пунктов Алтайского края, подвергшихся воздействию высоких доз ионизирующих излучений (от 0,97 до 2,43 Зв) в результате ядерного взрыва 1949 г. на Семипалатинском испытательном полигоне показано, что в облученных группах жителей наблюдается обеднение генофонда по сравнению с контролем вследствие снижения генетического разнообразия аллелей, выявляемых путем электрофореза белков.

Мало изучена генетическая чувствительность половых клеток человека и ранних эмбриональных этапов развития. Учет генетического груза и груза тератогенных изменений, реализуемых в период развития эмбрионов человека, по мнению академика Н.П.Дубинина, должен коренным образом изменить в сторону увеличения оценку генетического риска облучения человека в связи с аварией на Чернобыльской АЭС и другими радиационными ситуациями в различных странах. В этом направлении важные результаты получены белорусскими генетиками при изучении

последствий Чернобыльской катастрофы.

Сразу после аварии большое количество женщин стало обращаться в медицинские учреждения с требованием прервать беременность, поскольку они опасались за ее исход. Белорусский НИИ наследственных и врожденных заболеваний с целью выяснения врожденных генетических последствий сравнил частоту пороков развития, выявленную у искусственно абортированных плодов до аварии на Чернобыльской АЭС (в 1980–1985 гг. были собраны данные по более чем 10000 случаев прерывания беременности на сроках 5-12 недель), с той, которая наблюдалась в наиболее загрязненных радионуклидами районах. Общая частота пороков развития у зародышей в Минске до аварии составила 5,6% (табл. 6.5). После аварии не зарегистрировано достоверного увеличения частоты пороков в Минске, в районах же Гомельской и Могилевской областей, подвергшихся наиболее интенсивному загрязнению в результате аварии, частота пороков развития в 1986–1992 гг., ($10,53 \pm 1,56\%$) достоверно ($P < 0,05$) превышала контрольные показатели. В загрязненных радионуклидами районах увеличилась частота всех пороков, но в наибольшей степени – частота расщелин губы и неба, удвоение почек и мочеточников, полидактилии и дефектов нервной трубки.

В Белоруссии проведено также исследование динамики частот врожденных аномалий развития у поворожденных в периоды до аварии (1982–1985 гг.) и после аварии (1987–1992 гг.). Анализировали врожденные пороки развития (ВНР) строгого учета, т.е. те аномалии, которые однозначно диагностируются независимо от уровня подготовки врача и технического обеспечения медицин-

Таблица 6.5. Частота пороков развития у искусственно абортированных плодов в Белоруссии до и после аварии на ЧАЭС

Показатели	Контролируемые регионы				
	г. Минск		Зоны первоочередного отселения		
	1980–1985 гг.	(2-е полугодие) 1986–1995 гг.	(2-е полугодие) 1986–1994 гг.*	1989–1995 гг.**	Всего
Количество исследованных плодов	10168	17477	1243	1352	2595
Частота пороков к количеству исследованных образцов по обнаруженным порокам, %	5,6 ± 0,3	4,7 ± 0,2	10,5 ± 1,6	5,2 ± 0,9	7,4 ± 0,8
Достоверность различий по сравнению с частотой в г. Минске в 1986–1990 гг.	t	2,6	4,7	0,4	2,3
	P	<0,05	<0,05	>0,05	<0,05

* – Хойникский, Брагинский, Наровлянский, Костюковичский, Климовичский, Славгородский, Чериковский, Краснопольский районы;

** – Буда-Копелевский и Быховский районы выделены в отдельную строку в связи с тем, что исследования в этих районах начаты с 1989 г.

ского учреждения. Сюда входят анэнцефалия, спинномозговые грыжи, расщелины губы и/или неба, полидактилия, редукционные пороки конечностей, атрофия пищевода и ануса, синдром Дауна и отдельные группы множественных врожденных пороков развития (суммарно эти пороки составляют 44-50% от всех манифестных форм врожденных пороков развития, регистрируемых в роддомах Белоруссии).

Результаты проведенных исследований за 10 лет представлены в таблице 6.6, в которой сопоставлены частоты пороков строгого учета в трех зонах. В первую зону входят 15 районов Брестской, Гомельской и Могилевской областей с уровнем загрязнения по Cs-137 1-5 Ку/км². Во вторую зону включены 17 районов Гомельской и Могилевской областей с уровнем загрязнения по Cs-137 15 Ку/км² и более. В качестве контроля выбраны незагрязненные радионуклидами районы Белоруссии. Количество рождений в первой и кон-

трольной группах составило до 1986 г., соответственно, 22500 и 27100 после Чернобыльской аварии – 20800 и 27420 в год. Как следует из таблицы, частота пороков строгого учета возросла во всех трех зонах, но особенно значительно в зонах наибольшего радионуклидного загрязнения. Коэффициент прироста составил для контрольной зоны 1,2, для первой зоны – 1,3 и для второй зоны – 1,8. Различия суммарных частот ВПР при сопоставлении с доаварийным периодом по всем трем зонам достоверны (P << 0,05). Достоверно различаются между собой также суммарные частоты за 1986-1992 гг. по контрольной зоне (5,85±0,17) и по второй, наиболее загрязненной зоне (7,09±0,41).

Комбинированное воздействие радиации и других факторов окружающей среды

Эффекты ионизирующих излучений могут быть сильно модифициро-

Таблица 6.6. Абсолютные числа и частоты (на 1000 рождений) врожденных пороков развития строгого учета в трех зонах Беларуси (1982—1992 гг.)

Год наблюдения	Зоны загрязнения		Контрольная группа
	1-5 Кц/км ²	> 15 Кц/км ²	
1982	170 5,74 ± 0,44	30 3,06 ± 0,56	196 5,62 ± 0,40
1983	123 3,96 ± 0,36	37 3,58 ± 0,59	167 4,52 ± 0,35
1984	131 4,32 ± 0,38	38 3,94 ± 0,64	150 4,17 ± 0,34
1985	135 4,61 ± 0,38	46 4,76 ± 0,70	165 4,58 ± 0,36
1982-1985	559 4,61 ± 0,19	151 3,87 ± 0,31	678 4,72 ± 0,18
1987	160 5,54 ± 0,44	62 8,14 ± 1,03	223 5,94 ± 0,40
1988	134 4,62 ± 0,40	73 8,61 ± 1,00	190 5,25 ± 0,38
1989	173 6,32 ± 0,48	51 6,50 ± 0,91	196 5,80 ± 0,41
1990	199 7,98 ± 0,56	40 6,00 ± 0,95	221 6,76 ± 0,45
1991	135 5,65 ± 0,49	29 4,88 ± 0,90	181 5,52 ± 0,41
1992	141 6,22 ± 0,52	47 7,77 ± 1,13	175 5,89 ± 0,44
1987-1992	942 6,01 ± 0,20	302 7,09 ± 0,41	1186 5,85 ± 0,17
Коэффициент прироста	1,3	1,8	1,2

ваны естественными или антропогенными факторами среды. Вопросы комбинированного действия различных факторов, несмотря на большое внимание к ним в последние годы, разработаны пока недостаточно. Вместе с тем многие аспекты оценки риска облучения человека либо объектов природных сообществ непосредственно сопрягаются с необходимостью учитывать то обстоятельство, что радиационный мутагенез может быть сильно модифицирован в своем конечном выражении в зависимости от температуры, воздействия УФ-лучей, магнитных и электромагнитных полей, ульт-

развука, промышленной пыли, неорганических и органических химических соединений, антибиотиков и других лекарственных веществ, канцерогенов, гормонов, вирусов, бактериальных инфекций и т.д. Соответственно модифицированы могут быть и дозовые зависимости, о которых шла речь в предыдущих разделах этой главы.

В настоящее время в окружающую среду поступает более 4 млн. искусственных химических соединений, и каждый год к этому списку добавляется 300 тыс. новых соединений. Современное общество повседневно использует около 50 тыс. химикатов, не счи-

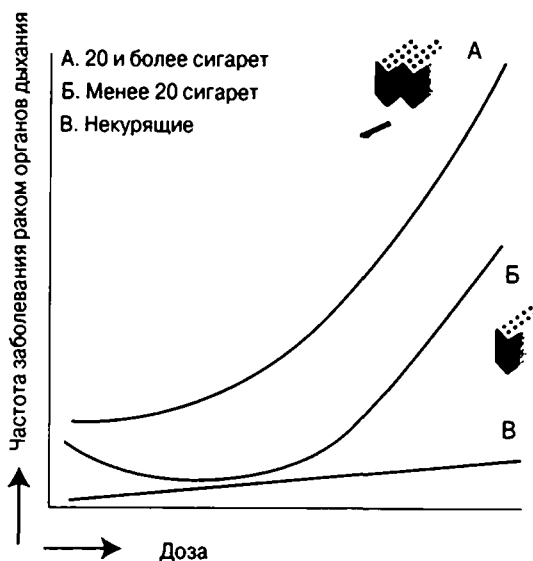


Рис. 6.27. Смертность от рака органов дыхания как функция дозы облучения, обусловленной дочерними продуктами радиоактивного распада радона, для трех групп рабочих урановых рудников – среди заядлых курильщиков, выкуривающих более 20 сигарет в день (кривая А), среди умеренных курильщиков, выкуривающих менее 20 сигарет в день (кривая Б), и среди некурящих (кривая В)

тая пестицидов, пищевых добавок и лекарственных препаратов. К категории широко распространенных следует отнести “энергетические соединения”, такие, как окислы азота, углерода, соединения серы, ароматические углеводороды. Среди последних 3,4-бензопирен (БП) часто используют как индикатор уровня ароматических углеводородов с канцерогенными свойствами.

Список веществ, которые могут приводить к отрицательным эффектам в сочетании с ионизирующими излучениями, можно пополнить соединениями мышьяка, хрома, никеля, минеральной пылью. В частности, летучая зола электростанций может обладать канцерогенными свойствами, служить в качестве носителя микроэлементов, радионуклидов или полициклических ароматических углеводородов.

В последнее время уделяется особое внимание количественным подходам к оценке комбинированного действия радиации и других агентов окружающей среды, основанных на концепциях аддитивности, синергизма, антагонизма, сенсбилизации и протекции. Предложено выделить два класса комбинированных эффектов: случай, когда ионизирующее излучение и модифицирующий агент способны вызвать наблюдаемый эффект, и случай, когда только ионизирующее излучение может вызвать наблюдаемый эффект, но его характер и степень могут модифицироваться другим агентом, который неактивен сам по себе. Соответственно для первого класса можно выделить три типа комбинированных взаимодействий. Если результат комбинированного действия равен сумме эффек-

тов каждого из агентов, действующих в отдельности, то имеет место **аддитивность**. В случае, когда результат взаимодействия оказывается ниже, чем ожидаемый эффект при независимом действии агентов, имеет место **антагонизм**. Третий вариант, когда результат комбинированного действия превосходит сумму эффектов для агентов, действующих независимо, называют **синергизмом**.

Для второго класса комбинаций выделяют два варианта взаимодействия с противоположными эффектами — **протекцию** (защиту) и **сенсбилизацию** (очувствление).

Естественно, что представленная классификация не является абсолютной. Учитывая, что многие химические соединения в зависимости от концентрации могут вызывать различные эффекты и тем самым переходить из одного класса взаимодействия в другой, можно ожидать что при одних дозах этих факторов будет наблюдаться, например, протекция, при других, более высоких, — синергизм. Важен сам по себе факт наличия различных дозовых зависимостей для ионизирующих излучений и модифицирующих агентов — реальная картина взаимодействия таких факторов трудно прогнозируема. Это особенно важно в отношении низких уровней доз излучений и модифицирующих естественных и антропогенных факторов среды, оценка эффективности которых строится в основном экстраполяционно.

К сожалению, число детально исследованных примеров взаимодействия радиации и других факторов пока

явно ограничено. Наиболее убедительные доказательства взаимодействия радиации и других факторов были получены при обследовании шахтеров урановых рудников. Оказалось, что курящие шахтеры урановых рудников (подвергающиеся воздействию излучения за счет распада радона) заболевают раком органов дыхания гораздо чаще, чем некурящие (рис. 6.27). Налицо явление синергизма при взаимодействии ионизирующих излучений и канцерогенных продуктов табачного дыма.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие типы генных мутаций вам известны?
2. Какие изменения генетического материала можно увидеть под световым микроскопом?
3. Чем отличаются aberrации хромосомного типа от хроматидных aberrаций?
4. Чем отличаются генные мутации от геномных?
5. К какому виду мутаций относится полиплоидия? 6. Что такое мозаицизм?
7. Какой набор хромосом встречается при синдроме Дауна?
8. Чем отличаются менделевские наследственные болезни от мультифакториальных?
9. Что вы знаете об общем уровне спонтанных мутаций у человека?
10. В чем сходство и различие спонтанных и индуцированных радиацией мутаций?
11. Какие хромосомные нарушения возникают при действии ионизирующих излучений?
12. Какие типы генетических изменений позволяют изучать FISH-метод?
13. Что такое метод удваивающей дозы?
14. Какие примеры реального воздействия ионизирующих излучений на наследственность человека вам известны?

Глава 7. ПОПУЛЯЦИОННАЯ ГЕНЕТИКА

Популяции

Популяционная генетика возникла из попыток соединить дарвиновскую теорию эволюции и менделевское учение о наследственности. По этой причине популяционная генетика в первую очередь изучает наследственные изменения, происходящие в ряду поколений. Отдельно взятая особь имеет неизменный на протяжении жизни генотип, поэтому она не может рассматриваться как элементарная эволюционирующая единица. В качестве таковой выступает **популяция** — совокупность особей одного вида, скрещивающихся между собой и имеющих определенный ареал обитания. Эволюционные изменения, происходящие в отдельных популяциях, могут распространяться по всему ареалу обитания вида, но не затрагивают популяции других видов.

Вид — это более высокая таксономическая единица, представленная совокупностью популяций. В основе определения понятия «вид» лежит возможность скрещивания. К разным видам относятся особи, которые полностью генетически изолированы друг от друга репродуктивными барьерами. С этой точки зрения все человечество, несмотря на межрасовые различия, относится к одному биологическому виду *Homo sapiens*. Всякая же этнически однородная, компактно проживающая группа людей может рассматриваться как отдельная популяция.

Обычно говоря о популяции, мы имеем в виду, что ее члены не только в той или иной степени связаны родственными узами, но и в значительной

степени доступны друг другу как брачные партнеры. Так, вряд ли стоит рассматривать жителей Москвы и Варшавы как единую популяцию. Это различные популяции, связанные незначительными миграционными потоками. Частичная репродуктивная изоляция отдельных популяций, как правило, обусловлена их географической разобщенностью. В единой популяции всевозможные варианты скрещиваний должны быть примерно равновероятны. При полной случайности внутрипопуляционных скрещиваний говорят о **панмиксии**. Введение этого специального термина оправдано исключительной важностью случайности скрещиваний для построения теорий эволюции частот менделирующих генов.

Часто популяция, являясь панмиктической по отношению к одной группе локусов, не является таковой по отношению к другой группе признаков. Например, для человеческих популяций характерна положительная ассортивность скрещиваний в отношении цвета кожи (преимущественное вступление в брак людей одной расы). Вместе с тем, те же популяции можно считать панмиктическими по отношению ко многим другим локусам, например, определяющим группу крови брачных партнеров.

Для панмиктических популяций справедливы определенные соотношения, связывающие частоты аллельных генов (закон Харди-Вайнберга). Более того, предположение о случайности скрещиваний позволяет рассматривать генотипы всех особей, образующих популяцию, как единую совокуп-

ность генов, отвлекаясь при этом от их носителей. Говорят, что панмиктическая популяция имеет единый генофонд. Генофонд диплоидной популяции, насчитывающей N особей, состоит из $2N$ гаплоидных геномов, то есть содержит $2N$ генов каждого локуса и N пар гомологичных хромосом.

Исключение составляют половые хромосомы и локализованные на них гены, которые представлены в одном экземпляре.

Изменчивость и генетический полиморфизм

Любая популяция обнаруживает внешнюю или фенотипическую изменчивость по большинству качественных и количественных признаков. Популяции человека гетерогенны по росту, пигментации кожи, чертам лица, группам крови и многим другим признакам. При этом не всегда ясно, какая доля морфологической изменчивости обусловлена генетическим разнообразием, а какая возникает за счет изменчивости внешней среды. Сегодня мы знаем, что скрытая генетическая изменчивость намного выше, чем можно заключить из простых наблюдений морфологической изменчивости. Однако представления о масштабах генетической изменчивости не раз подвергались пересмотру. Каждый этап развития генетики сопровождался внедрением новых методов генетического анализа, использование которых позволяло выявить новые пласты скрытой генетической изменчивости.

Под генетическим полиморфизмом понимается устойчивое сосуществование в популяции двух (или более) генотипически различающихся форм, причем частота наиболее редкой формы все же достаточно велика, чтобы ее поддержание можно было объяснить

мутационным давлением (спонтанным мутационным процессом). Генетический полиморфизм — это понятие, которое конкретизирует термин «генетическая изменчивость». Как правило, феномен полиморфизма связывают с поддержанием нескольких аллельных форм гена, что обнаруживается присутствием в популяции гомо- и гетерозиготных генотипов по данному локусу. Если же все особи гомозиготны по одному тому же аллелю, говорят, что популяция мономорфна по данному локусу. Соответственно, если в достаточно большой выборке из популяции обнаруживается единственный аллельный вариант, локус мономорфен. В противном случае говорят, что локус поддерживается в полиморфном состоянии. Очевидные примеры полиморфизма в популяциях человека — локусы, контролирующие иммунные реакции или синтез ферментов.

Для количественной оценки генетической изменчивости природных популяций используют два показателя:

1. Гетерозиготность — средняя частота особей, гетерозиготных по некоторым локусам.

2. Полиморфность — средняя доля полиморфных локусов. Следует подчеркнуть, что конкретные значения этих показателей зависят от методов выявления генетической изменчивости.

В период 1900 — 1930 гг., основным методом генетического анализа был метод скрещиваний, в частности, близкородственные скрещивания, или инбридинг. При инбридинге увеличивается вероятность появления в потомстве рецессивных гомозигот, у которых проявляются рецессивные аллели. Этим методом было показано, что практически каждая особь несет несколько рецессивных генов, которые фенотипически

не обнаруживают себя в гетерозиготном состоянии. Отсюда возникло представление, что генотип организмов состоит в основном из гомозиготных локусов, и лишь редкие локусы гетерозиготны по неким, как правило, вредным рецессивным аллелям. Случаи полиморфизма рассматривались, скорее, как исключения из этого общего правила.

Ситуация изменилась в середине 60-х гг. после внедрения в исследовательскую практику метода гель-электрофореза белков. Суть его заключается в разделении в полиакриламидном (или крахмальном) геле родственных белков (изозимов), чьи электрофоретические подвижности различаются из-за мутационной замены отдельных аминокислотных остатков. Использование этого метода показало, что примерно треть всех локусов, контролируемых биохимические реакции, находится в полиморфном состоянии. При этом средняя гетерозиготность колеблется от 7% у человека до 42% у дрозофилы.

Однако изменчивость белков лишь частично отражает изменчивость первичного генетического материала — нуклеотидных последовательностей ДНК. В конце 80-х гг., благодаря развитию методов секвенирования ДНК, появилась возможность непосредственной оценки полиморфизма на уровне отдельных нуклеотидов. Эти исследования подводят черту под давними спорами о масштабах генетической изменчивости популяций. По современным представлениям, доля полиморфных нуклеотидов составляет 1/1000. Учитывая, что обычный ген содержит от одной до 10 тыс. нуклеотидных пар, получаем, что почти 100% локусов находятся в полиморфном состоянии, так что каждый из нас отличается от соседа примерно по 22 млн. нуклеотидов.

Закон Харди-Вайнберга

Распределение частот генотипов в равновесной популяции

В любой популяции существует изменчивость в отношении многих признаков и определяющих их локусов. Например, каждый человек может иметь один из трех возможных генотипов по группе крови MN:

1. Гомозиготный генотип MM
2. Гетерозиготный генотип MN
3. Гомозиготный генотип NN

Чаще всего встречаются люди с гетерозиготным фенотипом MN, обладатели же гомозиготных генотипов MM или NN встречаются приблизительно в два раза реже. Вот точные данные, полученные при обследовании белого населения США:

$$P_{MM} = 0,292 \text{ (или 29,2\%)},$$

$$P_{MN} = 0,496 \text{ (или 49,6\%)},$$

$$P_{NN} = 0,212 \text{ (или 21,2\%)}.$$

Здесь и далее мы будем обозначать буквой P частоту встречаемости соответствующего генотипа. Для других популяций соотношение частот генотипов может быть совершенно иным, но отнюдь не произвольным.

Например, вряд ли существует популяция с распределением частот генотипов 20%, 70%, 10%. Дело в том, что в популяциях со случайным скрещиванием для любого локуса характерна закономерность:

$$P_{MN} = 2\sqrt{P_{MM} \cdot P_{NN}}$$

Действительно, рассматривая распределение людей по группам крови в США, мы видим:

$$P_{MN} = 2\sqrt{P_{MM} \cdot P_{NN}} = 2\sqrt{0,292 \cdot 0,212} = 0,498 \approx P_{MN}$$

Это проявление так называемого закона Харди — Вайнберга, согласно которому при случайном скрещивании

частоты генотипов неизменны в поколениях и удовлетворяют соотношениям, имеющему вид пропорции:

$$P_{MM} : P_{MN} : P_{NN} = p^2 : 2pq : q^2,$$

где p и q — частоты встречаемости генов M и N в генотипе популяции. Частоты генов (аллелей) можно оценить по частоте генотипов следующим образом. Все особи с генотипом MM производят гаплоидные половые клетки, несущие ген M . Кроме них, такие же половые клетки с вероятностью $1/2$ производят гетерозиготные особи MN . Поэтому частота гена M равна

$$p = P_{MM} + \frac{P_{MN}}{2} = 0,292 + \frac{0,496}{2} = 0,54.$$

Частота же гена N равна

$$q = P_{NN} + \frac{P_{MN}}{2} = 0,212 + \frac{0,496}{2} = 0,46$$

Правильность вычислений можно контролировать равенством

$$p + q = 1.$$

Таковы частоты генов в текущем поколении. При образовании потомства любая яйцеклетка с вероятностью $0,54$ несет ген M . Если скрещивания случайны, то она с вероятностью $0,54$ сливается с гаметой типа M , и с вероятностью $0,46$ с гаметой типа N . Таким образом, частота генотипов MM в следующем поколении равна

$$p^2 = 0,54^2 = 0,292.$$

Точно так же частота потомков типа NN равна

$$q^2 = 0,46^2 = 0,212.$$

Гетерозиготы в потомстве образуются в двух случаях: яйцеклетка типа M оплодотворяется сперматозоидом типа N , либо наоборот. Это соответствует сумме вероятностей

$$pq + qp = 2pq = 2 \cdot 0,54 \cdot 0,46 = 0,496$$

Обратите внимание, что для рассмотренной популяции частоты генотипов потомства в точности равны частотам генотипов родителей. В этой ситуации мы будем говорить, что популяция находится в равновесии, имея в виду неизменность частот генотипов в последующих поколениях. Популяция является равновесной, если частоты генотипов MM , MN и NN находятся в соотношении $p^2 : 2pq : q^2$. Действительно, в этом случае частоты генов M и N равны, соответственно

$$P_{MN} + \frac{P_{MN}}{2} = p^2 + \frac{2pq}{2} = p(p + q) = p$$

$$P_{NN} + \frac{P_{MN}}{2} = q^2 + \frac{2pq}{2} = q(p + q) = q,$$

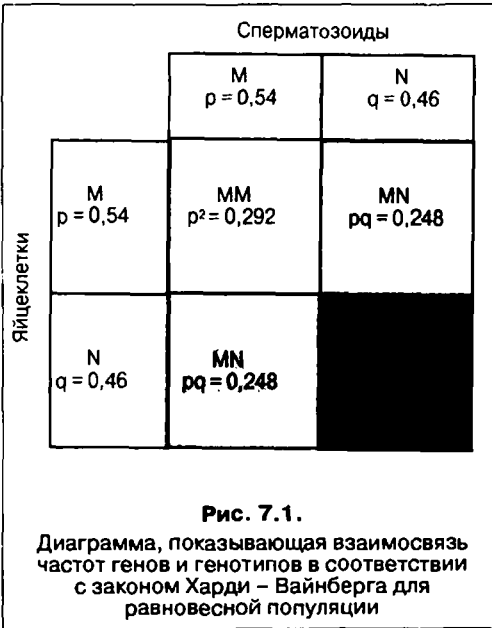
а частоты генотипов в следующем поколении по-прежнему находятся в соотношении $p^2 : 2pq : q^2$. На рисунке 1 приведена геометрическая интерпретация соотношений частот генов и генотипов в равновесной популяции.

Переход к равновесию в неравновесной популяции

Что произойдет в последующих поколениях с неравновесной популяцией? Рассмотрим популяцию, которую мы приводили в качестве примера «невозможной» (см. начало раздела). Пусть в исходном поколении частоты генотипов MM , MN и NN равны 20% , 70% и 10% , соответственно. Тогда частоты генов M и N равны

$$p = 0,2 + \frac{0,7}{2} = 0,55;$$

$$q = 0,1 + \frac{0,7}{2} = 0,45.$$



няются за одно поколение (при неизменной частоте генов), в результате чего популяция приходит в равновесие. В дальнейшем частоты генотипов не изменяются в поколениях (рис.7.2).

Подытоживая сказанное, можно заключить, что менделевское наследование само по себе не изменяет частоты генов и в условиях случайного скрещивания за одно поколение приводит популяцию в состояние равновесия.

Отметим, что закон Харди-Вайнберга не является законом в том смысле, в котором мы говорим о законах Ньютона или Менделя. Скорее, это несложная математическая теорема, которая вытекает из предположения о случайности скрещиваний. Этот закон неоднократно открывался и переткрывался в начале XX в. Помимо немецкого врача В. Вайнберга и английского математика Г. Харди, его формулировали В. Кастл, К. Пирсон и многие другие.

Закон Харди-Вайнберга легко обобщается в случаях произвольного числа аллельных генов. Заметим, что при двух аллелях частоты генотипов вычисляются возведением в квадрат суммы частот генов, которая заведомо равна единице:

$$(p+q)^2 = p^2+2pq+q^2 = 1$$

Аналогичное соотношение справедливо для случая трех и большего числа аллелей. Пусть частоты аллелей A_1, A_2 и A_3 для некоторого локуса равны соответственно p, q и r . Тогда частоты всех возможных генотипов ($A_1A_1, A_2A_2, A_3A_3, A_1A_2, A_1A_3, A_2A_3$) можно вычислить возведением в квадрат суммы частот аллелей:

$$(p + q + r)^2 = p^2 + q^2 + r^2 + 2pq + 2pr + 2qr = 1$$

Этими соотношениями мы воспользуемся при анализе полиморфизма в

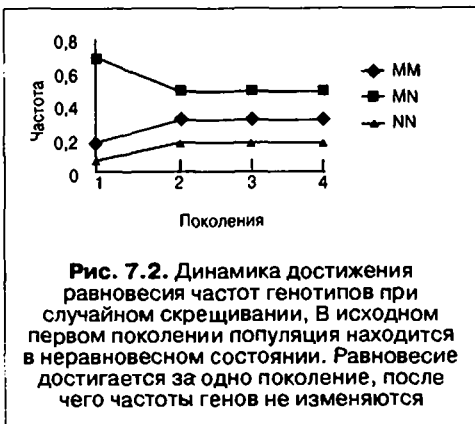
Частоты особей с различными генотипами в следующем поколении составят

$$P_{MM} = p^2 = 0,55^2 = 0,3025;$$

$$P_{MN} = 2pq = 2 \cdot 0,55 \cdot 0,45 = 0,495;$$

$$P_{NN} = q^2 = 0,45^2 = 0,2025.$$

Мы видим, что частоты генотипов в неравновесной популяции резко изме-



популяциях человека по группам крови системы АВО.

Закон Харди – Вайнберга для доминантных генов

В предыдущем разделе мы рассматривали ситуацию, когда все генотипы имеют различное фенотипическое проявление. Это позволяет непосредственно оценить частоты всех возможных генотипических классов. Это возможно, например, при исследованиях полиморфизма белков методом электрофореза. Однако во многих важных случаях невозможно отличить гетерозиготы от гомозигот из-за доминирования одних аллельных генов над другими. В результате частоты генов нельзя оценить непосредственно по частоте генотипов, так что единственной возможностью становится применение закона Харди-Вайнберга. Рассмотрим пример.

Альбинизм у человека обусловлен редким рецессивным геном, который мы обозначим как a . Доминирующий аллель нормальной пигментации естественно обозначить как A . Тогда генотип альбиносов будет aa , генотипы нормально пигментированных – AA либо Aa (гетерозигота неотличима от гомозиготы). По данным 1965 г. в европейских странах на каждые 20 000 новорожденных приходится один случай появления ребенка – альбиноса. Это означает, что частота рецессивных гомозигот равна $P_{aa} = 5 \cdot 10^{-5}$. Пусть q – частота гена a . По закону Харди – Вайнберга в равновесном случае имеем $P_{aa} = q^2$, откуда

$$q = \sqrt{P_{aa}} = \sqrt{5 \cdot 10^{-5}} = 0,007.$$

Частота нормальных генов равна $p = 1 - q = 1 - 0,007 = 0,993$. Теперь можно вычислить неизвестное соотношение гомо- и гетерозигот среди фенотипически нормальных людей.

$$P_{aa} = p^2 = 0,993^2 = 0,986;$$

$$P_{Aa} = 2pq = 2 \cdot 0,993 \cdot 0,007 = 0,014.$$

Обращает на себя внимание, что доля гетерозиготных носителей гена альбинизма не так уж низка и составляет 1,4% от общей численности популяции. Это проявление общего правила, согласно которому редкие аллели присутствуют в популяции главным образом в гетерозиготном, а не в гомозиготном состоянии. Это положение подтверждается и другим примером: частота людей, страдающих алькаптонурией, равна 1 на 1 млн., в то время как частота носителей этого гена в гетерозиготном состоянии равна 0,002 (приблизительно в 1000 раз больше).

Яркий пример генетической изменчивости – система групп крови АВО. Полиморфизм по этому признаку был выявлен в начале нашего века при изучении реакции агглютинации. Антигенные группы крови контролируются тремя аллельными генами I^A , I^B и I^O . Обозначим соответствующие аллельные частоты как p , q и g . Гены I^A и I^B доминантны по отношению друг к другу, но полностью доминируют над геном I^O . В результате такого взаимодействия (см. Табл. 1) шесть возможных генотипов оказываются распределенными по четырем фенотипическим классам (группам крови) со следующими частотами.

Таблица 1. Генетическая изменчивость в системе групп крови АВО

Группа крови	Генотипы	Равновесные частоты фенотипов
I(O)	OO	g^2
II(A)	AA; AO	$p^2 + 2pg$
II(B)	BB; BO	$q^2 + 2qg$
IV(AB)	AB	$2pq$

Предположим, что в некоторой популяции наблюдаются следующие частоты групп крови:

$$A = 0,45$$

$$B = 0,13$$

$$AB = 0,06$$

$$O = 0,36$$

Рассчитаем частоты аллелей, предполагая популяцию равновесной. Так как частота группы O равна q^2 , частота гена I^O равна $q = \sqrt{0,36} = 0,6$. Далее заметим, что суммарная частота групп O и B равна $q^2 + (q^2 + 2qr) = (q + r)^2 = 0,36 + 0,13 = 0,49$. Откуда $r + q = \sqrt{0,49} = 0,7$.

Таким образом, частота гена I^B равна $q = 0,7 - 0,6 = 0,1$. Наконец, частота аллеля I^A равна $p = 1 - (r + q) = 1 - 0,7 = 0,3$.

Встречаемость гена I^B резко различается в популяциях коренного населения из разных регионов мира: от 0,02 (американские индейцы, аборигены Австралии) до 0,24 (жители полуострова Индостан). Существует предположение, что это связано с повышенной устойчивостью людей с определенными группами крови к тяжелым инфекционным заболеваниям, характерным для конкретных регионов.

Условия выполнения закона Харди — Вайнберга

При всей своей универсальности закон Харди — Вайнберга выполняется далеко не во всех ситуациях. Различные факторы эволюции могут отклонять популяцию от положения равновесия и нарушать соотношение генотипических частот. Ниже мы перечислим условия, которые необходимы для строго соблюдения закона Харди — Вайнберга, а в последующих разделах подробно обсудим каждое из них.

1. **Панмиксия, или случайность скрещиваний.** Это самое важное ус-

ловие для выполнения закона Харди — Вайнберга. Любое предпочтение при скрещиваниях существенно искажают соотношения Харди — Вайнберга.

2. **Отсутствие отбора.** Имеется в виду, что жизнеспособность и плодовитость особей не зависят от их генотипа. Это требование обеспечивает равную значимость вклада каждого генотипа в следующее поколение.

3. **Отсутствие мутационного процесса,** приводящего к возникновению новых аллельных вариантов.

4. **Отсутствие миграций** между различными независимыми популяциями.

5. **Большая численность популяции.** В популяциях малой численности возможен так называемый случайный дрейф генов, который приводит к флуктуациям частот генов вплоть до их полного исчезновения.

Естественный отбор

Приспособленность генотипов и виды отбора

«Естественный отбор — это переживание наиболее приспособленных индивидумов». Развивая это определение Ч. Дарвина, можно сказать, что естественный отбор — это дифференциальное воспроизведение различных генотипических вариантов. Отбор является важнейшим направляющим фактором эволюции популяций, выражающим некоторый интегральный итог взаимодействия особей или их групп с окружением. Количественной мерой интенсивности процессов отбора может служить относительная **приспособленность**, которая является мерой вклада каждого генотипа в следующее поколение.

Понятие приспособленности включает в себя:

1. Жизнеспособность, то есть вероятность выживания до репродуктивного периода.

2. Плодовитость, то есть количество произведенных потомков.

Упрощая ситуацию, можно сказать, что приспособленность пропорциональна произведению выживаемости на плодовитость. Естественный отбор оценивает лишь суммарную или общую приспособленность, но не ее отдельные компоненты.

При вычислениях приспособленность принято обозначать буквой w . По определению она — величина относительная.

Обычно w наиболее приспособленного генотипа принимается за единицу. Приспособленности остальных генотипов задаются формулой:

$$w = 1 - s,$$

где s — коэффициент отбора, определяющий скорость уменьшения частоты того или иного генотипа.

Рассмотрим несколько случаев, в которых определение приспособленности достаточно очевидно.

1. Болезнь Тэя — Сакса, вызываемая накоплением в тканях нервной системы человека некоторых липидов (ганглиозидов), приводит к умственной отсталости, слепоте и ранней смерти. Приспособленность индивидуумов с этой болезнью равна нулю (коэффициент отбора равен единице), поскольку они умирают в раннем возрасте.

2. Ахондропластические карлики оставляют в среднем в 5 раз меньше потомства, чем здоровые люди. В этом случае приспособленность равна $w = 1/5 = 0,2$, а коэффициент отбора $s = 1 - 0,2 = 0,8$.

В случае полиморфизма популяции по некоторому локусу, мы имеем дело

с тремя генотипами, приспособленности которых в общем случае различны:

$$\begin{array}{ll} \text{Генотипы:} & AA \ Aa \ aa \\ \text{Приспособленности:} & w_1 \ w_2 \ w_3 \end{array}$$

Очевидно, что если аллель A доминирует, то следует положить $w_1 = w_2$. Если при этом рецессивная аллель a является летальной, то $w_3 = 0$, и $w_1 = w_2 = 1$.

Динамика частот генотипов в последующих поколениях будет целиком зависеть от соотношения между приспособленностями генотипов. В зависимости от того, какой генотип обладает максимальной приспособленностью, различают три варианта отбора:

1. Направленный: $w_1 > w_2 > w_3$

Это отбор против гена a во всех его проявлениях. Результатом будет постепенное вытеснение (элиминация) аллеля a из популяции.

2. Стабилизирующий: $w_1 < w_2 > w_3$. В этой ситуации гетерозиготы обладают селективным преимуществом, что приводит к поддержанию устойчивого полиморфизма в популяции.

3. Дизруптивный: $w_1 > w_2 < w_3$.

Для этого случая характерно вытеснение одного из аллелей в зависимости от первоначального соотношения частот генов.

Ниже мы дадим количественное описание наиболее важных случаев отбора в панмиктических популяциях.

Отбор против рецессивных леталей

Предельным случаем отбора против рецессивных аллелей является ситуация, когда рецессивные гомозиготы обладают нулевой приспособленностью, то есть погибают до достижения половозрелости или стерильны. Изме-

Таблица 2. Изменения частот генотипов за одно поколение отбора против рецессивных гомозигот

	Генотип			Всего
	AA	Aa	aa	
Приспособленность	1	1	0	
Частота генотипа в исходном поколении	p^2	$2pq$	q^2	1
Вклад генотипа в следующее поколение	p^2	$2pq$	0	$p(1+q)$
Частота генотипа в следующем поколении	$p/(1+q)$	$2q/(1+q)$	0	1

ственным примером болезни, обусловленной рецессивным летальным геном, может служить фенилкетонурия.

Предположим, что в некотором поколении в равновесной популяции частота летального рецессивного гена a равна q . Тогда частота нормального доминирующего аллеля равна $p = 1 - q$. Основные этапы дальнейших рассуждений представлены в Таблице 2. В исходном поколении частоты генотипов соответствуют распределению Харди — Вайнберга. В следующей строке приведены частоты генотипов, умноженные на соответствующие приспособленности. Тем самым мы вычисляем относительные вклады каждого генотипа в следующее поколение. Эти вклады пропорциональны частотам генотипов после отбора. Для того, чтобы они стали частотами генотипов, их нужно «нормировать», то есть разделить каждый из них на общую сумму вкладов, равную $p^2 + 2pq = p(p + 2q) = p(1 + q)$. Результат этой операции приведен в последней строке таблицы.

Итак, в следующем поколении частота генотипов Aa равна $2q/(1+q)$, а

частота самого летального гена равна половине этой величины, то есть $q/(1+q)$. Следовательно, за одно поколение частота рецессивной летали изменяется по формуле:

$$q \rightarrow \frac{q}{1+q}$$

Обозначим частоты рецессивных генов в последовательности поколений как $q_0, q_1, q_2, \dots, q_t$. Тогда, если в исходном (нулевом) поколении частота леталей равна q_0 , то в первом поколении

$$q_1 = \frac{q_0}{1+q_0},$$

во втором поколении —

$$q_2 = \frac{q_1}{1+q_1} = \frac{q_0/(1+q_0)}{1+q_0/(1+q_0)} = \frac{q_0}{1+2q_0}, \text{ и т.д.}$$

Легко проверить, что эта закономерность соблюдается и далее: в поколении под номером t

$$q_t = \frac{q_0}{1+tq_0}.$$

Полученная формула точно описывает динамику снижения частоты рецессивных леталей в поколениях за счет отбора. Происходит оно очень медленно. Вычислим число поколений, за которое частота рецессивных деталей уменьшается вдвое. Имеем

$$\frac{q_0}{q_t} = 1 + tq_0 = 2, \text{ или } t = \frac{1}{q_0}.$$

Таким образом, редкая рецессивная деталь, встречающаяся с частотой 10^{-3} лишь через 1000 поколений будет встречаться вдвое реже. Если рецессивная гомозигота выживает, но имеет пониженную приспособленность, то скорость выведения из популяции рецессивного гена будет еще ниже.

Таблица 3. Изменение частот генотипов за однопоколение отбора в пользу гетерозигот

Всего	Генотип			
	AA	Aa	Aa	
Приспособленность	1-s	1	1-t	
Частота генотипа в исходном поколении	p^2	$2pq$	q^2	1
Вклад геотипа в следующее поколение	$p^2(1-s)$	$2pq$	$q^2(1-t)$	W
Частота генотипа в следующем поколении	$p^2(1-s)/W$	$2pq/W$	$q^2(1-t)/W$	1

Этот вывод полностью перечеркивает любые евгенические программы очищения генофонда от вредных генов. В частности, принудительная стерилизация лиц, страдающих от наследственных заболеваний, абсолютно не эффективна. Если подобную операцию проводить на протяжении, скажем, 20 поколений, то частота вредного рецессивного гена уменьшится от 0,001 до $0,001/(1+20 \cdot 0,001) = 0,00098$. Но это частоты рецессивных генов. Доля заболевших равна частоте рецессивных гомозигот, то есть квадрату частоты вредного гена. Таким образом, заболеваемость уменьшится от 10^{-6} до $0,00098^2 \approx 0,96 \cdot 10^{-6}$ (не более чем на 4%).

Отбор в пользу гетерозигот

Отбор в пользу гетерозигот, когда обе гомозиготы имеют пониженную по сравнению с гетерозиготой приспособленность, часто называют гетерозисом, или сверхдоминированием. Этот тип отбора существенно отличается от рассмотренного выше направленного отбора: сверхдоминирование приводит к созданию устойчивого полиморфного равновесия.

Рассмотрим изменения генотипических частот за одно поколение отбора при сверхдоминировании. Все рассуждения представлены в таблице 3.

В первых двух строчках приведены приспособленности и частоты геноти-

пов в некотором поколении. Вклад в следующее поколение равен произведению частоты на приспособленность (третья строка). Сумма вкладов всех генотипов называется **средней приспособленностью** и равна

$$W = p^2(1-s) + 2pq + q^2(1-t).$$

Последняя строка таблицы соответствует частотам генотипов в следующем поколении. Вычислим изменение частоты аллеля за поколение, опустив часть простых алгебраических выкладок.

$$\Delta q = q - (P_{aa} + \frac{1}{2}P_{Aa}) = q - \frac{q^2(1-t) + pq}{W} = \frac{pq(sp - tq)}{W}.$$

Популяция приходит в равновесие, когда частоты аллелей перестают изменяться. Тогда при достижении равновесия $\Delta q = 0$, откуда $sp = tq$, или $s(1-q) = tq$. Окончательное выражение для равновесной частоты аллеля a имеет вид

$$q = \frac{s}{t+s}.$$

При этом для аллеля A имеем

$$p = \frac{s}{t+s}.$$

В отличие от равновесия в нейтральной популяции (в отсутствии отбора), равновесие при сверхдоминировании является устойчивым. Это означает,

что при отклонении генных частот от равновесного значения популяция возвращается к тому же равновесному уровню. Напомним, что нейтральная популяция при отклонении от положения равновесия за одно поколение переходит в новое равновесное состояние (с другими частотами генотипов).

Детально изученным примером сверхдоминирования в популяциях человека служит серповидноклеточная анемия — болезнь, широко распространенная в некоторых странах Африки и Азии. Анемия обусловлена аномальным строением гемоглобина (форма S) и развивается у людей гомозиготных по аллелю Hb^S . Нормальный гемоглобин вырабатывается в присутствии аллеля Hb^A в гомо- или гетерозиготном состоянии. Большинство людей с генотипом $Hb^A Hb^S$ погибает до достижения половозрелости, так что приспособленность этого генотипа близка к нулю. Несмотря на это, частота аллеля достигает довольно высоких значений в ряде регионов, особенно в районах распространения малярийного плазмодия. Причина этого состоит в том, что гетерозиготы $Hb^A Hb^A$ более устойчивы к малярии, чем гомозиготы $Hb^A Hb^A$, то есть обладают селективным преимуществом по сравнению с обеими гомозиготами, у которых смертность от анемии или от малярии выше, чем у гетерозигот.

Данные, полученные при обследовании населения Нигерии, показывают, что в малярийных районах отбор против гомозигот $Hb^A Hb^A$ равен $s = 0,12$, а против гомозигот $Hb^S Hb^S$: $t = 0,87$. Согласно изложенной выше теории равновесная частота гена Hb в этом случае равна

$$\frac{s}{(s+t)} = \frac{0,12}{(0,12+0,87)} = 0,121,$$

что весьма близко к фактически наблюдаемой частоте.

Мутации

Мутационное давление из-за низкой скорости процесса спонтанного мутирования крайне слабо влияет на распределение популяционных частот аллелей. Под скоростью или частотой мутирования понимается доля гамет, в которых произошли изменения данного гена. Для высших организмов эта величина не превышает 10^{-6} — 10^{-5} на локус за поколение. Эволюционное значение мутационного процесса заключается в создании разнообразия аллелей за счет появления новых генов. Однако почти все вновь возникающие мутантные гены селективно отрицательны, например, они обуславливают различные заболевания в гомо- или гетерозиготном состоянии.

Необходимо различать три тесно связанные величины:

1. Скорость мутирования
2. Частота встречаемости мутантного гена в популяции
3. Частота заболеваний, вызванных мутантным геном.

Первая из них определяется процессами на клеточном и организменном уровне. Вторая величина — это равновесный уровень популяционной частоты, который пропорционален скорости мутирования и обратно пропорционален интенсивности отбора против мутантных генов. Третья — определяется популяционной частотой мутантного гена и степенью его рецессивности по отношению к нормальному аллелю. Между всеми этими величинами существует простая связь, которую мы обсудим в данном разделе.

Рассмотрим сначала доминантные летальные мутации. Особи, несущие

такие гены, не способны к размножению, и, следовательно, эти аллели будут присутствовать в генотипе лишь тех организмов, у которых они возникли в результате мутаций в данном поколении. Если μ — скорость мутирования, а p — частота мутантного гена, то предыдущее утверждение можно выразить равенством: $p = \mu$, то есть равновесная частота доминантных летальных мутаций равна скорости мутирования. Однако, частота заболеваний при этом будет вдвое выше, так как заболевания проявляются у всех гомо- и гетерозигот по мутантному аллелю, что составляет

$$p^2 + 2p(1-p) = 2p - p^2 \approx 2p.$$

В качестве доминантных мутаций можно рассматривать некоторые хромосомные перестройки. Таковой является трисомия, вызывающая синдром Дауна. Так как больные с синдромом Дауна не оставляют потомства, соответствующую мутацию можно считать доминантной леталью. Синдром Дауна возникает с частотой 1 на 700 новорожденных, и, значит, мутабельность для трисомии равна 1/1400.

В случае рецессивных деталей ситуация несколько сложнее. Мутационный процесс постоянно, с малой частотой μ , индуцирует мутантные аллели, которые могут сохраняться в популяции в гетерозиготном состоянии. Отбор элиминирует эти гены лишь при образовании гомозигот. В результате частота рецессивных мутаций быстро достигает равновесного значения, которое можно оценить с помощью следующих рассуждений. За одно поколение отбора частота рецессивного летального гена изменяется по правилу:

$$q \rightarrow \frac{q}{1+q}$$

Поэтому изменение частоты за одно поколение составляет

$$\Delta q = q - \frac{q}{1+q} = -\frac{q^2}{1+q}.$$

При малых q снижение частоты за счет отбора приблизительно равно $\Delta q \approx -q^2$. В то же время за счет мутационного процесса происходит увеличение частоты мутаций на величину μ за поколение. Для поддержания равновесия прирост и убыль частоты должны быть равны друг другу. Отсюда получаем равенство $q^2 = \mu$, а значит, равновесный уровень мутантных рецессивных генов равен

$$q = \sqrt{\mu}.$$

При этом частота соответствующего заболевания равна частоте мутантных гомозигот, то есть по-прежнему равна μ .

Частота появления новорожденных с фенилкетонурией, обусловленной рецессивным геном, составляет 4 на 100 000, то есть $q^2 = 4 \cdot 10^{-5}$. Поэтому частота этого гена в популяции человека равна $q = \sqrt{4 \cdot 10^{-5}} = 6,3 \cdot 10^{-3}$. Частота соответствующих гетерозигот равна $2pq \approx 2q = 2 \cdot 6,3 \cdot 10^{-3} = 1,26 \cdot 10^{-3}$. Таким образом, в среднем около 13 человек из тысячи являются носителями этого аллеля, хотя частота индивидуумов, страдающих фенилкетонурией, составляет всего 4 на 100000.

Приведенные оценки относятся к случаю полной летальности (или стерильности) мутантных генотипов. В некоторых случаях бывает необходимо вычислить равновесную частоту мутаций при неполной элиминации особей, несущих мутантный ген. Пусть приспособленность гомозигот по мутантному гену равна $1-s$. Как и ранее, обозначим буквой μ частоту мутационных превращений нормального аллеля + в мутантный аллель m. Тогда

Таблица 4. Равновесные частоты мутаций и обусловленных ими заболеваний

	Рецессивные мутации	Доминантные мутации
Приспособленности генотипов ++ +m mm	1 : 1 : 1-s	1 : 1-s : 1-s
Скорость мутирования + → m	μ	μ
Равновесная частота аллеля m	$\frac{\mu}{s}$	$\frac{\mu}{s}$
Частота заболеваний	$\frac{\mu}{s}$	$\frac{2\mu}{s}$

равновесные частоты мутантного аллеля определяются формулами, которые представлены в таблице 4.

Мы опускаем вывод этих формул, отсылая заинтересованного читателя к классическому руководству Ч. Ли "Введение в популяционную генетику".

Приведем один пример из генетики человека, использующий представленные формулы. Ахондроплазия — это тяжелое заболевание, обусловленное доминантным аллелем. Частота мутаций, вызывающих ахондроплазию, составляет $5 \cdot 10^{-8}$. Число детей у больных ахондроплазией в среднем в пять раз меньше по сравнению со здоровыми людьми. Таким образом,

$$s = 1 - \frac{1}{5} = 0,8.$$

Равновесная частота мутантного гена равна

$$p = \frac{\mu}{s} = \frac{5 \cdot 10^{-8}}{0,8} = 6,25 \cdot 10^{-5}.$$

Частота заболевших при этом составляет $2p = 2 \cdot 6,25 \cdot 10^{-5} = 1,25 \cdot 10^{-4}$, то есть 125 больных на 1 млн. новорожденных.

Генетический дрейф

Случайным генетическим дрейфом, или просто, дрейфом генов называется изменение частот аллелей в ряду поколений, обусловленное случайными причинами. Интенсивность этих изменений зависит в первую очередь от численности популяции, точнее, от числа участвующих в размножении особей.

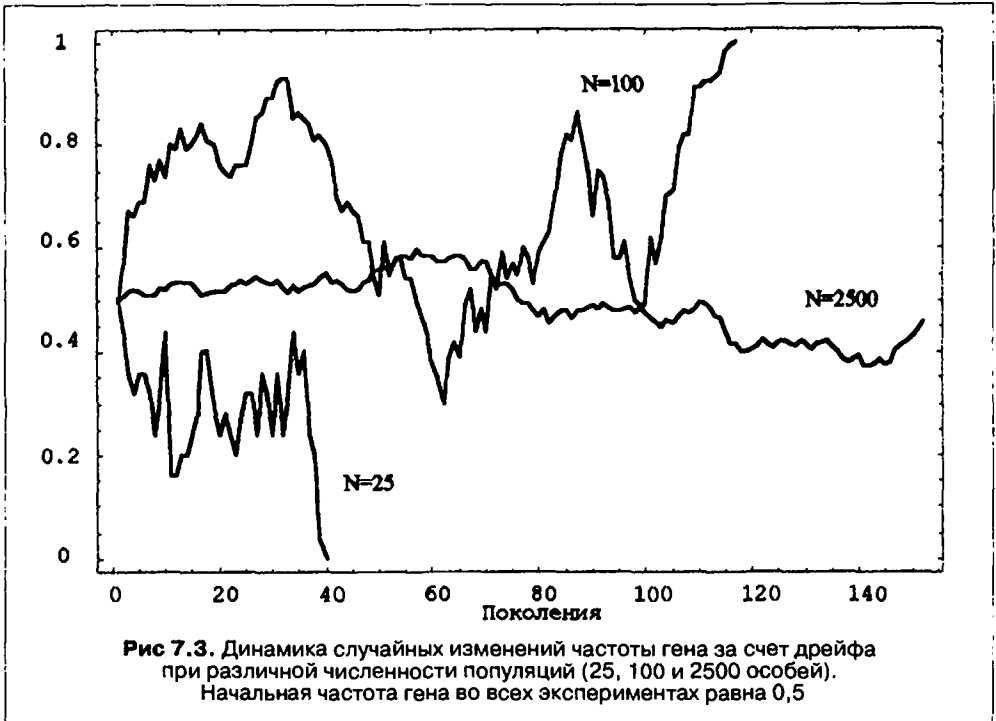
Чтобы «прочувствовать» механизм дрейфа генов, следует мысленно обратиться к процессу подбрасывания монетки. Сколько раз выпадает «орел» при 100 подбрасываниях монеты?

Большинство даст правильный ответ — приблизительно 50. Но далеко не все понимают, что вероятность выпадения ровно 50-ти «орлов» довольно мала — около 7,9%. Хотя с вероятностью, превышающей 95%, их число будет попадать в интервал от 40 до 60.

Таким образом, доля «орлов» при 100 подбрасываниях, скорее всего, будет заметно отличаться от $1/2$, и окажется равной 0,43 или, скажем, 0,56. Теперь представим себе, что монетка подбрасывается 1000 раз. В этом случае вероятность выпадения 430 или 560 «орлов» очень мала. Их доля будет гораздо ближе к $1/2$, чем 100 при подбрасываниях.

Суть этого примера заключается в том, что, чем больше выборка, тем ближе соответствие между теоретически ожидаемой ($1/2$) и реально наблюдаемой частотой. В популяциях мы сталкиваемся с тем же явлением: при небольших численностях теоретически ожидаемая частота (то есть частота аллеля в родительском поколении) может существенно отличаться от реально наблюдаемой (то есть от частоты аллеля у потомства).

Однако между бросанием монеты и дрейфом гена имеется важное разли-



чие. При бросании монетки вероятность выпадения «орла» остается равной $\frac{1}{2}$ на протяжении всей серии подбрасываний. Для популяций эта вероятность изменяется в каждом поколении: частота аллеля в данном поколении представляет собой вероятность появления этого аллеля в следующем поколении. Если, например, частота аллеля изменилась от 0,5 до 0,6, то вероятность того, что этот аллель появится в следующем поколении равна 0,6. Таким образом, изменения частот аллелей за счет дрейфа накапливаются в поколениях. Ясно, что рано или поздно это приведет к тому, что частота аллеля достигнет значения, равного нулю (аллель исчезнет) или единице (исчезнет альтернативный аллель). В последнем случае говорят о **фиксации** аллеля. На этом процесс завершается, так как даль-

нейшие изменения частоты аллеля невозможны.

Случайный дрейф гена легко имитировать с помощью компьютера. (рис. 7.3). На нем показаны три случайные реализации дрейфа гена при различных численностях популяции. Из рисунка видно, что при очень малой численности (25 особей) уже через 40 поколений аллель элиминируется из популяции по случайным причинам. В другой случайной реализации с вероятностью $\frac{1}{2}$ можно наблюдать противоположную картину: частота аллеля возрастает до единицы. Если численность популяции довести до 100 особей, то для фиксации аллеля понадобится уже 115 поколений. В популяции большой численности (2500 особей) частота аллеля существенно не изменяется на протяжении 150 поколений. Но это не означает, что в

этом случае полиморфизм будет поддерживаться сколь угодно долго. Фиксация аллеля с вероятностью единица происходит в любых конечных популяциях при отсутствии источников новых аллелей (мутации и миграции). Однако для это понадобится число поколений, сравнимое по величине с численностью популяции.

Влияние генетического дрейфа можно наблюдать и в изолированных малочисленных популяциях человека. При обследовании членов закрытой секты баптистов в штате Пенсильвания (США), основанной в XVIII в. выходцами из Германии, обнаружено, что частоты генов групп крови АВО у членов секты отличаются от таковых у американцев немецкого происхождения. Особенно разительны эти различия по частоте гена I^B : 2,5% у членов секты и 12% у американцев немецкого происхождения.

В заключение перечислим основные черты генетического дрейфа.

1. Дрейф приводит к случайным колебаниям частот аллелей, которые особенно заметны в малых популяциях.

2. Дрейф неуклонно снижает генетическую изменчивость популяций, увеличивая частоту гомозигот. Окончательным итогом действия генетического дрейфа является элиминация либо фиксации аллеля.

3. Число поколений, необходимых для элиминации (или фиксации) аллеля за счет дрейфа, сопоставимо по величине с численностью популяции.

Близкородственные браки

Близкородственные скрещивания, или **инбридинг** — одна из форм ассорттивности при образовании брачных пар. При инбридинге скрещивания между родственными особями происходят чаще, чем можно было бы ожи-

дать, предполагая случайность скрещиваний. Поскольку родственные особи в генетическом отношении более сходны между собой, чем не состоящие в родстве, инбридинг ведет к повышению частоты гомозигот и снижению частоты гетерозигот по сравнению с ожидаемой по закону Харди — Вайнберга.

Количественной мерой последствий инбридинга служит **коэффициент инбридинга**, который определяется как вероятность того, что у какой-либо особи оба гена в данном локусе принадлежали одному из предков в каком-то из предшествовавших поколений. Пусть F — коэффициент инбридинга. Тогда можно показать, что частоты генотипов в инбредной популяции имеют вид:

$$P_{AA} = p^2 + pqF, P_{Aa} = 2pq(1 - F), P_{aa} = q^2 + pqF.$$

Таким образом, доля гетерозигот за счет инбридинга уменьшается по сравнению с распределением Харди — Вайнберга в $1/(1-F)$ раз. При отсутствии инбридинга $F = 0$, и частоты генотипов удовлетворяют закону Харди — Вайнберга.

Вычисление коэффициента инбридинга в конкретных ситуациях связано с анализом родословных и проведением сложных комбинаторных рассуждений, поэтому мы будем пользоваться готовой таблицей коэффициентов инбридинга в зависимости от системы скрещиваний (см. Табл. 5).

Инбридинг обычно приводит к понижению приспособленности потомства вследствие повышения степени гомозиготности по вредным рецессивным генам. Это явление принято называть **инбредной депрессией**.

Рассмотрим рецессивный летальный аллель, возникающий мутационным путем с частотой $\mu = 10^{-5}$. Равно-

весная частота этого гена равна $q = \sqrt{\mu} = 0,0032$. Заболеваемость равна частоте гомозигот, то есть составляет $q^2 = 10^5$. Теперь представим, что в популяции поддерживается коэффициент инбридинга, равный $F = 1/16$, что соответствует скрещиванию двоюродных сибсов. Тогда частота гомозигот по рецессивной летали будет равна

$$q^2 + pqF = 10^{-5} + (1-0,0032) \cdot 0,0032 \cdot \frac{1}{16} \approx 2 \cdot 10^{-4}.$$

Таким образом, при данной степени инбридинга частота летальных гомозигот возрастает в 20 раз. При скрещивании сибсов ($F = 1/4$) вероятность появления летальных гомозигот возрастает примерно в 80 раз.

В случае вредных, но не летальных рецессивных аллелей при коэффициенте отбора $s = 0,1$ равновесная частота аллеля равна

$$q = \sqrt{\frac{10^{-5}}{0,01}} = 0,01.$$

Тогда при скрещивании двоюродных сибсов частота рецессивных гомозигот будет составлять

$$q^2 + pqF = 10^{-4} + (1 - 0,01) \cdot 0,01 \cdot \frac{1}{16} \approx 7 \cdot 10^{-4},$$

то есть примерно в семь раз выше, чем при случайном скрещивании.

Известно, что в потомстве от браков между двоюродными братьями и сестрами частота большинства рецессивно наследуемых дефектов (ихтиоз, альбинизм, фенилкетонурия) в 5 — 10 раз выше, чем в потомстве от неродственных браков.

Генетический груз популяции

Как уже было показано в предыдущей главе, приблизительно у 70% лю-

Таблица 5. Значения коэффициентов инбридинга при разных типах скрещивания

Типы скрещиваний	F
Самооплодотворение	$1/2$
Сибсы (братья и сестры)	$1/4$
Дядя x племянница, тетка x племянник	$1/8$
Двоюродные сибсы	$1/16$
Двоюродные дядя x племянницы	$1/32$
Троюродные сибсы	$1/64$
Четвероюродные сибсы	$1/256$

дей в течение жизни проявляются те или иные наследственные аномалии, приводящие к серьезным последствиям для здоровья. Исходя из этого можно заключить, что популяции человека существенно отягощены различными мутациями, которые либо проявляются доминантно, либо выщепляются в каждом поколении благодаря появлению гомозигот. Однако в большей своей части, подобно айсбергу, они остаются скрытыми в генофонде популяции в гетерозиготном состоянии, составляя генетический груз популяции.

Термин “генетический груз популяции” отражает одно из фундаментальных понятий популяционной генетики. Впервые генетический груз в популяциях был выявлен в 20-30-х гг. в исследованиях природных популяций дрозофил.

В 1929 г. выдающийся русский генетик С.С. Четвериков с группой сотрудников провел генетические исследования дрозофил из популяций Крыма путем инбридинга потомства отловленных самок. В инбредных линиях были обнаружены разнообразные видимые мутации, которые у исходных фенотипически нормальных самок были скрыты в гетерозиготном состоянии. В результате этих работ впервые была выявлена насыщенность популяций мутациями, комплекс которых, как

предположил С.С. Четвериков, является эволюционным резервом вида. В дальнейшем в 1931-1934 гг. Н.П. Дубинин с группой сотрудников при исследовании генетики природных популяций дрозофилы обнаружил, что дрозофилы из природных популяций необычайно часто несут в своем генотипе рецессивные летальные мутации. Так, в популяции Кутаиси более 40% дрозофил оказались гетерозиготными по летальным генам. Каждый из этих генов в гомозиготном состоянии приводил к гибели оплодотворенных яйцеклеток.

Открытие отягощенности особей из природных популяций дрозофилы летальными мутациями положило начало учению о генетическом грузе популяций. В дальнейшем стало ясно, что генетический груз может быть выявлен практически в любой популяции разных видов — будь то растения, животные или человек.

Американский генетик Г. Меллер и другие исследователи развили учение о генетическом грузе, показав, что он складывается из ряда категорий: летальных, полuletальных и субвитаальных изменений. Величина генетического груза определяется как отношение разницы между наибольшей приспособленностью (W_{\max}), что свойственно особям, обладающим лучшим генотипом в популяции, и фактической средней приспособленностью популяции (W), отнесенной к величине наибольшей приспособленности.

$$L = \frac{W_{\max} - W}{W_{\max}}$$

Генетический груз разделяется на три главных типа:

— сегрегационный груз — выщепление менее приспособленных гомозиготных форм при наличии в популяции отбора в пользу гетерозигот;

— мутационный груз — результат появления и накопления в популяциях мутаций, которые понижают приспособленность мутантных особей;

— груз дрейфа — результат случайного увеличения концентрации аллелей в изолированной популяции. Частным случаем этого типа служит повышение доли гомозиготных особей при инбридинге (инбредный груз; инбредная депрессия).

Объем генетического груза зависит от мутационного разнообразия, имеющегося в популяциях. В генетическом составе популяции широко представлены рецессивные мутации. Увеличение концентраций отдельных мутаций сдерживается отбором, в результате чего каждая рецессивная мутация включена в генофонд на уровне низкой концентрации. Как правило, концентрация рецессивного аллеля составляет 0,02-0,03. Появление фенотипических отклонений, что связано с гомозиготностью, происходит в этих условиях с частотой 1 особь на 1000-2500. Многие рецессивные аллели имеют еще более низкую концентрацию.

Однако число разных рецессивных мутаций столь велико, что каждая особь несет одну или несколько таких мутаций в гетерозиготном состоянии. У каждого человека имеются, как полагает академик Н.П. Дубинин, 3-4 эквивалента летальных мутаций.

Согласно современным оценкам, частота аутомных рецессивных мутаций в популяциях человека составляет 0,75%, причем большая их часть (около 75%) — следствие точковых мутаций (см. табл. 6.1).

Влияние отрицательных доминантных мутаций в популяциях связано с прямым фенотипическим проявлением вновь возникающих изменений. У человека около 60% всех регистрируе-

мых менделевских мутаций относятся к доминантным (абсолютная частота аутосомных доминантных мутаций составляет 1,5%). В целом различные типы менделевских наследственных болезней (аутосомные рецессивные, аутосомные доминантные и сцепленные с X-хромосомой) выявляются у 2,4% людей. Ряд пока не учитываемых доминантных изменений проявляется на ранних этапах развития зародыша человека в виде серьезных дефектов, приводящих к прекращению беременности.

Преобладающую часть наследственной изменчивости человека составляют врожденные пороки развития и мультифакториальные болезни (в сумме — 66%), наследование которых не подчиняется менделевским законам. Эти заболевания проявляются в результате сложного взаимодействия генетических изменений и факторов окружающей среды. Из материалов, изложенных в главе 6, следует, что генетические изменения, обуславливающие мультифакториальные болезни, составляют значительную часть генетического груза популяций человека. Однако эту компоненту генетического груза пока трудно оценить количественно в силу сложности механизмов генетического контроля таких болезней.

Воздействие мутагенных факторов должно приводить к увеличению уровня мутаций в популяциях различных организмов. Детально закономерности динамики мутационного процесса в популяциях исследованы в экспериментах с ионизирующими излучениями. Первые работы по генетике облученных популяций выполнены американским генетиком Б. Уолесом в 1951-1956 гг. Опыты проводились с экспериментальными популяциями *D. melanogaster*, созданными из особей,

свободных от леталей и полублеталей во второй хромосоме. Популяции в каждом поколении подвергали хроническому облучению в дозах 0,9-5,1 сГр/ч. В каждом поколении исследовали частоту накопленных летальных мутаций во второй хромосоме путем перевода второй хромосомы облученных особей в гомозиготное состояние с помощью специальной системы скрещивания. Эксперименты продолжались в течение нескольких лет, за это время в популяциях дрозофилы прошло около 150 поколений.

Результаты анализа по количеству леталей в облученных и в контрольной популяциях представлены на рисунке 7.4. В контрольной популяции, свободной первоначально от рецессивных леталей во второй хромосоме, в течение 70 поколений под давлением естественного мутационного процесса идет накопление мутаций до определенного равновесного уровня. Равновесный уровень естественных мутаций поддерживается в популяции более или менее постоянно, подвергаясь флуктуациям за счет изменения среды и эволюции генома популяции. В облученных популяциях концентрация леталей увеличилась.

Популяция N 1, самцы которой получили единовременную дозу 7 Гр, а самки 10 Гр, в первых пяти поколениях имела повышенное количество леталей по сравнению с контролем. Облучение каждого поколения в дозе 0,9 сГр привело к незначительному (по сравнению с контролем) увеличению в популяции леталей (популяция N 7), в то время как облучение в дозе 5,1 сГр/ч на поколение (популяции 5 и 6) увеличило уровень генетического груза в несколько раз. Равновесный уровень концентрации леталей для облучаемых популяций достигается через

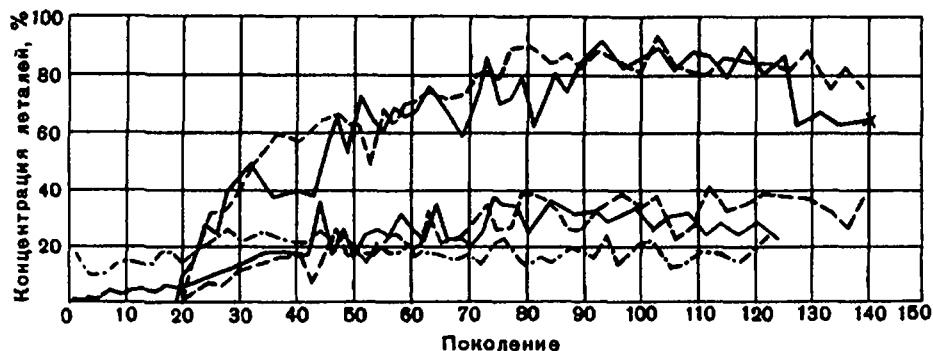


Рис. 7.4. Концентрация летальных мутаций в облученных экспериментальных популяциях в течение 150 поколений. Три нижние кривые: популяция № 1 (—); популяция № 3 (---); популяция № 7 (----). Две верхние кривые популяция № 5(---); популяция №6 (-----)

60-70 поколений после начала облучения.

Рассмотрим более детально, как зависит скорость установления равновесного уровня мутагенеза в популяции от интенсивности мутационного процесса. На рис. 7.5 представлены расчетные данные, полученные А.В.

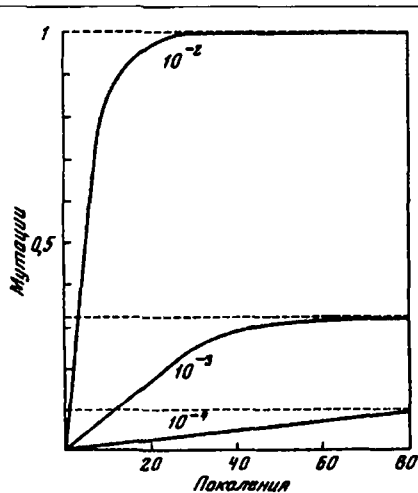


Рис. 7.5. Влияние скорости мутагенеза на величину стационарного уровня и темп выхода популяции на стационарный уровень

Рубановичем по величине равновесного уровня и скорости его достижения при различных гипотетических скоростях мутирования (10^{-2} , 10^{-3} и 10^{-4}), связанных с предполагаемым воздействием различных мутагенных факторов. Видно, что чем выше темп мутирования в популяции, тем выше равновесный уровень и тем быстрее он достигается. Опираясь на эти расчеты, можно заключить, что при действии малых доз ионизирующих излучений равновесный уровень мутаций в популяциях будет достигаться лишь спустя весьма значительное число поколений после начала хронического воздействия ионизирующих излучений.

Результаты, полученные на популяциях дрозофилы, были в дальнейшем подтверждены на других экспериментальных объектах — одноклеточных водорослях, растениях, мышах. Кроме того, высокий генетический груз в природных популяциях различных организмов был выявлен при изучении генетических последствий ядерной аварии на предприятии «Маяк», произошедшей в 1957 г, в результате которой возник Восточно-Уральский ра-

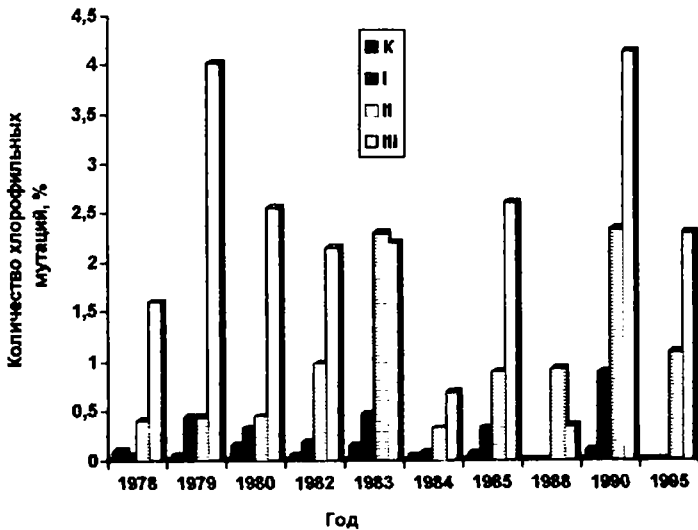


Рис. 7.6. Динамика хлорофильных мутаций в хронически облучаемых и контрольной популяциях *C. scabiosa* L., произрастающих при разных концентрациях ^{90}Sr – ^{90}Y в почве

диоактивный след. Например В.А. Кальченко была прослежена в течение 38 лет динамика хлорофильных мутаций у василька шероховатого (*Centaurea scabiosa* L.), подвергающегося хроническому воздействию бета-излучения стронция-90 и иттрия-90 (рис. 7.6). Видно, что частота выявляемых хлорофильных мутаций (по существу, летальных и сублетальных мутаций) поддерживается в хронически облучаемой популяции на высоком равновесном уровне, значительно превышающем контрольный. В экспериментах, проведенных в зоне аварии на Чернобыльской атомной станции, В.И. Абрамов изучал динамику генетического груза в природных популяциях арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*), хорошо изученного генетического объекта. Был проведен анализ частоты эмбриональных леталей (рецессивные летальные мутации), на-

блюдаемых в стручках этого растения (регистрировали погибшие зародыши семян). На рисунке 7.7 видно, что уровни эмбриональных леталей, наблюдаемые в течение нескольких лет в облучаемых популяциях, намного превосходят контрольный уровень, равный в контрольной популяции 5%. Полученные результаты свидетельствуют о насыщении генофонда облучаемых популяций арабидопсиса рецессивными летальными мутациями.

Возникает вопрос, как скоро после прекращения воздействия мутагенного фактора популяция может освободиться от груза индуцированных мутаций. Этот вопрос интересовал исследователей с первых шагов зарождения радиационной генетики. Ответ был найден в экспериментах, проведенных на дрозофиле Б. Уолсом и Н.В. Тимофеевым-Рессовским, и на одноклеточных водорослях, про-



веденных В. А. Шевченко. Показано, что уровень мутаций каждого мутантного клона (например, летальных мутаций) снижается после прекращения облучения в последующих поколениях по экспоненциальному закону. Требуется несколько десятков поколений (для популяций дрозофилы — около 30-40), чтобы уровень мутаций в популяции достиг равновесного уровня контрольных популяций. Однако незначительная часть индуцированных мутаций остается закрепленной в популяции на более длительное время, создавая резерв для адаптивной изменчивости популяции при изменении условий окружающей среды.

В природных популяциях исследователь имеет дело с совокупностью огромного количества различных мутаций, постоянно возникающих и подвергающихся отбору. Острое облучение популяций того или иного вида

индуцирует широкий спектр мутаций, формирующих мутантные клоны, каждый из которых обладает своей, присущей только ему селективной ценностью, своими параметрами отбора.

Популяционные закономерности едины для любых скрещивающихся (панмиктических) популяций. Выявленные на экспериментальных объектах исследования, они имеют прямое отношение к человеку. Так же, как для дрозофилы, в облучаемых популяциях человека при воздействии ионизирующих излучений в течение многих поколений предполагается появление равновесного уровня мутагенеза, характеризующего накопленный груз индуцированных мутаций. Как следует из докладов Научного Комитета ООН по действию атомной радиации, равновесный уровень мутаций в облучаемых популяциях человека, возникающий через 7-10 поколений после начала

Генетический груз популяции

хронического облучения в дозе 1 Зв на поколение, приблизительно в восемь раз превышает эффект облучения, наблюдаемый в первом поколении.

После прекращения воздействия радиации элиминация индуцированных мутаций в этой гипотетической популяции человека до установления равновесного уровня естественного мутационного процесса, как и в популяциях дрозофилы, составит многие поколения.

Вопросы для самоконтроля

1. В каком случае совокупность особей можно рассматривать как популяцию?
2. Какие показатели характеризуют генетическую изменчивость популяций?
3. При изучении популяции обнаружены 2 особи

с генотипом AA и 8 особей с генотипом AB. Соответствуют ли наблюдаемые частоты генотипов закону Харди – Вайнберга?

4. В каких случаях закон Харди – Вайнберга не выполняется?
5. Может ли отбор поддерживать генетическое разнообразие в популяциях?
6. Пусть M – нормальный ген, а m – летальный рецессивный аллель. Каковы приспособленности всех трех возможных генотипов (MM, Mm, mm)?
7. Какова эффективность отбора против рецессивных аллелей?
8. Как связаны частота мутирования и частота заболеваний, вызванных мутантным геном?
9. Как влияет численность популяции на динамику частот генов?
10. Пусть равновесная частота рецессивного летального гена равна 10^{-3} . Каков генетический груз, обусловленный данным геном.

Глава 8. НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ И ИХ КЛАССИФИКАЦИЯ

Проблема здоровья людей и генетика тесно взаимосвязаны. Ученые-генетики пытаются ответить на вопрос, почему одни люди подвержены различным заболеваниям, в то время как другие в этих или даже худших условиях остаются здоровы. В основном это связано с наследственностью каждого человека, т.е. свойствами его генов, заключенных в хромосомах.

В последние годы отмечаются быстрые темпы развития генетики человека и медицинской генетики. Это объясняется многими причинами и прежде всего резким увеличением доли наследственной патологии в структуре заболеваемости и смертности населения. Статистика показывает, что из 1000 новорожденных у 35-40 выявляются различные типы наследственных болезней, а в смертности детей в возрасте до 5 лет хромосомные болезни составляют 2-3%, генные — 8-10%, мультифакториальные — 35-40%. Ежегодно в нашей стране рождается 180 тыс. детей с наследственными заболеваниями. Более половины из них имеют врожденные пороки, около 35 тыс. — хромосомные болезни и свыше 35 тыс. — генные болезни. Следует отметить, что число наследственных болезней у человека с каждым годом растет, отмечаются новые формы наследственной патологии. В 1956 г. было известно 700 форм наследственных заболеваний, а к 1986 году число их увеличилось до 2000. В 1992 количество известных наследственных болезней и признаков возросло до 5710.

Все наследственные болезни делятся на три группы:

1. Генные (моногенные — в основе патологии одна пара аллельных генов)
2. Хромосомные
3. Болезни с наследственным предрасположением (мультифакториальные).

Генные болезни

Генные болезни — это большая группа заболеваний, возникающих в результате повреждения ДНК на уровне гена.

Общая частота генных болезней в популяции составляет 1-2%. Условно частоту генных болезней считают высокой, если она встречается с частотой 1 случай на 10.000 новорожденных, средней — 1 на 10.000-40.000 и далее — низкой.

Моногенные формы генных заболеваний наследуются в соответствии с законами Г. Менделя. По типу наследования они делятся на аутосомно-доминантные, аутосомно-рецессивные и сцепленные с X- или Y-хромосомами.

Большинство генных патологий обусловлено мутациями в структурных генах, осуществляющих свою функцию через синтез полипептидов — белков. Любая мутация гена ведет к изменению структуры или количества белка.

Начало любой генной болезни связано с первичным эффектом мутантного аллеля. Основная схема генных болезней включает ряд звеньев: мутантный аллель → измененный первичный продукт → цепь последующих биохимических процессов клетки → органы → организм.

В результате мутации гена на молекулярном уровне возможны следующие варианты:

- 1) синтез аномального белка;
- 2) выработка избыточного количества генного продукта;
- 3) отсутствие выработки первичного продукта;
- 4) выработка уменьшенного количества нормального первичного продукта.

Не заканчиваясь на молекулярном уровне в первичных звеньях, патогенез генных болезней продолжается на клеточном уровне. При различных болезнях точкой приложения действия мутантного гена могут быть как отдельные структуры клетки — лизосомы, мембраны, митохондрии, пероксисомы, так и органы человека. Клинические проявления генных болезней, тяжесть и скорость их развития зависят от особенностей генотипа организма (гены-модификаторы, доза генов, время действия мутантного гена, гомо- и гетерозиготность и др.), возраста больного, условий внешней среды (питание, охлаждение, стрессы, переутомление) и других факторов.

Особенностью генных (как и вообще всех наследственных) болезней является их гетерогенность. Это означает, что одно и то же фенотипическое проявление болезни может быть обусловлено мутациями в разных генах или разными мутациями внутри одного гена. Впервые гетерогенность наследственных болезней была выявлена С.Н. Давиденковым в 1934 г.

К генным болезням у человека относятся многочисленные болезни обмена веществ. Они могут быть связаны с нарушением обмена углеводов, липидов, стероидов, пуринов и пиримидинов, билирубина, металлов и др. Пока еще нет единой классификации наследственных болезней обмена веществ. Научной группой ВОЗ предложена следующая классификация:

1) болезни аминокислотного обмена (фенилкетонурия, алкаптонурия и др.);

2) наследственные нарушения обмена углеводов (галактоземия, гликогеновая болезнь и др.);

3) болезни, связанные с нарушением липидного обмена (болезнь Ниманна-Пика, болезнь Гоше и др.);

4) наследственные нарушения обмена стероидов;

5) наследственные болезни пуринового и пиримидинового обмена (подагра, синдром Леша-Найяна и др.);

6) болезни нарушения обмена соединительной ткани (болезнь Марфана, мукополисахаридозы и др.);

7) наследственные нарушения гема и порфирина (гемоглобинопатии и др.);

8) болезни, связанные с нарушением обмена в эритроцитах (гемолитические анемии и др.);

9) наследственные нарушения обмена билирубина;

10) наследственные болезни обмена металлов (болезнь Коновалова-Вильсона и др.)

11) наследственные синдромы нарушения всасывания в пищеварительном тракте (муковисцидоз, непереносимость лактозы и др.).

Рассмотрим наиболее часто встречающиеся и генетически наиболее изученные в настоящее время генные болезни.

Наследственные болезни аминокислотного обмена

Это — самая многочисленная группа наследственных болезней обмена веществ. Почти все они наследуются по аутосомно-рецессивному типу. Причина заболеваний — недостаточность того или иного фермента, ответственного за синтез аминокислот. Болезни со-

проводятся рвотой и обезвоживанием организма, летаргическим состоянием или возбуждением и судорогами. В позднем возрасте проявляется угасание умственного и физического развития.

К наследственным болезням с нарушенным аминокислотным обменом относится фенилкетонурия, альбилизм и др.

Фенилкетонурия (ФКУ) впервые была описана А. Фелингом в 1934 г. У больных нарушено превращение аминокислоты фенилаланина в тирозин из-за резкого снижения активности фермента фенилаланин-гидроксилазы. В результате содержание фенилаланина в крови и моче больных значительно возрастает. Далее фенилаланин превращается в фенилпировиноградную кислоту, которая является нейротропным ядом и нарушает формирование миелиновой оболочки вокруг аксонов центральной нервной системы.

Фенилкетонурия встречается в среднем в мировом масштабе с частотой 1 на 1000 новорожденных. Однако по этому показателю имеются значительные различия между популяциями: 1:2600 в Турции, 1:4500 в Ирландии, 1:30000 в Швеции, 1:119000 в Японии. Частота гетерозиготного носительства в большинстве европейских популяций составляет 1:100.

Локус (фенилгидроксилазы) расположен в длинном плече 12-й хромосомы. В настоящее время для большинства семей возможна молекулярно-генетическая диагностика и выявление гетерозиготного носительства. Болезнь наследуется по аутосомно-доминантному типу. Известно несколько форм фенилкетонурии, которые различаются по тяжести протекания болезни. Это связано с наличием 4-х аллелей гена и их комбинациями.

Ребенок с фенилкетонурией рождается здоровым, но в первые же недели в связи с поступлением фенилаланина в организм с молоком матери развивается повышенная возбудимость, судорожный синдром, склонность к дерматитам, моча и пот больных имеют характерный "мышинный" запах, но главными симптомами ФКУ являются судорожные припадки и олигофрения.

Большинство больных — блондины со светлой кожей и голубыми глазами, что определяется недостаточным синтезом пигмента меланина. Диагноз заболевания устанавливается на основании клинических данных и результатов биохимического анализа мочи (на фенилпировиноградную кислоту) и крови (на фенилаланин). С этой целью несколько капель крови на фильтровальной бумаге подвергают хроматографии и определяют содержание фенилаланина. Иногда используют пробу Фелинга — в 2,5 мл свежей мочи ребенка добавляют 10 капель 5% раствора треххлористого железа и уксусной кислоты. Появление сине-зеленого окрашивания указывает на наличие заболевания.

Метод лечения фенилкетонурии в настоящее время хорошо разработан. Он состоит в назначении больному диеты (овощи, фрукты, варенье, мед) и специально обработанных гидролизатов белков с низким содержанием фенилаланина (лофелак, кетонил, минафен и др). В настоящее время разработаны методы дородовой диагностики. Ранняя диагностика и профилактическое лечение предупреждают развитие болезни.

Альбилизм (глазо-кожный) описан в 1959 г. Болезнь обусловлена отсутствием синтеза фермента тирозиназы. Для нее характерна обесцвеченность кожи, волос, глаз, независимо от расы

и возраста. Кожа больных розово-красная, совершенно не загорает. Имеет предрасположенность к злокачественным новообразованиям. Волосы белые или желтоватые. Радужка серо-голубого цвета, но может быть и розоватая из-за отражения света от глазного дна. Больным свойственна сильная светобоязнь, их зрение снижено и не улучшается с возрастом.

Альбинизм встречается с частотой 1 на 39.000, наследуется по аутосомно-рецессивному типу (рис. 8.1). Ген локализован на длинном плече 11-й хромосомы.

Наследственные заболевания, связанные с нарушением обмена углеводов

Известно, что углеводы входят в состав ряда биологически-активных веществ — гормонов, ферментов, мукополисахаридов, выполняющих энергетическую и структурную функции. В результате нарушения углеводного обмена развивается гликогеновая болезнь, галактоземия и др.

Гликогеновая болезнь связана с нарушением синтеза и разложения гликогена — животного крахмала. Гликоген образуется из глюкозы при голодании; в норме он снова превращается в глюкозу и усваивается организмом. При нарушении этих процессов у человека развиваются тяжелые заболевания — различные типы гликогенозов. К ним относятся болезнь Гирке, болезнь Помпе и др.

Гликогеноз (I тип — болезнь Гирке). У больных в печени, почках и слизистой кишечника накапливается большое количество гликогена. Превращение его в глюкозу не происходит, т.к. отсутствует фермент глюко-6-фосфатаза, регулирующий уровень глюкозы в крови. В результате у больного раз-



Рис. 8.1. Глазо-кожный альбинизм

вивается гипогликемия, в печени, почках и слизистой кишечника накапливается гликоген. Болезнь Гирке наследуется по аутосомно-рецессивному типу.

Сразу после рождения главными симптомами болезни являются гликогемические судороги и гепатомегалия (увеличение печени). С 1-го года жизни отмечается задержка роста. Характерен вид больного: большая голова, “кукольное лицо”, короткая шея, выступающий живот (рис. 8.2). Кроме того, отмечаются носовые кровотечения, задержка физического и полового развития, мышечная гипотония. Интеллект при этом нормальный. В крови повышается уровень мочевой кислоты, так что с возрастом может развиваться подагра.

В качестве лечения используется диетотерапия: частый прием пищи, повышенное содержание углеводов и ограничение жиров в диете.

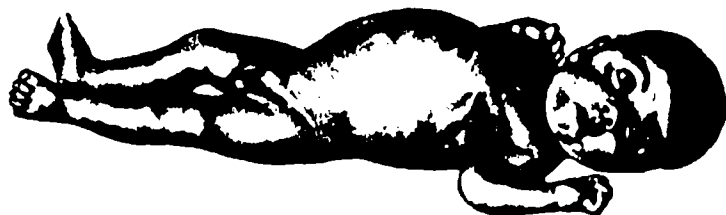


Рис. 8.2. Болезнь Гирке. Большая голова, "кукольное лицо", короткая шея, выступающий живот

Гликогеноз (II тип — болезнь Помпе) протекает в более тяжелой форме. Гликоген накапливается как в печени, так и в скелетных мышцах, миокарде, легких, селезенке, надпочечниках, стенках сосудов, в нейронах.

У новорожденных спустя 1-2 месяца появляется мышечная слабость, дефицит 1,4-глюкозидазы в печени и в мышцах. В этот же период возникают кардиомегалия (увеличение сердца) и макроглоссия (патологическое увеличение языка). Нередко у больных развивается тяжелая форма пневмонии из-за накопления секрета в дыхательных путях. Дети погибают на первом году жизни.

Болезнь наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Ген локализован на длинном плече 17-й хромосомы. Диагностика заболевания возможна еще до рождения ребенка. С этой целью определяют активность фермента 1,4-глюкозидазы в амниотической жидкости и ее клетках.

Известны и другие типы гликогенозов (III-VII), которые в общем повторяют клиническую картину первого типа. Для их диагностики необходимы специальные биохимические исследования.

Галактоземия. При этом заболевании происходит накопление в крови больного галактозы, что приводит к

поражению многих органов: печени, нервной системы, глаз и др. Симптомы болезни появляются у новорожденных после приема молока, поскольку галактоза — составная часть молочного сахара лактозы. При гидролизе лактозы образуются глюкоза и галактоза. Последняя необходима для миелинизации нервных волокон. При избытке галактозы в организме она в норме превращается в глюкозу с помощью фермента галактоза-1-фосфат-уридилтрансферазы. При понижении активности этого фермента происходит накопление галактоза-1-фосфата, токсичного для печени, мозга, хрусталика глаза.

Болезнь проявляется с первых дней жизни расстройствами пищеварения, интоксикацией (понос, рвота, обезвоживание). У больных увеличивается печень, развивается печеночная недостаточность и желтуха. Обнаруживается катаракта (помутнение хрусталика глаза), умственная отсталость. У погибших в первый год жизни детей при вскрытии обнаруживают цирроз печени.

Наиболее точные методы диагностики галактоземии — определение активности фермента галактоза-1-фосфат-уридилтрансферазы в эритроцитах, а также галактозы в крови и моче, где уровни ее увеличены. При исключении из пищи молока (источника га-



Рис. 8.3. Внешний вид ребенка при болезни Гоше

лактозы) и раннем назначении диеты больные дети могут нормально развиваться.

Тип наследования галактоземии — аутосомно-рецессивный. Ген локализован на коротком плече 9-й хромосомы. Болезнь встречается с частотой 1 на 16.000 новорожденных.

Наследственные заболевания, связанные с нарушением липидного обмена

В число липидов входят холестерол (холестерин), триглицериды, эфиры холестерола, фосфолипиды, сфинголипиды и др.

Наследственные болезни обмена липидов (липидозы) подразделяются на два основных типа: 1) внутриклеточные, при которых происходит накопление липидов в клетках различных тканей и 2) болезни с нарушением метаболизма липопротеидов, содержащихся в крови.

К числу наиболее изученных наследственных заболеваний липидного обмена первого типа относятся болезнь Гоше, болезнь Ниманна-Пика и амавротическая идиотия (болезнь Тея-Сакса).

Болезнь Гоше характеризуется накоплением цереброзидов в клетках нервной и ретикуло-эндотелиальной системы, обусловленным дефицитом фермента глюкоцереброзидазы. Это приводит к накоплению в клетках ретикуло-эндотелиальной системы глюкоцереброзида. В клетках мозга, печени, лимфатических узлах обнаруживаются крупные клетки Гоше. Накопление цереброзида в клетках нервной системы приводит к их разрушению.

Выделяют детскую и ювенильную формы болезни. Детская проявляется в первые месяцы жизни задержкой умственного и физического развития, увеличением живота, печени и селезенки, затруднением глотания, спазмом гортани. Возможна дыхательная недостаточность, инфильтрация (уплотнение легких клетками Гоше) и судороги. Смерть наступает на первом году жизни (рис. 8.3).

Наиболее часто встречается ювенильная форма болезни Гоше. Она поражает детей различного возраста и носит хронический характер. Заболевание проявляется, как правило, на первом году жизни. Возникают пигментация кожи (коричневые пятна), остеопороз (снижение плотности кост-

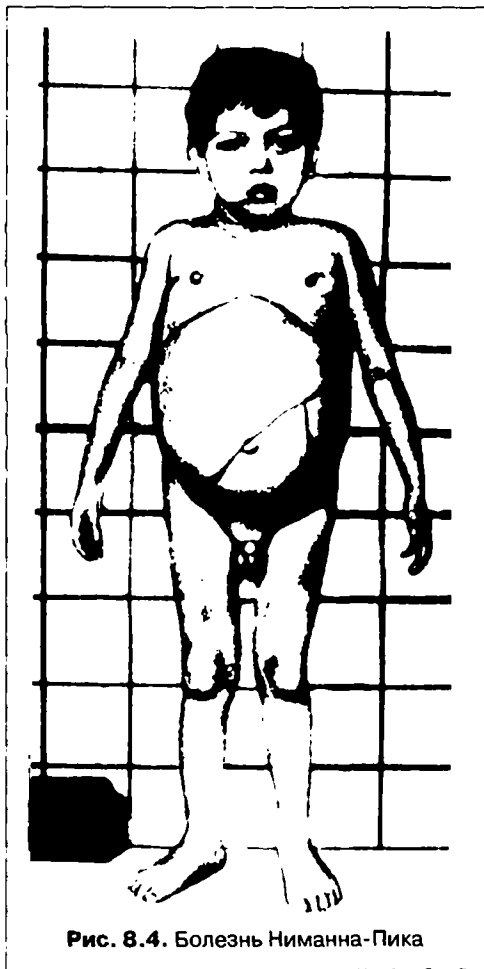


Рис. 8.4. Болезнь Ниманна-Пика

ти), переломы, деформация костей. В тканях мозга, печени, селезенки, костного мозга содержится большое количество глюкоцереброзидов. В лейкоцитах, клетках печени и селезенки снижена активность глюкозидазы. Тип наследования аутосомно-рецессивный. Ген локализован на длинном плече 1-й хромосомы.

Болезнь Ниманн-Пика обусловлена снижением активности фермента сфингомиелиназы. В результате происходит накопление сфингомиелина в клетках печени, селезенке, мозге, рети-

куло-эндотелиальной системе. Вследствие дегенерации нервных клеток нарушается деятельность нервной системы.

Выделяют несколько форм заболевания, различающихся клинически (время начала, течение и тяжесть неврологических проявлений). Однако имеются и общие для всех форм симптомы.

Болезнь чаще проявляется в раннем возрасте. У ребенка увеличиваются лимфатические узлы, размеры живота, печени и селезенки; отмечаются рвота, отказ от пищи, мышечная слабость, снижение слуха и зрение (рис. 8.4). У 20-30% детей на сетчатке глаза обнаруживается пятно вишневого цвета (симптом «вишневой косточки»). Поражение нервной системы ведет к отставанию нервно-психического развития, глухоте, слепоте. Резко снижается устойчивость к инфекционным заболеваниям. Дети погибают в раннем возрасте.

Наследование болезни — аутосомно-рецессивное. Ген сфингомиелиназы картирован на хромосоме 11.

Диагностика болезни Ниманна-Пика основана на выявлении в плазме крови и спинномозговой жидкости повышенного содержания сфингомиелина. В периферической крови выявляются большие зернистые пенистые клетки Пика. Лечение симптоматическое.

Амаврогическая идиотия (болезнь Тея-Сакса) также относится к заболеваниям, связанным с нарушением липидного обмена. Для нее характерно отложение в клетках мозга, печени, селезенки и других органах липида ганглиозида. Причина — снижение активности фермента гексозаминидазы А в организме. В результате происходит разрушение аксонов нервных клеток.

Болезнь проявляется в первые месяцы жизни. Ребенок становится вялым, малоподвижным, безразличным к окружающим. Задержка психического развития приводит к снижению интеллекта до степени идиотии. Отмечается мышечная гипотония, судороги, характерный симптом “вишневой косточки” на сетчатке глаза. К концу первого года жизни наступает слепота. Причина — атрофия зрительных нервов. Позднее развивается полная обездвиженность. Смерть наступает в 3-4 года.

Тип наследования болезни — ауто-сомно-рецессивный. Ген локализован на длинном плече 15-й хромосомы (рис. 8 5).

Наследственные болезни соединительной ткани

Роль соединительной ткани в организме связана с опорной, трофической и защитной функциями. Важнейшими компонентами соединительной ткани являются:

- а) клеточные компоненты;
- б) коллагеновые, эластические и ретикулярные волокна;
- в) аморфное основное вещество.

Сложная структура соединительной ткани задана генетически. Патология в ее системе является причиной различных наследственных заболеваний и обусловлена в той или иной степени нарушениями строения структурных белков — коллагенов.

Большинство болезней соединительной ткани связано с дефектами опорно-двигательного аппарата и кожи. К числу их относятся синдром Марфана, синдром Элерса-Данлоса, а также мукополисахаридозы.

Синдром Марфана (“паучьи пальцы”) относится к числу наследственных болезней обмена веществ и характеризуется системным поражением со-



Рис. 8.5. Болезнь Тея-Сакса

единительной ткани. Наследуется по ауто-сомно-доминантному типу с высокой пенетрантностью и различной степенью экспрессивности. С этим связан значительный клинический и возрастной полиморфизм. Впервые синдром был описан В. Марфаном в 1886 г. Причина болезни — мутация в гене, ответственном за синтез белка соединительнотканых волокон фибриллина. Блокирование его синтеза приводит к повышенной растяжимости соединительной ткани.

Больных с синдромом Марфана отличают высокий рост, длинные паучо-

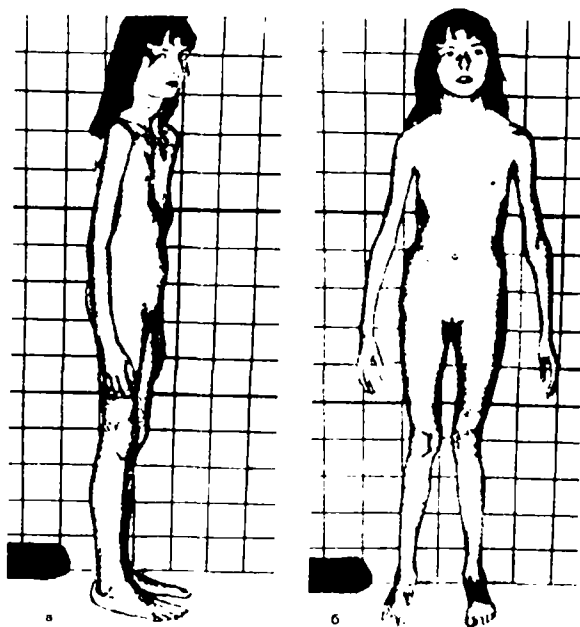


Рис. 8.6. Синдром Марфана

а, б – диспропорциональное телосложение, длинные тонкие конечности, узкое лицо, воронкообразная грудная клетка, плоскостопие; в – арахнодактилия

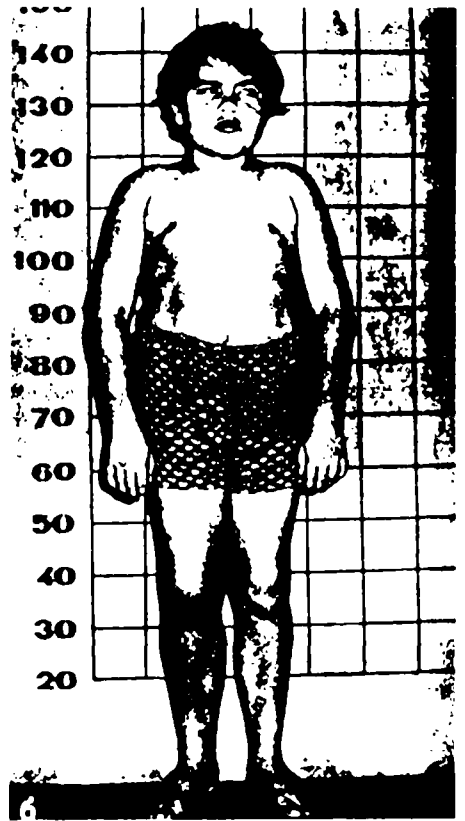


Рис. 8.7. Мукополисахаридоз, тип I
а – макро- и скалоцефалия (увеличение размеров и формы черепа), б – внешний вид

образные пальцы, деформация грудной клетки (воронкообразная, килевидная, уплощенная), плоскостопие (рис. 8.6). Нередко имеют место бедренные и паховые грыжи, гипоплазия (недоразвитие) мышц, мышечная гипотония, ухудшение зрения, изменение формы и размера хрусталика, значительная миопия вплоть до отслойки сетчатки, гетерохромия (разное окрашивание участков радужки); подвывих хрусталика, катаракта, косоглазие.

Помимо перечисленного, при синдроме Марфана характерны врожденные пороки сердца, расширение аорты с развитием аневризмы. Нередко отмечаются расстройства органов дыхания, поражения желудочно-кишечного тракта и мочевыводящей системы.

Лечение в основном симптоматическое. Положительное действие оказывают массаж, лечебная физкультура, а в ряде случаев оперативное вмешательство. Большое значение имеет ранняя диагностика заболевания. Частота синдрома Марфана в популяции равна 1:10.0(1:15.000).

Следует отметить, что синдромом Марфана страдали президент США

Авраам Линкольн, великий итальянский скрипач и композитор Николо Паганини.

Мукополисахаридозы представлены целой группой наследственных заболеваний соединительной ткани. Для них характерно нарушение в организме метаболизма кислых гликозаминогликанов, что связано с недостаточностью лизосомальных ферментов. В результате патологические продукты обмена откладываются в соединительной ткани, в печени, селезенке, роговице и в клетках центральной нервной системы.

Первые сведения о мукополисахаридозах появились в 1900 г., а затем в 1917–1919 гг. Еще раньше это заболевание было известно под названием “гаргоилизм”, поскольку внешне пробынды напоминали фигуры, украшавшие собор Парижской Богоматери.

При мукополисахаридозах поражаются опорно-двигательный аппарат, внутренние органы, глаза, нервная система.

Клиническими признаками болезни служат: замедление роста, короткая шея и туловище, деформация костей, снижение интеллекта, грубые черты лица с крупными губами и языком, пупочные и паховые грыжи, пороки сердца, нарушение психического развития с отставанием от нормы (рис. 8.7).

Тип наследования болезни — аутосомно-рецессивный. Ген картирован на коротком плече 4-й хромосомы.

Всего выделяют 8 основных типов мукополисахаридозов в зависимости от снижения активности разных ферментов и особенностей клинических признаков. Для определения типа заболевания исследуются биохимические показатели кислых гликозаминогликанов в крови и моче больных.

Лечение: диетотерапия, физиопроцедуры (электрофорез, магнитотерапия, массаж, лечебная физкультура и др.), гормональные и сердечно-сосудистые средства.

Наследственные нарушения обмена в эритроцитах

К этой группе относятся болезни, связанные чаще всего с укорочением срока жизни эритроцитов, а также со снижением его уровня в крови. Гемоглобин — основной белок эритроцитов. В настоящее время хорошо изучена аминокислотная последовательность и структура его молекулы. Изу-

чение гемоглобина у человека началось с открытия наследственного заболевания — серповидноклеточной анемии. Было показано, что молекулярная структура серповидноклеточного гемоглобина отличается от нормального.

По мере совершенствования методов электрофореза были выявлены более 400 вариантов гемоглобина и расшифрована их полная аминокислотная последовательность. Установлено, что молекула человеческого гемоглобина состоит из 4-х полипептидных цепей ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$). Большинство разновидностей гемоглобина человека имеет идентичные α -цепи и различаются по остальным цепям. К каждой цепи глобина в специфическом участке присоединяется молекула небелковой природы — гемогруппа, или гем. Четыре глобиновых цепи вместе с гемами образуют функциональную молекулу гемоглобина, которая переносит кислород из легких в ткани.

Молекула глобина состоит из 141 — 146 аминокислотных остатков, расположенных в строго определенном порядке. Последовательность аминокислот в белке называется его первичной структурой. Пространственное взаиморасположение соседних мономеров в полипептидной цепи именуется вторичной структурой, а трехмерная конфигурация белковых субъединиц — структурой третичной. Четвертичная же структура гемоглобина реализуется во взаимной организации четырех субъединиц в составе функционирующей молекулы.

У детей и взрослых преобладающим типом гемоглобина является НвА, состоящий из двух α - и двух β -цепей ($\alpha_2\beta_2$), α -цепи у всех гемоглобинов идентичны. α - и β -цепи различаются по многим аминокислотным остаткам.

У всех взрослых есть 2-3 % гемоглобина HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$). Характерная для него δ -цепь отличается от β -цепи по 10 аминокислотным остаткам. После рождения у всех детей обнаруживается также небольшое количество (меньше 1%) фетального гемоглобина HbF ($\alpha_2\gamma_2$). γ -цепь значительно отличается от β -цепей. Синтез γ -цепей у эмбриона происходит в основном в печени и селезенке, но могут они синтезироваться и в клетках костного мозга. А β -цепи, наоборот, синтезируются главным образом в клетках костного мозга.

Все нормальные гемоглобины человека имеют идентичную трехмерную структуру, оптимальную для переноса кислорода.

Аминокислотная последовательность каждой глобиновой цепи кодируется своим геном, равно как и синтез небелковой гемогруппы.

Гены глобинов у человека образуют мультигенное семейство и расположены на хромосомах двух кластеров (Кластеры — группа генов, расположенных в определенных локусах, объединенных общими функциями.) — α -кластер занимает 25000 пар нуклеотидов в коротком плече 16-й хромосомы. Семейство γ - β - δ -генов расположено в коротком плече 11-й хромосомы (60 000 п.н.).

Все глобиновые гены имеют сходную функциональную организацию. Они содержат 3 кодирующие последовательности (экзоны) и 2 интрона, которые транскрибируются вместе с экзонами и вырезаются в ходе процессинга. Варианты гемоглобинов возникают в результате мутаций в конкретном глобиновом гене. Эти варианты (чаще всего) отличаются одной аминокислотой в глобиновой цепи. Описано более 350 таких единичных замен. Замены аминокислот влияют на сродство молекулы гемоглобина к кислороду.

Нарушение же его функций ведет к возникновению заболеваний. К другим типам мутаций, изменяющим гемоглобин, относятся: делеции, дупликации, мутации сдвига рамки считывания, мутации, нарушающие процессинг РНК и др.

В результате мутаций в эритроцитах и гемоглобине возникают наследственные болезни человека — гемолитические анемии и гемоглобинопатии.

Гемолитические анемии включают заболевания, обусловленные снижением уровня гемоглобина и укорочением срока жизни эритроцитов. Кроме того, причиной болезни могут быть:

1) Нарушение мембраны эритроцитов.

2) Нарушение активности ферментов эритроцитов (ферментов, гликолиза пентозофосфатного цикла и др.).

3) Нарушение структуры или синтеза гемоглобина.

Рассмотрим кратко наиболее распространенную форму наследственной гемолитической анемии у человека.

Наследственный микросфероцитоз — гемолитическая анемия Минковского-Шоффара. Болезнь описана в 1900 г. Примерно в половине случаев она проявляется у новорожденных. Диагноз ставится в возрасте 3-10 лет. Заболевание обусловлено генетическими аномалиями эритроцитов и связано с врожденной недостаточностью липидов их оболочки. В результате повышения проницаемости мембраны в клетку проникают ионы натрия и теряется АТФ. Эритроциты принимают сферическую форму. Измененные эритроциты разрушаются в селезенке с образованием токсического белка — билирубина.

При данной болезни отмечают желтуху, анемию, спленомегалию (разрыв селезенки), изменения скелета.

Болезнь может протекать в двух формах — хронической и острой, при которой усиливается гемолиз, обуславливающий анемию.

У детей в первые месяцы жизни часто возникает “ядерная желтуха”. Причина — поражение ядер головного мозга за счет высокого содержания билирубина. В более старшем возрасте высокий уровень билирубина приводит к образованию камней и развитию желчекаменной болезни.

Для больных характерно увеличение селезенки и печени, деформация скелета; башенный череп, готическое небо, нарушенное расположение зубов.

Для диагностики заболевания исследуют кровь. Характерными признаками являются обнаружение микросфероцитов, снижение осмотической стойкости эритроцитов и др.

Тип наследования — аутосомно-доминантный с неполной пенетрантностью. Ген картирован на коротком плече 8-й хромосомы.

Наследственные аномалии циркулирующих белков.

Гемоглобинопатии

Гемоглобинопатии — это болезни, связанные с наследственным нарушением синтеза гемоглобина. Выделяют количественные (структурные) и качественные их формы. Первые характеризуются изменением первичной структуры белков гемоглобина, что может приводить к нарушению его стабильности и функции. При качественных формах структура гемоглобина остается нормальной, снижена лишь скорость синтеза глобиновых цепей.

Талассемии. Данная патология обусловлена снижением скорости синтеза полипептидных цепей нормального гемоглобина А. Впервые болезнь описана в 1925 г. Ее название происходит от гре-

ческого “Таласса” — Средиземное море. Полагают, что со средиземноморским регионом связано происхождение большинства носителей гена талассемии.

Талассемия встречается в гомо- и гетерозиготных формах. По клинической картине принято различать большую, промежуточную, малую и минимальную формы. Остановимся на одной из них.

Гомозиготная (большая) талассемия, она же — анемия Кули вызывается резким снижением образования гемоглобина HbA_1 и увеличением количества гемоглобина F.

Клинически болезнь проявляется к концу первого года жизни ребенка. Для нее характерны монголоидность лица, башенный тип черепа, отстаивание физического развития. При данной патологии в крови больного обнаруживаются мишеневидные эритроциты с низким содержанием Hb, укороченной продолжительностью жизни и повышенной осмотической стойкостью. У больных отмечается увеличение селезенки и, реже, печени.

По тяжести заболевания выделяют несколько форм талассемии. Тяжелая талассемия заканчивается быстрой гибелью в первые месяцы жизни ребенка. При хронической — больные дети доживают до 5-8 лет, а при легких формах больные доживают до взрослого возраста.

Серповидноклеточная анемия — наиболее часто встречаемое наследственное заболевание, вызванное изменением структуры молекулы гемоглобина. Люди, страдающие серповидноклеточной анемией, в большинстве случаев погибают, не достигнув зрелого возраста. В условиях низкого парциального давления кислорода их эритроциты приобретают форму серпа. У родителей больного эритроциты име-

ют несколько измененную форму, но они не страдают анемией.

Это заболевание впервые обнаружил в 1910 г. Дж. Херрик у студента-негра, страдавшего тяжелой формой анемии. В крови больного он выявил эритроциты необычной серповидной формы. Оказалось, что это заболевание не редкое явление у американских негров (рис. 8.8).

В 1946 г. Нобелевский лауреат Л. Полинг с коллегами провели биохимический и генетический анализ гемоглобина больных и здоровых людей и показали, что гемоглобины нормальных и серповидноклеточных эритроцитов различаются по подвижности в электрическом поле и растворимости. Оказалось, что гемоглобин у людей с признаками серповидноклеточности представляет смесь равных количеств и нормального и мутантного гемоглобина. Стало ясно, что мутация, вызывающая серповидноклеточную анемию, связана с изменением химической структуры гемоглобина.

Дальнейшие исследования показали, что в случае серповидноклеточной анемии происходит замена глутаминовой кислоты на валин в шестой паре нуклеотидов гена, кодирующего β -цепь гемоглобина человека. У гетерозигот измененный гемоглобин составляет 20-45 %, у гомозигот — 60-99 % общего гемоглобина.

При данной патологии отмечают бледность кожи и слизистых оболочек, желтушность. У 60% детей увеличена печень. Отмечается также шумы в области сердца и др. Болезнь протекает в виде чередования кризов и ремиссий.

Специальных методов лечения нет. Важное значение имеет предохранение больного от воздействия факторов, провоцирующих развитие болезни (гипоксия, обезвоживание, холод и др.).

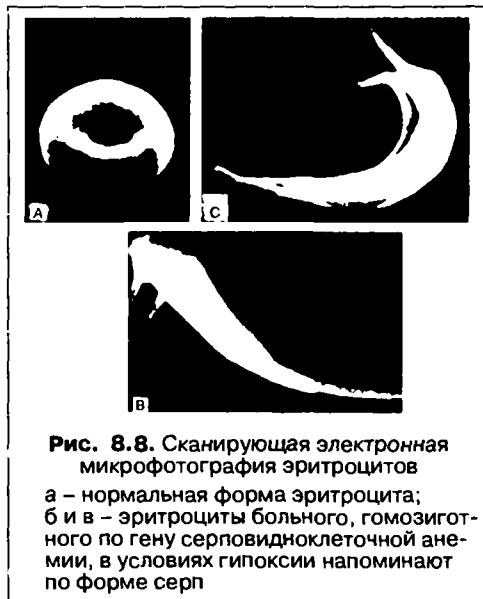


Рис. 8.8. Сканирующая электронная микрофотография эритроцитов
 а – нормальная форма эритроцита;
 б и в – эритроциты больного, гомозиготного по гену серповидноклеточной анемии, в условиях гипоксии напоминают по форме серп

Хромосомные болезни человека

К хромосомным относятся болезни, обусловленные геномными мутациями или структурными изменениями отдельных хромосом.

Хромосомные болезни возникают в результате мутаций в половых клетках одного из родителей. Из поколения в поколение передаются не более 3-5 % из них. Хромосомными нарушениями обусловлены примерно 50 % спонтанных аборт и 7 % всех мертворождений. По данным 1987 г. из 1000 новорожденных 7 имели различные хромосомные аномалии.

Все хромосомные болезни принято делить на две группы.

Связанные с аномалиями числа хромосом

В эту группу входят три подгруппы:

1. Болезни, обусловленные нарушением числа аутосом.
2. Болезни, связанные с увеличением или уменьшением числа половых X- и Y-хромосом.

Таблица 8.1. Частота рождения детей с хромосомными болезнями в зависимости от возраста матери

Возраст матери, годы	Частота рождения детей	
	с болезнью Дауна	с любой хромосомной болезнью
20	1:1667	1:526
25	1:1250	1:476
30	1:952	1:385
35	1:378	1:192
40	1:106	1:66
45	1:30	1:21
49	1:12	1:8

3. Болезни, причиной которых является полиплоидия — кратное увеличение гаплоидного набора хромосом.

Связанные со структурными нарушениями (абберациями) хромосом

Их причинами бывают:

1. Транслокации — обменные перестройки между негомологичными хромосомами.

2. Делеции — потери участка хромосомы.

3. Инверсии — повороты участка хромосомы на 180 градусов.

4. Дупликации — удвоения участка хромосомы.

5. Изохромосомия — хромосомы с повторяющимися генетическим материалом в обоих плечах.

6. Возникновение кольцевых хромосом (соединение двух концевых делеций в обоих плечах хромосомы).

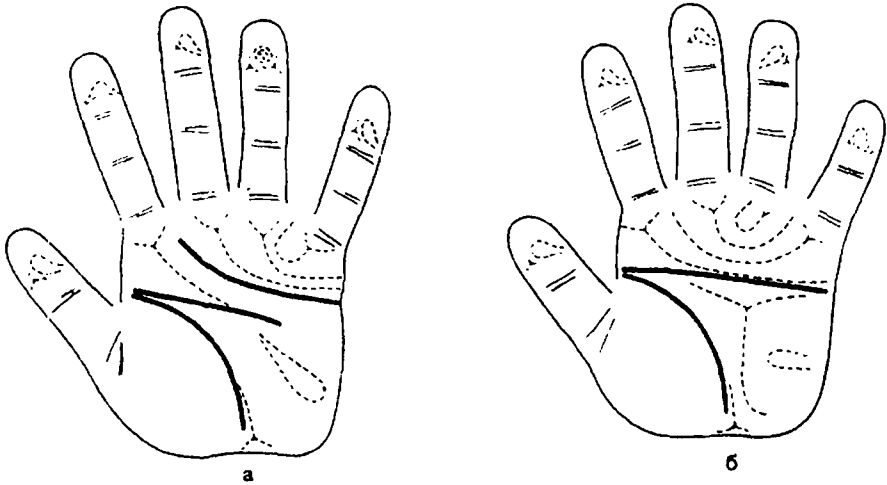
В настоящее время у человека известно более 700 таких заболеваний, вызванных структурными нарушениями хромосом. Имеющиеся данные показывают, что около 25% приходится на аутомсомные трисомии, 46% — на патологию половых хромосом. Структурные перестройки составляют 10,4%. Среди хромосомных перестроек наиболее часто встречаются транслокации и делеции.

Рассмотрим наиболее часто встречаемые хромосомные болезни.

Синдром Дауна (трисомия по 21-й хромосоме). Данное заболевание относится к числу наиболее распространенных патологий человека. Встречается у новорожденных с частотой 1:700-800. Частота рождения детей с болезнью Дауна зависит от возраста матери и в меньшей степени от возраста отца. Риск рождения больного ребенка матерью в 40-46 лет в 16 раз

Таблица 8.2 Частота рождения детей с болезнью Дауна

Автор	Местность	Частота	Автор	Местность	Частота
Jenkins (1933)	Чикаго	1:636	Oster (1953)	Копенгаген	1:765
Malpas (1937)	Ливерпуль	1:776	Schul, Neel (1962)	Хиросима и Нагасаки	1:785
Parker (1950)	Вашингтон	1:873	Wagner (1962)	Гонолулу	1:478
Hug (1951)	Цюрих	1:520	Jaworska (1962)	Польша	1:575
Carter, Mc Karty (1951)	Лондон	1:666	Е. Ф. Давиденкова (1966)	Ленинград	1:912
Collman, Stoller (1961)	Австралия (штат Виктория)	1:688			



Дерматоглифика при болезни Дауна.

а — ладонь нормального субъекта, б — ладонь при болезни Дауна

выше, чем в 20-24 года. Заметных различий по частоте заболевания болезнью Дауна в разных географических и расовых популяциях (Табл. 8.1. и 8.2) не отмечается. Обычно трисомия по 21-й паре хромосом составляет около 95% от общего числа больных с синдромом Дауна. Примерно 4% больных страдает транслокационной формой и около 2% — мозичными. При транслокационном варианте в кариотипе наблюдается 46 хромосом, а лишняя 21-я хромосома транслоцирована чаще всего на хромосому из групп D или G.

Лежащее в основе синдрома Дауна нерасхождение 21-й пары хромосом происходит либо в яйцеклетке во время мейоза, либо на ранних стадиях дробления зиготы.

Соотношение больных мальчиков и девочек среди новорожденных составляет 1 : 1. Признаки синдрома заметны уже при рождении и позднее проявля-

ются более четко. Больные обычно невысокого роста, отличаются слабоумием. У них характерная внешность: монголоидный разрез глаз, круглое утолщенное лицо, короткий нос, плоская переносица, эпикант (полулунная вертикальная складка у внутреннего угла



Рис. 8.9. Дети с болезнью Дауна

Таблица 8.3. Наиболее частые внешние признаки синдрома Дауна

Порок или признак	Встречаемость, % от общего числа больных
Мозговой череп и лицо	98,3
брахицефалия	81,1
монголоидный разрез глазных щелей	79,8
эпикант	51,4
плоская спинка носа	65,9
узкое небо	58,8
деформированные ушные раковины	43,2
Костно-мышечная система	80,0
короткие и широкие кисти	64,4
клинодактилия мизинца	56,3
деформация грудной клетки	26,9
Глаза	72,1
помутнение хрусталика	32,2

Таблица 8.4. Врожденные пороки развития внутренних органов у больных с синдромом Дауна

Пораженная система и порок	Встречаемость, % от общего числа больных
Сердечно-сосудистая система	53,2
дефект межжелудочковой перегородки	31,4
дефект межпредсердной перегородки	24,3
аномалии крупных сосудов	23,1
Органы пищеварения	15,3
атрезия или стеноз двенадцатиперстной кишки	6,6
атрезия пищевода	0,9
атрезия прямой кишки и ануса	1,1
Мочевая система (гипоплазия почек, гидроуретер, гидронефроз)	5,9

глаза), маленькие деформированные уши, полуоткрытый рот со слегка выдвинутым языком и выступающей нижней челюстью (рис. 8.9), (Табл. 8.3).

За счет сильной мышечной гипотонии объем движений в суставах увеличен. Дети с синдромом Дауна в первый год жизни заметно отстают в психомоторном развитии. Они позже начинают ходить и сидеть. Нередко у них отмечают врожденные пороки сердца, характерные изменения дерматоглифики (на ладони имеется глубокая «обезьянья борозда»).

Умственное развитие больных с синдромом Дауна отстает; если не при-

меняются специальные методы обучения возможно, развитие тяжелой идиотии. Болезнь сопровождается расстройством эндокринных желез, нарушением обмена веществ, снижением иммунитета. По этой причине они часто болеют пневмонией, инфекционными заболеваниями. (Табл.8.4).

Продолжительность жизни больных ограничена. Однако с помощью специальных методов обучения, укрепления физического здоровья, правильного питания и ухода, применения лекарственных препаратов и др. ее можно значительно продлить. Многие люди с синдромом Дауна способны жить са-

мостоятельно, овладевать несложными профессиями, создавать семьи.

Синдром Патау (трисомия по 13-й хромосоме) описан в 1960 г. у детей с множественными врожденными пороками развития. Встречается у новорожденных с частотой 1:5000 — 1:7000. Болезнь обусловлена трисомией по 13-й хромосоме у 80-85% больных с синдромом Патау. Нерасхождение хромосом в мейозе происходит чаще всего у матери. Другие случаи (мозаицизм, изохромосома, транслокация и др.) встречаются очень редко (рис. 8.10). Мальчики и девочки с синдромом Патау рождаются с одинаковой частотой.

При рождении больные дети отличаются малым весом, хотя рождаются в срок. Для беременных женщин типично многоводие. При синдроме Патау



а



б

Рис. 8.10. Синдром Патау

а — аномалии лица, б — полисиндактилия обеих стоп



Рис. 8.11. Синдром Эдвардса
черепно-лицевые аномалии и характерное
расположение пальцев кисти того же больного (а, б)

характерны различные врожденные пороки развития лица и головного мозга. Определяют типичный внешний вид больного: окружность черепа уменьшена, низкий скошенный лоб, узкие глазные щели, западающая переносица, ушные раковины низко расположены и деформированы. Часто встречается расщелина верхней губы и неба. Из аномалий костно-мышечной системы характерны полидактилия (шестипалость), повышенная подвижность суставов. Среди патологии внутренних органов всегда отмечаются врожденные пороки сердца (дефекты межжелудочковой и межпредсердной перегородок), органов пищеварения, кисты почек и др.). Кроме того, в большинстве случаев поражены гениталии: у девочек — это удвоение матки и влагалища,

у мальчиков — крипторхизм (задержка яичка при спускании в мошонку). У 80-85% больных выявляется глухота.

В связи с тяжелыми пороками развития 95% больных детей умирают в возрасте до одного года. Практически все дети с синдромом Патау страдают глубокой идиотией.

Синдром Эдвардса (трисомия по 18-й хромосоме). Описан в 1960 г. Эдвардсом. Частота больных среди новорожденных равна 1: 5000 — 1: 7000. Соотношение мальчиков и девочек с синдромом Эдвардса составляет 1:3. Причины преобладания больных девочек пока не известны.

Наиболее характерными особенностями синдрома являются изменения мозгового черепа и лица, дефекты опорно-двигательного аппарата, сер-

дечно-сосудистой системы и половых органов.

Внешняя картина нарушений многообразна: маленький рот, узкие и короткие глазные щели, косоглазие, низкорасположенные и деформированные уши, вывернутая нижняя губа, короткая и складчатая шея, выступающий затылок, удлиненный череп.

Отмечаются также флексорное положение кистей, аномально развитые стопы, косолапость и др. Для синдрома характерны дефекты мочевой системы, пороки сердца (рис. 8.11).

90% детей с синдромом Эдвардса погибают до 1 года. Причиной смерти становятся пневмонии, кишечная непроходимость, сердечно-сосудистая недостаточность.

Синдромы, обусловленные внутрихромосомными перестройками

К этому типу перестроек хромосом (наряду с делениями, дупликациями и инверсиями) относятся частичные трисомии и моносомии аутосом. Обнаружение указанных хромосомных нарушений стало возможным после разработки методов дифференциальной окраски хромосом, позволяющих не только идентифицировать каждую хромосому набора, но и судить о происхождении аномальной хромосомы, ее дополнительного или утраченного участка. В настоящее время для большинства хромосом человека обнаружены частичные дупликации или делеции. Они могут затрагивать как короткое или длинное плечо хромосомы, так и одновременно оба плеча. Для многих хромосом выявлена относительная клиническая специфичность фенотипических отклонений при аутосомных частичных трисомиях или моносомиях, однако клинико-

цитогенетические синдромы пока выделить не удалось.

Приведем два примера синдромов, обусловленных внутрихромосомной патологией.

Синдром “кошачьего крика” связан с делецией короткого плеча 5-й хромосомы. Впервые описан Дж.Леженом в 1963 г. Признаком его служит необычный плач детей, напоминающий мяуканье или крик кошки. Это связано с патологией гортани или голосовых связок. Однако с возрастом этот крик исчезает.

Клиническая картина синдрома значительно варьирует. Наиболее типичным, помимо “кошачьего крика”, является умственное и физическое недоразвитие, микроцефалия (аномально уменьшенная голова).

Своеобразен внешний вид больных: лунообразное лицо, микрогения (маленькие размеры верхней челюсти), эпикант (вертикальная складка кожи у внутреннего угла глазной щели), высокое небо, плоская спинка носа, косоглазие. Ушные раковины расположены низко и деформированы. Отмечаются также врожденные пороки сердца, патология костно-мышечной системы, синдактилия стоп (полное или частичное сращение соседних пальцев), плоскостопие, косолапость и др.), мышечная гипотония (рис. 8.12).

Большинство детей умирает в раннем возрасте. Вместе с тем известны описания больных старше 50 лет. Популяционная частота синдрома “кошачьего крика” 1:40000 — 1:50000 новорожденных. Размер делеции в разных случаях различен.

Синдром Вольфа-Хиршхорна впервые описан в 1965 г. У 80 % страдающих им новорожденных цитологическую основу данного синдрома составляет делеция короткого плеча 4-й хромосомы. Размеры делеции колеблются



Рис. 8.12. Синдром "кошачьего крика"
а – внешний вид больного; б – кариотип больного

от небольших терминальных до занимающих около половины дистальной части короткого плеча. Отмечается, что большинство делеций возникает заново, около 13 % происходит в результате транслокаций у родителей. Реже в геноме больных, помимо транслокации, имеются и кольцевые хромосомы. Наряду с делениями хромосом, патология у новорожденных может быть обусловлена инверсиями, дупликациями, изохромосомами.

Болезнь характеризуется многочисленными врожденными пороками развития, задержкой умственного и психомоторного развития.

У новорожденных небольшой вес при нормальной продолжительности беременности. Среди внешних признаков отмечают: микроцефалия, клювовидный нос, эпикант, антимонголоидный разрез глаз (опущение наруж-

ных углов глазных щелей), аномальные ушные раковины, расщелина верхней губы и неба, маленький рот, деформация стоп и др.

Дети с синдромом Вольфа-Хиршхорна маложизнеспособны, как правило умирают в возрасте до одного года. Частота этого синдрома низкая — 1 : 100000 рождений.

Синдромы с числовыми аномалиями половых хромосом

Синдром Шерешевского-Тернера впервые описан Н.А. Шерешевским в 1925 г., а позднее, в 1938 г. Х.Х. Тернером.

Причиной болезни является нарушение расхождения половых хромосом. Болеют только женщины, у них отсутствует одна X-хромосома (45 XO).

Частота встречаемости синдрома 1 : 3000 новорожденных девочек. Отмеча-

ется, что только у 20% женщин беременность большим плодом сохраняется до конца и рождается живой ребенок. В остальных случаях происходит самопроизвольный аборт или мертворождение.

Для синдрома характерны: низкорослость, половой инфантилизм, соматические нарушения. У детей уже на первом году жизни отмечается отставание в росте, что становится наиболее четко заметно к 9-10 годам. Средний рост больных взрослых женщин составляет в среднем 135 см. У них имеются аномалии в развитии скелета: короткая шея с боковыми кожными складками, короткая и широкая грудная клетка, чрезмерная подвижность локтевых и коленных суставов, укорочение 4-5-го пальцев на руках. Характерен внешний вид больных: микрогнатия (недоразвитие нижней челюсти), эпикант, низкопосаженные деформированные уши, высокое твердое небо и др. (рис. 8.13). Нередко отмечается косоглазие, катаракта, дефекты слуха, аномалии мочевой системы (удвоение почек, мочевыводящих путей).

Важной особенностью этого заболевания является половой инфантилизм. Внутренние и наружные гениталии недоразвиты, в период полового созревания вторичные половые признаки отсутствуют или развиты слабо, недоразвиты влагалище и матка, менструаций нет, больные бесплодны. Однако в литературе существуют данные о рождении детей у женщин с синдромом Шерешевского-Тернера.

В 50 % случаев больные страдают умственной отсталостью, они пассивны, склонны к психогенным реакциям и психозам.

Продолжительность жизни близка к норме. Лечение направлено на стимуля-



Рис. 8.13. Внешний вид больной с синдромом Шерешевского - Тернера

цию роста и уменьшение полового инфантилизма (длительные курсы половых гормонов и др.).

Синдром полисомии по X-хромосоме у женщин. Синдром включает трисомию (кариотип 47, XXX), тетрасомию (48, XXXX), пентасомию (49, XXXXX). Наиболее часто встречается трисомия — 1 на 1000 родившихся девочек. Клиническая картина довольно разнообразная. Отмечается незначительное снижение интеллекта, повышенная вероятность развития психозов и шизофрении с неблагоприятным типом течения. Плодовитость таких женщин страдает в меньшей степени.

При тетра- и пентасомии — X повышается степень умственной отсталости, отмечаются соматические аномалии, недоразвитие гениталий. Диагностика синдрома полисомии X включает определение полового хроматина и исследование кариотипа больного. Рационального лечения нет (Табл. 8.5).

Синдром Клайнфельтера описан в 1942 г. Н. Клайнфельтером. Болеют только мальчики. Частота встречаемости — 2 из 1000 новорожденных мальчиков. Установлено, что больные имеют лишнюю X-хромосому (кариотип 47, XXУ, вместо 46, ХУ). Наряду с этим, встречаются варианты полисомии с большим числом X- и Y-хромосом, которые также относят к синдрому Клайнфельтера (Табл. 8.5).

До рождения заболевание клинически не диагностируется. Генетические аномалии проявляются в период полового созревания в виде недоразвития семенников и вторичных половых признаков.

Для мужчин с синдромом Клайнфельтера характерны высокий рост, свнухоидный тип сложения (широкий таз, узкие плечи), гинскомастия (развитие грудных желез больше, чем в норме), слабый рост волос на лице, в подмышечных впадинах и на лобке. Яички уменьшены в размерах, отмечается половой инфантилизм, склонность к ожирению. При этом у больных нарушен сперматогенез и они бесплодны. Их умственное развитие отстает, однако иногда интеллект нормальный.

Увеличение числа X-хромосом в генотипе сопровождается усилением умственной отсталости, нарушением психики, антисоциальными поступками и алкоголизмом (рис. 8.14).

Синдром дисомии по Y-хромосоме (47, ХУУ) описан в 1961 г. Встречается с

частотой 1 на 1000 новорожденных мальчиков.

Мужчины с набором хромосом 47 ХУУ не отличаются от нормы по физическому и умственному развитию. Отмечается небольшое увеличение роста — около 185 см. Иногда наблюдается незначительное снижение интеллекта, склонность к агрессивным и антисоциальным поступкам. По некоторым данным, в местах заключения мужчин с генотипом ХУУ в 10 раз больше, чем мужчин с нормальным генотипом.

Болезни, причиной которых является полиплодия

Полиплодия — связана с кратным увеличением гаплоидного набора хромосом. Причиной образования полиплоидов является нарушение процесса мейоза вследствие мутации. В результате дочерняя половая клетка получает вместо гаплоидного (23) диплоидный (46) набор хромосом, т.е. 69 хромосом (у мужчин кариотип 69, ХУУ, у женщин — 69, ХХХ).

Рождение детей с полиплоидией наблюдается очень редко. Около 22,6% всех спонтанных аборт обусловлены полиплоидией. Следует отметить, что триплодия встречается в три раза чаще по сравнению с тетраплоидией.

При триплоидии беременность протекает с осложнениями (сильный токсикоз, повышение уровня хорионального гонадотропина и др.) Основными пороками развития являются: расщелина губы и неба, низко расположенные ушные раковины, сраще-

Таблица 8.5. Типы полисомии по половым хромосомам у человека

Х-полисомии при отсутствии У-хромосомы	Х-полисомии с одной У хромосомой	У-полисомии с одной Х-хромосомой	Полисомии по обоим хромосомам
47, ХХХ	47, ХХУ	47, ХУУ	48, ХХУУ
48, ХХХХ	48, ХХХУ	48, ХУУУ	49, ХХХУУ
49, ХХХХХ	49, ХХХХУ	49, ХУУУУ	

ние соседних пальцев кисти или стопы, аномалии в развитии всех внутренних органов и др. Дети с синдромом трипloidии практически нежизнеспособны и погибают в первые дни после рождения. Биопсия разных участков кожи у таких детей показала, что часть тканей у них трипloidная, часть — диплоидная.

Факторы, повышающие риск рождения детей с хромосомными болезнями

Причины возникновения хромосомных болезней до настоящего времени недостаточно изучены. 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 во время беременности, гормональные нарушения, алкоголизм и др. 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. Как видно из таблицы 8.1, 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 анеупloidии по аутосомам у ребенка и возрасту матери старше 35 лет.

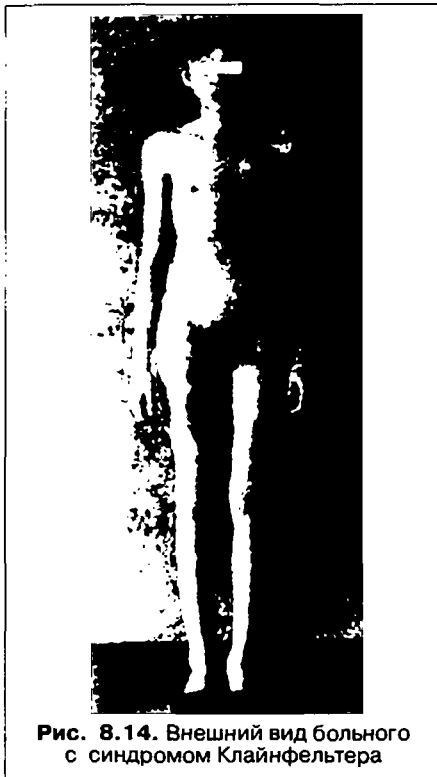


Рис. 8.14. Внешний вид больного с синдромом Клайнфельтера

К кариотипическим факторам риска у супружеских пар относятся: анеупloidия (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.

Болезни с наследственной предрасположенностью (мультифакториальные)

Болезни с наследственной предрасположенностью, в отличие от генных болезней, обусловлены как наследст-

Таблица 8.6. Наиболее частые болезни с наследственной предрасположенностью

Группы и козологические формы	Распространенность на 1000 человек (в соответствующей возрастной группе)
Врожденные пороки развития:	
расщелина губы и неба	1 - 2
спинномозговая грыжа	1
стеноз привратника	0,5 - 3
аизцефалия и черепно-мозговая грыжа	1
вывих бедра	2 - 5
косолапость	5
Психические и нервные болезни:	
шизофрения	10 - 20
эпилепсия	8 - 10
маниакально-депрессивный психоз	2 - 5
рассеянный склероз	0,02 - 0,7
Соматические болезни среднего возраста	
псориаз	10 - 20
бронхиальная астма	2 - 5
язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки	20 - 50
коронарная болезнь сердца	50 - 100
гипертоническая болезнь	100 - 200
диабет	10 - 20

венными, так и, в значительной степени, факторами внешней среды. Эта группа болезней в настоящее время составляет 92% от общего числа наследственных патологий человека. С возрастом частота заболеваний возрастает. В детском возрасте процент больных составляет не менее 10 %, а в пожилом — 25-30 %.

К наиболее часто встречающимся мультифакториальным болезням относятся: ревматизм, ишемическая болезнь сердца, гипертоническая и

язвенная болезни, цирроз печени, сахарный диабет, бронхиальная астма, псориаз, шизофрения и др. (Табл. 8.6).

Болезни с наследственным предрасположением связаны с действием многих генов, поэтому их называют также мультифакториальными.

Являясь многофакторными системами, они сложны для генетического анализа. Лишь в последнее время успехи в изучении генома человека и картировании его генов открывают возможности

Таблица 8.7. Наследственная предрасположенность к некоторым мультифакториальным болезням

Показатель	Ишемическая болезнь сердца БС	Ревматизм Р	Сахарный диабет СД	Язвенная болезнь ЯБ	Шизофрения Ш
Частота в общей популяции, %	19	2	0,6	0,6	1
Частота повторных случаев среди родственников 1-й степени родства, %	30-60	10	10	8	14
Конкордантность близнецов					
мопозиготных	67	37	42	50	67
диэнзиготных	43	7	12	14	18

Таблица 8.8. Эмпирический риск при некоторых мультифакториальных болезнях

N п/п	Заболевания, пороки	Риск для sibсов (и в отдельных случаях для потомства)
1.	Анэнцефалия	2 – 5%
2.	Врожденные пороки сердца	2 – 4 % (в зависимости от формы)
3.	Косолапость	2%
4.	Опухоль Вильмса	5%
5.	Рак молочной железы	6 – 7 %
6.	Эпилепсия	3 – 12%
7.	Шизофрения: если болен один из родителей; если больны оба родителя; для sibсов в спорадических случаях	10% 40% 12,5 – 20%
8.	Псoriasis	10 – 15 % (для детей и sibсов)
9.	Ревматоидный артрит	5%
10.	Псориаз	16% (для sibсов) 20 % (для детей пробанда)
11.	Язвенная болезнь желудка	7,5 %
12.	Атопический дерматит	16%
13.	Бронхиальная астма	8 – 9%

выявления генетической предрасположенности и основных причин развития мультифакториальных заболеваний, (Табл. 8.7).

Наследственная предрасположенность может иметь моно- или полигенную природу. В первом случае она обусловлена мутацией одного гена, для проявления которой необходим определенный внешний фактор, а во втором случае – сочетанием аллелей нескольких генов и комплексом факторов внешней среды.

Клиническая картина и тяжесть течения мультифакториальных болезней человека в зависимости от пола и возраста очень различны. Вместе с тем, при всем их разнообразии, выделяют следующие общие особенности:

1. Высокая частота заболеваний в популяции. Так, шизофренией болеют около 1% населения, сахарным диабетом – 5%, аллергическими заболеваниями – более 10%, гипертонией – около 30%.

2. Клинический полиморфизм заболеваний варьирует от скрытых субклинических форм до ярко выраженных проявлений.

3. Особенности наследования заболеваний не соответствуют менделевским закономерностям.

4. Степень проявления болезни зависит от пола и возраста больного интенсивности работы его эндокринной системы, неблагоприятных факторов внешней и внутренней среды, например, нерационального питания и др.

Генетический прогноз при мультифакториальных заболеваниях зависит от следующих факторов:

1) чем ниже частота болезни в популяции, тем выше риск для родственников пробанда;

2) чем сильнее степень выраженности болезни у пробанда, тем больше риск развития болезни у его родственников;

3) риск для родственников пробанда зависит от степени родства с пораженным членом семьи;

4) риск для родственников будет выше, если пробанд относится к менее поражаемому полу;

Для оценки риска при мультифакториальной патологии собирают эмпирические данные о популяционной и семейственной частоте каждого заболевания или порока развития (Табл. 8.8).

Полигенная природа болезней с наследственной предрасположенностью подтверждается с помощью генеалогического, близнецового и популяционно-статистического методов. Достаточно объективен и чувствителен близнецовый метод. При его использовании проводят сравнение конкордантности моно- и дизиготных близнецов или сравнение конкордантности выросших вместе или порознь монозиготных близнецов. Было показано, что конкордантность монозиготных близнецов выше, чем дизиготных по ряду болезней сердечно-сосудистой системы (гипертонии, инфаркту миокарда, инсульту, ревматизму). Это указывает на генетическую предрасположенность к указанным заболеваниям. Изучение природы злокачественных новообразований у монозиготных близнецов показало невысокую конкордантность (11 %), но вместе с тем, она в 3-4 раза превышает таковую для дизиготных близнецов. Очевидно, что значение внешних факторов (особенно канцерогенных) для возникновения рака намного больше наследственных.

С помощью близнецового метода показана наследственная предрасположенность к некоторым инфекционным заболеваниям (туберкулез, полиомиелит) и многим распространенным болезням (ишемическая болезнь сердца, ревматизм, сахарный диабет, язвенная

болезнь, шизофрения и др.) (Табл. 8.7).

В заключение следует отметить, что распространение мультифакториальных болезней в разных популяциях человека может значительно варьировать, что связано с различием генетических и средовых факторов. В результате генетических процессов, происходящих в человеческих популяциях (отбор, мутации, миграции, дрейф генов), частота генов, определяющих наследственную предрасположенность, может возрастать или уменьшаться вплоть до полной их элиминации.

Успехи программы "Геном человека", выделение и расшифровка молекулярной организации генов, изучение причин их патологии несомненно будут способствовать разработке профилактических мероприятий и выявлению групп людей, склонных к мультифакториальным заболеваниям.

Вопросы для самоконтроля

1. Каковы подходы к классификации генных болезней?
2. Почему генные болезни называют болезнями обмена веществ или энзимопатиями?
3. В чем сущность фенилкетонурии? Возможно ли в настоящее время вылечить больных с фенилкетонурией?
4. Опишите наследственные болезни соединительной ткани?
5. В чем сущность классификации хромосомных болезней?
6. Опишите синдромы Дауна, Патау, Эдвардса.
7. В чем сущность синдромов, связанных с изменением числа половых хромосом? Дайте им характеристику.
8. Какие генетические закономерности можно выявить у мультифакториальных болезней?
9. В чем сущность синдрома Лежена ("кошачье го крика")?
10. Выберите один правильный ответ. Укажите правильную формулу кариотипа при синдроме Патау: а) 47 XX; 18+; б) 46 XY, 13+; в) 46 XX 5p-; г) 47 XXУ; д) 47 45, XO.

Глава 9. МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КОНСУЛЬТИРОВАНИЕ

В настоящее время число детей с тяжелыми наследственными заболеваниями в странах бывшего СНГ превышает один миллион. На их лечение расходуются огромные материальные средства. В связи с этим диагностика, профилактика и лечение наследственных и врожденных заболеваний у детей приобретает большое значение.

Наиболее эффективным методом профилактики наследственной патологии является медико-генетическое консультирование, главная цель которого состоит в определении прогноза рождения больных детей в семье, а также — консультирование по вопросам дальнейшей планирования семьи.

Первая медико-генетическая консультация была организована в конце 20-х гг. в Москве крупнейшим отечественным неврологом и генетиком С.Н. Давиденковым при институте нервно-психиатрической профилактики.

Первый кабинет по медико-генетическому консультированию был организован в 1941 г. Дж. Нилом в Мичиганском университете (США). В России в 1932 г. под руководством С.Г.Левита был создан медико-генетический институт.

Интенсивное развитие медико-генетической помощи в нашей и других странах началось в 60-70 гг. XX в., что было связано как с ростом удельного веса наследственных заболеваний, так и с достижениями в изучении хромосомной патологии и болезней обмена веществ. По данным 1995 г., на территории Российской Федерации существовало 70 медико-генетических учреждений, услугами которых пользовались около 80 тыс. семей.

Цели, задачи и методы медико-генетического консультирования (МГК)

Основная цель медико-генетического консультирования — предупреждение рождения больного ребенка. Главными задачами МГК являются:

1. Установление точного диагноза наследственной патологии.

2. Пренатальная (дородовая) диагностика врожденных и наследственных заболеваний различными методами (ультразвуковыми, цитогенетическими, биохимическими, молекулярно-генетическими).

3. Определение типа наследования заболевания.

4. Оценка величины риска рождения больного ребенка и оказание помощи в принятии решения.

5. Пропаганда медико-генетических знаний среди врачей и населения.

Поводом для медико-генетического консультирования могут быть:

1. Рождение ребенка с врожденными пороками развития, умственной и физической отсталостью, слепотой и глухотой, судорогами и др.

2. Спонтанные аборт, выкидыши, мертворождения.

3. Близкородственные браки.

4. Неблагополучное течение беременности.

5. Работа супругов на вредном предприятии.

6. Несовместимость супружеских пар по резус-фактору крови.

7. Возраст женщины старше 35 лет, а мужчины — 40 лет.

Медико-генетическая консультация включает 4 этапа: диагноз, прогноз, заключение и совет.

Работа начинается с уточнения диагноза заболевания. Точный диагноз — необходимое условие для любой консультации. В некоторых случаях диагноз наследственной патологии может быть установлен врачом еще перед направлением в консультацию. Это относится к хорошо изученным и довольно часто встречаемым наследственным болезням, например, болезни Дауна, сахарному диабету, гемофилии, мышечной дистрофии и др. Чаще же диагноз неясен.

В медико-генетических консультациях диагноз уточняется благодаря использованию современных генетических, биохимических, иммуногенетических и других методов.

Одним из основных методов является генеалогический метод, т.е. составление родословной для супружеской пары, обратившейся в консультацию. В первую очередь это относится к тому из супругов, в родословной которого имелась наследственная патология. Тщательный сбор родословной дает определенную информацию для постановки диагноза болезни.

В более сложных случаях, например, при рождении ребенка с множественными пороками развития, правильный диагноз может быть поставлен лишь при использовании специальных методов исследования. В процессе диагностики нередко возникает необходимость обследования не только пациента, но и других членов семьи.

После установления диагноза определяется прогноз для потомства, т.е. величина повторного риска рождения больного ребенка. Основой для решения этой задачи являются теоретические расчеты с использованием методов генетического анализа и вариационной статистики или таблиц эмпи-

рического риска. Это входит в функции врача-генетика.

Передача наследственных заболеваний возможна несколькими путями в зависимости от особенностей передачи наследственной патологии. Например, если у ребенка имеется заболевание, как у одного из родителей, это указывает на доминантный тип наследования. В таком случае при полной пенетрантности гена больные члены семьи передадут заболевание половине своих детей.

Наследственная патология у ребенка здоровых родителей указывает на рецессивный тип наследования. Риск рождения больного ребенка у родителей с рецессивным заболеванием составляет 25%. По данным 1976 г. у человека было известно 789 рецессивно наследуемых заболеваний и 944, наследуемых по доминантному типу.

Наследственная патология может быть сцеплена с полом (X-сцепленный тип наследования). В этих условиях риск заболевания у мальчиков и носительства у девочек составляет 50%. Таких заболеваний в настоящее время известно около 150.

В случае мультифакториальных болезней генетическое консультирование является достаточно точным. Эти болезни обусловлены взаимодействием многих генов с факторами внешней среды. Число патологических генов и их относительный вклад в заболевание в большинстве случаев неизвестны. Для расчета генетического риска используются специально разработанные таблицы эмпирического риска при мультифакториальных заболеваниях (см. гл. 8 и табл. 8.8).

Генетический риск до 5% считается низким и не является противопоказанием к повторному рождению ребенка в семье. Риск от 6 до 20% принято считать

средним, и в этом случае для дальнейшего планирования семьи рекомендуется всестороннее обследование. Генетический риск свыше 20% принято относить к высокому риску. Дальнейшее деторождение в данной семье не рекомендуется.

При хромосомных болезнях вероятность повторного рождения больного ребенка крайне низка и не превышает 1% (при отсутствии других факторов риска).

Для транслокационной формы болезни Дауна при вычислении риска важно определить, кто из родителей несет сбалансированную транслокацию. Например при транслокации (14/21) величина риска равна 10%, если носителем является мать, и 2,5% — если носитель отец. При транслокации 21-й хромосомы на ее гомолог, риск рождения больного ребенка составляет 100%, независимо от того, кто из родителей является носителем транслокации.

Для определения риска повторного рождения ребенка с патологией важно установить гетерозиготных носителей мутантного гена. Особое значение это имеет при аутосомно-рецессивном типе наследования, при наследовании, сцепленном с полом, и близкородственных браках.

В ряде случаев гетерозиготное носительство устанавливается при анализе родословной, а также путем клинических и биохимических анализов. Так, если у отца имеется рецессивное заболевание, сцепленное с X-хромосомой (например, гемофилия), то с вероятностью 100% его дочь будет гетерозиготна по данному гену. Наряду с этим, снижение антигемофильного глобулина в сыворотке крови у дочерей отца-гемофилика может служить вполне убедительным доказательством гетерозиготного носительства гена гемофилии.

В настоящее время некоторые наследственные заболевания устанавливаются с помощью ДНК-диагностики.

Гетерозиготным носителям дефектных генов следует избегать близкородственных браков, заметно увеличивающих риск рождения детей с наследственной патологией.

Заключение медико-генетического консультирования и советы родителям (два последних этапа) могут быть объединены. В результате проведенных генетических исследований врач-генетик дает заключение об имеющейся болезни, знакомит с вероятностью возникновения болезни в будущем, дает соответствующие рекомендации. При этом учитывается не только величина риска появления больного ребенка, но и тяжесть наследственного или врожденного заболевания, возможности пренатальной диагностики и эффективности лечения. Вместе с тем, все решения по дальнейшему планированию семьи принимаются только супругами.

Современные методы пренатальной диагностики наследственных заболеваний

Эффективность медико-генетического консультирования значительно возрастает благодаря использованию современных методов пренатальной (дородовой) диагностики. Она позволяет задолго до рождения ребенка определить заболевание и, если необходимо, прервать беременность. Такая ситуация возникает в случае наследственных заболеваний, лечение которых в настоящее время не дает нужных результатов.

Основными показателями к проведению дородовой диагностики являются:

- 1). Наличие в семье точно установленного наследственного заболевания.
- 2). Наличие в семье заболевания, сцепленного с полом.

3). Возраст будущей матери от 35 лет, а отца — от 40 лет.

4). Гетерозиготность обоих родителей по одной паре аллелей при аутосомно-рецессивном заболевании

5). Наличие структурных перестроек хромосом (особенно транслокаций и инверсий) у одного из родителей.

6). Наличие в анамнезе беременной, длительной работы на вредных для здоровья производствах, проживание в зонах с повышенным радиационным фоном и др.

К основным методам пренатальной диагностики относятся:

1. Определение альфа-фетопротеина.

2. Ультразвуковое исследование плода (УЗИ).

3. Биопсия хориона и плаценты.

4. Амниоцентез (прокол плодного пузыря для получения околоплодной жидкости).

5. Кордоцентез (взятие крови из пуповины).

6. Фетоскопия (введение зонда и осмотр плода).

Определение альфа-фетопротеина (АФП) в крови и амниотической жидкости беременной получило большое распространение. АФП — это белок, вырабатываемый клетками печени плода. Оптимальным сроком для его определения в сыворотке крови матери является 15-16-я неделя беременности. Установлено, что концентрация АФП в крови беременной может существенно повышаться при некоторых аномалиях плода, например, спинномозговой грыже, врожденном нефрозе, дефектах нервной трубки и брюшной стенки. В случае уточнения диагноза аномалии нервной трубки проводится детальное ультразвуковое обследование плода и содержание белка в амниотической жидкости. Следует отметить, что концентрация

АФП в крови беременных может быть повышена и при других заболеваниях матери: опухоль печени, хронический гепатит, цирроз и др.

В крови женщин, вынашивающих плод с хромосомными аномалиями (синдром Дауна, Эдвардса и др.) уровень АФП снижен. Если концентрация АФП мала, назначается цитогенетический анализ клеток плода.

Ультразвуковое исследование (УЗИ)

Метод используется главным образом для выявления врожденных пороков развития и основан на способности ультразвуковой волны отражаться от поверхности двух сред с различной плотностью. Это позволяет получить изображение на экране монитора.

Оптимальные сроки проведения УЗИ — 17-23 недели беременности. Однако при определенных показаниях (редукция конечностей, задержка роста эмбриона или плода) УЗИ проводят в более ранние сроки.

С помощью ультразвукового исследования можно исследовать строение плода (его головки, туловища, конечностей, половых органов), выявить пороки развития головного мозга, пороки развития костей скелета и внутренних органов, задержку роста эмбриона или плода и др. Накопленные данные показывают, что УЗИ не приносит вреда развивающемуся плоду. В некоторых странах эту процедуру проводят всем беременным, что позволяет предупредить рождение детей с пороками развития. Перечень врожденных дефектов развития, диагностируемых с помощью УЗИ, достаточно широк (таб. 9.1).

Биопсия хориона и плаценты

К числу перспективных методов пренатальной диагностики относится

Таблица 9.1. Врожденные пороки развития, диагностируемые с помощью УЗИ

Система или орган	Пороки
ЦНС	Грубые пороки мозга, черепно- и спинномозговые грыжи, недоразвитие передних отделов мозга и др.
Конечности	Редукционные пороки, тяжелые формы карликовости с укорочением конечностей, ломкость костей и др.
Сердце	Тяжелый порок сердца
Почки	Дефекты развития почек, поликистоз почек
Желудочно-кишечный тракт	Аномалии развития двенадцатиперстной кишки, дефекты передней брюшной стенки

биопсия плода и плаценты. Она проводится на более ранних, чем УЗИ, сроках беременности (7-9 недель). Ворсинки хориона берут особым шприцом с помощью гибкого катетера через шейку матки (рис. 9.1, 9.2). Затем их подвергают лабораторной диагностике с помощью цитологических, биохимических, молекулярно-генетических методов. В случае выявления наследственных заболеваний у плода беременность прерывают. Одним из осложнений хорионбиопсии является относительно высокая частота спонтанных аборт (выкидышей). Общие потери плода после хорионбиопсии в среднем

составляют 2,5-3%, а в некоторых случаях и выше, что ограничивает применение этого метода. Каких-либо нарушений плаценты, роста плода, появлений пороков развития и увеличения перинатальной смертности после хорионбиопсии не отмечается. Однако, существуют данные, что ранняя хорионбиопсия может вызывать поперечные врожденные ампутации конечностей (редукционные пороки). По этой причине в последнее время хорионбиопсию не рекомендуется проводить ранее 8-й недели, а плацентобиопсию — 12-й недели беременности.

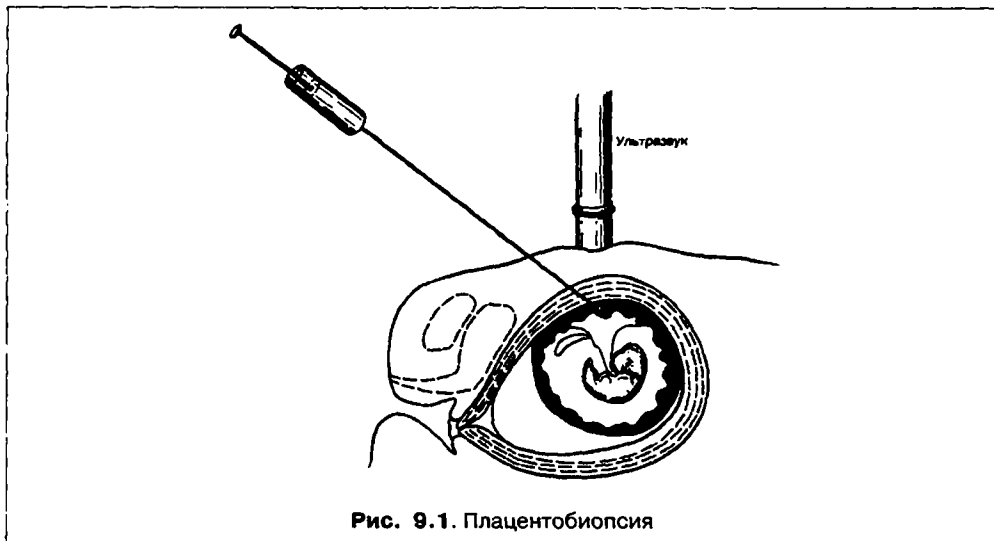


Рис. 9.1. Плацентобиопсия

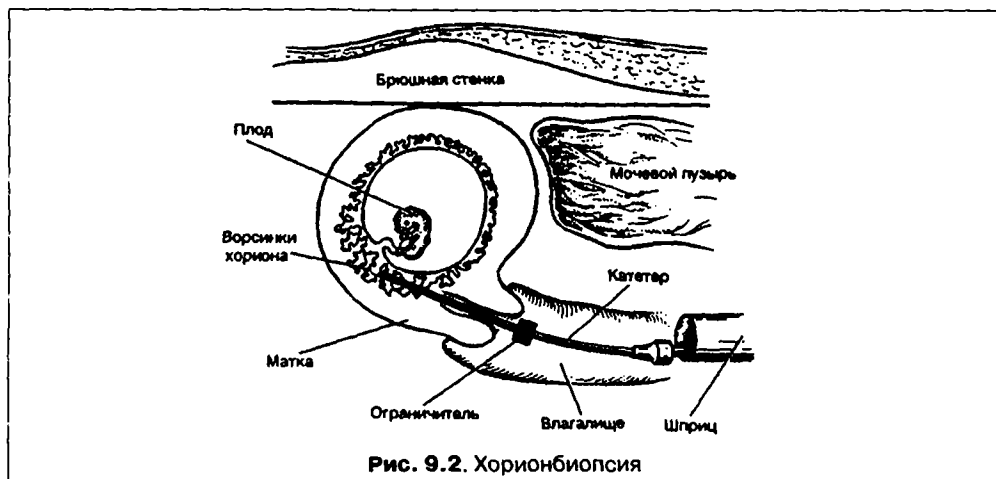


Рис. 9.2. Хорионбиопсия

Амниоцентез

Это — прокол плодного пузыря для взятия 8-10 мл околоплодной жидкости с находящимися в ней слущенными клетками амниона и плода. Последние являются основным субстратом для цитологических и биохимических исследований. Этот метод является наиболее распространенным и доступным. Проводится на 15-18-й неделе беременности. Риск осложнения ее течения незначителен (0,2%).

Амниоцентез делают чрезбрюшинно под контролем УЗИ, чтобы не повредить плаценту (рис. 9.3). Чрезвагинальный амниоцентез применяется редко.

С помощью этого метода диагностируют многие хромосомные нарушения, болезни, сцепленные с полом, болезни обмена веществ (болезнь Тея-Сакса, мукополисахаридозы, гликогенозы, фенилкетонурия и др.).

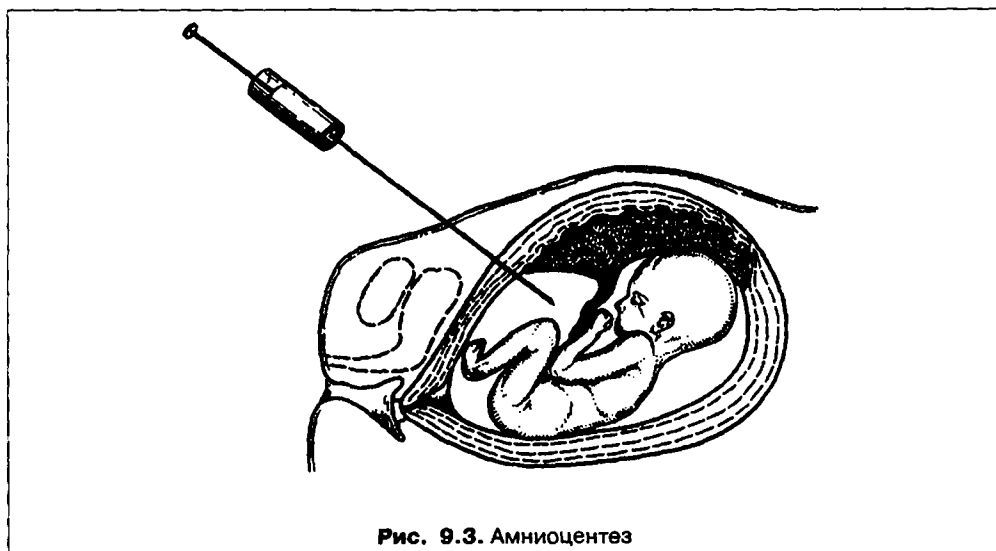


Рис. 9.3. Амниоцентез

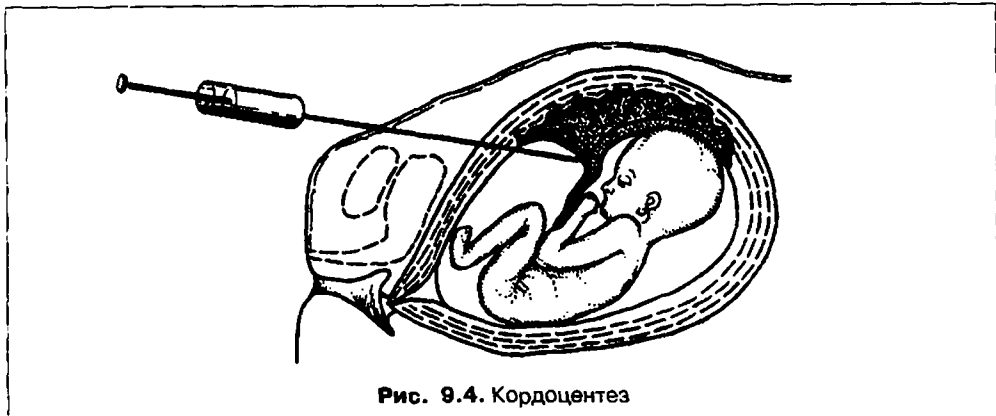


Рис. 9.4. Кордоцентез

Кордоцентез

В этом случае берутся образцы крови (лейкоциты) из пуповинных сосудов плода, для цитогенетического, молекулярно-генетического и биохимического анализов крови. Кровь более удобна для исследования, чем клетки амниотической жидкости, т.к. лимфоциты быстрее и надежнее культивируются.

Кордоцентез проводится под контролем УЗИ на 18-22-й неделе беременности (рис. 9.4). Его используют для диагностики хромосомных болезней, таких, как: гемоглобинопатии, энзимопатии, различные иммунодефицитные аномалии, синдром фрагильной (ломкой) X-хромосомы и др.

Фетоскопия

Данный метод основан на прямом рассмотрении плода через специальный прибор — фетоскоп (тонкий эластичный зонд со специальной оптической системой). Зонд вводится в плоскость амниона через брюшную систему. Проводится на 18-23-й неделе беременности. Фетоскопия используется редко и только при особых показаниях, поскольку вхождение зонда в амниотическую жидкость может вызвать осложнение беремен-

ности. Выкидыши отмечаются в 7-8% случаев фетоскопии. Проще и безопаснее использовать УЗИ, способное выявить большинство пороков развития.

Методы пренатальной диагностики постоянно совершенствуются и все шире применяются в профилактике наследственных заболеваний. Дальнейшее совершенствование и расширение применения этих методов — одна из задач современной медицинской генетики.

Вопросы для самоконтроля

1. Основная цель и задачи медико-генетического консультирования (МГК).
2. Перечислите показания для направления на медико-генетическое консультирование; основные этапы МГК.
3. Что такое прогноз потомства?
4. Что имеется в виду под термином "пренатальная диагностика"? Назовите основные показатели для проведения пренатальной диагностики.
5. Перечислите важнейшие методы дородовой диагностики.
6. Выберите два правильных ответа.
Состояния, диагностируемые у плода с помощью УЗИ: 1) синдром Марфана; 2) редуцирующие пороки конечностей; 3) фенилкетонурия; 4) нарушения в развитии мозга.
7. Какой из указанных методов дает наибольший процент осложнений: а) фетоскопия; б) хорионбиопсия; в) кордоцентез; г) УЗИ.

Глава 10. ПРОБЛЕМЫ КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Одно из тяжелейших заболеваний человека и животных — рак — занимает второе место после сердечнососудистых заболеваний среди причин смертности населения Земли. В развитых странах от него умирает каждый пятый. Известно более ста видов раковых заболеваний, для каждого из которых характерны свои особенности. Наиболее распространенными являются пять видов рака — легких, молочной железы, толстой кишки, простаты и матки. Им соответствует более 50% случаев всех первичных онкологических диагнозов.

Ныне под термином рак объединяют группу родственных заболеваний, в основе которых лежат нарушения фундаментальных законов поведения клеток в многоклеточном организме. В процессе роста раковой опухоли отдельные клетки, бесконтрольно делясь, стремятся к собственному процветанию в ущерб соседям, но в конце концов разрушают все клеточное сообщество и погибают вместе с ним. От 80 до 90% опухолей человека развивается в тех органах и тканях, где состав клеток постоянно обновляется, и клетки, соответственно, находятся в митотическом цикле.

Несмотря на большое разнообразие раковых заболеваний, клетки, всех раковых опухолей имеют общие свойства и значительно отличаются от здоровых.

Одно из главных их отличий — способность к бесконечному делению. Известно, что в каждом организме клетки могут делиться лишь определенное число раз.

Например, для одного из видов нематод установлено, что оплодотворенное яйцо может совершить столько делений, что у взрослой особи в соматических клетках в сумме насчитывается только 959 ядер. Общее количество ядер в клет-

ках человека подсчитать невозможно, но существуют другие методы, позволяющие учитывать способность клеток к делению, в частности, метод клеточных культур.

В искусственных условиях культивирования клетки человека прикрепляются к поверхности сосуда с питательной средой и начинают активно делиться. Нормальные клетки, полученные из разных типов тканей, делятся до тех пор, пока не покроют поверхность сосуда полностью и не начнут контактировать между собой. То есть нормальные клетки образуют однослойные культуры. Опухолевые же клетки преодолевают барьер контактного торможения и могут образовывать многослойные культуры.

Чтобы пересеять клеточные культуры из одного флакона в несколько сосудов, их снимают со стекла и переносят в питательную среду в несколько чистых флаконов, где клетки вновь прикрепляются к стеклу и начинают делиться, покрывая всю поверхность. Нормальные клетки могут выдержать несколько таких пассажей, а опухолевые, в силу способности к бесконечному делению, сохраняют устойчивость к пересеву очень длительное время. Существуют переливаемые клеточные опухолевые линии человека, полученные в середине 50-х гг. XX в., и успешно культивируемые до сих пор.

Несмотря на приобретенную способность к бесконечному делению, опухолевые клетки частично сохраняют свою специализацию, т.е. остаются частично дифференцированными. Например, клетки меланомы синтезируют гранулы пигмента, клетки карциномы частично сохраняют синтез промежуточных филаментов цитоскелета дифференцированных клеток-предшественников.

Часто морфологические изменения опухолевых клеток выражены не четко. Одно из наиболее характерных для всех опухолевых клеток морфологическое отклонение — изменение формы ядра и числа ядер. Нередко также в делящихся опухолевых клетках изменены число и структура хромосом. Так, для хронического миелоидного лейкоза характерна определенная транслокация в клетках миелоидного ряда: перенос фрагмента длинного плеча 22-й хромосомы на длинное плечо 9-й хромосомы. Нередко в опухолевых клетках присутствуют небольшие добавочные хромосомы, образующиеся за счет амплификации какого-либо участка одной из хромосом. Еще одно распространенное нарушение — измененная ploидность ядер.

В последние годы большое внимание уделяется изучению цитоскелета опухолевых клеток. Показано, что в опухолевых клетках спектр синтеза цитоскелетных белков изменяется, с чем связывают большую подвижность опухолевых клеток и нарушение их контактов с соседними клетками и субстратом.

Все раковые опухоли подразделяют на две большие категории: доброкачественные и злокачественные. Рассмотренные выше свойства опухолевых клеток характерны для обеих категорий. Однако клетки злокачественных опухолей обладают дополнительными свойствами. Они способны освободиться от межклеточных контактов с другими клетками, перемещаться и проходить путь до кровеносного или лимфатического сосуда, проникать через базальную мембрану кровеносного сосуда и слой эндотелиальных клеток, попадая в просвет сосуда и, путешествуя по нему, проходить сквозь стенку сосуда в обратном направлении, обосновываться на новом месте, размножаться и давать начало новой опухоли — метастазу.

История вопроса

В конце XIX в. была высказана идея о том, что нарушения в ядре клетки играют главную роль в процессе канцерогенеза. Изучая протекание митоза, Хансемани предположил, что нормальные клетки приобретают способность к злокачественному росту из-за нарушения структуры хроматина. В начале XX в. основоположник мутационного учения Гуго де Фриз высказал мнение, что рак развивается в результате соматических мутаций. К 30-м гг. с развитием теории индуцированного мутагенеза формируется гипотеза о том, что рак — это производное точковых соматических мутаций, возникающих на генном уровне.

В 50-е гг. одновременно с общей теорией мутационного процесса развивается и мутационная теория раковых заболеваний. Рождалась идея, что в основе злокачественности лежит не одномоментное появление отдельной мутации, а более сложный процесс, например, последовательные мутации ряда генов в одной клетке. В частности, было показано, что возникновение ретинобластомы в глазу человека является двухступенчатым процессом. Предрасположенность к этой форме рака зависит от одного из генов, передающихся по наследству. Развитие же опухоли связано с дополнительной соматической мутацией в другом независимом гене. Клетка, несущая двойную мутацию, трансформируется, приобретая способность к злокачественному росту.

В 80-е гг. идея о многоступенчатости мутагенеза, лежащего в основе злокачественного перерождения клеток, развивается дальше. Формируется представление о том, что канцерогенез связан с мутациями достаточно узкой группы генов, отвечающих за дифференцировку клеток.

Параллельно с развитием мутационной теории канцерогенеза шло изучение канцерогенов химической и физической природы.

К физическим канцерогенам относят рентгеновское, гамма- и ультрафиолетовое излучения. Они оказывают как прямое, мутагенное и канцерогенное действие на структуру ДНК, так и не прямое, вызванное повреждением клеточных макромолекул свободно-радикальными формами кислорода, которые образуются в тканях под действием облучения. Именно лучевой канцерогенез был главной опасностью для первых радиологов и рентгенологов, работавших с радием и лучами рентгена без защиты от облучения. Из-за него у многих из них развивался рак кожи. При общем облучении организма чаще всего развиваются лейкозы, реже — опухоли костей из-за накопления в них радиоактивного стронция, являющегося аналогом кальция, и рак щитовидной железы, провоцируемый накоплением в ней радиоактивного йода. Для шахтеров урановых рудников, вдыхающих радиоактивную пыль, характерен рак легких.

Химические канцерогены объединяют широкий круг веществ: от простых, таких, как четыреххлористый углерод, до весьма сложных полициклических и гетероциклических соединений. Химические канцерогены вызывают сходные биологические эффекты, которые выражаются в стимуляции неограниченного размножения клеток-предшественников опухоли.

Хрестоматийными примерами форм рака, индуцированных химическими канцерогенами, являются плоскоклеточная карцинома легких, развивающаяся у курильщиков, мезотелиома плевры, стимулированная асбестовой пылью, рак мочевого пузыря у работников химического пред-

приятия, контактирующих с 2-нафтиламином.

По мере развития теории мутационного процесса стало понятно, что все химические и физические канцерогены обладают общим свойством: они являются мутагенами. Таким образом, химический и физический мутагенез лежит в основе опухолевой трансформации клеток.

Наряду с мутационной теорией канцерогенеза, долгие годы существовала также и вирусная теория, поскольку экспериментально было доказано, что опухоли могут индуцироваться как ДНК-, так и РНК-содержащимися вирусами. Наиболее изучены ДНК-содержащий вирус SV40, выделенный из клеток обезьяны, и вирус саркомы Рауса — куриный ретровирус, часто приводящий к развитию раковых опухолей животных. Однако среди множества причин, приводящих практически ко всем известным видам раковых заболеваний человека, вирусы не фигурируют. Возможно, иммунная система человека разрушает клетки, инфицированные вирусом, и защищает людей от возникновения раковых опухолей вирусной природы.

Обобщение данных о поведении вирусов в клетках хозяина позволило установить, что, воздействуя на клетку, они стимулируют ее к вступлению в S-фазу клеточного цикла и заставляют проходить митотический цикл снова и снова. Одна из причин такого воздействия — наличие в вирусном геноме онкогенов, способных регулировать митотический цикл клетки хозяина. Другая причина состоит в нарушении контроля экспрессии встроенных в геном клетки хозяина вирусных генов, регулирующих репликацию ДНК, и за счет того, что при встраивании в хромосому хозяина в результате случайного события вирусный геном оказывается в ином окружении. Таким образом, постепенно вирусная теория опухолевой

трансформации превратилась в вирусогенетическую, в основе которой — изменение работы генов, регулирующих митотический цикл клеток.

В конце 90-х гг. мутационная и вирусогенетическая теории развития опухолей объединились в одну. Показано, что трансформация нормальной клетки в опухолевую сопровождается сложным мутационным процессом, который затрагивает несколько (от 3 до 7) генов, контролирующих пролиферативную активность клеток. Мутации в каждом гене происходят независимо, и каждая из мутаций имеет очень низкую вероятность возникновения. Причины же мутационного процесса могут быть различны: как физический и химический мутагенез, так и мутагенез вирусной природы, одновременно нельзя не учитывать возможность спонтанного мутагенеза.

За два последние десятилетия выявлено значительное число генов, обеспечивающих трансформацию нормальных клеток в опухолевые. Условно их можно подразделить на несколько групп. К первой относятся протоонкогены, активность которых провоцирует пролиферацию клеток. Ко второй группе относятся гены-супрессоры, активность которых подавляет клеточные деления. В третью группу можно объединить выделенные в последнее время несколько генов, обеспечивающих стабилизацию структуры, размеров и упорядоченность вторичной структуры ДНК. К этой группе относятся гены теломеразного комплекса и системы репарации ДНК. Нарушение их функциональной активности играет важную роль в возникновении и развитии опухолей.

Факторы, способствующие возникновению опухоли

Заболеваемость большинством видов рака резко увеличивается с возрастом.

Например, смертность от рака толстого кишечника среди двадцатилетних не превышает десяти человек на 1 млн населения за год, среди шестидесятилетних — около ста человек, а среди восьмидесятилетних эта цифра приближается к 400. Повышение вероятности ракового заболевания с возрастом тем, что в течение жизни человек многократно контактирует с мутагенами разной природы.

Известно, что стимулируют мутационный процесс длительность воздействия и сила мутагена. Так, частота возникновения рака легкого резко возрастает лишь после 10-20 лет курения, а мутагеном в этом случае является бензпирен-компонент угольной смолы и табачного дыма. Частота возникновения лейкоза в Хиросиме и Нагасаки оставалась низкой в первые 5 лет после атомной бомбардировки и достигла пика только через 8 лет после нее.

Роль сопутствующего фактора, ускоряющего развитие опухолевых заболеваний, играет раневая процесс. Хорошо известно, что вслед за образованием раны наступает период ее заживления, который всегда связан с делением клеток. Интенсивное деление клеток любой ткани сопровождается изменением регуляции клеточного цикла. Значительная часть находящихся вне митотического цикла клеток должна вновь войти в фазу G_1 , чтобы пройти синтетический период, связанный с удвоением ДНК, подготовиться к митозу и поделиться. Такая функциональная перестройка связана с изменением активности генов, регулирующих клеточный цикл. В ходе перестройки клеточной активности в работу включаются новые гены, которые до этого момента длительное время не функционировали. Некоторые гены, участвующие в регуляции клеточного цикла соматических клеток, могут оказаться дефектными и этап их включения

способен стать пусковым моментом в развитии опухолевого перерождения.

Как говорилось выше, вирусные инфекции не являются причиной развития раковых заболеваний у человека, однако некоторые из них стимулируют развитие опухоли. Так, вирус гепатита в сочетании с другими факторами риска, такими, как алкоголь, курение, употребление пищевых продуктов, зараженных грибами, может стимулировать развитие рака печени. Вирус иммунодефицита человека (HIV-1) в условиях иммунной недостаточности или заражения другими вирусами может стимулировать развитие саркомы Капоши, рака эпителиальных клеток кровеносных сосудов. Причины такой стимуляции до конца не выяснены. Предполагается, что сами вирусы могут мутировать и становиться онкогенными, или изменяется активность генов вируса, встроенного в геном клетки хозяина, из-за изменения приывного окружения генов.

Предполагается, что значительную роль в регуляции работы генов, являющихся причиной опухолевой трансформации клеток, играет окружающая среда. Известно, что почти в каждой стране есть местности, где очень низок уровень заболевания тем или иным видом рака. То есть образ жизни людей способен предотвращать развитие того или иного вида или формы рака. Например, у жителей окрестностей Бомбея (Индия) в 200 раз ниже, чем в других местах, уровень заболевания раком кожи. В Нигерии в 300 раз ниже уровень заболевания раком пищевода, в Англии — в 100 раз ниже уровень заболевания раком печени.

Таким образом, раневой процесс, вирусные инфекции и образ жизни оказываются важными факторами, влияющими на вероятность развития раковых опухолей.

Развитие раковой опухоли

В настоящее время считается, что опухоль развивается из одной единственной клетки, несколько мутантных генов которой нарушают регуляцию клеточного деления. Поскольку эта мутировавшая клетка несет наследственные изменения, все ее потомки будут иметь аналогичные мутации. К моменту обнаружения опухоли (когда она выявляется на рентгенограмме) в ее составе насчитывается до 10^8 родственных клеток. Диаметр опухоли в это время составляет лишь 1 мм. К моменту пальпирования опухоль разрастается до 10 мм в диаметре, а количество клеток достигает 10^9 . Летальный исход приближается при достижении опухолью диаметра 10 см, количество клеток в ней при этом достигает 10^{12} .

Все опухолевые клетки несут наследственные изменения генов социального контроля. В них наблюдается частичная утрата черт клеточной дифференцировки. Кроме того, злокачественное перерождение опухолевых клеток сопровождается секрецией в окружающую среду протеолитических ферментов, что способствует образованию метастазов.

Развитие раковой опухоли связано с рядом общих процессов, закономерности которых сходны для всех видов и форм рака, хотя каждая конкретная форма этого заболевания имеет собственную специфику.

Вопросы для самоконтроля

1. Назовите отличительные свойства клеток раковых опухолей.
2. Отличительные особенности доброкачественных и злокачественных опухолей.
3. Как понимать идею о многоступенчатости мутгена?
4. В чем взаимосвязь мутационной и вирусной теории канцерогенеза?
5. Назовите факторы, способствующие возникновению опухоли.

Литература

1. Албертс Б., Брей Д, Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки: В 3 т. М.: Мир, 1994.
2. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М.:Наука, 1989.
3. Айала Ф., Кайгер Д. Современная генетика. М.: Мир, 1987, т. 1.
4. Баев А.А. Программа "Геном человека", ее возникновение, содержание и развитие. Итоги науки и техники. ВИНТИ. Сер. Геном человека. — 1990.
5. Бочков Н.П. Клиническая генетика. М.: Медицина, 1997.
6. Бочков Н.П., Захаров А.Ф., Иванов В.И. Медицинская генетика. М.: Медицина, 1984.
7. Бочков Н.П., Чеботарев А.Н. Наследственность человека и мутагены внешней среды. М.: Медицина 1989.
8. Дубинин Н.П. Эволюция популяций и радиация. Москва: Госатомиздат. 1966, 743с.
9. Дубинин Н.П. Генетика. Кишинев, 1985.
10. Дубинин Н.П. Некоторые проблемы современной генетики. М.: Наука, 1994.
11. Захаров А.Ф. Хромосомы человека (Проблемы линейной организации). М.: Медицина, 1977.
12. Инге-Вечтомов С.Т. Генетика с основами селекции. — М.: Высшая школа, 1989.
13. Козлов С.И. и др. Наследственные синдромы и медико-генетическое консультирование. Л., 1987.
14. Ли Ч. Введение в популяционную генетику. М.: Мир, 1978.
15. Льюин Б. Гены. М.: Мир, 1987.
16. Мак-Кьюсик В.А. Генетика человека. "Мир", 1967.
17. Наследственность человека и окружающая среда. — М.: Наука, 1992.
18. Орехова В.А., Лашковская Т.А., Шейбак М.П. Медицинская генетика. Минск: Вышэйшая школа, 1998.
19. Последствия Чернобыльской катастрофы: Здоровье человека. Центр экологической политики России. Москва, 1996.
20. Приходченко Н.Н, Шкураг Т.П. Основы генетики человека. Ростов-на-Дону: Феникс, 1997.
21. Ратнер В.А. Математическая популяционная генетика. Новосибирск: Наука, 1977.
22. Фогель Ф., Мотульски А. Генетика человека: В 3 т. М.: Мир, 1989, 1990.
23. Хесин Р.Б. Непостоянство генома. М.: Наука, 1984.
24. Шевченко В А Померанцева М.Д. Генетические последствия действия ионизирующих излучений. М.: Наука, 1985.
25. Штерн К. Основы генетики человека. М.: Мир, 1987.
26. Эфроимсон В.П. Введение в медицинскую генетику. Изд. 2-е, М.: Медицина, 1968.
27. McKusick V.A. Mendelian Inheritance in Man. XI edition, Volumes 1-2. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1994.