



УДК 612.6.05

**В. Н. Запорожан**, акад. АМН України, д-р мед. наук, проф.

## **АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ ГЕНЕТИКИ**

*Одесский государственный медицинский университет, Одесса, Украина*

УДК 612.6.05

**В. М. Запорожан**

### **АКТУАЛЬНІ ПРОБЛЕМИ МЕДИЧНОЇ ГЕНЕТИКИ**

*Одеський державний медичний університет, Одеса, Україна*

Обговорено проблеми генетики людини, що мають перспективне значення для клінічної медицини: діагностика та лікування спадкових захворювань і злоякісних новоутворень, фармакогенетика. Наведено головні результати досліджень, виконаних в Одеському державному медичному університеті.

**Ключові слова:** генетика, клінічна медицина, спадкові захворювання.

UDC 612.6.05

**V. N. Zaporozhan**

### **ACTUAL PROBLEMS OF MEDICAL GENETICS**

*The Odessa State Medical University, Odessa, Ukraine*

Problems of human genetics that have future importance for practical medicine: diagnosis and treatment of hereditary disorders and malignant tumors, development of pharmacogenetics are discussed in the article. Key results of researches, conducted in the Odessa state medical university scientists, are given.

**Key words:** genetic, clinical medicine, hereditary diseases.

Конец XX и начало XXI вв. ознаменовались величайшими открытиями в области молекулярной биологии и генетики, которые революционным образом изменили наше представление о механизмах кодирования и реализации наследственной информации у эукариот, создали возможности для изучения генов и геномов. В настоящее время можно говорить о новом направлении в молекулярной генетике — геномике. К числу открытий этой науки относится расшифровка геномов многих микроорганизмов, ряда многоклеточных, в том числе лабораторных животных (дрозофила, мышь), и, наконец, практически полная расшифровка генома человека. Оказалось, что геном человека содержит значительно меньшее количество генов, чем предполагалось ранее. По предварительным оценкам, в геноме человека от 32 000 до 40 000 структурных генов. Однако гены имеют чрезвычайно сложное строение и механизмы экспрессии. Классическая гипотеза один ген — один фермент претерпела существенные изменения: найдены механизмы кодирования нескольких белков одним геном. Общее количество синтезируемых в течение онтогенеза белков у человека предположительно достигает 250 000. Вся совокупность белков, синте-

зируемых организмом в течение жизни, получила название протеом. В настоящее время понятно, что только изучение протеома позволит уточнить функции многих генов и завершить изучение генома человека, поэтому появилось второе важное направление современной молекулярной биологии — протеомика.

Выяснены многие эпигенетические механизмы экспрессии генов, включая функциональную неоднозначность материнского и отцовского геномов, что получило название «геномного импринтинга». Были открыты мобильные элементы генома, обратная транскрипция, новые механизмы мутаций. Все это позволило изучить этиологию и патогенез многих наследственных заболеваний.

В настоящее время на базе геномики и протеомики формируется новое направление клинической и экспериментальной медицины — молекулярная медицина.

К числу важнейших вопросов молекулярной медицины могут быть отнесены следующие.

Изучение патогенеза наследственных болезней и болезней с наследственной предрасположенностью на молекулярном уровне: на уровне гена (или группы генов) и продуктов генов. Весьма перспективными являются молекуляр-

но-генетические исследования в области онкогенетики. Канцерогенезу сопутствуют генетические изменения в протоонкогенах, генах-супрессорах, генах репарирующей системы. Молекулярно-генетические изменения включают точечные мутации в кодирующих и регуляторных областях генов, амплификацию онкогенов, делеции и хромосомные перестройки, изменение экспрессии генов. Предполагается, что для полной трансформации нормальной клетки в злокачественную требуется от 4 до 7 последовательных мутаций.

В Украине в структуре онкозаболеваний рак эндометрия составляет 7,6 %, а среди злокачественных опухолей малого таза он занимает первое место. Анализ средних показателей заболевания раком в Украине в течение двух периодов (до и после чернобыльской аварии) показал значительный темп роста рака тела матки — 30,3 % при среднегодовом увеличении на 3,5 %. Одна из главных задач онкологии — раннее выявление опухоли. Для этого должны быть надежные опухолевые маркеры. Многообразие комбинаций генетических дефектов, лежащих в основе канцерогенеза, обуславливает «индивидуальность» профиля маркеров конкретной опухоли.

В научно-исследовательском отделе НИИ новых медицинских технологий и проблемных заболеваний Одесского государственного медицинского университета проводятся исследования по молекулярной генетике и функциональной геномике рака эндометрия. Получены интересные результаты по некоторым направлениям исследований. При исследовании ДНК больных раком эндометрия с помощью полимеразной цепной реакции и изучении простых повторяющихся последовательностей (ISSR) нами выявлен дополнительный ампликон в ДНК клеток опухоли и крови, отсутствующий в нормальной ткани той же больной. Подтверждение полученных данных в последующих более широких исследованиях, как мы полагаем, позволит получить маркер рака эндометрия.

Повреждения в системе генов репарации приводят к неточному воспроизведению генома, в результате чего возникает его нестабильность. С наибольшей частотой ошибки репликации проявляются в микросателлитных повторяющихся последовательностях. Молекулярная нестабильность наблюдается в среднем в 50 % случаев всех типов раков у женщин и в 17–28 % случаев — при спорадическом раке эндометрия матки. Для изучения молекулярно-генетической природы рака эндометрия нами проведен анализ ряда микросателлитных последовательностей. Установлено, что в микросателлитных последовательностях некоторых генов выявляются дополнительные аллели или, наоборот, отмечена потеря аллеля. Для ряда

других генов изменений в микросателлитных структурах не выявлено. Продолжается работа с расширенным спектром микросателлитов. Считаем, что микросателлитный анализ можно самостоятельно применять для детекции нарушений в системе репарации и оценки нестабильности генома в диагностических целях.

Известно, что эндометрий является органом-мишенью для половых гормонов яичников, которые через мембранные и ядерные рецепторы обеспечивают физиологические циклические процессы в клетках эндометрия. Два различных эстрогеновых рецептора: ER-альфа и ER-бета связывают эстрогены и имеют различную локализацию и концентрацию. Функциональные различия выражаются в активации транскрипции эстрогенов в присутствии ER-альфа и ингибировании в присутствии ER-бета.

Для ER-альфа гена идентифицировано 10 промоторных областей, 3 из них (A, B и C) регулируют синтез специфических транскриптов, соответствующих ER-альфа A, ER-альфа B, ER-альфа C изоформам. Разные типы клеток и тканей имеют разные изоформы транскриптов эстрогеновых рецепторов. Роль их неясна, однако специфические пути ER-экспрессии предполагают дифференцированное действие эстрогенов на ткань-мишень.

При поиске мутаций в данных промоторных областях нами выявлены однонуклеотидные делеции Т-основания, замена Т на G в промоторах ER-альфа и ER-бета при раке эндометрия. Дополнительно в промоторе ER-бета обнаружена делеция в 48 парах оснований. В норме таких изменений не выявлено. В то же время известно, что опухоли с нарушениями в рецепторах эстрадиола более агрессивны и не поддаются лечению. Таким образом, результаты скрининга генов эстрогеновых рецепторов позволят вносить коррективы в лечение больных.

Анализ результатов клинико-генеалогического обследования больных со злокачественными новообразованиями в Украине свидетельствуют о том, что у 56,5 % пациентов развитие заболевания обусловлено воздействием генетических факторов. Наследственные формы рака молочной железы составляют 5–10 % в структуре заболеваемости этой формой рака, а частота возникновения рака молочной железы у кровных родственников пробандов в 3–10 раз выше, чем в общей популяции.

В норме BRCA 1 и BRCA 2 являются регуляторами клеточного роста, однако изменения в этих генах могут нарушать нормальную функцию и увеличивать риск развития рака. Мутации в генах BRCA 1 и BRCA 2 составляют до 85 % всех наследственных раков молочной железы и яичника. Если мутации детектированы в этих генах, то рак может развиваться с высокой вероятностью в течение жизни. Индивидуаль-

ные мутации в BRCA 1 или BRCA 2 имеют 50 % вероятности получения альтерации у носительницы мутации или ее детей, независимо от пола.

Нами проводится скрининг женщин группы риска для выявления наиболее общих мутаций BRCA 1 и BRCA 2 на основе мультиплексной ПЦР. Планируем также анализ мутаций методом ПЦР в реальном времени и создание ДНК-микрочипов для одновременного скрининга мутаций расширенного числа генов, ответственных за развитие данной патологии. Идентификация мутаций в генах при наследственных формах онкопатологии имеет решающее значение для профилактической медицины.

Метод ДНК-комет, или электрофореза отдельной клетки, открывает широкие возможности для исследования ДНК-протекторного эффекта, степени повреждения ДНК, активности репаративной системы при воздействии экзогенных факторов, лучевой и лазерной терапии, оценки генотоксичности фармакологических препаратов на нормальные и патологически измененные клетки. Сочетанное использование метода ДНК-комет с другими методами молекулярной биологии, цитологии и иммунологии может использоваться для коррекции терапии и диагностики предраковых и раковых заболеваний. Проводятся исследования по сравнительному анализу репаративной активности ДНК нормальных и патологически измененных клеток при раковых и предраковых состояниях у человека.

Разработка и внедрение молекулярно-генетических методов, которые в настоящее время широко используются для диагностики моногенных и хромосомных болезней, онкологических и инфекционных заболеваний, в судебной медицине — для идентификации личности и установления родства. Кроме того, они применяются для пренатальной диагностики наследственных заболеваний. Революцию в области молекулярной генетики совершило открытие полимеразной цепной реакции (К. Мюллис, 1983). Точность и невысокая стоимость позволили внедрить методы ДНК-диагностики в практическое здравоохранение и на основе ПЦР разработать новые диагностические подходы.

Одним из новейших инструментов биологии и медицины XXI в. являются ДНК-биочипы (biochips), или DNA-microarrays, — размещение химически связанных молекул ДНК, расположенных на подложке размером предметного стекла. Несмотря на миниатюрный размер биочипа, на небольшой площади размещается огромное количество разных молекул ДНК, соответствующих определенным генам. На чипах проводят одновременный анализ работы тысяч и десятков тысяч генов и сравнивают

экспрессию этих генов в здоровых и в раковых клетках. Такие исследования помогают создавать новые лекарственные препараты и быстро выяснять, на какие гены и каким образом эти новые лекарства действуют. Сейчас также разрабатывают белковые микрочипы.

Продолжаются разработки для создания микрочипов на базе нашего НИИ. Начаты работы по созданию микрочипов для детекции экспрессии генов рецепторов эстрадиола и прогестерона, разрабатываются микрочипы для определения экспрессии интерлейкинов и факторов роста. Планируется создание микрочипов для скрининга предрасположенности к раку молочной железы и детекции рака эндометрия.

Медицина сейчас стоит на пороге возможности тестирования генома каждого человека по наиболее значимым патологическим мутациям и создания в ближайшем будущем генетического паспорта. Генетическая индивидуальность определяется однонуклеотидным полиморфизмом, варьирующим числом минисателлитных и микросателлитных последовательностей и наличием ретротранспозонов во фланкирующих последовательностях и интронах гена. Это имеет большое значение для профилактики онкологических и наиболее распространенных мультифакториальных заболеваний, ибо позволяет создать адаптивную среду, предупреждающую развитие патологии.

Большие надежды возлагаются сейчас на исследование такого генетического маркера, как одиночные замены нуклеотидов (однонуклеотидный полиморфизм, или SNP-single nucleotide polymorphism), которые характеризуют вариабельность практически каждого гена человека. Они возникают через каждые 300 пар оснований. Карта одиночных замен нуклеотидов покрывает весь геном человека и важна для выяснения вклада отдельных генов в развитие полигенных мультифакториальных заболеваний.

Геномный скрининг SNP позволяет выявлять гены, участвующие в проявлении полигенных признаков, разрабатывать стандартные подходы к исследованию молекулярной природы предрасположенности к различным заболеваниям и предсказанию индивидуальной чувствительности к лекарственным средствам. Самым точным и быстрым методом детектирования SNP является пиросеквенирование — в течение 20 мин анализируется 96 образцов. В настоящее время нами ведутся работы по дизайну праймеров для анализа пиросеквенированием эстрогеновых рецепторов, генов репарации (MLH1, MLH2, MSH и др. ), генов рецепторов натуральных киллеров NK, KIR.

Наряду с разработкой новых молекулярно-генетических методов диагностики, пригодных для клинического применения, продолжается совершенствование цитогенетических методов

исследования и на их основе разрабатываются новые маркеры, характерные для различных заболеваний.

Так, при цитогенетическом исследовании лимфоцитов периферической крови больных раком эндометрия нами показано, что средний уровень aberrаций хромосом в группе больных составил  $(20,5 \pm 2,0) \%$ , а в группе здоровых этот показатель равен  $(2,8 \pm 0,3) \%$ . В группе больных доля клеток с аномалиями кариотипа составила 8,7 %, aberrации хроматидного типа встречались в 7,3 % клеток, aberrации хромосомного типа найдены в 3,5 % клеток.

Среди aberrаций хроматидного типа чаще всего встречались хроматидные разрывы и ахроматиновые пробелы. Aberrации хроматидного типа включали в себя дицентрики и парные ацентрические фрагменты. Клетки с аномалиями кариотипа в группе больных аденокарциномой эндометрия включали анеуплоидные и тетраплоидные клетки. У здоровых женщин клетки с аномалиями кариотипа встречались в 0,8 % всех исследованных клеток, aberrации хроматидного типа — в 2 %; aberrации хромосомного типа не встречались. Аномалии кариотипа у здоровых женщин включали в себя только анеуплоидию.

В последние годы большое внимание уделяют изучению фрагильных участков хромосом. По-видимому, именно в ломких участках происходит разрыв хроматиды с последующей перестройкой хромосомы. В нашем исследовании ломкие сайты хромосом обнаружены в 14 % всех изученных клеток. Наибольшая частота встречаемости фрагильных сайтов хромосом была в следующих участках: 5q2.3–3.2; 2q2.4–3.1; 1q3.1–3.2 и составила 18,9; 16,2; 15,1 % соответственно. По данным литературы, район 5q2.3–3.2 является «горячей» точкой, в которой происходит разрыв хромосомы. Так, процесс развития рака толстой кишки начинается с делеции 5q; частые делеции района 5q3.1 наблюдают при миелоидных лейкозах и миелодиспластическом синдроме. Дальнейшие исследования помогут нам уточнить онкогены, локализованные в обнаруженных участках хромосом наибольшей ломкости при раке эндометрия. Специфические фрагильные сайты хромосом могут быть выявлены задолго до начала манифестации онкозаболевания, и поэтому цитогенетический метод может применяться в онкопатологии как дополнительный, применяемый для обследования групп риска.

Другим направлением цитогенетических исследований является диагностика хромосомных aberrаций у пациентов с нарушениями репродуктивной функции. Хромосомные aberrации часто являются причиной бесплодия и спонтанных abortов. В результате анализа ка-

риотипов пациентов с нарушениями репродуктивной системы у 8,3 % обнаружены аномалии числа хромосом, у 13,1 % наблюдались хромосомные перестройки, 20,2 % являются носителями хромосомных вариантов, у 20,5 % выявлена нестабильность, а у 5,9 % — ломкие участки хромосом.

Основную долю в группе пациентов с аномалиями числа хромосом составляют мозаики по половым хромосомам (синдром Тернера, Клайнфельтера, гонадальный дисгенез). В группе пациентов с хромосомными перестройками чаще всего встречались делеция короткого плеча X-хромосомы, прицентромерные инверсии 1, 9 и 18-й хромосом.

В группе пациентов с хромосомными вариантами больше всего было выявлено экстремальных вариантов прицентромерного гетерохроматина хромосом 1 и Y. У пациентов с нарушенной репродуктивной функцией обнаружена и повышенная частота нестабильности хромосом. Ломкие участки хромосом представлены регионами 4q2.7–3.2 и Xq2.4–2.5. Если суммировать все приведенные факты, то 67,7 % обследованных пациентов с нарушениями репродуктивной функции имеют те или иные хромосомные аномалии, что свидетельствует о значительном вкладе хромосомных аномалий в патогенез бесплодия и спонтанных выкидышей.

В дальнейшем планируется дополнение классического цитогенетического исследования методами молекулярной цитогенетики: 24-цветный FISH и сравнительная геномная гибридизация. Эти методы позволят углубить и расширить наши исследования.

Следующее перспективное направление молекулярной генетики и генно-инженерной биотехнологии — генная терапия моногенных и мультифакториальных заболеваний. Генная терапия заключается во введении нормального гена в клетки больного с наследственным заболеванием. Первая успешная генотерапия наследственного заболевания была проведена в США в 1990 г. при наследственном тяжелом иммунодефицитном состоянии, обусловленном дефектом фермента лимфоцитов аденозиндезаминазы А.

Среди выполняемых в мире проектов генной терапии более 60 % приходится на лечение опухолей, примерно по 15 % — на лечение инфекционных болезней (СПИД, гепатит В, туберкулез и др.), столько же на лечение моногенных заболеваний (муковисцидоз, болезни накопления (мукополисахаридозы), семейная гиперхолестеринемия, гемофилия В и др.).

Однако сегодня широкое внедрение методов генной терапии сдерживается техническими и деонтологическими проблемами. К числу технических проблем может быть отнесено создание эффективных векторов, контроль места

встраивания гена и его экспрессии. Важнейшая деонтологическая проблема — возможные отдаленные последствия вмешательства в геном человека. Этот метод требует дальнейшего анализа генетической безопасности с точки зрения влияния на генофонд человека.

В настоящее время реально существуют возможности с помощью анализа индивидуальных особенностей активности генов и ферментов, принимающих участие в биотрансформации лекарственных препаратов, подбирать индивидуальную оптимальную лекарственную терапию. Принципиально новые способы получения лекарственных препаратов основаны на достижениях генной инженерии. Одно из основных направлений современной фарминдустрии — получение лекарственных препаратов на основе метода рекомбинантных ДНК-технологий. Современная тенденция — это переход от рекомбинантных лекарственных препаратов бактериального происхождения к биопрепаратам, получаемым из молока трансгенных животных.

Преимуществом таких препаратов является то, что они синтезируются эукариотической клеткой и проходят все необходимые посттрансляционные изменения, не требуют выделения и очистки.

О перспективности этого подхода свидетельствуют следующие факты: чтобы обеспечить мировую потребность в IX факторе свертываемости крови (85 кг), достаточно стада из 15–20 трансгенных коров, а для получения фибриногена, потребность в котором больше (3 т), — стада из 500 коров.

Молекулярно-генетические методы широко используются в современных репродуктивных технологиях. Дальнейшего серьезного изучения требуют такие вопросы, как клонирование человека, возможность коррекции генотипа на уровне гамет и зигот. Так же, как и генотерапия, это связано с вмешательством в геном человека, которое может привести к существенным изменениям генофонда отдельных популяций или вида человека в целом.

С другой стороны, использование методов терапевтического клонирования с целью получения стволовых соматических клеток открывает огромные перспективы в трансплантоло-

гии и патогенетическом лечении многих болезней терапевтического профиля. Для этого создается (клонировается) эмбрион, генетически идентичный клеткам пациента. Клетки эмбриона способны развиться в любую человеческую ткань или орган и, в отличие от пересаженных органов, не отторгаются иммунной системой, которая воспринимает их как собственные.

Однако для дальнейшего развития терапевтического клонирования должен быть прежде всего решен вопрос, с какого момента клон является развивающейся человеческой личностью и не может рассматриваться просто как источник стволовых клеток.

Помимо этических проблем, применение стволовых клеток ограничивают биологические сложности. Во-первых, велик риск того, что в условиях взрослого организма они сформируют не здоровую ткань, а опухоль. Во-вторых, многие исследователи до сих пор ставят под сомнение уже полученные результаты своих коллег. Эксперименты со стволовыми клетками законодательно ограничиваются в США и Великобритании. Запрет на использование стволовых клеток намеревается ввести и Европарламент: многие видят большую проблему в том, что при их получении гибнет эмбрион.

Запреты на эксперименты со стволовыми клетками пытаются обойти многие ученые. Одна из таких возможностей — организация банка клеток, модифицированных таким образом, чтобы не вызывать отторжения в организме реципиента. Другие медики пытаются использовать для пересадки стволовые клетки, основываясь на предположении о том, что их также можно заставить развиться в любую ткань.

Внедрение современных молекулярно-генетических методов в практику здравоохранения, активное выявление генов предрасположенности среди населения к наследственно-обусловленным заболеваниям играет большую роль в профилактике и выявлении групп повышенного риска к развитию мультифакториальных и онкологических заболеваний. Геномные исследования служат основой для разработки методов лечения.