

**Санкт-Петербургская государственная педиатрическая
медицинская академия**

Введение в молекулярную медицину

В. Н. ГОРБУНОВА

Кафедра медицинской генетики СПбГПМА
(методическое пособие для студентов медицинских вузов)

2007

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение

1. Проект «Геном человека». Определение генома. Центральная молекулярно-генетическая догма, основные информационные процессы – транскрипция, сплайсинг, трансляция. Генетический код
 2. Геномика, цели, подходы, основные достижения и их значение для развития молекулярной медицины. Структура генома человека. Число генов. Процент сходства по нуклеотидным последовательностям ДНК. Соотношение между кодирующими и некодирующими последовательностями. Изменчивость генома.
 3. Разнообразие и структура моногенных заболеваний. Типы наследования. Возможности молекулярной диагностики мутаций. Профилактика моногенных заболеваний на базе пренатальной диагностики.
 4. Мультифакториальные болезни. Цели и методы предиктивной медицины. Гены-кандидаты. Полиморфизмы генов. Генетические факторы риска.
 5. Открытие генов человека. кДНК. Обратная генетика.
 6. Полимеразная цепная реакция. Цели использования. Необходимые реактивы. Принципы, последовательные этапы метода. Технические условия проведения реакции и ее достоинства.
 7. Основные направления молекулярной медицины, состояние и перспективы развития.
 8. Проблема генетической паспортизации
 9. Молекулярные основы канцерогенеза. Доминантные онкогены и гены-супрессоры опухолей. Роль геномной нестабильности в развитии неопластического процесса.
 10. Генетические основы старения
 11. Генотерапия наследственных и онкологических заболеваний. Структура генотерапевтических проектов. Генотерапия наследственного иммунодефицита, обусловленного ADA-недостаточностью.
 12. Гено-инженерные продукты. Перспективы использования.
 13. Перспективы развития отечественной молекулярной медицины
- Заключение

Введение

В начале 2000 года мир облетело сенсационное известие: *«Расшифрована структура генома человека!»*. Новость оказалась настолько значимой, что стала предметом обсуждения между президентами ведущих стран мира. Однако на многих сообщение не произвело никакого впечатления. В первую очередь это связано с недостаточным пониманием того, что такое геном, какова его структура и что значит ее расшифровка?

Имеет ли эта новость отношение к медицине и может ли коснуться каждого из нас? Поможет ли она преодолеть какие-то наши недуги или решить иные проблемы? Что такое молекулярная медицина и связана ли ее развитие с расшифровкой структуры генома? Более того, у некоторых людей возникли опасения, не грозит ли в очередной раз новое открытие ученых человечеству? Не последует ли за этим всеобщее принудительное генетическое обследование - своеобразная генетическая паспортизация населения? Не явится ли наш геном предметом анализа и насколько конфиденциальна будет полученная информация?

1. Проект «Геном человека». Определение генома. Центральная молекулярно-генетическая догма, основные информационные процессы – транскрипция, сплайсинг, трансляция. Генетический код.

Под геномом понимается полная генетическая система клетки, которая обеспечивает наследственную передачу в ряду поколений всех ее свойств и признаков. Но ведь и ДНК выполняет ту же функцию! Поэтому очень часто выражения «геном» и «ДНК» употребляют как синонимы.

В начале XX века генетики сформулировали основные законы передачи признаков по наследству. Стало понятно, что гены являются некими дискретными единицами, которые, не смешиваясь друг с другом, передаются из поколения в поколение через половые клетки. Эти единицы располагаются в ядрах клеток и ассоциированы с компактными структурами - хромосомами, которые на определенной стадии деления клетки после специфического окрашивания можно наблюдать в микроскоп.

ДНК - это нитевидная молекула, основу которой составляют монотонно чередующиеся остатки сахара (дезоксирибозы) и фосфорной кислоты. Каждый остаток сахара в нити ДНК соединен с одним из четырех типов различающихся между собой нуклеотидных оснований или нуклеотидов аденина, тимина, гуанина и цитозина, сокращенно обозначаемых буквами А, Т, Г и Ц. Порядок расположения этих зубцов и является тем языком, на котором могут быть записаны информационные программы развития любого организма из оплодотворенной яйцеклетки. Но оказалось, что далеко не вся ДНК состоит из подобных программ. Они в виде отдельных генов вкраплены в ДНК и занимают не более 10-15% общей длины молекулы. Кроме того, в большинстве генов человека присутствуют длинные некодирующие участки. Так что, суммарно кодирующие области ДНК составляют менее 3% от общей длины молекулы.

Два удивительных свойства отличают нуклеиновые кислоты от всех других типов молекул. Во-первых, молекулы ДНК способны размножаться, то есть сами себя воспроизводить. Именно поэтому появление ДНК ассоциируется с возникновением жизни, которая невозможна без размножения. Во-вторых, в нуклеиновых кислотах в виде генов записана информация о развитии любого живого существа. Недаром ДНК сравнивают с энциклопедией жизни! Реализация этих двух свойств определяется тем, что в живой материи ДНК находится, главным образом, в форме двунитевой спирали. Образование двунитевых структур ДНК происходит по очень

строгую правилу, в соответствии с которым напротив нуклеотида А в одной из нитей ДНК всегда располагается нуклеотид Т в другой нити, тогда как напротив Г всегда находится Ц. Вот это правило: А-Т, Г-Ц, которое называется правилом комплементарности, и определяет способность ДНК к самовоспроизводству, а также к производству неких шаблонов генов, которые затем используются для строительства белков. Связи между комплементарными нуклеотидами в двунитевых ДНК настолько непрочные, что даже при относительно небольшом нагревании они рвутся, и молекула ДНК переходит в одонитевую форму. Но при нормализации условий взаимодополняющие друг друга комплементарные нити вновь объединяются и двунитевая структура ДНК восстанавливается. При размножении молекулы или при работе генов одонитевая цепь ДНК служит трафаретом или матрицей для строительства комплементарной нити в соответствии с правилом: А-Т, Г-Ц.

Основная масса ДНК находится в составе хромосом в ядрах клеток в суперскрученной форме за счет взаимодействия с определенными ядерными белками. Относительно небольшая часть ДНК локализована в органеллах клетки, которые называются митохондриями. Длина молекулы ДНК измеряется в нуклеотидах или в парах оснований. Размер ДНК человека составляет 3.2 миллиарда пар оснований. Если бы каким-то образом нам удалось выделить из ядра и развернуть, не повредив, эту тончайшую нить ДНК, то ее физическая длина составила бы немногим менее двух метров. Нужно обладать очень богатым воображением, чтобы представить себе, что в ядре каждой нашей клетки имеется молекула ДНК такого гигантского размера, и как же она суперскручена, как замечательно она упакована, что ей не только там не тесно, но она способна выполнять две свои удивительные функции: самовоспроизводства и кодирования!

Основной структурной единицей генов являются нуклеотиды - А, Т, Г и Ц, тогда как основной структурной единицей белков является совершенно иной тип молекул - аминокислоты. Их разнообразие больше - 20 вариантов. Как же происходит переход от гена к белку? В основе этого перехода лежит генетический код - центральный закон нашей жизни, в соответствии с которым последовательность из трех нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты - кодон - соответствует одной аминокислоте в молекуле белка. Таким образом, знание нуклеотидной последовательности кодирующей ДНК позволяет однозначно прогнозировать аминокислотную последовательность кодируемого белка. Очень важным свойством генетического кода является его вырожденность – способность кодировать одну и ту же аминокислоту не одним вариантом нуклеотидных триплетов, а несколькими. Причем, эти синонимические триплеты, как правило, различаются по третьему нуклеотиду в кодоне. Важным следствием этого свойства является то, что знания аминокислотной последовательности кодируемого белка не достаточно для однозначного воспроизводства кодирующей нуклеотидной последовательности. Удивительным является то, что генетический код оказался одинаковым для всех живых существ от вирусов до человека.

Универсальность генетического кода является бесспорным доказательством родственности всего живого на Земле. При этом наиболее правдоподобной гипотезой возникновения жизни кажется ее привнесение в форме взаимодействия нуклеиновых кислот и белков откуда-то извне. Правда, остается неразрешимым вопрос, а как жизнь образовалась там, откуда она пришла на Землю? В этом месте уместнее всего произнести слово Бог и говорить о божественном характере возникновения жизни на Земле. Но это уже вопрос не науки, а веры, убеждения.

Декодирование информации, заложенной в молекуле ДНК, происходит в соответствии с центральной догмой молекулярной генетики. В соответствии с этой догмой один ген кодирует один белок, а точнее одну полипептидную цепь. Но это справедливо не для всех генов. Конечными продуктами примерно четверти генов человека являются не белки, а рибонуклеиновые кислоты. РНК, также как ДНК, состоят из четырех типов произвольно чередующихся нуклеотидов. Правда, в РНК функции Т выполняет другой нуклеотид – У (урацил). Второе важное структурное отличие заключается в том, что в РНК в основании располагается другой сахар - не дезоксирибоза, а рибоза. Первым шагом на пути расшифровки информации в молекуле ДНК является процесс транскрипции – синтез молекул РНК, комплементарных определенным участкам в молекуле ДНК. Те участки молекулы ДНК, которые транскрибируются, как раз и являются генами. Молекулы РНК, которые образуются в результате транскрипции, носят название преРНК или точнее первичный РНК-транскрипт. Серия модификаций превращает преРНК в информационную или матричную РНК - мРНК. В ходе процессинга преРНК происходят изменения на концах молекулы, обеспечивающие ее стабилизацию и возможность продвижения к нужным органеллам, в первую очередь, к рибосомам. Происходит полиаденилирование – присоединение полиА-последовательности к 3'-концу, и кэпирование – присоединение гуанозин-3-фосвата к 5'-концу молекулы преРНК. Но самой главной смысловой модификацией преРНК является сплайсинг. Для того чтобы определить, что такое сплайсинг, нужно вспомнить, что подавляющее большинство генов человека, также как генов эукариот, в отличие от прокариот, имеют прерывистую структуру. Кодирующие участки гена, которые носят название экзоны, перемежаются с гораздо более длинными некодирующими участками – интронами. И экзоны и интроны переписываются в молекулу преРНК. А потом действует механизм избирательного вырезания интронов и сшивки экзонов с образованием мРНК. Этот процесс и носит название сплайсинг. Таким образом, молекулы мРНК могут быть в десятки раз короче молекул преРНК, так как интроны, как правило, значительно длиннее экзонов. мРНК переходит в цитоплазму клетки и соединяется с рибосомой - структурой, которая выполняет функцию фабрики по производству белков. Последовательное вхождение кодонов мРНК в этот комплекс является инструкцией для выбора в соответствии с генетическим кодом аминокислот

из цитоплазмы клетки и соединения их между собой. Так и строится остов белка до тех пор, пока в мРНК не встретится один из стоп-кодонов.

Возможность специфического выбора аминокислот определяется тем, что в цитоплазме клетки присутствуют определенные физические прообразы генетического кода в виде 20 типов молекул транспортных РНК - тРНК. Основным свойством этих необычных нуклеиновых кислот, несколько напоминающих по форме лист клена, является их способность транспортировать одну из аминокислот, причем каждому из 20 типов аминокислот соответствует своя тРНК. Это соответствие зависит от структуры очень важного участка тРНК - антикодона. Антикодон, также как и кодон, состоит из трех нуклеотидов. Последовательность этих нуклеотидов в антикодоне и определяет тип тРНК, то есть то, какую именно аминокислоту способна транспортировать определенная тРНК. Комплементарное взаимодействие (по правилу А-У, Г-Ц) между кодоном в молекуле мРНК и антикодоном в молекуле тРНК и обеспечивает правильность выбора аминокислоты при «сборке» белка.

2. Геномика, цели, подходы, основные достижения и их значение для развития молекулярной медицины. Структура генома человека. Число генов. Процент сходства по нуклеотидным последовательностям ДНК. Соотношение между кодирующими и не кодирующими последовательностями. Изменчивость генома.

В конце XX века молекулярные технологии развивались настолько интенсивно, что были созданы предпосылки для планомерного изучения структуры геномов разных видов живых существ, включая человека. Одной из наиболее значимых целей этих проектов является определение полной нуклеотидной последовательности геномных ДНК. Таким образом, родилась новая наука - геномика. В настоящее время с различной степенью точности расшифрована нуклеотидная последовательность геномной ДНК около 300 видов микроорганизмов, большинство из которых являются инфицирующими. Для многих низших полнота анализа оказалась абсолютной, то есть не осталось не расшифрованным ни одного нуклеотида! Однако при переходе на многоклеточные организмы задача значительно усложняется и не только потому, что длина ДНК высших в тысячи, а иногда в сотни тысяч раз больше, но и структура ее становится более сложной для анализа. Переход от низших к высшим сопровождается появлением большого числа не кодирующих ДНК, значительную часть которых составляют повторяющиеся последовательности. Они вносят большую путаницу в правильную стыковку уже расшифрованных фрагментов ДНК. Кроме того, tandemные повторы сами очень трудно поддаются подобной расшифровке. Поэтому в геноме одного из видов круглого червя (нематоды) - первого многоклеточного организма, для которого удалось определить нуклеотидную последовательность ДНК, - уже осталось некоторое число неясных мест. Правда, их удельный вес составляет менее одной сотой процента от общей длины ДНК, и эти неясности не касаются генов или регуляторных элементов. Нуклеотидная же последовательность всех 19 099

генов этого червя, распределенных на площади в 97 миллионов пар оснований, была определена полностью.

Еще больший успех связан с расшифровкой генома дрозофилы, лишь в 2 раза уступающего по размеру ДНК человека и в 20 раз превосходящего ДНК нематоды. Несмотря на высокую степень генетической изученности дрозофилы, около 10% ее генов были до этого момента неизвестны. Но самым парадоксальным является тот факт, что у высоко организованной дрозофилы количество генов оказалось меньше, чем у микроскопического круглого червя! С современных биологических позиций это трудно объяснить.

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

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

Наиболее важным следствием расшифровки структуры генома определенного вида является возможность идентификации всех его генов и, соответственно, определения аминокислотной последовательности всех его белков. Таким образом, геномика создает фундамент для интенсивного развития новой науки - протеомики (протеин это синоним белка, его латинское название). Протеомика занимается изучением структуры и функции каждого белка; анализом белкового состава клетки; определением молекулярных основ функционирования отдельной клетки, являющегося результатом координированной работы многих тысяч белков, и исследованием формирования фенотипического признака организма, являющегося результатом координированной работы миллиардов клеток.

Расшифровка структуры генома человека привела к сенсационному открытию. Оказалось, что в нашем геноме только 32 000 генов, что в несколько раз меньше количества белков. При этом белок-кодирующих генов только 24 000, продуктом остальных генов являются молекулы РНК. Процент сходства по нуклеотидным последовательностям ДНК между разными индивидуумами, этническими группами и расами составил 99,9%. Это то, что делает нас *Homo sapiens*! Вся наша изменчивость на нуклеотидном уровне определяется 0,1%. Если сопоставить эти цифры с длиной молекулы ДНК, то окажется, что около 100 000 мутаций формируют эту изменчивость. Примерно 70% этих мутаций определяют наши индивидуальные непатологические особенности. Немногим менее 5% составляют мутации, серьезным образом нарушающие структуру и функции кодируемых белков или даже приводящие к их полному отсутствию. Именно эти мутации связаны с тяжелыми моногенными болезнями человека. Кроме того, широкое распространение в популяциях получили такие мутации, которые в относительно небольшой степени влияют на функции кодируемых белков. Эти мутации, которые получили название полиморфизмов, рассматривают как варианты нормы. Но именно они формируют наследственную предрасположенность к наиболее частым мультифакториальным болезням человека.

3. Разнообразие и структура моногенных заболеваний. Типы наследования. Возможности молекулярной диагностики мутаций. Профилактика моногенных заболеваний на базе пренатальной диагностики.

В основе развития моногенных наследственных заболеваний лежит повреждение одного гена. Количество подобных заболеваний достигает 4 - 5 тысяч. С клинической точки зрения это очень разные, в большинстве своем достаточно тяжелые, очень трудно поддающиеся лечению или даже неизлечимые болезни. Среди моногенных болезней значительный процент составляют врожденные пороки развития, различные формы умственной отсталости, неврологические болезни, дефекты слуха, зрения, многие варианты бесплодия, эндокринные болезни, нарушения системы свертывания крови и многое другое.

К счастью, подобные заболевания встречаются достаточно редко. Это объясняется двумя обстоятельствами. Далеко не все гены человека (а только

около 5%) связаны с моногенными заболеваниями. Кроме того, частоты распространения среди населения таких мутаций достаточно низки. Встречаемость среди новорожденных наиболее распространенных моногенных болезней, таких как муковисцидоз, фенилкетонурия, гемофилия, колеблется в пределах от 1:2000 до 1:10000. Основная масса моногенных болезней это более редкие состояния - $1:10^5$ - 10^6 . Большое разнообразие и редкость моногенных болезней делают очень дорогостоящей разработку специфических методов их диагностики и терапии. В разных странах эта проблема решается по-разному. Но наиболее эффективная помощь людям с моногенными заболеваниями оказывается там, где сильны родительские общества, привлекающие внимание общественности к таким больным и добивающиеся спонсорской и государственной поддержки соответствующих программ.

Наследование моногенных заболеваний осуществляется различным образом. И это зависит от двух обстоятельств: (1) является ли мутантный аллель доминантным или рецессивным и (2) где расположен мутантный ген - в одной из аутосом или в X-хромосоме. В соответствии с этим моногенные болезни делят на доминантные и рецессивные, а они, в свою очередь, могут быть аутосомными или X-сцепленными.

Профилактика моногенных заболеваний проводится на базе пренатальной диагностики. Заметим сразу, такой подход применим только в случае тяжелых неизлечимых болезней. К сожалению, пренатальная диагностика практически проводится только в тех семьях, где уже имеется больной ребенок. Целью ее является предотвращение повторного рождения в семье больного. Напомним, что у гетерозиготных родителей при каждой беременности сохраняется 25%-ный риск рождения больного ребенка, независимо от того, кто родился перед этим - больной или здоровый. Это очень высокий риск! Кроме того, этот риск повышен и у других родственников больного. Поэтому так важно проводить молекулярную диагностику не только самому больному, но и его родственникам, особенно тем, которые хотят иметь детей.

4. Мультифакториальные болезни. Цели и методы предиктивной медицины. Гены-кандидаты. Полиморфизмы генов. Генетические факторы риска.

Основной характеристикой мультифакториальных заболеваний является то, что на их развитие наряду с различными неблагоприятными факторами окружающей среды значительное влияние оказывают состояния десятков, а иногда и сотен генов. В отличие от моногенных болезней вклад каждого отдельного гена в развитие мультифакториального заболевания может быть относительно небольшим даже при значительном суммарном генетическом эффекте.

Поиск генов, мутации в которых определяют предрасположенность к тем или иным болезням, осуществляется по нескольким направлениям. Во-первых, кажется очевидным участие в этих процессах генов, формирующих защитные функции организма. Это в первую очередь гены иммунной системы, а также гены, продукты которых участвуют в обезвреживании и

выведении из организма токсических веществ, поступающих из внешней среды. Их так и называют: «гены окружающей среды». Дефектная работа подобных генов может приводить к развитию широкого спектра заболеваний. Не менее плодотворным оказывается путь поиска генов предрасположенности среди тех, продукты которых так или иначе связаны со специфическими патологическими процессами. На первое место здесь выступают наши знания о болезни. Какие системы в наибольшей степени страдают при том или ином заболевании? Какие белки участвуют в реализации нормальной работы этих систем? Какие «генные сети» ответственны за формирование этих систем и тех метаболических циклов, которые вовлечены в патологические процессы? Ответы на эти вопросы позволяют нам понять, какие гены оперируют в патологических метаболических циклах. И именно эти гены подвергаются дальнейшему анализу на предмет выявления в них полиморфных повреждающих мутаций. При обнаружении подобных мутаций на следующем этапе проводят оценку частот мутантных и нормальных аллелей в выборках больных и в контрольных группах. Полиморфный аллель рассматривается в качестве генетического фактора риска только в том случае, если он встречается у больных достоверно чаще, чем в норме.

Анализ генетических факторов риска может и должен проводиться задолго до появления клинических симптомов. Поэтому у врача может быть достаточно времени, чтобы постараться предотвратить развитие того заболевания, к которому у пациента имеется генетическая склонность. При этом профилактические мероприятия в первую очередь должны быть направлены на исключение или ограничение средовых факторов риска по развитию конкретного заболевания. Это является предметом нового направления профилактической медицины, так называемой предиктивной медицины.

5. Открытие генов человека. кДНК. Обратная генетика.

Открытие гена сопровождается изоляцией и клонированием его кодирующей области, так называемой молекулы комплементарной ДНК – кДНК. Для того чтобы определить, что такое кДНК, нужно вспомнить процесс транскрипции. Мы говорили, транскрипция это синтез молекулы РНК, комплементарной определенным участкам молекулы ДНК, то есть генам. А есть процесс обратной транскрипции, когда в качестве матрицы используется молекула РНК и с помощью определенного фермента, который так и называется – обратная транскриптаза – производится синтез молекул ДНК. Так, если взять какую-то специфическую молекулу мРНК и провести обратную транскрипцию получится очень важный класс молекул - кДНК. Вы помните, в мРНК уже нет интронов, и, проводя такой обратный синтез, можно получить молекулу ДНК, составленную из экзонов, то есть представляющую всю, как говорят полноразмерную кодирующую область гена. На следующем этапе молекулу кДНК клонируют. Клонирование это очень эффективный метод поддержания и размножения любых относительно небольших молекул ДНК путем их встраивания в вектор и введение этой

конструкции в клетки-хозяина. Вектора обеспечивают проникновение чужеродных ДНК в клетки, и их конструируют на базе тех молекул, которым свойственно проникать в клетки, то есть вирусных или плазмидных ДНК. В качестве клеток-хозяина чаще всего используют бактериальные клетки. Клонированную кДНК условно называют «ген в пробирке», и на этом этапе можно работать с геном как с веществом. Можно наращивать число копий гена путем размножения клеток-хозяина, одновременно могут быть обеспечены условия для его работы или экспрессии. Так например, при клонировании генов человека в бактериях можно добиться синтеза в них чужеродных для этих клеток белков человека. Такая возможность определяется универсальностью генетического кода, то есть одинаковым прочтением информации, записанной в молекулах ДНК, клетками любого видового происхождения. Клонирование лежит в основе всей генной инженерии.

На следующем этапе определяют нуклеотидную последовательность клонированной кДНК, то есть ее секвенируют. Это позволяет прогнозировать аминокислотную последовательность кодируемого белка и с использованием современных компьютерных технологий реконструировать не только его третичную структуру и доменную организацию, но и возможные функции. Эта методология получила название обратной генетики. Таким образом, важнейшим следствием завершения многих геномных проектов является возможность проведения анализа на белковый уровень. Переход от прогнозируемого или виртуального белка к реальному осуществляется за счет получения антител либо к искусственно синтезируемым полипептидам, гомологичным прогнозируемой полипептидной последовательности, либо к продукту экспрессии кДНК в клетках-хозяина. С помощью антител можно анализировать характер распределения этого белка *in vivo* в норме и при каких-то патологических состояниях, а также попытаться выделить его в препаративном количестве для прямого биохимического анализа и выявления тех метаболитов, которые взаимодействуют с этим белком. Что все это означает, если речь идет о заболевании в этиологии которого есть генетическая составляющая? Идентификация подобного белка означает нахождение первичного биохимического дефекта при данном заболевании. Выделение этого белка и его биохимический анализ означает расшифровку первичной патологической метаболической цепи или расшифровку молекулярных основ патогенеза заболевания. А это, в свою очередь, создает базис для разработки не симптоматических, а патогенетических методов лечения заболевания – одно из главнейших направлений современной молекулярной медицины.

6. Полимеразная цепная реакция. Цели использования. Необходимые реактивы. Принципы, последовательные этапы метода. Технические условия проведения реакции и ее достоинства.

Анализ состояния генов у отдельных индивидуумов стал возможен после разработки метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), называемой также специфической амплификацией ДНК. Изобретение этого метода,

удостоенное в 1993 году Нобелевской премии, оказало огромное влияние на развитие всей молекулярной генетики и явилось фундаментом для широкого внедрения этой методологии в медицинскую практику. Суть открытия заключается в том, что были разработаны условия для искусственного избирательного синтеза огромного числа копий небольшого фрагмента ДНК при использовании в качестве матрицы любой другой молекулы ДНК, которая может включать синтезируемую область. Небольшие размеры фрагмента и огромное количество копий позволяют использовать затем очень простые методы для детального анализа синтезированной ДНК, вплоть до определения ее нуклеотидной последовательности. ПЦР можно сравнить с очень мощным увеличительным стеклом, с помощью которого можно рассмотреть есть ли определенный очень небольшой участок в гигантской молекуле ДНК и как он устроен у конкретного индивидуума. Присутствуют ли в нем какие-нибудь мутации? При этом мы заранее знаем, какой именно участок хотим рассмотреть.

Для правильного автоматического выбора этого участка необходимо искусственно синтезировать две пары совсем небольших молекул ДНК - праймеров, соответствующих началу и концу синтезируемого фрагмента. А это значит, что нужно знать, с чего начинается и чем заканчивается этот фрагмент. Поэтому метод ПЦР может быть применен к анализу только таких ДНК, нуклеотидные последовательности которых уже известны.

Для того чтобы провести ПЦР, достаточно иметь ДНК исследуемого пациента, два типа праймеров, фермент, обеспечивающий комплементарный синтез ДНК (ДНК-полимеразу) и 4 типа молекул, являющихся предшественниками ДНК и состоящих из дезоксирибозы, фосфорной кислоты и одного из нуклеотидных оснований - А, Т, Г или С. В методическом отношении ПЦР очень проста. Вся реакция проводится в очень небольшом объеме, поэтому себестоимость диагностики с использованием ПЦР невелика. Она сопоставима со стоимостью обычного клинического анализа.

Большим достоинством ПЦР является то, что для ее проведения не требуется большого количества ДНК и можно ограничиться анализом даже одной молекулы. В качестве образцов ДНК, наряду с чистыми препаратами, могут использоваться высушенные на фильтровальной бумаге пятна крови, смывы из полости рта, луковицы корней волос и тому подобный материал. Поэтому применение ПЦР особенно эффективно в тех случаях, когда имеется очень мало биологического материала для анализа, то есть в пренатальной диагностике, включая доимплантационную, при диагностике инфекций, а также в судебной медицине. Для анализа может использоваться также длительно хранившийся патологоанатомический материал. Молекулярный анализ такого материала может способствовать созданию условий для проведения пренатальной диагностики в тех семьях, в которых больной ребенок уже умер и не был при жизни обследован.

В настоящее время практически вся молекулярная диагностика основана на ПЦР. Единые методические подходы используются как для диагностики

моногенных заболеваний, так и для анализа генетической предрасположенности к мультифакториальным болезням. Различия будут только в выборе системы праймеров. Поэтому оправданным является создание унифицированных центров по молекулярной генетике человека, в которых одновременно может проводится ДНК-диагностика очень многих заболеваний.

7. Основные направления молекулярной медицины, состояние и перспективы развития.

Медицину можно определить как науку о болезнях, способах их диагностики, предупреждения и лечения. Молекулярная медицина это та ее часть, которая занимается изучением молекулярных механизмов, лежащих в основе возникновения и развития патологических процессов в организме человека. Подобные процессы могут явиться результатом генетических дефектов и/или могут быть индуцированы действием неблагоприятных внешних факторов. Важнейшей задачей молекулярной медицины является разработка патогенетических методов диагностики, профилактики и лечения, то есть таких методов, которые направлены на поиск и коррекцию первичных биохимических нарушений. Особенно хочется подчеркнуть профилактическую направленность молекулярной медицины, главной целью которой является более раннее досимптоматическое выявление лиц, имеющих генетическую предрасположенность к развитию того или иного заболевания, а также разработка методов предупреждения тех болезней, к которым человек имеет генетическую склонность.

Конечно, молекулярная медицина родилась не на пустом месте и в ней используется богатейший опыт, накопленный в различных разделах медицины и, прежде всего, в патофизиологии и патохимии. Однако очевидно, что огромные достижения последних десятилетий в молекулярной генетике человека и особенно в геномике и протеомике явились мощным стимулом для бурного развития не только теоретических направлений молекулярной медицины, но что особенно важно, ее практических аспектов. Можно без преувеличения сказать, что в настоящее время буквально у нас на глазах происходит не только рождение и становление этой новой науки, но и ее активное проникновение во все частные медицинские дисциплины.

Важнейшей задачей при изучении любой патологии является разработка методов диагностики заболевания и определения причины его возникновения, включая оценку вклада в патологический процесс генетических и средовых составляющих. Выявление тех метаболических циклов, которые нарушены или изменены при различных формах патологии, а также идентификация генов, мутации которых предопределяют развитие болезни или являются ее факторами риска, позволяют осуществить переход от организменного уровня анализа заболевания к молекулярному. Основной целью этого перехода является молекулярная идентификация всех участников патологических процессов от белков, оперирующих в патологических метаболических циклах, до генов и нахождение среди них первичных дефектов. До геномной эры эти задачи решались очень трудно и

только для относительно небольшого числа болезней были известны первичные биохимические дефекты. При этом в каждом частном случае подобный анализ требовал разработки специфических биохимических подходов, часто достаточно трудоемких и дорогостоящих.

Открытие огромного числа генов человека, сопровождающееся идентификацией кодируемых этими генами белков, детальное молекулярное описание многих болезнетворных микроорганизмов, а также разработка методов ДНК-диагностики, позволяющих тестировать состояние генов или иных элементов генома у отдельных индивидуумов, коренным образом изменили эту ситуацию. В настоящее время использование методологии молекулярного анализа стало возможным не только для многих сотен моногенных болезней, но и для подавляющего большинства наиболее распространенных мультифакториальных, а также инфекционных болезней человека.

Одним из основных инструментов молекулярной медицины является ДНК-диагностика. Она выполняется с использованием стандартного набора методов, главным из которых служит полимеразная цепная реакция - ПЦР.

В настоящее время подобная молекулярная диагностика принципиально возможна примерно для 1000 моногенных заболеваний. Подчеркнем еще раз, что для ее проведения необходима молекулярная идентификация гена, ответственного за развитие заболевания. Диагностика мутаций является самым объективным, а иногда и единственным критерием определенного моногенного заболевания. Она может проводится на любых стадиях развития, начиная с момента зачатия ребенка, и не зависит от времени появления первых симптомов заболевания. Таким образом, методы молекулярно-генетического анализа активно используются при диагностике моногенных болезней, включая пренатальную и досимптоматическую диагностику.

Но еще более широкое распространение получила ДНК-диагностика при исследовании наследственной предрасположенности к наиболее частым мультифакториальным болезням человека. В настоящее во всем мире проводятся широкие комплексные исследования, в которые вовлечены десятки тысяч людей. Формируются группы больных по самым разным широко распространенным заболеваниям и контрольные группы. В каждой из них проводится тестирование различных полиморфных аллелей десятков генов - таких генов, которые предположительно могут иметь отношение к развитию заболевания. При этом для анализа выбирают те полиморфные аллели, которые оказывают повреждающее влияние на функцию кодируемых белков. Одновременно в этих группах проводится учет и средовых факторов риска. При обнаружении достоверных различий по частотам аллелей в группе больных по сравнению с контролем эти аллели рассматривают, как генетические факторы риска. Количественная оценка степени различия в частотах аллелей позволяет судить о вкладе того или иного гена в риск развития заболевания. На следующем этапе с использованием методов многомерной статистики проводят анализ вклада ген-генных, межсредовых

и ген-средовых взаимодействий. Получаемые в ходе этого анализа количественные оценки позволяют достаточно надежно прогнозировать риск развития заболевания при сочетании определенного генотипа по исследуемым генам с параметрами, характеризующими образ жизни человека.

Очень активно методы молекулярной генетики используются при анализе инфекционных заболеваний. Причем это касается не только разработки наиболее точных и высокочувствительных методов диагностики инфекций, основанных на ПЦР. Не менее важное значение имеют исследования геномов самих патогенных микроорганизмов и анализ молекулярных механизмов их взаимодействия с геномом человека. Организм человека является средой обитания для сотен видов бактерий и вирусов. С биологической точки зрения каждый из нас представляет собой целую систему сосуществующих организмов - симбионтов. Далеко не все из этих симбиотических микроорганизмов патогенные. Без некоторых видов бактерий человек просто не способен существовать и их утрата или снижение количества является причиной развития ряда тяжелых заболеваний. Расшифровка структуры геномов многих болезнетворных микроорганизмов с одновременной идентификацией всех белков, в том числе и вирулентных, является великолепной предпосылкой для разработки патогенетических методов предупреждения и лечения многих инфекционных болезней. Однако нужно отдавать себе отчет, что во многих случаях эта задача является очень непростой. Оказалось, что геномы многих паразитирующих микроорганизмов обладают огромной пластичностью и имеются значительные структурные различия между штаммами бактерий, обитающими в разных частях нашего организма.

Метод ПЦР используется и в судебной медицине. Он лежит в основе геномной дактилоскопии - идентификации личности на основе молекулярного анализа высоко изменчивых маркерных участков ДНК, таких, например, как полиморфные нейтральные однонуклеотидные замены или переменные микросателлитные повторы. Одинаковый характер маркерных аллелей у человека, подозреваемого в совершении преступления, и в образцах биологического материала, оставленного на месте совершения преступления, может интерпретироваться, как доказательство вины. Причем для проведения подобного анализа годится любой биологический материал, будь то пятна крови, кусочки кожи, волосы или сперматозоиды при изнасиловании. По точности заключения геномная дактилоскопия не уступает обычному дактилоскопическому анализу, но не всегда преступник оставляет отпечатки пальцев на месте совершения преступления. Этот же метод может быть использован для установления отцовства или идентификации останков погибших людей. В последнем случае необходимо обследование ближайших родственников предполагаемого погибшего.

8. Проблема генетической паспортизации

Идентификация огромного количества генов человека и присутствие в геноме большого числа полиморфных мутаций, формирующих наши

индивидуальные особенности, в том числе предрасположенности к широко распространенным болезням, в сочетании с разработкой высокоэффективных и простых методов тестирования аллельного состояния генов делают реальной перспективу генетической паспартизации населения. Под генетическим паспортом мы понимаем набор сведений, касающихся аллельного состояния группы генов и/или маркерных локусов у определенного индивидуума. Прежде всего определим некоторые этические условия, соблюдение которых является обязательной предпосылкой для начала этой работы. Это добровольное согласие индивидуума на проведение тестирования, полная конфиденциальность полученных результатов и право личной собственности тестируемого индивидуума на все результаты.

Зачем нужен генетический паспорт и какие гены при этом необходимо тестировать? Эти два вопроса неразрывно связаны между собой и выбор тестируемых генов в значительной степени определяется целью паспартизации. Еще одно очень важное обстоятельство, которое нужно учитывать, заключается в том, что по экономическим соображениям набор тестируемых генов не должен быть слишком большим. Он может быть ограничен десятком или несколькими десятками позиций. Поэтому на первое место при составлении генетического паспорта выдвигается задача оптимального подбора тестируемых генов. Очевидно, что генетический паспорт не может быть унифицированным, одинаковым для всех людей. При решении вопроса о том, какой паспорт нужен тому или иному человеку, необходимо учитывать его пол, возраст, национальность, состояние здоровья, образ жизни, данные семейного анамнеза, финансовые возможности и возможно, другие параметры.

Вот один из самых простых примеров. Предположим, что генетический паспорт необходим человеку, отправляющемуся на войну или другое опасное для жизни мероприятие и заботящемуся о том, чтобы в случае смерти его останки были надежно идентифицированы. Для составления подобного паспорта необходимо провести индивидуальное тестирование ряда высоко изменчивых маркерных локусов. При выборе набора маркеров нужно учесть национальность индивидуума, так как уровень изменчивости маркерных локусов в разных этнических группах может быть различен.

Другой пример. Человек хочет выбрать профессию, при которой у него будет вероятность соприкосновения с определенными токсическими соединениями. В какой степени он устойчив к болезням, индуцируемым этими веществами? Для ответа на этот вопрос необходимо провести тестирование генов, кодирующих ферменты системы детоксикации. В том случае, если он окажется носителем аллелей, снижающих активность этой системы, работа с вредными веществами будет ему категорически противопоказана. Врачу инфекционисту необходимо тестировать состояние генов, участвующих в формировании иммунной системы, а врачу наркологу необходимо поинтересоваться, имеет ли он наследственную устойчивость к ВИЧ-инфекции. Человеку не следует заниматься спортом или иметь большие физические нагрузки, если он является носителем аллелей,

предрасполагающих к раннему инфаркту. Парадокс заключается в том, что до определенного времени такие люди способны выдерживать повышенные физические нагрузки и показывают наилучшие результаты в спорте. Подобных примеров можно приводить еще очень много.

Ну а если к врачу обращается здоровый молодой человек, интересующийся состоянием своих генов и желающий знать, какие болезни могут ожидать его в будущем и как предотвратить их развитие? Что можно посоветовать в этом случае? Прежде всего, нужно составить его родословную и посмотреть, чем болели его родственники? Очевидно, что определение носительства рецессивных мутантных аллелей, связанных с моногенными болезнями, может быть рекомендовано только в том случае, если в семье имеются подобные больные или заболевание с высокой частотой встречается среди людей той этнической группы или того географического ареала, к которой принадлежит или в котором проживает обследуемый. Если среди родственников обследуемого присутствует более одного пациента с однотипным хроническим заболеванием, необходимо проанализировать аллельное состояние генов той «генной сети», которая может иметь отношение к развитию данного мультифакториального заболевания. Причем лучше на первом этапе провести обследование самих больных, а затем посмотреть, есть ли выявленные у больных функционально неполноценные аллели у их здорового родственника. Затем нужно поинтересоваться профессией и образом жизни обследуемого и выявить средовые патогенные факторы риска. Если такие факторы обнаружатся, то на следующем этапе необходимо провести тестирование генов, которые могут иметь отношение к развитию патологии, индуцируемой именно этими средовыми факторами. Например, если обследуемый окажется злостным курильщиком, необходимо провести молекулярный анализ генов, имеющих отношение к легочной патологии и, прежде всего, к раку легких. Но как поступить в том случае, если в семье все здоровы и не выявляется определенных средовых факторов риска. В этом случае можно рекомендовать (1) анализ генов, нарушение работы которых может быть фактором риска по развитию широкого спектра заболеваний, таких как гены «окружающей среды», иммунной системы и т.п. и (2) анализ генов, дефектная работа которых предрасполагает к наиболее частым болезням, таким как сердечно-сосудистая патология, диабет, онкологические заболевания и т. д. Что именно из этого выбрать или провести обследование по полной программе, это должен решать сам обследуемый, исходя из своих финансовых возможностей.

Независимо от нашего отношения к проблеме генетической паспортизации работы в этом направлении уже начались. Они получили финансовую поддержку в некоторых штатах США, в Финляндии, большие средства на генетическое тестирование всего населения выделены правительством Эстонии. Однако по многим прогнозам в развитых странах мира рутинной эта работа станет не раньше чем через 10-30 лет.

9. Молекулярные основы канцерогенеза. Доминантные онкогены и гены-супрессоры опухолей. Роль геномной нестабильности в развитии неопластического процесса.

Нарушения в работе генов имеют непосредственное отношение к развитию самого тяжелого недуга человечества - рака. В 5-10% случаев можно проследить семейный характер онкологических заболеваний, то есть присутствие в семье не одного, а несколько больных. Не вызывает сомнения также участие в индукции опухолевого роста неблагоприятных факторов среды, таких как повышенные дозы радиации, действие ряда вирусов и многих химических соединений, относящихся к классу канцерогенов. Однако в подавляющем большинстве случаев онкологические заболевания не носят характер наследственных болезней и причины возникновения опухолей остаются неизвестными. Это так называемые спорадические случаи. Тем не менее, в настоящее время можно считать доказанным, что возникновению и развитию злокачественного роста предшествует накопление мутаций в определенных генах в тех тканях, которые вовлекаются в онкологический процесс. Эти гены, число которых в геноме человека составляет несколько сотен, в своей нормальной форме носят название протоонкогенов, а в измененной мутантной форме называются онкогенами. При семейных формах раков мутации в онкогенах присутствуют во всех клетках больных, в том числе и в зародышевых, и они могут передаваться по наследству. При индуцированных и спорадических формах раков мутации в онкогенах обнаруживаются только в опухолевых тканях и они не наследуются.

Целый ряд фундаментальных фактов свидетельствует о ключевой роли повреждений молекул ДНК в развитии опухолевого процесса. Наиболее значимыми из них являются следующие: (1) наличие большого числа хромосомных перестроек и мутаций в опухолевых тканях больных и в культивируемых линиях раковых клеток, (2) существование семейных форм раков, в этиологии которых четко прослеживаются наследственные компоненты, (3) практически полное совпадение класса химических веществ и физических воздействий, обладающих одновременно мутагенным (вызывающим мутации, повреждения молекул ДНК) и канцерогенным эффектами, (4) онкогенное действие ряда вирусов, способных взаимодействовать с геномом клеток-хозяина и встраиваться в молекулы ДНК. Но не весь вирус ответствен за индукцию опухолевого роста, а лишь определенные его гены, получившие название вирусных онкогенов.

Мощным толчком для развития всей молекулярной онкологии явилось открытие того факта, что в геноме человека присутствуют последовательности, гомологичные онкогенам вирусов. Оказалось, что эти гены человека сами обладают онкогенной активностью и, будучи выделены из опухолевых клеток человека, способны вызывать развитие опухолей у экспериментальных животных и превращать нормальные культивируемые линии клеток в раковые. Они получили название клеточных онкогенов. Именно эти гены часто обнаруживаются в местах разрывов хромосом в тех специфических структурных перестройках, которые в большом проценте

случаев присутствуют в раковых линиях клеток и в клетках опухолевых тканей больных. Продуктами этих генов являются белки, участвующие в контроле регуляции деления клеток.

Деление клетки находится под очень сложным контролем системы позитивных и негативных регуляторов. К позитивным регуляторам роста относятся биологические молекулы, способные индуцировать деление клетки. Класс негативных регуляторов роста составляют молекулы, препятствующие делению клетки. В процессе эволюции были выработаны мощные механизмы, направленные как на сохранение генетической стабильности, так и на поддержание равновесия между действием двух систем регуляции деления клетки. Нарушение этого равновесия является причиной развития патологических процессов, сопровождающих злокачественный рост. Оказалось, что онкогены также разделяются на два класса, как по характеру своего действия, так и по типам кодируемых белков. К первому классу относятся доминантные протоонкогены, значительная часть которых была идентифицирована по гомологии с вирусными онкогенами. Из самого названия этих генов следует, что их канцерогенный эффект может проявиться при наличии мутации в гетерозиготном состоянии. Однако основным свойством доминантных протоонкогенов является то, что их продукты, как правило, относятся к системе позитивных регуляторов роста и деления клетки.

Значительно позже был открыт второй класс рецессивных онкогенов или супрессоров опухолей, иногда называемых антионкогенами. Рецессивные онкогены кодируют белки, относящиеся к системе негативных компонентов регуляции клеточного роста. Канцерогенный эффект рецессивных онкогенов может проявиться лишь при наличии гомозиготных мутаций, полностью нарушающих их функции.

Для чего нужно изучать, какова молекулярная основа развития опухоли и какие гены изменены в тех или иных опухолях? Ответы на эти вопросы имеют определяющее значение для составления обоснованных прогнозов в отношении развития опухолевого процесса у конкретного больного и выбора тактики его лечения. До сих пор лечение злокачественных новообразований проводится без учета молекулярных основ их этиологии и патогенеза.

10. Генетические основы старения

Нет сомнения в том, что процесс старения и средняя продолжительность жизни организмов любого вида генетически детерминированы. Сбой в работе этой системы может приводить к преждевременному старению. Хорошо известно, что при старении повышается доля клеток со структурными и числовыми аномалиями хромосом. Кроме того, по видимому, страдает система энергообеспечения клеток, так как с возрастом в них накапливаются дефектные митохондрии, не имеющие около двух третей своей ДНК. У человека описано несколько тяжелых, но к счастью очень редких наследственных синдромов, при которых старение и ранняя смерть наступают уже в детском или в

юношеском возрасте. Показано, что при некоторых из них дефектной оказывается система, направленная на поддержание стабильности ДНК.

Но как реально осуществляется генетический контроль над продолжительностью жизни и происходят ли какие то системные изменения в генах при старении? Дать полный ответ на эти вопросы в настоящее время не представляется возможным, но один из ключевых механизмов старения клетки уже расшифрован. Он связан с неполным воспроизводством молекулы ДНК, происходящем при каждом цикле деления клетки. Но опишем все по порядку. Хорошо известен тот факт, что в условиях искусственного культивирования нормальные соматические клетки могут делиться лишь ограниченное число раз. Причем, чем от более пожилого индивидуума взяты клетки, тем меньшее количество раз они могут делиться в культуре. Так, клетки новорожденных могут делиться 80-90 раз, тогда как клетки 70-летнего человека - не более 20-30 раз. Затем резко нарушаются процессы обмена и воспроизводства ДНК в клетках, они «дряхлеют» и погибают. В тоже время клетки ранних зародышей и, особенно, раковые клетки можно поддерживать в культуре неограниченно долго. Еще в начале 70-ых годов было высказано предположение, что ограниченная продолжительность жизни клеток обусловлена неполным воспроизводством ДНК каждой хромосомы, происходящем при их удвоении. Эта гениальная гипотеза спустя почти четверть века нашла блестящее экспериментальное подтверждение.

Действительно, при делении клеток в дочерних нитях ДНК недосинтезируется около 10-20 нуклеотидов, расположенных на концах каждой хромосомы. Таким образом, при каждом цикле деления хромосомы немного укорачиваются. Но что расположено на концах хромосом? Еще в 30-ые годы была выявлена необычная роль концевых участков хромосом, названных теломерами. Было показано, что теломерные участки предотвращают деградацию хромосом и их слияние, а также участвуют в прикреплении хромосом к цитоскелету ядра, обеспечивая тем самым их упорядоченное внутриядерное расположение. Молекулярный анализ показал, что теломерные области хромосом не содержат генов, но составлены из tandemно повторяющихся высоко консервативных минисателлитных последовательностей. У позвоночных это блоки из ТТАГГГ-последовательностей. Количество этих блоков различно у разных видов. У человека оно колеблется в пределах от 2 тысяч до 20 тысяч нуклеотидов. Таким образом, при делении клетки происходит сокращение количества ТТАГГГ-блоков. Это сокращение до определенного предела не оказывает влияния на жизнеспособность клетки. Но существует определенный предел, за границей которого дальнейшее укорочение теломер нарушает их функцию и, возможно, функции генов, расположенных в непосредственной близости от теломер. Это и приводит к резкому старению и гибели клетки.

Оказалось, что в зародышевых клетках, а также в различных типах стволовых клеток, дающих начало постоянно возобновляющимся клеткам крови, кожи, слизистой, существует механизм «омоложения» теломер. При

каждом делении происходит восстановление недосинтезированного участка теломеры с помощью определенного ферментативного комплекса, получившего название теломеразы. В половых клетках теломеразы обладает наивысшей активностью и длина теломеры составляет от 15 до 20 тысяч нуклеотидов. В соматических клетках активность теломеразы полностью отсутствует, длина теломеры при рождении составляет от 10 до 12 тысяч нуклеотидов и с возрастом она сокращается. А вот в раковых клетках, хотя длина теломеры может быть относительно небольшой, вторично появляется теломеразная активность, что и обеспечивает «бессмертие» этих клеток при культивировании. Небольшой размер теломеры в раковых клетках может быть причиной многих метаболических нарушений, которые в свою очередь могут приводить к генетической нестабильности, так характерной для злокачественного роста. Попутно отметим, что разработка способов избирательного подавления теломеразной активности в раковых клетках является одним из современных направлений в противораковой терапии.

Ключевая роль теломеразы в обеспечении «бессмертия» клеток была подтверждена в прямых экспериментах. Восстановление методами генной инженерии теломеразной активности в нормальных соматических клетках существенно продлевало их жизнь в условиях культивирования. Очень интересной представляется гипотеза о том, что потеря теломеразной активности в дифференцированных клетках - это эволюционное приобретение, уберегающее нас от раковых заболеваний. Поэтому с большой осторожностью нужно относиться к таким способам борьбы со старостью, которые основаны на активизации в соматических клетках теломеразной активности. В то же время такая возможность не исключена для отдельных тканей, преждевременное старение которых может быть причиной серьезных заболеваний, таких, например, как сетчатка глаза, частое помутнение которой у пожилых людей может приводить к серьезным дефектам зрения.

Мы разобрали только один из генетических механизмов старения. Обсуждая эту тему, следует, конечно, упомянуть о том, что существует нормальный физиологический механизм программированной гибели клеток - апоптоз. Без этого развитие организма и формирование органов были бы просто невозможны. Апоптоз сопровождается характерными морфологическими изменениями, прежде всего фрагментацией хромосом. Смерть в результате старения удаляет из популяции особей, уже не участвующих в воспроизводстве. Это очень важный биологический процесс, направленный на поддержание генетического разнообразия и обеспечения тем самым общей жизнеспособности вида. Известно, что при старении меняется характер работы 1-2% всех генов. Примерно четверть из этих генов связана с регуляцией клеточного цикла. Но если при раке уровень экспрессии этих генов повышается, то при старении он, наоборот, понижается. Изменяется также характер работы генов, обеспечивающих устойчивость организма к стрессовым воздействиям. Очевидно, что старение сопровождается изменением огромного количества биохимических реакций в клетке, не говоря уже об организме, в целом. В реализации старения

участвует множество молекулярных механизмов, большинство из которых нам еще неизвестны.

В этой связи интересен накопленный в геронтологии опыт терапии биорегулирующими пептидами. Оказалось, что относительно короткие последовательности аминокислот - пептиды - способны затормозить процессы старения, причем их эффект обладает выраженной тканеспецифичностью. Более того, назначение комплекса пептидных биорегуляторов, может предотвратить развитие даже таких старческих заболеваний, к которым у пациента имеется генетическая склонность. Не исключено, что специфические пептиды способны влиять на характер экспрессии генов, чем и может в определенной степени объясняться их эффект. Это лишь один из примеров профилактического направления молекулярной медицины.

11. Генотерапия наследственных и онкологических заболеваний. Структура генотерапевтических проектов. Генотерапия наследственного иммунодефицита, обусловленного ADA-недостаточностью

Наиболее перспективным современным направлением развития молекулярной медицины является генотерапия - лечение путем направленного введения в клетки нуклеиновых кислот. Конечно, в значительной степени генотерапия это технология будущего, но для тех тысяч пациентов, которые уже сейчас вовлечены в клинические испытания генотерапевтических методов лечения, это технология настоящего. До недавнего времени генотерапия развивалась как чисто теоретическая дисциплина. Предполагалось, что генотерапия будет направлена на лечение наследственных и, в первую очередь, моногенных заболеваний и при ее проведении будет исправляться генный дефект в ранних зародышах или даже в зародышевых клетках. Принципиальная возможность такого подхода многократно доказана на экспериментальных животных и, в частности, на генетических линиях мышей, моделирующих различные наследственные болезни человека. В результате введения определенных генетических конструкций в ранние зародыши мышей с последующей пересадкой их донорским самкам можно получить животное, не несущее дефектов, характерных для данной генетической линии. Однако в этих опытах было одновременно показано, что слишком дорогой ценой дается такое лечение. Проводя такие процедуры, мы можем пожертвовать десятью - двадцатью зародышами мышей ради исправления дефекта у одного. На человеке это невозможно. Кроме того, в настоящее время еще не достаточно хорошо разработаны методы направленного введения генетического материала в нужное место генома, а встраивание чужеродной ДНК в несвойственную для нее область может приводить к дестабилизации этой области и реализоваться в виде повышенной частоты возникновения мутаций в потомстве выведенного таким образом мышонка. С другой стороны, попадание введенного гена в область онкогена может индуцировать развитие опухолей, что также в определенном проценте

случаев хорошо прослеживается в эксперименте. Поэтому реальное развитие генотерапии у человека пошло по иному пути. Проводится не зародышевая, а соматическая генотерапия, то есть гены вводятся в те соматические клетки, которые вовлечены в патологический процесс, которые наиболее дефектны, в наибольшей степени страдают при том или ином заболевании. Подобные манипуляции с зародышевыми клетками человека не ведутся, так как неконтролируемые последствия от таких введений могут сказаться в будущих поколениях. Считается, что в настоящее время наш уровень знаний о структуре генома еще недостаточен для проведения генетических манипуляций с зародышевыми клетками человека и вмешательства тем самым в судьбу наших отдаленных потомков. Неожиданным оказалось и то, что генотерапия, которая разрабатывалась специально применительно к лечению наследственных болезней, в большей степени используется для лечения ненаследственных, в первую очередь, онкологических заболеваний, вирусных инфекций и многих других патологических состояний. Более 80% утвержденных для клинических испытаний генотерапевтических проектов связано с лечением онкологических заболеваний.

Разработка и клинические испытания программ генной терапии требуют серьезной финансовой поддержки и эти исследования проводятся лишь в нескольких экономически развитых странах, в первую очередь в США. В этой стране существует достаточно жесткое законодательство, не позволяющее проводить эксперименты на людях. И любая генотерапевтическая программа может быть допущена до стадии клинических испытаний только после ее рассмотрения и утверждения специальными комитетами. Что входит в программу генотерапии? Прежде всего, необходимо доказать, почему именно это заболевание необходимо лечить с помощью генов и какие существуют альтернативные методы лечения? Почему этот пациент или пациенты отобраны для клинических испытаний? Какой генетический материал предполагается вводить пациенту - один ген, его фрагмент или несколько генов и почему? В какие клетки пациента должен попасть вводимый генетический материал? Проводя соматическую генную терапию, нельзя модифицировать все клетки пациента, так какие же клетки достаточно модифицировать? Каким способом будет вводиться генетический материал? Все способы введения ДНК в клетки условно можно разделить на биологические, физические и химические. Наиболее часто употребляется биологический способ введения, основанный на использовании векторов. Вектора конструируют на базе биологических молекул, которым свойственно проникать внутрь клетки. Это прежде всего вирусные ДНК и РНК. При конструировании вектора стараются удалить гены вирусов, с тем чтобы вектор не действовал как инфекционная частица, и присоединить к оставшейся молекуле вводимую ДНК. Физические способы основаны на механическом введении экзогенных ДНК. Одним из них является бомбардировка клеток металлическими частицами с «пришитыми» к ним молекулами ДНК с помощью определенных установок, которые так и

называются - «генные ружья». Химические способы используют пассивное проникновение ДНК с помощью частиц, которые могут захватываться клетками. Все перечисленные способы введения имеют свои преимущества и недостатки. Так какой способ введения выбирается в рассматриваемой программе и почему? Как обеспечить адресность доставки генетического материала и его попадание в нужный тип клеток? Какое количество клеток необходимо модифицировать, для того чтобы получить клинический эффект? Как контролировать попадание генетического материала в нужный тип клеток? Как обеспечить устойчивость введенной ДНК и ее работу в клетке? Как длительно введенная ДНК должна работать? С какой периодичностью необходимо вводить генетический материал? И наконец, какой ожидается клинический эффект, а также какие нежелательные побочные эффекты при этом возможны? Решение каждого из перечисленных вопросов требует проведения большого числа экспериментов на культурах клеток и на животных. И только в том случае, если эти эксперименты окажутся успешными, может быть получено разрешение на проведение клинических испытаний. Несмотря на такие строгие ограничения, уже около 400 генотерапевтических проектов либо достигли стадии клинических испытаний, либо находятся на стадии утверждения.

Первое успешное лечение методами генотерапии было осуществлено немногим более 10 лет тому назад в США в отношении одной из моногенных форм наследственного иммунодефицита, обусловленного недостаточностью фермента аденозиндезаминазы (ADA). При отсутствии этого фермента в крови пациентов накапливается промежуточный метаболит, который препятствует нормальному созреванию Т- и В-лимфоцитов, что и приводит к развитию сложного, комбинированного иммунодефицита. Дети с недостаточностью по аденозиндезаминазе не выдерживают соприкосновения ни с какими инфекциями. Напомним, что окружающий нас мир буквально насыщен болезнетворными и паразитирующими бактериями, вирусами, патогенными грибами. Дети с дефектной иммунной системой могут существовать только в условиях стерильного бокса. Та терапия, которая применялась в отношении детей с недостаточностью по аденозиндезаминазе, это либо введение высоких доз фермента (ADA), либо пересадки клеток костного мозга от совместимых доноров. Обе эти процедуры не дают длительного эффекта. Кроме того, очень трудно подбирать совместимых доноров для подобных пересадок.

Четырехлетней девочке, страдающей этим редким (1:100000) аутосомно-рецессивным заболеванием, были пересажены ее собственные лимфоциты, в которые предварительно в условиях культивирования вводили в составе ретровирусного вектора нормальный ген ADA и маркерный бактериальный ген нео, обеспечивающий устойчивость модифицированных клеток к антибиотику неомицину и, следовательно, возможность их отбора на селективной среде, содержащей этот антибиотик. Лечебный эффект наблюдали в течение нескольких месяцев, после

чего процедуру повторяли с интервалом в 3-5 месяцев. На протяжении трех лет терапии в общей сложности было проведено 23 внутривенных трансфузии ADA-трансформированных Т-лимфоцитов без видимых неблагоприятных эффектов. В результате лечения состояние пациентки настолько улучшилось, что она смогла вести нормальный образ жизни и не бояться случайных инфекций. Столь же успешным оказалось лечение и других подобных пациентов, проводимое в США, Италии, Франции, Великобритании и Японии. Программа генотерапевтического лечения недостаточности по ADA модифицирована в настоящее время таким образом, что не в зрелые Т-лимфоциты, а в их предшественники, в стволовые клетки костного мозга вводится генетическая конструкция, содержащая нормальный ген ADA. При этих условиях получают более пролонгированный эффект от каждой процедуры реинфузии. В развитых странах все дети с диагнозом недостаточности по ADA находятся на генотерапевтическом лечении. Недавно появилось сообщение о том, что первые пациенты с данной формой иммунодефицита, участвующие в клинических испытаниях программы генотерапии, имеют настолько хороший иммунологический статус, что уже в течение нескольких лет не нуждаются в повторных реинфузиях модифицированных клеток. Начаты клинические испытания генотерапии семейной гиперхолестеринемии, муковисцидоза, гемофилии В, болезни Гоше. В отношении нескольких десятков других моногенных заболеваний медицинские протоколы клинических испытаний находятся на стадии утверждения.

Целый комплекс программ генной терапии предложен для лечения злокачественных опухолей. В ряде этих программ используется целенаправленное введение в опухолевые ткани "генов-самоубийц", продукция которых обладает цитотоксическим эффектом. Наиболее перспективными в этом плане считаются так называемые условно-летальные гены, кодирующие белки, которые сами по себе не являются токсичными для клеток, но при взаимодействии с каким-либо веществом могут вызывать их разрушение. Таким является ген тимидинкиназы вируса герпеса, так как тимидинкиназа обладает цитотоксическим эффектом только при взаимодействии с противовирусным препаратом - ганцикловиром. Таким образом, можно прицельно ввести ген тимидинкиназы вируса герпеса в опухолевые клетки пациента, убедиться, что этот ген там присутствует и работает и после этого назначить больному ганцикловир. В результате будут разрушены генетически модифицированные опухолевые клетки больного, то есть произойдет своеобразное «вырезание» опухоли без ножа. Некоторые схемы генотерапии опухолей основаны на стимуляции с помощью генов противоопухолевого иммунитета. Во многих случаях генотерапия не исключает использования традиционных методов лечения злокачественных новообразований, но является очень мощным дополнительным средством. Так, перспективными для генотерапии опухолей считаются гены множественной лекарственной устойчивости, повышающие резистентность клеток к широкому спектру химических

препаратов. Предварительное введение подобных генов в стволовые клетки костного мозга пациентов позволяет увеличивать дозы химиотерапевтических препаратов, применяемых при лечении опухолей. На фоне введения генов, обладающих радиопротективным эффектом, удастся проводить более массивную лучевую терапию.

Основная сложность на пути развития и широкого практического внедрения программ соматической генотерапии связана с необходимостью проведения многократных повторных процедур генетической модификации. При этом во многих случаях могут возникнуть реакции иммунологического отторжения на вводимые конструкции. Наибольшей эффективностью введения экзогенных ДНК обладают векторные молекулы, которые в ряде случаев могут обеспечить возможность длительного присутствия и работы вводимых генов за счет их интеграции с геномом хозяина. Однако сами вектора не являются полностью безопасными и в редких случаях могут приводить к вспышкам инфекций, значительно усложняющим состояние больного. Поэтому очень интенсивно в последнее время разрабатываются методы направленной модификации генетических дефектов с помощью коротких односторонних последовательностей ДНК или РНК. Такие последовательности могут замещать дефектное место за счет гомологичной рекомбинации. Основная трудность данной методологии заключается в низкой частоте подобных событий в клетках млекопитающих и в том числе в клетках человека. Повышение эффективности гомологичной рекомбинации за счет, например, временной гиперпродукции специфических ферментов, катализирующих этот процесс, или за счет изменения каких-то других условий реакции рассматривается в настоящее время как один из перспективных путей генной терапии. Существуют и другие достаточно перспективные научные направления современной генотерапии. Однако в целом генотерапию можно рассматривать как одно из наиболее перспективных направлений молекулярной медицины будущего.

12. Гено-инженерные продукты. Перспективы использования.

Генетика оказала решающее влияние на развитие сельского хозяйства, а также на решение многих экологических проблем. Человечество достигло такой численности, что при сохранении прежних технологий в растениеводстве, в животноводстве, в микробном синтезе многие народы стояли бы уже на грани голодного вымирания. Хорошо известно, какой резкий скачок в продуктивности произошел при введении в производство гетерозисных сортов кукурузы или бройлерных цыплят. «Зеленая революция» в растениеводстве связана с выведением устойчивых к полеганию карликовых сортов многих зерновых культур. Это привело не только к значительному увеличению урожайности, но и к изменению технологии выращивания зерновых культур, отказа от экологически небезопасных химических препаратов, подавляющих рост стебля. Таких примеров можно приводить очень много. Но если раньше высокопродуктивные сорта получали в результате длительной селекции, то в настоящее время этот процесс может быть значительно ускорен за счет

возможности генно-инженерного введения нужных комбинаций аллелей в уже существующие производственные сорта. В частности, в настоящее время проводится работа по выведению карликовых сортов риса генно-инженерными методами. Очевидно, что те сорта сельскохозяйственных растений, в которые ген карликовости был искусственно введен, принципиально не будут отличаться от карликовых сортов, полученных в результате селекции. Этот пример показывает, что не должно быть никаких опасений при использовании продуктов, произведенных из подобных генно-инженерных сортов растений.

Развитие современной промышленной микробиологии также связано с успехами в области молекулярной генетики. С 80-х годов спектр продуктов микробного синтеза начал существенно расширяться за счет внедрения в область микробной биотехнологии методологии генной инженерии. Были сконструированы промышленные штаммы бактерий, продуцирующие несвойственные им биологические молекулы, прежде всего гормоны и ферменты высших организмов и в том числе человека. Биотехнология генно-инженерного производства лекарственных и других биологически активных препаратов, используемых, в частности, в качестве пищевых добавок, включает введение определенных генов животных или человека в бактериальные системы в составе векторных конструкций, обеспечивающих высокий уровень экспрессии этих генов. При наращивании бактериальной массы производится большое количество белкового продукта введенного гена. Этот белок затем изолируют из бактерий, очищают и используют в качестве необходимого препарата. С использованием методологии генетической инженерии удалось значительно повысить продуктивность промышленных микроорганизмов за счет введения дополнительных копий генов и/или регуляторных элементов, существенно влияющих на уровень генной активности. Таким же образом удалось видоизменить питательные потребности микроорганизмов и тем самым удешевить их производство. Принципиально изменилась схема селекции промышленных микроорганизмов, основанная не на поиске эффективных штаммов-продуцентов, а на введении генов, обеспечивающих эффективный синтез целевого продукта, в штаммы бактерий, приспособленные к условиям производства. Кроме того, в качестве промышленных продуцентов стали использовать не только микробные культуры, но и культуры клеток и тканей растительного и животного происхождения.

В 1982 году впервые было разрешено клиническое использование генно-инженерного продукта бактерий - человеческого инсулина. С тех пор зарегистрировано уже более 600 патентов на промышленные генно-инженерные микробные продуценты. Среди них лекарственные препараты, такие как интерфероны, интерлейкины и ростовые факторы иммунной системы; ростовые факторы и гормоны роста человека, способствующие ускоренному заживлению ран и лечению карликовости; антикоагулянты, эффективные при лечении тромботических заболеваний, инфарктов и инсультов; факторы свертывания крови и эритропоэтины, применяемые при

лечении болезней крови и почечной недостаточности; ряд вакцин, в том числе против гепатита В, моноклональные антитела, используемые в диагностических целях и для адресной доставки лекарственных препаратов; и многое другое. Все генно-инженерные лекарства проходят длительный период апробации, предшествующий клиническому использованию. И каких-либо побочных, нежелательных эффектов, связанных с особенностями их производства, до сих пор не зарегистрировано.

В последнее время широкое развитие получает так называемая «питательная» геномика. Хорошо понятен интерес врачей к составлению сбалансированных рационов питания. Учеными диетологами разработаны точные рекомендации, в которых указывается, во сколько раз нужно увеличить потребление того или иного микроэлемента или витамина, чтобы понизить риск онкологических, сердечно-сосудистых, респираторных и многих других заболеваний. И среди населения резко повысились требования к потреблению здоровой пищи, содержащей все необходимые ингредиенты в достаточном, но не в избыточном количестве и одновременно не содержащей токсических компонентов. Однако многие сельскохозяйственные культуры и получаемые из них продукты не несут или содержат недостаточное количество необходимых для человека аминокислот, микроэлементов, витаминов или гормонов. С другой стороны в этих продуктах в большом количестве могут содержаться вещества вредные или даже опасные для здоровья человека. Поэтому особое значение приобретают исследования геномов сельскохозяйственных растений, их биохимического состава, целиком зависящего от набора и структуры генов. И на одно из первых мест выдвигаются работы по биотехнологии переноса генов и конструирования на этой базе растений и животных с заранее определенной питательной ценностью. При этом в производственные сорта сельскохозяйственных продуцентов могут вводиться гены от видов, непригодных к пищевому использованию. И наоборот, из растений, не используемых, к примеру, в пищевом рационе сельскохозяйственных животных, могут удаляться гены, контролирующие образование тех токсических соединений, которые определяют их пищевую непригодность. На первый взгляд кажется, что в таком подходе нет ничего опасного. Ведь в конце концов в наш организм будут поступать не искусственно синтезированные, а природные вещества, к которым человек давно адаптировался на протяжении своей эволюции. Однако эффективность этого направления производства генно-инженерных продуктов зависит от многих вещей и в первую очередь от четкого понимания наших пищевых потребностей, метаболизма веществ, поступающих в наш организм с пищей, и влияния различных соединений на риск развития тех или иных заболеваний. Кроме того, необходимо иметь хорошие представления о метаболизме тех видов, которые мы используем для производства продуктов. Поскольку на многие из этих вопросов нет достаточно четких ответов, к генно-инженерному конструированию сортов растений и животных, обладающих заданной питательной ценностью, следует пока относиться с некоторой осторожностью.

13. Перспективы развития отечественной молекулярной медицины

Люди старших поколений хорошо помнят тот период в нашей истории, когда генетика и кибернетика были запрещены, объявлены лженауками, «продажными девками империализма». Парадокс заключается в том, что именно эти две науки в конце прошлого и в начале нынешнего тысячелетия определили новый виток цивилизации в истории человечества. Развитие кибернетики завершилось созданием глобальной компьютерной сети «Интернет». А прогресс в области генетики привел к полной или частичной расшифровке структуры геномов многих видов организмов и в том числе человека.

В период «царствования» Т. Д. Лысенко ученые, которые отстаивали свои научные убеждения в генетике, в лучшем случае лишались работы, а иногда и жизни. Последствия этого волюнтаризма драматическим образом сказались на всей отечественной науке и особенно на медицинской и сельскохозяйственной генетике. Достаточно сказать, что в подавляющем большинстве вузов соответствующих профилей преподавание генетики до сих пор проводится в курсе общей биологии и едва выходит за рамки школьной программы. В медицинских институтах студентов, как правило, не знакомят с наследственными болезнями человека и с вопросами медико-генетического консультирования, нет курсов по цитогенетике, по биохимической и молекулярной генетике, нет кафедр по медицинской генетике, явно недостаточно количество часов, отпускаемых на преподавание будущим врачам медицинской генетики и на их переподготовку в системе последипломного образования. Катастрофически не хватает преподавателей, способных вести эти предметы и владеющих современной информацией, касающейся молекулярных основ различных форм патологии. Отсутствуют учебники на русском языке по общим и частным вопросам молекулярной медицины. В последнее десятилетие в связи с ухудшением общей экономической обстановки резко сократилось финансирование проводившихся в стране фундаментальных исследований по молекулярной генетике, в том числе и по проекту «Геном человека». Вследствие этого образовался мощный поток миграции из страны молодых специалистов и ученых среднего поколения. Если во времена Лысенко ученым запрещали заниматься генетикой, то сейчас созданы такие условия, что они вынуждены уезжать за границу, чтобы заниматься научными исследованиями в области генетики. В стране осталось очень мало лабораторий, в которых имеется современное оборудование и достаточно ресурсов для финансового обеспечения научных исследований, не говоря уже о зарплате сотрудников, в десятки раз уступающей той, которую аналогичные специалисты - выходцы из нашей страны - получают в лабораториях США и Западной Европы.

Несмотря на то что наука в России переживает сейчас не лучшие времена, работы в области молекулярной медицины все же продолжают. Нужно отметить, что преподавание генетики сохранилось на прежнем высоком уровне во многих университетах, и это в равной степени относится к кафедрам медицинской генетики, молекулярной биологии и биофизики,

открытым в ряде медицинских университетов и академий, а также в некоторых технических вузах. Таким образом, имеется постоянный приток юных, хорошо подготовленных специалистов в соответствующие лаборатории, медико-генетические консультации и кабинеты. Фундаментальные исследования в области молекулярной генетики человека успешно продолжают в ряде институтов РАН, таких как московские институты молекулярной биологии, молекулярной генетики и общей генетики, Петербургский институт ядерной физики, Институт цитологии и генетики Новосибирска, Институт биохимии и генетики Уральского Научного Центра. Не менее успешно и с большей прикладной направленностью подобные исследования проводятся в институтах РАМН, прежде всего в Москве в Медико-Генетическом научном центре, в Эндокринологическом, Онкологическом и Кардиологическом научных центрах, в НИИ неврологии; в Петербурге в Институте акушерства и гинекологии, в НИИ экспериментальной медицины, в НИИ онкологии, а также в Институте биорегуляции и геронтологии; в Томске в НИИ медицинской генетики. Основная тяжесть практической работы по медицинской генетике лежит на медико-генетических консультациях и кабинетах, сеть которых создана по всей стране. В большинстве этих учреждений проводится цитогенетическая диагностика хромосомных болезней.

Молекулярная диагностика монгенных заболеваний, включая досимптоматическую и пренатальную диагностику, осуществляется в ряде лабораторий страны, находящихся в перечисленных выше институтах и центрах, в отношении таких заболеваний, как муковисцидоз, гемофилия А и В, фенилкетонурия, миодистрофия Дюшенна/Беккера, некоторые формы конечностно-поясной миодистрофии, миотоническая дистрофия, семейная гиперхолестеринемия, синдром Мартина-Белл, адрено-генитальный синдром, некоторые формы спинальных и невралгических амиотрофий, болезнь Вильсона-Коновалова, хорея Гентингтона, моногенные формы болезни Паркинсона и болезни Альцгеймера и другие.

Широко разворачиваются в настоящее время исследования, направленные на выявление и анализ генов предрасположенности, а также на разработку профилактических мероприятий в отношении групп лиц, имеющих повышенную генетическую склонность к развитию широко распространенных заболеваний. Наибольшее количество работ в этом направлении касается сердечно-сосудистой патологии, включая атеросклероз, гипертензию, инфаркт миокарда. С этой целью анализируются гены, участвующие в контроле липидного гомеостаза, состояния сосудистой стенки, в работе ренин-ангиотензиновой системы и системы свертывания крови. Последние из перечисленных генов анализируется также в связи с риском развития тромботических заболеваний, включая венозные и артериальные тромбозы и в том числе инсульт. На предрасположенность к этим заболеваниям также может оказывать влияние состояние стенки сосудов. С другой стороны, дефектная работа этих генов может формировать

генетический риск развития некоторых форм варикозного расширения вен. В ряде лабораторий активно исследуются гены, повреждения которых ответственны за развитие аутоиммунных заболеваний и в первую очередь диабета. В этих случаях важное значение имеет аллельное состояние генов комплекса гистосовместимости (HLA). Но совершенно иная группа генов участвует в определении риска развития наиболее тяжелых сосудистых осложнений при диабете, таких как нефропатия и ретинопатия. Начаты работы по определению генетической предрасположенности к бронхиальной астме и атопии. Здесь на первое место выступают гены иммунной системы, а также гены, определяющие секреторные функции клеток бронхов и легких. Существенное модифицирующее влияние на эти заболевания могут оказывать гены системы детоксикации ксенобиотиков. Но состояния этих генов не являются специфическими факторами риска. Они могут влиять на очень разные болезни, такие, например, как эндометриоз и остеопороз. При этом очевидно, что основной вклад в формирование предрасположенности к различным формам этих заболеваний будут вносить гены, непосредственно участвующие в контроле метаболических процессов, нарушенных в патологических тканях.

В Москве, Санкт-Петербурге и в ряде других крупных городов создана сеть лабораторий, в которых используется метод ПЦР для диагностики широко распространенных вирусных и бактериальных инфекций. Многие из этих лабораторий работают на коммерческой основе. В разных центрах разработаны различные модификации геномной дактилоскопии, которые используются не только в криминалистике или для установления отцовства, но и для идентификации останков жертв многочисленных террористических и контр- террористических операций, происходящих в последнее время на территории нашей страны.

Не остаются в стороне вопросы молекулярной онкологии. Ими прежде всего занимаются в специализированных центрах и институтах. В этой связи исследуют состояния онкогенов, связанных с раком крови, молочной железы, кишечника, простаты. В геронтологических центрах анализируются молекулярные основы, так называемых, старческих заболеваний. В ряде лабораторий Москвы и Санкт-Петербурга началась разработка генотерапевтических программ в отношении миодистрофии Дюшенна, муковисцидоза и некоторых онкологических заболеваний. Однако эти исследования не достигли пока стадии клинических испытаний.

Еще раз подчеркнем, что уровень государственной финансовой поддержки исследований, проводимых в нашей стране в области молекулярной медицины, не сопоставим с тем, который характерен для многих стран Западной Европы, Японии, Индии и даже Китая, не говоря уже о странах Северной Америки. Если эта ситуация в ближайшее время не будет кардинально меняться, мы заранее обрекаем себя на значительное отставание от промышленно развитых стран в одном из самых передовых направлений здравоохранения.

Заключение.

Завершилась первая «структурная» часть проекта «Геном человека». В результате идентифицированы все гены человека и расшифрована их молекулярная природа. В ближайшие годы будут идентифицированы все белки человека и прочитана их аминокислотная последовательность. Значение этих открытий для молекулярной медицины трудно переоценить. Прежде всего, это приведет к существенному расширению списка заболеваний, анализ которых может осуществляться с использованием молекулярной методологии. Значительное развитие в этой связи получают диагностическое и профилактическое направления молекулярной медицины, основанные на анализе индивидуальных особенностей генома, формировании на этой базе групп риска по отдельным нозологиям и разработке способов предупреждения заболеваний до появления клинических симптомов и/или наступления каких-то необратимых патологических изменений.

Успехи в структурной геномике создают основу для мощного развития «функционального» направления этой науки или протеомики. Идентификация генов открывает дорогу для анализа их экспрессии, ответа на вопрос: «В каких тканях, на какой стадии дифференцировки и с какой интенсивностью работает тот или иной ген?». Уже сейчас можно дать приблизительные оценки количества генов, участвующих в образовании и функционировании различных тканей и органов, то есть формирующих специфические «генные сети» (рис.). Хотя подобные оценки еще уточняются, в ближайшее время эти вопросы будут полностью решены. И тогда станет совершенно ясно, структуру каких генов необходимо анализировать при наследственных дефектах развития и функционирования специфических тканей и органов.

Мы уже писали о том, что расшифровка аминокислотной последовательности белка позволяет определять не только пространственную структуру, но во многих случаях и его функции в организме человека. В настоящее время полностью или частично известно назначение примерно трех четвертей из всех идентифицированных белков. Около трети из них относится к структурным белкам клетки. Значительная часть участвует в производстве и потреблении энергии. Примерно равное количество белков задействовано в коммуникациях внутри и вне клетки и в ее защите от инфекций и повреждений. Разные группы белков ответственны за фиксацию положения клетки и ее пространственное перемещение. Немногим более 5% белков участвуют в воспроизводстве клеток. Идентификация первичного биохимического дефекта при различных формах патологии, понимание функций этого белка и характера его взаимодействия с другими молекулярными компонентами внутри и вне клеток создают основу для разработки патогенетических методов терапии. И это важнейшее направление молекулярной медицины. Темпы его реализации в ближайшие годы будут значительно ускоряться по мере развития «функциональной» геномики и постепенного перехода от понимания характера взаимодействия белков, кодируемых генами одной «сети», к выяснению характера

взаимодействия групп белков, контролируемых разными «генными сетями». Подобные «функциональные» задачи геномики не менее сложные, чем ее структурная часть, и потребуют для своего решения нескольких десятилетий. Но еще более трудным будет переход от этого этапа к пониманию функционирования клеток и организма в целом, как интегральных систем.

Ожидается прорыв и в области генной терапии, хотя сравнительно небольшой эффект от огромных финансовых вложений последнего десятилетия в эту область, а также ряд неудач, сопровождавших некоторые генотерапевтические программы, внесли определенные разочарования.

Через 2-3 десятилетия в ряде стран станет реальной работа по генетической паспортизации населения. Начнется составление компьютерных баз данных, в которых будут учитываться индивидуальные, в первую очередь, патологические особенности генома и характер их наследования в семьях (полная компьютеризация родословных). Это позволит разрабатывать методы индивидуальной терапии, то есть лечения не болезни, а больного с учетом особенностей его генома и образа жизни.

Существенные успехи ожидаются в диетологии, а значит и в таком профилактическом направлении молекулярной медицины, как «питательная» геномика. Здесь одно из первых мест будет принадлежать разработке генно-инженерных методов производства биологически активных пищевых добавок и лекарственных препаратов. Не менее, а может быть даже более важное значение будет иметь также генно-инженерное конструирование таких сортов сельскохозяйственных растений и животных, которые обладали бы сбалансированным набором необходимых питательных компонентов и производство которых было бы экономически оправдано и не наносило вреда экологии.

А какие опасности ожидают человечество в связи с расшифровкой структуры генома? Главная опасность состоит в возможности использования этой информации в военных целях, для разработки способов направленного уничтожения определенных этнических групп или народов, проживающих на определенной территории. Нам не хотелось бы детально останавливаться на этой теме. Заметим только, что подобное биологическое оружие нанесет вред всему человечеству и неизбежно коснется его разработчиков. Вторая не менее серьезная опасность связана с возможностью непроизвольного создания и выхода из под лабораторного контроля генетически модифицированных штаммов вирусов и бактерий, способных вызывать тяжелые заболевания у человека. Хотя в лабораториях предусмотрены определенные способы защиты и вероятность такого события невелика, полностью его исключить нельзя.

Открытия в области геномики порождают огромное количество этических, правовых и социальных проблем, причем таких, с которыми человечество раньше не сталкивалось. Мы немного касались этих вопросов при обсуждении генетического паспорта. Целые институты работают сейчас над изучением проблем адаптации человека и общества в целом к

восприятию достижений генетики, ее проникновению не только в медицину, но и во многие другие области человеческой деятельности.

Нет сомнения в том, что расшифровка структуры генома человека имеет определяющее значение для понимания его биологии и эволюции и в 21-ом веке будет сделано очень много открытий в этом направлении.

Литература

1. Бочков Н.П. Клиническая генетика. Учебник. М.: «Гэотар-мед», 2001 г. Издание 2-ое, дополненное.
2. Горбунова В. Н., Баранов В. С. «Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний.» СПб.: «Специальная литература», 1997.- 287 с.
3. Горбунова В. Н. «Молекулярные основы медицинской генетики». СПб: «Интермедика», 1999.- 210 с.
4. Горбунова В. Н. Что вы знаете о своем геноме? СПб.: «Интермедика», 2001,143 с.
5. Горбунова В. Н., Имянитов Е. Н. Генетика и канцерогенез. Методическое пособие. Изд-во СПбГПМА, 2007.- 24 с.
6. Баранов В.С., Баранова А.В., Иващенко Т. Э., Асеев М. В. Геном человека и гены предрасположенности.СПб.:«Интермедика».2001.