

А. В. Агаджанян, А. Ф. Фучич,
Л. В. Цховребова, Р. И. Лазан-Турчич

МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНЕТИКА

в иллюстрациях и таблицах



практическая медицина

А. В. Агаджанян, А. Ф. Фучич,
Л. В. Цховребова, Р. И. Лазан-Турчич

МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНЕТИКА

в иллюстрациях и таблицах

Учебное пособие

Рекомендовано Координационным советом
по области образования «Здравоохранение и медицинские науки»
в качестве учебного пособия для использования
в образовательных учреждениях, реализующих основные
профессиональные образовательные программы высшего
образования уровня специалитета по направлениям подготовки
31.05.01 «Лечебное дело», 31.05.02 «Педиатрия», 31.05.03
«Стоматология», 32.05.01 «Медико-профилактическое дело»

практическая медицина

Москва • 2022

УДК 575(075.8)
ББК 52.5
М42

Регистрационный номер лицензии: 732 ЭКУ от 23 мая 2019 года.
Протокол № 031 от 23 мая 2019 г. заседания Экспертной комиссии
по работе с учебными изданиями ФГАОУ ВО
«Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)»

Авторы:

Агаджанян Анна Владимировна — канд. биол. наук, старший преподаватель кафедры биологии и общей генетики Медицинского института Российского университета дружбы народов (г. Москва, Россия).

Фучич Александра Францевна — канд. биол. и мед. наук, научный руководитель Института медицинских исследований и охраны здоровья (г. Загреб, Хорватия).

Цховребова Лейла Вахтанговна — канд. биол. наук, старший преподаватель кафедры биологии и общей генетики Медицинского института Российского университета дружбы народов, научный сотрудник лаборатории клеточных технологий Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства (г. Москва, Россия).

Лазан-Турчич Ружица Иосифовна — канд. биол. и мед. наук, заведующая отделением цитогенетики Университетской больницы (г. Загреб, Хорватия).

Рецензенты:

Мустафин А.Г. — д. м. н., профессор, заведующий кафедрой биологии им. академика В.Н. Ярыгина педиатрического факультета ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России.

Жилина С.С. — д. м. н., доцент кафедры неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики имени академика Л.О. Бадаляна педиатрического факультета ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России.

Николаева Е.А. — д. м. н., руководитель отдела клинической генетики Научно-исследовательского клинического института педиатрии имени академика Ю.Е. Вельтищева ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России.

Воинова В.Ю. — д. м. н., главный научный сотрудник отдела клинической генетики Научно-исследовательского клинического института педиатрии имени академика Ю.Е. Вельтищева ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России.

М42

Медицинская генетика в иллюстрациях и таблицах : Учеб. пособие / А.В. Агаджанян, А.Ф. Фучич, Л.В. Цховребова, Р.И. Лазан-Турчич. — М.: Практическая медицина, 2022. — 504 с.: ил. [Medical genetics in illustrations and tables : Textbook manual / A. V. Aghajanyan, A. F. Fucic, L. V. Tskhovrebova, R. I. Lazant-Turchich. — М.: Practical medicine, 2022. — 504 pp., Ill.]

ISBN 978-5-98811-598-4

Издание посвящено современным вопросам медицинской генетики. В нем изложены основы биологии клетки, молекулярной и общей генетики, подробно описаны методы медицинской генетики, в которой более широко представлены технологии классической и молекулярной цитогенетики, молекулярной генетики. Приведены основные способы картирования генома человека. Представлено применение новейших методов лабораторной генетики в клинической онкогематологии, общей онкологии, педиатрии, кардиологии и биодозиметрии. Рассмотрены примеры наследственных болезней человека и их генетическая характеристика. Многочисленные иллюстрации и таблицы облегчают восприятие материала.

Издание предназначено для студентов медицинских вузов, а также может представлять интерес для медицинских генетиков, биологов, врачей различного профиля.

УДК 575(075.8)
ББК 52.5

ISBN 978-5-98811-598-4

© Коллектив авторов, 2021

© практическая медицина, оформление, 2021

Содержание

Предисловие	13
-------------------	----

Раздел I

БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ, МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ОБЩАЯ ГЕНЕТИКА

15

Глава 1. Клетка — структурно-функциональная единица организма ..	16
1.1. Характеристика клеток прокариот	16
1.2. Характеристика клеток эукариот	18
1.3. Плазматическая мембрана клетки	19
1.4. Мембранный транспорт	21
1.5. Цитоплазма клетки	21
1.5.1. Гиалоплазма (цитозоль)	22
1.5.2. Органоиды (органеллы) клетки	22
1.5.2.1. Двумембранные органоиды клетки	22
1.5.2.2. Одномембранные органоиды клетки	23
1.5.2.3. Немембранные органоиды клетки	25
1.5.3. Включения	27
1.6. Ядро клетки	27
1.7. Взаимодействие структур клетки в процессе метаболизма	29
1.8. Межклеточные контакты	29
1.8.1. Замыкающие контакты	30
1.8.2. Адгезионные контакты	31
1.8.3. Проводящие контакты	32

Глава 2. Химический состав клетки	33
2.1. Химические элементы клетки	33
2.2. Неорганические вещества клетки	34
2.2.1. Вода	34
2.2.2. Неорганические соли	36
2.3. Органические вещества клетки	37
2.3.1. Белки	37
2.3.2. Углеводы	39
2.3.3. Липиды	41
2.3.4. Нуклеиновые кислоты	43
2.3.4.1. Дезоксирибонуклеиновая кислота	43
2.3.4.2. Рибонуклеиновая кислота	53
Глава 3. Реализация наследственной информации	57
3.1. Геном	57
3.2. Ген	60
3.2.1. Свойства гена	60
3.2.2. Классификация генов	61
3.3. Генетический код	61
3.4. Экспрессия генов	62
3.5. Репликация — синтез ДНК	64
3.5.1. Ферментативный и белковый комплексы репликации	68
3.5.2. Этапы репликации	72
3.5.3. Сравнение репликации у прокариот и эукариот	73
3.5.4. Репликация в митохондриях	73
3.6. Регуляция репликации	74
3.7. Транскрипция — синтез РНК	75
3.7.1. Транскриптон	76
3.7.2. Ферментативный и белковый комплексы транскрипции	77
3.7.3. Транскрипция в клетках прокариот	79
3.7.4. Транскрипция в клетках эукариот	80
3.7.5. Сравнение транскрипции у прокариот и эукариот	84
3.7.6. Транскрипция в митохондриях	84

3.8. Регуляция транскрипции	85
3.8.1. Регуляция транскрипции в клетках прокариот	85
3.8.2. Регуляция транскрипции в клетках эукариот	87
3.8.3. Эпигенетические механизмы регуляции транскрипции	89
3.9. Процессинг — модификация РНК	90
3.9.1. Процессинг пре-матричной РНК	90
3.9.1.1. Кэпирование (модификация 5'-конца)	90
3.9.1.2. Полиаденилирование (модификация 3'-конца)	91
3.9.1.3. Сплайсинг	92
3.9.2. Процессинг пре-рибосомной и пре-транспортной РНК	95
3.9.3. Процессинг в митохондриях	96
3.9.4. Процессинг тРНК и рРНК в клетках прокариот	97
3.10. Трансляция — синтез первичной структуры белка	98
3.10.1. Трансляция в клетках прокариот	101
3.10.2. Трансляция в клетках эукариот	104
3.10.3. Трансляция в митохондриях	105
3.11. Регуляция трансляции	105
3.12. Посттрансляционная модификация белка	108
3.13. Эпигенетические модификации	112
3.13.1. Модификация ДНК	115
3.13.2. Свойства CpG-островков	116
3.13.3. Характеристика метилированной ДНК	117
Глава 4. Изменчивость организма	118
4.1. Онтогенетическая изменчивость	119
4.2. Модификационная изменчивость	123
4.3. Комбинативная изменчивость	124
4.4. Цитоплазматическая изменчивость	125
4.5. Мутационная изменчивость	125

Глава 5. Мутагены. Репарация ДНК. Мутации	127
5.1. Мутагены среды	127
5.1.1. Физические мутагены	127
5.1.2. Химические мутагены	129
5.1.3. Биологические мутагены	133
5.2. Повреждения ДНК	134
5.3. Репарация ДНК	135
5.3.1. Прямая ДНК-репарация	137
5.3.2. Непрямая репарация	140
5.4. Мутации	153
5.4.1. Генетическая классификация мутаций	154
5.4.2. Полиморфизм генов	160
5.4.3. Генетический груз	161
5.4.4. Спонтанный уровень мутаций	161
5.4.5. Возрастная динамика частот мутаций	163
5.4.6. Мозаицизм	166
5.4.7. Мультиаберрантные клетки	167
5.4.8. Хромотрипсис	168
Глава 6. Деление клеток	170
6.1. Клеточный цикл	170
6.1.1. Регуляция клеточного цикла	172
6.1.2. Нарушения в клеточном цикле	177
6.2. Митоз	177
6.2.1. Значение митоза и его этапы	177
6.2.2. Регуляция митоза	181
6.2.3. Патологии митоза	181
6.3. Обновление клеток организма	182
6.3.1. Апоптоз	183
6.3.2. Некроз	189
6.3.3. Аутофагия	190
6.3.4. Клеточное старение	194
6.4. Мейоз	199
6.4.1. Значение мейоза	199
6.4.2. Этапы мейоза	200

6.4.3. Регуляция мейоза	205
6.4.4. Патологии мейоза	205
6.5. Гаметогенез	206
6.5.1. Значение гаметогенеза	206
6.5.2. Стадии гаметогенеза	206
6.5.3. Регуляция гаметогенеза	208
6.5.4. Различия сперматогенеза и оогенеза	208
6.6. Строение половых клеток человека	209
6.6.1. Мужская половая клетка	209
6.6.2. Женская половая клетка	210
Глава 7. Конформационные изменения ДНК в клеточном цикле ..	213
7.1. Пространственная организация ДНК	213
7.2. Расположение хромосом в интерфазном ядре	217
7.3. Хромосома	219
7.3.1. Морфология хромосомы	220
7.3.2. Эухромосомные и гетерохромосомные участки хромосомы ..	222
7.3.3. Центромерные участки хромосомы	224
7.3.4. Теломерные участки хромосомы	226
7.3.5. Спутничные участки хромосомы	228
Глава 8. Закономерности наследования и взаимодействия генов ..	230
8.1. Закон расщепления генов	232
8.2. Взаимодействие аллельных генов	234
8.2.1. Полное доминирование	234
8.2.2. Неполное доминирование	234
8.2.3. Кодоминирование	235
8.3. Закон независимого наследования генов	236
8.4. Взаимодействие неаллельных генов	239
8.4.1. Комплементарность	239
8.4.2. Эпистаз	239
8.4.3. Полимерия	240
8.5. Закон сцепленного наследования генов	241
8.6. Наследование генов, сцепленное с полом	243

Раздел II
МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНЕТИКА
 247

Глава 9. Медико-генетическое консультирование	248
Глава 10. Генетико-эпидемиологические методы	252
10.1. Клинико-генеалогический метод	252
10.2. Близнецовый метод	259
10.3. Популяционно-генетический (статистический) метод	263
Глава 11. Методы лабораторной генетики	267
11.1. Цитогенетические методы	267
11.1.1. Классический цитогенетический метод	267
11.1.1.1. Этапы цитогенетического метода	268
11.1.1.2. Анализ метафаз	277
11.1.2. Основная номенклатура, используемая в цитогенетике	280
11.1.2.1. Символы и сокращения	280
11.1.2.2. Определения	282
11.1.3. Ограничение классического цитогенетического метода	282
11.1.4. Классификация хромосом человека	283
11.1.4.1. Денверская классификация хромосом	283
11.1.4.2. Парижская классификация хромосом	287
11.1.5. Молекулярно-цитогенетические методы	300
11.1.5.1. Флюоресцентная гибридизация <i>in situ</i>	301
11.1.5.2. Сравнительная геномная гибридизация	311
11.1.6. Автоматические станции	316
11.1.7. Сравнительная характеристика методов классической и молекулярной цитогенетики	318
11.2. Молекулярно-генетические методы	319
11.2.1. Выделение нуклеиновых кислот	320
11.2.2. Полимеразная цепная реакция	322
11.2.2.1. Компоненты реакционной смеси	323

11.2.2.2. Циклический температурный режим в приборе	324
11.2.2.3. Детекция результатов полимеразной цепной реакции в агарозном геле	326
11.2.2.4. Полимеразно-цепная реакция в реальном времени	327
11.2.2.5. Основные разновидности метода полимеразно-цепной реакции	327
11.2.3. Секвенирование нуклеиновых кислот	329
11.2.3.1. Секвенирование первого поколения	329
11.2.3.2. Секвенирование второго поколения	335
11.2.3.3. Секвенирование третьего поколения	338
11.2.4. Другие виды молекулярно-генетических технологий	338

Раздел III

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ГЕНЕТИКИ

341

Глава 12. Картирование генома человека	342
12.1. Генетические и физические карты генома	342
12.2. Карты генома человека	347
12.3. Патологическая анатомия генома человека на примере первой хромосомы	372
Глава 13. Применение методов медицинской генетики	379
13.1. Пренатальная диагностика	379
13.1.1. Неинвазивные методы пренатальной диагностики	380
13.1.2. Инвазивные методы пренатальной диагностики	382
13.1.2.1. Амниоцентез	382
13.1.2.2. Биопсия хориона	382
13.1.2.3. Кордоцентез	382
13.1.3. Ограничения пренатальной диагностики	383
13.2. Преимплантационная диагностика	383
13.2.1. Вспомогательные репродуктивные технологии	384
13.2.1.1. Экстракорпоральное оплодотворение	384

13.2.1.2. Микроманипуляционные методы	384
13.2.1.3. Донорство гамет и эмбрионов	385
13.2.1.4. Криоконсервация гамет и эмбрионов	385
13.2.1.5. Перенос гамет и эмбрионов в фаллопиеву трубу	385
13.2.1.6. Суррогатное материнство	385
13.2.1.7. Искусственная инсеминация спермой мужа/донора	385
13.3. Постнатальная диагностика у детей	386
13.3.1. Подтверждение клинического диагноза у новорожденных ..	386
13.3.2. Диагностика наследственных заболеваний и пороков развития у детей	386
13.4. Диагностика и ведение больных с онкологическими заболеваниями	388
13.4.1. Диагностика онкогематологических заболеваний	390
13.4.1.1. Острый лимфобластный лейкоз	391
13.4.1.2. Острый миелоидный лейкоз	393
13.4.1.3. Хронический миелоидный лейкоз (хронический миелолейкоз)	394
13.4.1.4. Хроническая лимфоцитарная лейкемия (лимфолейкоз) ..	396
13.4.1.5. Болезнь Ходжкина (лимфогранулематоз)	397
13.4.1.6. Неходжкинские лимфомы	397
13.4.1.7. Миелодиспластические синдромы	398
13.4.1.8. Синдром моносомии хромосомы 7	399
13.4.1.9. Синдром делеции длинного плеча хромосомы 5	399
13.4.2. Диагностика солидных опухолей	399
13.4.2.1. Применение методов лабораторной генетики при наследственных онкопатологиях	399
13.4.2.2. Применение методов лабораторной генетики при выборе индивидуальных схем лечения в онкологии	403
13.5. Диагностика и ведение больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями	405
13.6. Биологическая дозиметрия	408

Раздел IV

НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ ЧЕЛОВЕКА

411

Глава 14. Хромосомные болезни	415
14.1. Хромосомные болезни с изменением числа хромосом	415
14.1.1. Хромосомные болезни с изменением числа аутосом	416
14.1.1.1. Синдром Дауна (Down syndrome)	416
14.1.1.2. Синдром Патау	422
14.1.1.3. Синдром Эдвардса	425
14.1.2. Хромосомные болезни с изменением числа половых хромосом	426
14.1.2.1. Синдром Клайнфельтера	426
14.1.2.2. Синдром ХYY (47,ХYY)	428
14.1.2.3. Синдром трисомии X (47,XXX)	429
14.1.2.4. Синдром тетрасомии X (48,XXXX)	429
14.1.2.5. Синдром Шерешевского—Тернера (моносомия X)	429
14.1.2.6. Трисомия хромосомы 8 (синдром Варкани)	431
14.2. Хромосомные болезни с изменением структуры хромосом	432
14.2.1. Синдром Вольфа—Хиршхорна (синдром 4p-)	432
14.2.2. Синдром кошачьего крика (моносомия 5p)	433
14.2.3. Синдром Альфи (синдром 9p-)	434
14.2.4. Синдром 18q- (синдром кошачьего глаза/зрачков)	435
14.2.5. Синдром моносомии короткого плеча хромосомы 18 (синдром 18p-)	436
Глава 15. Генные болезни	437
15.1. Моногенные болезни с аутосомно-доминантным типом наследования	438
15.2. Моногенные болезни с аутосомно-рецессивным типом наследования	440

15.3. Моногенные болезни, сцепленные с половыми хромосомами	442
15.3.1. Моногенные болезни, сцепленные с X-хромосомой (доминантный тип наследования)	442
15.3.2. Моногенные болезни, сцепленные с X-хромосомой (рецессивный тип наследования)	443
15.4. Моногенные болезни, сцепленные с Y-хромосомой	446
Глава 16. Болезни с нетрадиционным типом наследования	447
16.1. Митохондриальные болезни	447
16.2. Болезни импринтинга	450
16.3. Болезни с нарушением репарации ДНК	453
Вопросы и задания	457
Литература	475

Предисловие

Бурным развитием молекулярной биологии и генетики, смежных дисциплин, а также успехами в биоинформатике и системной биологии отмечено начало новой эпохи — эпохи *геномики* (раздел молекулярной генетики, посвященный изучению генома и генов живых организмов). Поэтому XXI век называют веком молекулярной биологии и генетики. Разработка и усовершенствование новых технологий изучения *генома*, *протеома* и *эпигенома* человека способствовали широкому внедрению их в практическую и теоретическую медицину. Исследования в этих областях продолжаются и по сей день. Изучение сравнительной и функциональной геномики человека привело к быстрому развитию *молекулярной медицины* (*медицинской геномики*), в которой задачи диагностики, профилактики и лечения пациентов решаются не только классическими способами, но и на уровне анализа дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), рибонуклеиновой кислоты (РНК), белков, метилирования ДНК и др.

Благодаря развитию молекулярной биологии и генетики в медицине появились новые классификации ряда заболеваний. Для выбора тактики ведения пациента врачами могут быть использованы разные классификации (в том числе и недавно принятые молекулярно-генетические) той или иной патологии. Происходит усовершенствование комплексной диагностики и профилактики наследственных болезней человека. Наиболее широко это показано при диагностике моногенных заболеваний. Большой интерес представляет поиск наследственных причин в этиологии мультифакторных заболеваний.

Все вышеописанное стало неотъемлемой частью *медицинской генетики* и других областей медицины. Медицинская генетика — это наука, изучающая роль наследственности и изменчивости в формировании патологии. Медицинская генетика состоит из *общей генетики*, которая исследует универсальные проявления наследственности и изменчивости у всех живых организмов, и *клинической генетики*, которая изучает этиологию, патогенез, клинику, диагностику, лечение и профилактику наследственных болезней человека.

На сегодняшний день доказано, что геном любого человека индивидуален. Для успешной диагностики и тактики ведения пациента могут быть использованы различные методы медицинской генетики (*клинико-генеалогический*, *близнецовый*, *популяционно-статистический*, *цитогенетический*, *молекулярно-цитогенетический*, *молекулярно-генетический*) и биологии (*дерматоглифический*, *биохимический*, *иммунологический*, *гистологический* и др.). Комплексное применение этих и других способов диагностики и лечения в клинической практике способствует развитию *персонализированной медицины* (англ. *personalized medicine*).

Наиболее широко технологии молекулярной диагностики используются в таких областях практической медицины, как *педиатрия, онкология, генетическое тестирование и консультирование, пренатальная диагностика, картирование очагов заболевания, репродуктивная медицина* и др.

Книга состоит из четырех разделов и шестнадцати глав. В первом разделе изложены основы биологии клетки, молекулярной и общей генетики. Второй раздел посвящен медицинской генетике, в нем особое внимание уделено методам лабораторной генетики (классическая и молекулярная цитогенетика, молекулярная генетика). В третьем разделе представлены примеры применения методов генетики, благодаря которым были созданы карты генома человека, а также методов лабораторной генетики в клинической практике (онкогематология, общая онкология, кардиология, педиатрия, биодозиметрия). В четвертом разделе рассмотрены примеры наследственных болезней человека и их генетическая характеристика. Издание содержит вопросы и задания по главам для проверки усвоенных знаний, а также большое количество наглядного материала (рисунков, схем, таблиц, фотографий).

При написании рукописи авторами были использованы новейшие данные отечественных и международных источников. Книга представляет интерес для студентов медицинских университетов, медицинских генетиков, биологов, врачей различного профиля.

Раздел I

Биология клетки, молекулярная и общая генетика

Глава 1.	Клетка — структурно-функциональная единица организма ..	16
Глава 2.	Химический состав клетки	33
Глава 3.	Реализация наследственной информации	57
Глава 4.	Изменчивость организма	118
Глава 5.	Мутагены. Репарация ДНК. Мутации	127
Глава 6.	Деление клеток	170
Глава 7.	Конформационные изменения ДНК в клеточном цикле ..	213
Глава 8.	Закономерности наследования и взаимодействия генов ..	230

Клетка — структурно-функциональная единица организма

Клетка — структурно-функциональная элементарная единица строения и жизнедеятельности всех организмов (кроме внеклеточных форм — *вирусов* и *вирионов*). Считается, что в организме человека присутствует около 230 типов клеток. Они входят в состав *эпителиальной, мышечной, нервной тканей* и *внутренней среды организма* (*соединительная ткань, кровь, лимфа*).

Основные положения современной клеточной теории заключаются в следующем:

- 1) все живые организмы состоят из клеток (исключение — вирусы);
- 2) клетка — наименьшая единица живого: вне клетки жизни нет;
- 3) клетки всех организмов сходны по строению и химическому составу;
- 4) новые клетки возникают только путем деления ранее существовавших клеток;
- 5) активность организма складывается из активности и взаимодействия составляющих его самостоятельных клеток;
- 6) клеточное строение всех организмов говорит о единстве их происхождения.

По структурной и функциональной организации различают клетки *прокариот* и *эукариот*.

1.1. Характеристика клеток прокариот

К прокариотическим клеткам относят архибактерии, настоящие бактерии и цианобактерии. Собирательное понятие микроорганизмов, находящихся в симбиозе с человеком, обозначают термином «*микробиота*» (*микробиота*), а совокупность разнообразия генов микрофлоры (микробиоты) называют *микробиомом*. Проект «Микробиом человека» (Human Microbiome Project), запущенный в США в 2007 г., определил генетическую идентичность многих бактерий, вирусов и других микроорганизмов, которые живут в тесном контакте в организме человека. Показано, что в здоровом

человеческом теле содержится около 500 различных видов бактерий. К примеру, только в кишечнике содержится почти 2 кг бактерий. Симбиоз бактерий и клеток различных тканей человека выполняет важную роль в процессах пищеварения, производства витаминов и укрепления иммунной системы, модулирует воздействие лекарств. Кроме того, недавние исследования взаимодействия генома человека с микробиомом показали, что присутствие или количество определенных компонентов микробиома связано со структурными изменениями в геноме человека.

Размеры бактериальных клеток различны и колеблются от 1 до 10–15 мкм. Их особенность — отсутствие оформленного ядра (рис. 1.1).

Геном прокариотической клетки составляют хромосомная и внехромосомная дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК). Хромосомная ДНК — кольцевая, без гистоновых белков. Она находится в определенной части цитоплазмы — *нуклеоиде*. Рассчитано, что длина хромосомной ДНК прокариот составляет приблизительно 4,7 млн пар нуклеотидов (п. н.), или пар оснований (п. о.). Внехромосомная ДНК прокариотической клетки — это *плазмиды*. Они имеют кольцевую форму и намного меньше хромосомной ДНК. Число плазмид может варьировать в зависимости от функционального состояния клетки. Они повышают устойчивость бактериальной клетки к воздействию неблагоприятных факторов (антибиотиков, солей тяжелых металлов).

Реализация наследственной информации в клетках прокариот проходит непрерывно и с высокой скоростью [Feijoo-Siota L. et al., 2017].

Бактериальная клетка окружена мембраной, отделяющей цитоплазму от клеточной стенки. Клеточная стенка состоит из полисахаридов, основным из которых является *муреин*.

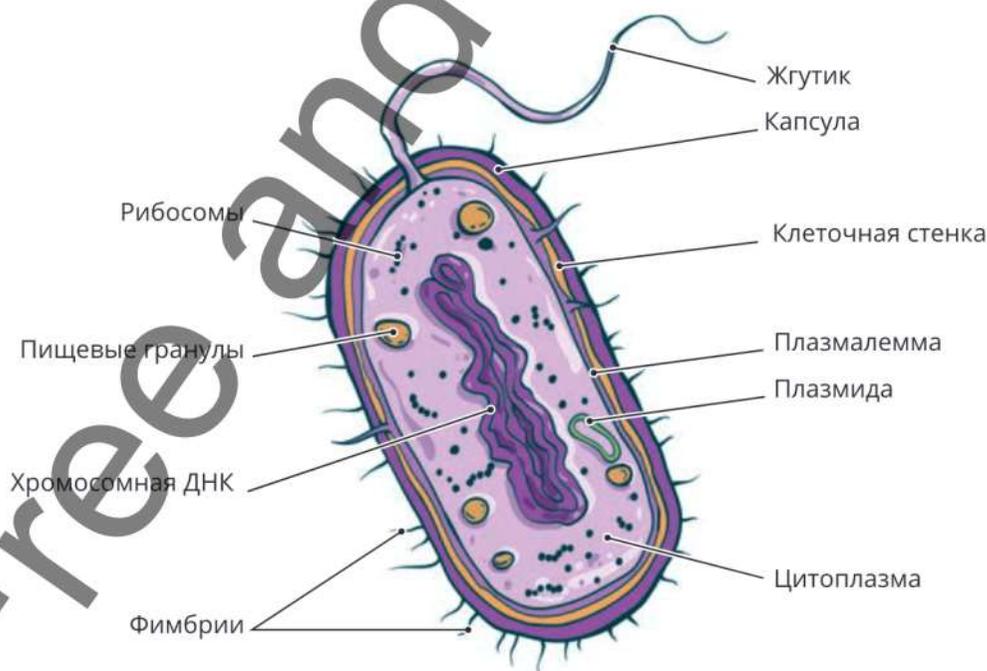


Рис. 1.1. Строение прокариотической клетки

В цитоплазме мембран мало. В основном это выпячивания плазматической мембраны внутрь цитоплазмы — *мезосомы*. Они участвуют в репликации и сегрегации ДНК нуклеоидов.

У прокариот есть мелкие рибосомы — 70 единиц Сведберга (S).

У некоторых бактерий есть органоиды движения — реснички и жгутики.

Бактерии размножаются делением клетки надвое (бинарное деление).

1.2. Характеристика клеток эукариот

К эукариотическим относят клетки одноклеточных (простейшие) и многоклеточных (грибы, растения, животные) организмов. Размер эукариотической клетки может варьировать от 10 до 100 мкм. Эукариоты характеризуются наличием оформленного ядра и более сложной внутренней организацией [Baum D.A., 2014] (рис. 1.2).

Все клеточные структуры находятся в состоянии постоянной пространственной мобильности, что отражает и обеспечивает функциональную и регенераторную активность клетки.

В структурно-функциональные комплексы входят: *цитолемма* (*cytolemma*), *ядро* и *цитоплазма* (рис. 1.3).

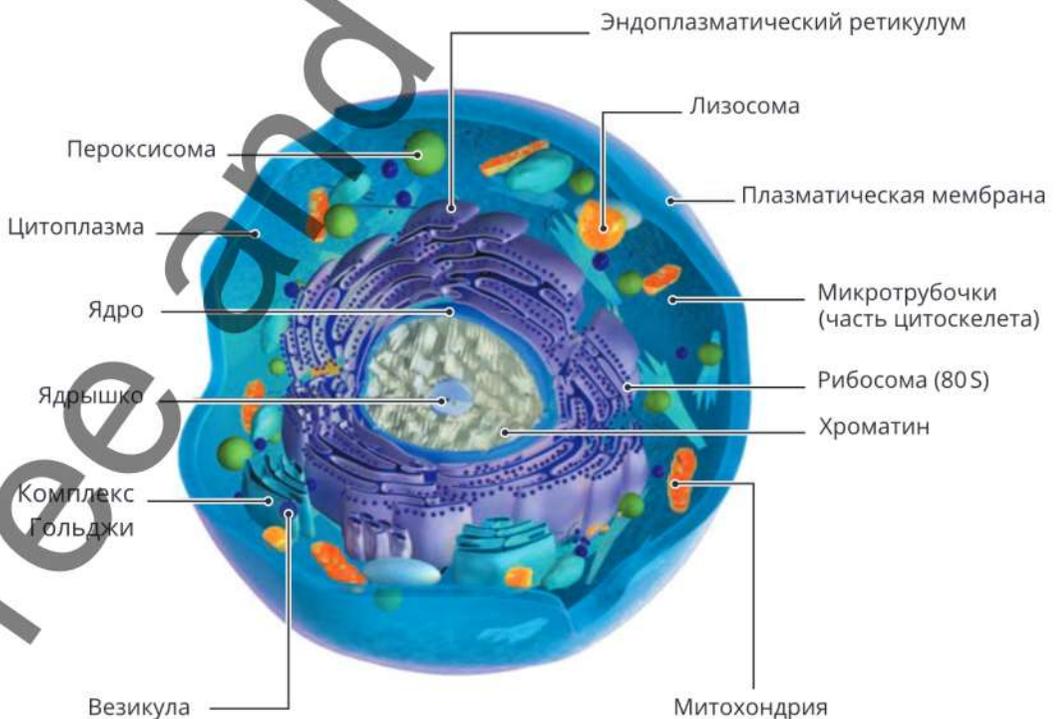


Рис. 1.2. Строение эукариотической клетки



Рис. 1.3. Структурно-функциональный комплекс клетки

1.3. Плазматическая мембрана клетки

Плазматическая мембрана клетки (*клеточная мембрана, цитолемма, плазмалемма*) является сложной структурой (рис. 1.4), которая отделяет внутреннее содержимое клетки от внешней среды и активно регулирует обменные процессы между клеткой и средой. В ее состав входят различные белки, липиды и углеводы (см. табл. 1.1). Мембрана клетки обладает рядом свойств (см. табл. 1.2) и функций (см. табл. 1.3).

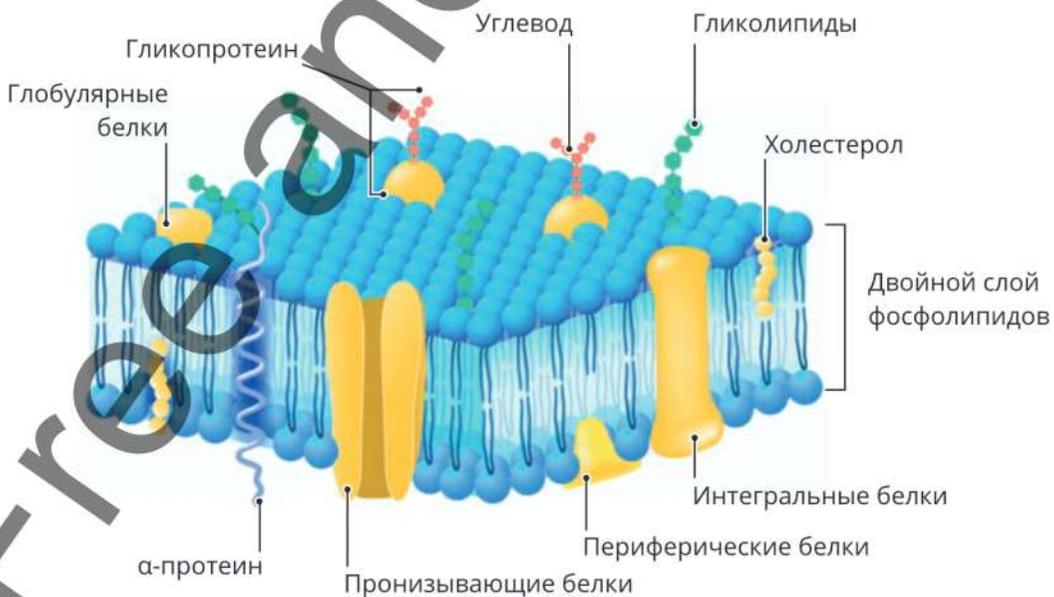


Рис. 1.4. Строение плазматической мембраны

Таблица 1.1. Химический состав плазматической мембраны

Состав	Функция
Липиды (фосфолипиды, гликолипиды, сфинголипиды, холестерол)	<ul style="list-style-type: none"> • Гидрофобная. • Структурная. • Строительная
Погруженные белки-ферменты	Катализируют различные биохимические реакции
Периферические белки	Стабилизируют расположение погруженных белков
Проницающие белки	Транспортная
Углеводы	Рецепторная

Таблица 1.2. Свойства плазматической мембраны

Свойство	Описание
Асимметрия	Состав наружного и внутреннего слоев белков и липидов различен
Полярность	Внешняя сторона мембраны несет положительный заряд, а внутренняя — отрицательный
Текучесть	Белки и липиды могут перемещаться в плоскости мембраны
Избирательная проницаемость	Мембраны пропускают помимо воды лишь определенные молекулы и ионы растворенных веществ

Таблица 1.3. Функции плазматической мембраны

Название	Процесс
Барьерная	Обеспечивает регулируемый обмен веществ с окружающей средой
Матричная	Обеспечивает определенное взаиморасположение мембранных белков и их взаимодействие
Механическая	Обеспечивает автономность клетки и ее внутриклеточных структур
Энергетическая	При клеточном дыхании в митохондриях в их мембранах действуют системы переноса энергии, в которых также участвуют белки
Транспортная	Через мембрану осуществляется транспорт веществ в клетку и из клетки

1.4. Мембранный транспорт

Одной из важнейших функций клеточной мембраны, позволяющей поддерживать постоянный состав клетки, является транспорт веществ. Трансмембранный транспорт молекул различных размеров может проходить как из клетки, так и в клетку с помощью различных механизмов (табл. 1.4). Этот процесс возможен благодаря такому свойству мембран клеток, как избирательная проницаемость.

Таблица 1.4. Характеристика типов мембранного транспорта

Вещества/молекулы	Тип транспорта
<ul style="list-style-type: none"> • Крупные молекулы органических веществ • Бактерии • Вирусы 	<p>Эндоцитоз (проникновение в клетку). Эндоцитоз подразделяется на <i>фагоцитоз</i> (поглощение твердых веществ) и <i>пиноцитоз</i> (поглощение жидкости).</p> <p>Экзоцитоз (выведение из клетки)</p>
Небольшие молекулы органических и неорганических веществ, ионы	<p>Пассивный транспорт (диффузия) — перемещение веществ из области высокой концентрации в область низкой концентрации. Осуществляется без затрат энергии.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Обычная диффузия — перенос через белковые поры жирорастворимых веществ (воды, углекислого газа) и ионов. • Облегченная диффузия — перенос крупных гидрофильных молекул с помощью специальных белков-переносчиков (например, комплекс глюкозы с белком-переносчиком облегчает проникновение глюкозы в клетку). <p>Скорость облегченной диффузии выше, чем у обычной диффузии</p>
Перенос ионов (например, натрия и калия)	<p>Активный транспорт — перемещение веществ из области низкой концентрации в область высокой концентрации. Осуществляется только с затратой энергии (пример — калий-натриевый насос).</p> <p>Везикулярный транспорт — молекулы, производимые в клетке, «упаковываются» в специальные мембранные пузырьки (<i>везикулы</i>) и доставляются вовремя и по адресу.</p> <p>Нарушения везикулярного транспорта приводят к серьезным болезням нервной и эндокринной систем</p>

1.5. Цитоплазма клетки

Цитоплазма представляет собой внутреннюю среду клетки (кроме ядра) и состоит из **гиалоплазмы, органоидов и включений**.

Циклоз — внутриклеточное движение цитоплазмы, происходящее без внешней деформации клетки.

1.5.1. Гиалоплазма (цитозоль)

Гиалоплазма состоит из коллоидной среды (биополимеры с водой), которая может находиться в виде геля (плотная) или золя (жидкая).

Функции гиалоплазмы:

- обеспечивает химическое взаимодействие всех клеточных структур;
- по гиалоплазме перемещаются различные вещества;
- в гиалоплазме протекают разнообразные биохимические реакции;
- откладываются разнообразные по химическому составу включения.

1.5.2. Органоиды (органеллы) клетки

1.5.2.1. Двумембранные органоиды клетки

К двумембранным органоидам относят митохондрии и пластиды. Поскольку в этой книге мы описываем процессы, происходящие в организме человека, то пластиды здесь не рассматриваются.

Митохондрия — полуавтономный органоид, осуществляющий синтез *аденозинтрифосфорной кислоты* (АТФ). Стенки митохондрии образованы двумя мембранами: *внешней* и *внутренней* (рис. 1.5). Внешняя мембрана — гладкая, а внутренняя образует многочисленные складки — *кристы*. На складчатой поверхности может расположиться больше ферментных комплексов, чем на гладкой. Если клетка нуждается в энергии, то число крист увеличивается. На кристах располагаются *АТФ-сомы* — комплекс ферментов класса транслоказ (аденозинтрифосфатсинтаза), необходимых для синтеза АТФ из аденозиндифосфата (АДФ) и неорганических фосфатов.

Одна клетка может содержать до нескольких сотен митохондрий. Внутреннее пространство митохондрий заполнено бесструктурным однородным веществом — *матриксом*. В нем располагаются собственные молекулы ДНК (кольцевая, не содержит белки), РНК и мелкие рибосомы (70 S, как у прокариот). В ДНК митохондрий (мтДНК) записана информация о строении митохондриальных белков. В среднем в одной митохондрии может содержаться 10 молекул ДНК и более. РНК и рибосомы осуществляют их синтез. Митохондрии называют полуавтономными органоидами. Это означает, что они зависят от клетки, но в то же время сохраняют некоторую самостоятельность. В нем происходит синтез собственных молекул ДНК, РНК и белков. Кроме того, митохондрии могут размножаться путем деления независимо от деления клетки.

Функции митохондрий:

- прохождение кислородного этапа энергетического обмена;
- синтез АТФ;
- синтез специфических белков.

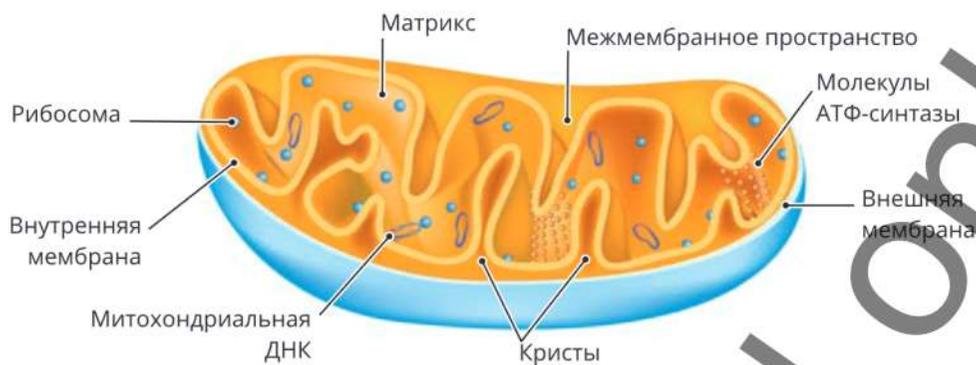


Рис. 1.5. Структура митохондрии

1.5.2.2. Одномембранные органоиды клетки

Система транспорта и синтеза веществ в клетке представлена одномембранными органоидами (табл. 1.5). К ним относят эндоплазматическую сеть, комплекс (аппарат) Гольджи, лизосомы и вакуоли. Эти четыре органоида составляют единую **канальцево-вакуолярную систему клетки (КВС)**.

Таблица 1.5. Одномембранные органоиды клетки

Органоид	Строение	Функции
Эндоплазматическая сеть (ретикулум)	Общая циркуляционная система каналов, по которым осуществляется транспорт веществ; на мембранах этих каналов находятся многочисленные ферменты, обеспечивающие жизнедеятельность клетки	<p>Гранулярная (шероховатая) эндоплазматическая сеть участвует в синтезе:</p> <ul style="list-style-type: none"> • первичной структуры белка; • мембран. <p>Агранулярная (гладкая) эндоплазматическая сеть осуществляет:</p> <ul style="list-style-type: none"> • синтез гормонов; • накопление и преобразование углеводов; • нейтрализацию ядов; • депо кальция; • синтез липидов; • синтез углеводов
Комплекс Гольджи	Комплекс мембран в виде узких каналов, расширяющихся в цистерны. От них отшнуровываются пузырьки. Каналы выглядят как наложенные одна на друга стопки — диктиосомы	<ul style="list-style-type: none"> • Формирование веществ, необходимых для обновления мембраны клетки (гликопротеиды, гликолипиды, полисахариды). • Накопление веществ и их временное «хранение». • «Упаковывание» образованных веществ в пузырьки (вакуоли) и перемещение их в таком виде по клетке. • Образование лизосом (сферические органоиды с расщепляющими ферментами)

Окончание табл. 1.5

Органоид	Строение	Функции
Лизосома	Шаровидные тельца диаметром 0,2–1,0 мкм. Содержат около 40 ферментов	<ul style="list-style-type: none"> • Расщепление веществ, поглощенных в результате фагоцитоза и пиноцитоза. Биополимеры расщепляются до мономеров, которые поступают в клетку и используются на ее нужды. • Разрушение старых, поврежденных, избыточных органоидов. • Осуществление аутолиза (расщепление) самой клетки (например, разжижение тканей в зоне воспаления, разрушение клеток хряща в процессе формирования костной ткани и др.). • Расщепление органоидов клетки может происходить и во время голодания клетки
Вакуоль	Сферической формы резервуары с водой и растворенными в ней веществами, отшнуровывающиеся от эндоплазматической сети и комплекса Гольджи. Вакуоли бывают фагоцитозные, пиноцитозные и пищеварительные. Вакуоли животной клетки — мелкие, многочисленные, но их объем не превышает 5 % от всего объема клетки. В клетке растений на долю вакуолей приходится до 90 % объема	<ul style="list-style-type: none"> • Транспорт веществ по клетке. • Осуществление взаимосвязи между органоидами. • Выделение продуктов диссимиляции
Пероксисома	Округлые мешочки с ферментами. Эти вещества генерируют активные метаболиты кислорода (супероксид анион, гидроксильный радикал, синглетный кислород, перекись водорода — пероксидаза) и утилизируют их избыток (каталаза)	<p>Функции разнообразны в разных группах организмов. Практически у всех видов они содержат фермент <i>каталазу</i>, а также ферменты <i>β-окисления жирных кислот</i>.</p> <p>Так, пероксидаза использует молекулярный кислород для отщепления атомов водорода от субстратов с образованием перекиси водорода.</p> <p><i>Каталаза</i> утилизирует перекись водорода для окисления других веществ</p>

Все вещества КВС имеют сходный химический состав мембран. Мембраны КВС активно взаимодействуют друг с другом. Все вещества КВС берут начало от эндоплазматической сети. От нее отделяются вакуоли, поступающие к комплексу Гольджи, от него отделяются пузырьки, сливающиеся с мембраной клетки, — лизосомы. Мембраны КВС делят содержимое клетки на отдельные отсеки (компарменты), в которых протекают определенные химические реакции. Это делает возможным одновременное протекание в клетке различных процессов, иногда прямо противоположных. В результате деятельности КВС происходит постоянное обновление мембраны клетки.

1.5.2.3. Немембранные органоиды клетки

К ним относятся рибосомы и органоиды опорно-двигательной системы клетки (табл. 1.6).

Таблица 1.6. Немембранные органоиды

Органоид	Строение/описание	Функции
Рибосома	<p>Рибосома <i>эукариотической клетки</i> (80 S*) состоит из малой и большой субъединиц. Диаметр — 15–35 нм. Синтезируется в ядрышке.</p> <p>Большая субъединица (60 S) состоит из 28 S, 5 S, 5,8 S рибосомных РНК (рРНК) и 50 белков.</p> <p>Малая субъединица (40 S) состоит из 18 S рРНК и 33 белков.</p> <p>Рибосомы располагаются:</p> <ul style="list-style-type: none"> • на поверхности гранулярной эндоплазматической сети; • в гиалоплазме клетки в виде полисом (комплекс информационной РНК [иРНК] и нескольких рибосом, считывающих с нее информацию). <p>Рибосома <i>митохондрий и прокариот</i> (70 S) мельче.</p> <p>Большая субъединица (50 S) состоит из 23 S, 5 S рРНК и 34 белков.</p> <p>Малая субъединица (30 S) состоит из 16 S рРНК и 21 белка.</p> <p>рРНК находится в виде магниевой соли, что необходимо для поддержания структуры. При удалении ионов магния рибосома подвергается диссоциации на субъединицы. Синтез рибосом у эукариот происходит в специальной внутриядерной структуре — ядрышке</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Участвует в трансляции. <p>Если рибосомы располагаются на мембранах эндоплазматической сети, то синтезируемые ими белки используются на нужды всего организма. Рибосомы гиалоплазмы синтезируют белки на нужды самой клетки.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Рибосомы митохондрий участвуют в синтезе белков митохондрий

Окончание табл. 1.6

Органоид	Строение/описание	Функции
Микрофиламенты (микронити)	Нити актинового комплекса миозина. Расположены в поверхностном слое гиалоплазмы, непосредственно под плазматической мембраной. Способны к сокращению	Сокращение приводит: <ul style="list-style-type: none"> • к перемещению гиалоплазмы; • впячиванию или выпячиванию клеточной мембраны; • образованию перетяжки во время деления клетки
Микротрубочки	Полые цилиндрические структуры клетки, состоящие из несократимого белка — тубулина. Стенки образованы 13 нитями тубулина. Микротрубочки располагаются в толще гиалоплазмы клеток, входят в состав ресничек, жгутиков, клеточного центра. Не способны к сокращению	<ul style="list-style-type: none"> • Создают эластичный и довольно прочный клеточный каркас, который поддерживает форму клетки. • образуют веретено деления клетки. • Участвуют в распределении хромосом при митозе и мейозе. • Обеспечивают передвижение органоидов
Клеточный центр (центросома)	Совокупность центриолей и микротрубочек веретена деления. Центриоли — цилиндрическая структура, стенки которой образованы 9 триплетами (27) микротрубочек. Центриоли расположены парами перпендикулярно друг другу	Образование полюсов и веретена деления при митозе и мейозе
Органоиды движения (реснички, жгутики)	Отличаются только размерами — жгутики более длинные. В их основе — 20 микротрубочек, расположенных по системе $9(2) + 2$. Опорой являются базальные тельца. Тельце имеет цилиндрическую форму, образовано 9 триплетами микротрубочек, в центре базального тельца микротрубочек нет	<ul style="list-style-type: none"> • Передвижение клеток. Реснички характерны для эпителия дыхательных путей, маточных труб, жгутики — для сперматозоидов

* S — единица Сведберга для обозначения константы седиментации — скорости осаждения при центрифугировании.

Опорно-двигательную систему клетки, или цитоскелет, образуют микронити, микротрубочки, центриоли, а в некоторых клетках — реснички и жгутики. Цитоскелет пронизывает всю гиалоплазму, определяет форму клетки и ее изменение во время деления или перемещения некоторых клеток, сегрегацию веретена деления во время деления клетки, обеспечивает перемещение органоидов в клетке.

1.5.3. Включения

В клетках могут быть клеточные включения, представляющие собой непостоянные образования, то возникающие, то исчезающие в процессе жизнедеятельности клетки. Основное место локализации включений — цитоплазма, но иногда они встречаются и в ядре. По характеру все включения — это продукты клеточного метаболизма. Они накапливаются главным образом в форме гранул, капель и кристаллов. Кроме того, установлено, что в случае инфицирования вирусом бешенства (*Rabies lyssavirus*) и вирусом Эбола (*Ebola virus*) происходит синтез вирусной РНК в органах включения цитоплазмы, которые, таким образом, могут рассматриваться как вирусные фабрики.

1.6. Ядро клетки

Структурные элементы ядра — это хроматин, ядрышко, кариоплазма (нуклеоплазма), кариолемма (ядерная оболочка) (рис. 1.6). Характеристика этих элементов представлена в табл. 1.7. В процессе клеточного цикла (интерфаза + деление клетки) ядро является непостоянной структурой. Во время деления клетки ядерная мембрана разрушается [Ram S. et al., 2016].

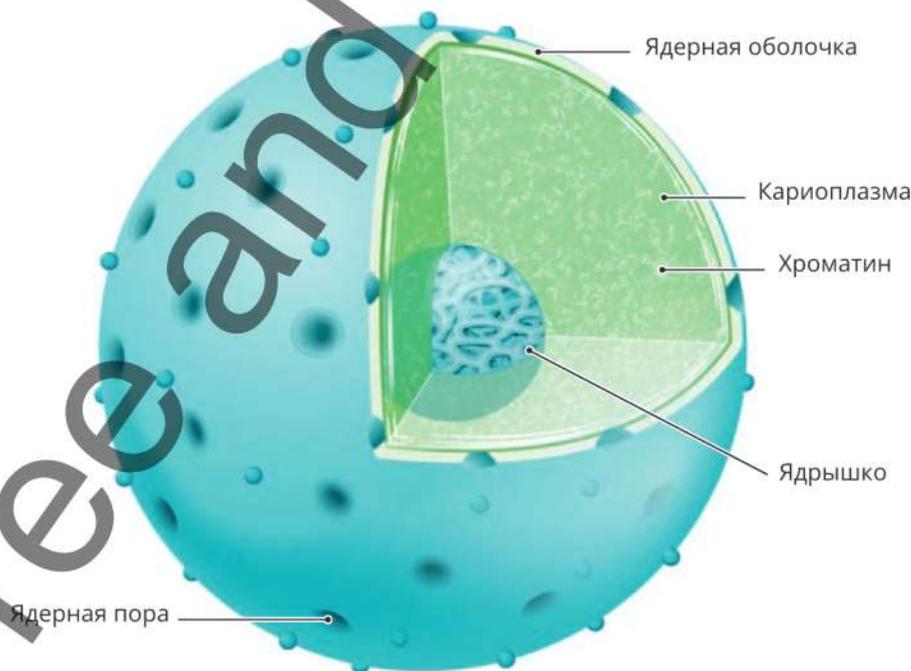


Рис. 1.6. Строение ядра и ядерной мембраны в эукариотической клетке

Таблица 1.7. Характеристика ядра клетки

Структура	Строение/описание	Функции
Кариолема (нуклеолема)	<p>Двумембранная ядерная оболочка, разделенная перинуклеарным пространством, шириной от 25 до 100 нм. Имеются поры диаметром 80–90 нм. В области пор внешняя и внутренняя ядерные мембраны переходят друг в друга, а перинуклеарное пространство оказывается замкнутым. Просвет поры закрыт особым структурным образованием — комплексом поры, который состоит из <i>фибрилярного</i> и <i>гранулярного</i> компонентов. Гранулярный компонент представлен белковыми гранулами диаметром 25 нм, располагающимися по краю поры в три ряда. От каждой гранулы отходят фибриллы и соединяются в центральной грануле, располагающейся в центре поры. Число пор изменяется в процессе дифференцировки клетки. Наружная ядерная мембрана может продолжаться в каналцы эндоплазматической сети</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Отделяет содержимое ядра от цитоплазмы (барьерная функция). • Обеспечивает регулируемый обмен веществ между ядром и цитоплазмой. • Комплекс поры играет роль диафрагмы, регулирующей ее проницаемость. • В наружной ядерной мембране могут локализоваться прикрепленные рибосомы
Кариоплазма (нуклеоплазма)	<p>Ядерный сок состоит из воды, белков и белковых комплексов (нуклеопротеидов, гликопротеидов), аминокислот, нуклеотидов, сахаров. При электронной микроскопии в ней определяются гранулы (15 нм), состоящие из рибонуклеопротеидов. Белки <i>кариоплазмы</i> являются ферментами, осуществляющими расщепление углеводов и образование АТФ. <i>Негистоновые (кислые) белки</i> образуют в ядре структурную сеть (<i>ядерный белковый матрикс</i>), которая вместе с ядерной оболочкой принимает участие в создании внутреннего порядка</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Осуществляет обмен веществ в ядре. • Способствует взаимодействию ядра и цитоплазмы. • Определяет локализацию хроматина
Ядрышко	<p>Сферическое образование диаметром 1–5 мкм располагается среди хроматина. Ядрышек может содержаться от 1 до 4 и более. Ядрышко не является самостоятельной структурой, оно формируется только в интерфазе в ядрышковых организаторах. Микроскопически в ядрышке различают:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>фибрилярный компонент</i> — локализуется в центральной части ядрышка и представляет собой нити рибонуклеопротеидов; • <i>гранулярный компонент</i> — локализуется в периферической части ядрышка и представляет скопление субъединиц рибосом 	<ul style="list-style-type: none"> • Участвует в транскрипции рибосомной РНК. • Способствует соединению рибосомной РНК с белком и образованию субъединиц рибосом
Хроматин	<p>Состоит из хроматиновых фибрилл толщиной 20–25 нм, которые могут располагаться в ядре рыхло или компактно. Различают два вида хроматина: <i>гетерохроматин</i> (плотно упакованный) и <i>эухроматин</i> (менее упакованный)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Хранение генетической информации. • Считывание (транскрипция) генетической информации

1.7. Взаимодействие структур клетки в процессе метаболизма

Метаболизм (от греч. μεταβολή — превращение, изменение), или обмен веществ, — это набор химических реакций, которые возникают в живом организме для поддержания жизни. Они позволяют организмам расти и размножаться, сохранять свои структуры и отвечать на воздействия окружающей среды.

Метаболизм обычно делят на две стадии: *катаболизм* и *анаболизм*. В ходе катаболизма сложные органические вещества распадаются до более простых, при этом выделяя энергию. В процессах анаболизма из более простых синтезируются более сложные вещества, и этот процесс сопровождается затратами энергии.

Аппарат внутриклеточного пищеварения и дезинтоксикации

Основные структуры: лизосомы, свободные рибосомы, комплекс Гольджи, эндосомы, пищеварительные вакуоли, пероксисомы, гладкая эндоплазматическая сеть, митохондрии, цитолемма.

Основные функции: эндоцитоз, аутолиз и аутофагия, нейтрализация ядовитых продуктов клеточного метаболизма.

Энергетический аппарат

Основные структуры: митохондрии.

Основные функции: энергообеспечение всех энергоемких внутриклеточных процессов.

Генетический аппарат

Основные структуры: ядро, митохондрии.

Основные функции: хранение, воспроизведение, передача, реализация, модификация наследственной информации на клеточном и митохондриальном уровнях.

Опорно-двигательный аппарат

Основные структуры: цитоскелет, кариоскелет, цитолемма и ее производные (микрореснички, микроворсинки, псевдоподии, межклеточные контакты), кариолемма, центриоли, базальные тельца, митохондрии.

Основные функции: формообразующая, локомоторная; внутриклеточные перемещения структур (циклоз); движение субстратов по клеточной поверхности, свободное перемещение клетки, эндо- и экзоцитоз; межклеточные соединения и контакты.

1.8. Межклеточные контакты

В многоклеточном организме во всех тканях соседние клетки соединены с внеклеточным матриксом и между собой помощью *межклеточных контактов* (*cell junction*,

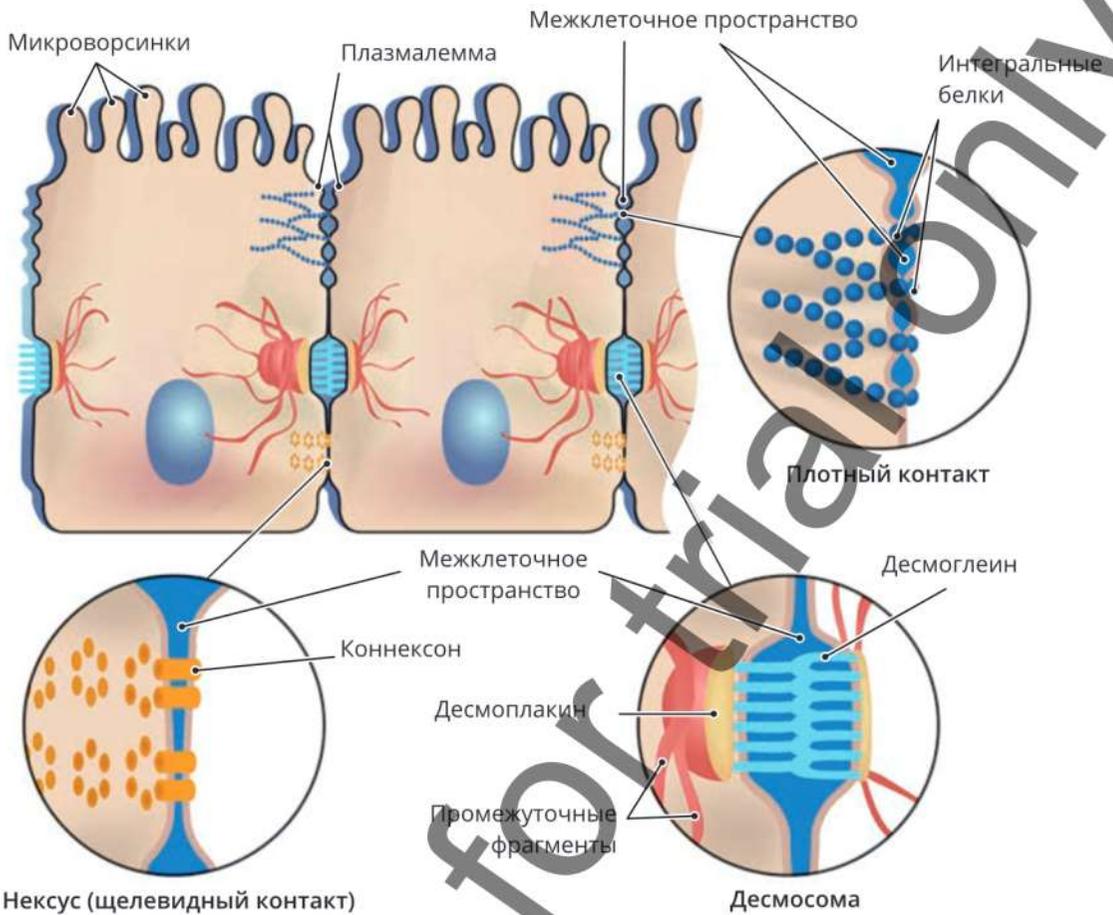


Рис. 1.7. Типы межклеточных контактов

intercellular bridges). Контакты между клетками представляют собой комплексы, которые выполняют следующие функции:

- служат для соединения клеток между собой и являются основой формирования тканей организма;
- создают барьеры проницаемости мембран;
- активно участвуют в процессах обмена веществ.

По функциональным характеристикам межклеточные контакты подразделяют на замыкающие, адгезионные (механические) и проводящие (химические) (рис. 1.7).

1.3.1. Замыкающие контакты

В случае замыкающих контактов (*occluding junctions*) клетки плотно прилегают друг к другу в виде простого или плотного соединения.

Простой контакт между мембранами соседних клеток происходит за счет их пространственных впячиваний и выпячиваний.

Плотный замыкающий контакт (tight junctions) создает водонепроницаемое уплотнение между двумя соседними клетками. Они плотно прилегают друг к другу благодаря множеству мембранных белков, называемых *клаудинами*. Плотные контакты не допускают утечки жидкости между клетками, позволяя слою клеток действовать в качестве непроницаемого барьера. Например, плотные соединения между эпителиальными клетками, выстилающими мочевой пузырь, предотвращают утечку мочи во внеклеточное пространство.

1.8.2. Адгезионные контакты

Процессы присоединения клеток друг к другу и их взаимодействия через специализированные молекулы клеточной поверхности называются *клеточной адгезией (cell adhesion)* [Zajiczek L. et al., 2016]. Адгезия может происходить как при прямом контакте между поверхностями соседних клеток, так и косвенно — при взаимодействии клетки с внеклеточным матриксом.

Молекулы клеточной адгезии подразделяются на четыре основных семейства: *интегрины*, *суперсемейство иммуноглобулинов*, *кадгерины* и *селектины*. Каждая из этих молекул имеет свою функцию и распознает разные лиганды. Кадгерины и иммуноглобулины напрямую связываются с одним и тем же типом молекул клеточной адгезии в другой клетке, а интегрины и селектины — с различными типами молекул. *Протеогликаны* также относят к молекулам клеточной адгезии, они регулируют тонкие процессы в межклеточном матриксе.

Межклеточные адгезионные соединения

Межклеточные адгезионные соединения могут встречаться в разных формах. Их основными связывающими белковыми молекулами являются *кадгерины* — специализированные адгезионные белки, которые обнаруживаются на мембранах обеих клеток и взаимодействуют в пространстве между ними, удерживая мембраны вместе. Для нормального функционирования этих белков необходимы ионы кальция. Внутри клетки кадгерины прикрепляются к особой структуре — *цитоплазматической бляшке*, которая в свою очередь соединяется с промежуточными *актиновыми филаментами*.

Адгезионные соединения между клеткой и внеклеточным матриксом

Межклеточное пространство клетки, или внеклеточный матрикс (*extracellular matrix*), формируют сами клетки, выводя необходимые молекулы во внеклеточное пространство. Внеклеточный матрикс является опорой при организации клеток в ткани и участвует в передаче сигналов между клетками. Клеточно-матричные соединения возникают с участием трансмембранных белков — *интегринов*. Они могут связываться с молекулами во внеклеточном матриксе, а также соединять матрицу с внутриклеточным цитоскелетом [Akiyama S.K. Integrins in Cell Adhesion and Signaling. Hum Cell. 1996; 9(3): 181–6].

Десмосомы

Клетки могут содержать соединения, называемые десмосомами (*desmosome*), которые действуют как точечные сваренные швы между соседними эпителиальными клетками. Десмосома включает в себя комплекс белков. Белки *десмоглейн* и *десмоколин* входят в состав мембран клеток и с участием ионов кальция закрепляют соединения этих клеток. С этими белками в комплексе функционируют и другие белки — *десмоплакин* и *плагтоглобин*, которые способствуют присоединению промежуточных филаментов. Десмосомы скрепляют соседние клетки и остаются соединенными в непрерывный слой в растягивающихся органах и тканях, таких как кожа и сердечная мышца.

1.8.3. Проводящие контакты

В клетках животных коммуникационное соединение (химические и электрические сигналы от клетки к клетке) обеспечивают *нексусы* (так называемые щелевые контакты) и *синапсы*.

Нексусы (щелевидные контакты)

Функционально *нексусы* (лат. *nexus* — связь, сцепление), или щелевидные контакты (*gap junctions*), в клетках представляют собой каналы между соседними клетками, которые обеспечивают транспорт ионов, воды и других веществ.

У позвоночных щелевые соединения развиваются, когда набор из шести мембранных белков (*коннексинов*) образует удлиненную структуру, называемую коннексоном. Когда поры коннексонов соседних клеток совпадают, то между клетками образуется канал. Функционирование щелевых контактов особенно важно в сердечной мышце. Электрический сигнал к сокращению быстро распространяется между клетками сердечной мышцы, и ионы, проходя через щелевые соединения, позволяют клеткам сокращаться в тандеме.

Синапсы

Синапс (греч. *σύναψις, συνάπτειν* — соединение, связь) — место контакта между двумя нейронами или между нейроном и получающей сигнал эффекторной клеткой. Синапсы обеспечивают передачу потенциала действия (нервного импульса) с нервной клетки на другую нервную или иную клетку. Основной функцией синапса является передача нервного импульса между двумя клетками. При этом частота и амплитуда сигнала могут регулироваться или химическим, или электрическим путем. Химический путь передачи импульсов осуществляется с помощью медиаторов, а электрический — посредством прохождения ионов из одной клетки в другую.

Химический состав клетки

2.1. Химические элементы клетки

В составе клеток находятся до 80 химических элементов. По количеству содержания в клетке их подразделили на макро-, микро- и ультрамикроэлементы (табл. 2.1).

Таблица 2.1. Основные элементы, входящие в состав клетки

Название элемента (лат., символ), номер в периодической таблице Менделеева	Содержание в клетке, %
Макроэлементы	
Кислород (Oxygenium, Oxygen, O), 8	65,00–75,00
Углерод (Carboneum, C), 6	15,00–18,00
Водород (Hydrogenium, H), 1	8,00–10,00
Азот (Nitrogenium, N), 7	1,50–3,00
Фосфор (Phosphorus, P), 15	0,20–1,00
Калий (Kalium, K), 19	0,15–0,40
Сера (Sulfur, S), 16	0,15–0,20
Кальций (Calcium, Ca), 20	0,04–2,00
Магний (Magnesium, Mg), 12	0,02–0,03
Натрий (Natrium, Na), 11	0,02–0,03
Железо (Ferrum, Fe), 26	0,01–0,15

Окончание табл. 2.1

Название элемента (лат., символ), номер в периодической таблице Менделеева	Содержание в клетке, %
Микроэлементы	
Бор (Borium, B), 5	0,001000–0,000001
Кобальт (Cobaltum, Co), 27	
Медь (Cuprum, Cu), 29	
Молибден (Molybdaenum, Mo), 42	
Цинк (Zincum, Zn), 30	
Ванадий (Vanadium, V), 23	
Йод (Iodum, I), 53	
Бром (Bromum, Br), 35	
Ультрамикроэлементы	
Уран (Uranium, U), 92	Менее 0,000001
Радий (Radium, Ra), 88	
Золото (Aurum, Au), 79	
Ртуть (Hydrargyrum, Hg), 80	
Бериллий (Beryllium, Be), 4	
Цезий (Caesium, Cs), 55	
Селен (Selenium, Se), 34	

2.2. Неорганические вещества клетки

2.2.1. Вода

Молекула воды (оксид водорода) (H_2O) состоит из двух атомов водорода и одного атома кислорода, которые соединены между собой ковалентной связью (рис. 2.1). Биологическая роль воды определяется малыми размерами ее молекул, их полярностью и способностью соединяться друг с другом водородными связями.

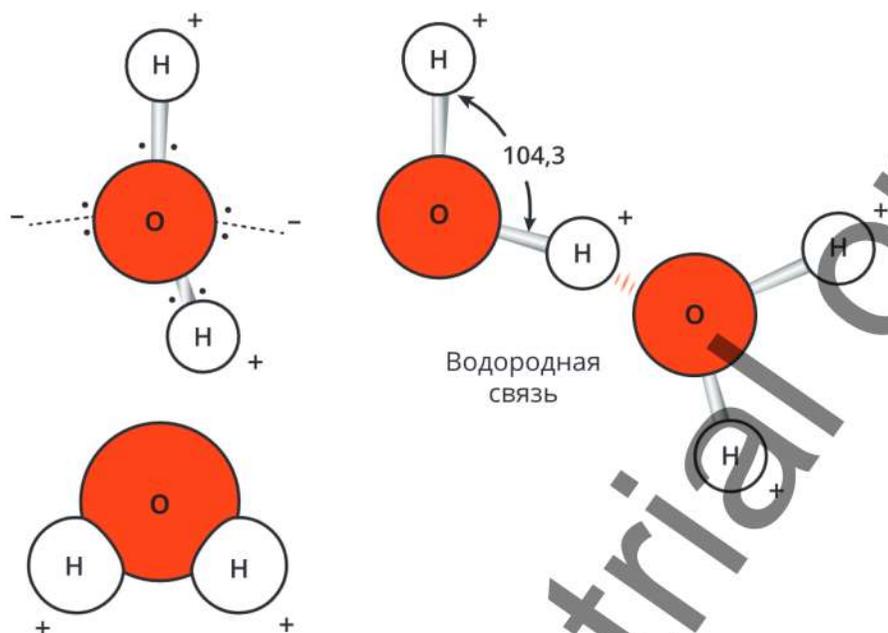


Рис. 2.1. Структура молекулы воды

Содержание воды в организме зависит от его возраста и метаболической активности и наиболее высоко в эмбриональный период развития — 87–95 %. В постнатальный период показатель снижается и составляет: у новорожденного — 80 %, в 6 мес. — 70 %, в 1 год — 65 %, в 5 лет — 62 %. Среднее количество воды во взрослом организме доходит до 60 %.

Содержание воды в клетках тканей и органов различно (табл. 2.2).

Таблица 2.2. Содержание воды в органах и тканях организма

Ткани и органы	Содержание воды, %
Кровь	90
Мозг	70–80
Кости	20–30
Хрящи	60
Мышцы	50–75
Почки	85
Печень	78
Кожа	6–7

Свойства воды

1. Вода — полярное вещество, молекулы воды являются диполями.
2. Вода несжимаема.
3. Имеет высокую теплоемкость и теплопроводность.
4. Обладает текучестью.
5. Имеет уникальное свойство: при охлаждении ее от +4 до 0° С она расширяется. Это очень важно для организмов, обитающих в водной среде.
6. Может быть хорошим смазочным материалом.

Роль воды в клетке

1. Является хорошим растворителем.
2. Обеспечивает тургор клеток.
3. Участвует в терморегуляции клетки.
4. Переносит растворенные в ней вещества.
5. Выступает средой для протекания химических реакций.
6. Участник и продукт химических реакций.
7. Источник водорода и кислорода в фотосинтезе цианобактерий и эукариот.
8. Снижает силу трения в некоторых структурах.

2.2.2. Неорганические соли

В организме человека соли присутствуют в растворенном состоянии в виде катионов и анионов. Катионы и анионы распределены неравномерно между клеткой и внеклеточной средой, что является необходимым условием существования клетки. Основными катионами являются K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , основными анионами — Cl^- , HPO_4^- , HCO_3^- , HPO_3^- . В табл. 2.3 представлены примеры участия катионов и анионов в различных процессах жизнедеятельности организма [Danlybaeva G. et al., 2014].

Таблица 2.3. Примеры участия катионов и анионов в жизнедеятельности организма

Катионы/анионы	Характеристика и функции
Ионы натрия	Участие в формировании нервных импульсов
Ионы калия	
Ионы кальция	Участие в свертывании крови, мышечном сокращении, формировании нервных импульсов. Компоненты межклеточного вещества костной ткани. Активизация работы ряда ферментов
Ионы магния	Активизация работы ряда ферментов
Ионы хлора	Участие в формировании нервных импульсов

Окончание табл. 2.3

Катионы/анионы	Характеристика и функции
Ионы железа	Входят в состав гемоглобина
Ионы цинка	Входят в состав гормона поджелудочной железы инсулина
Ионы йода	Входят в состав гормона щитовидной железы тироксина
Анионы PO_4^{2-} , HCO_3^- , PO_3^-	Входят в состав буферных систем клетки. Поддерживают pH на постоянном уровне
Анионы PO_4^{3-}	Входят в состав ряда органических веществ: нуклеотидов, фосфолипидов

2.3. Органические вещества клетки

К органическим веществам клетки относятся белки, липиды (жиры), углеводы, органические и нуклеиновые кислоты (табл. 2.4).

Таблица 2.4. Содержание органических веществ в клетке

Органические вещества клетки	Содержание в клетке, %
Белки	10,0–20,0
Липиды	1,0–5,0
Углеводы	0,2–2,0
Нуклеиновые кислоты	1,0–2,0
АТФ и другие органические кислоты	0,1–0,5

2.3.1. Белки

Белки, или пептиды (от греч. *пептос* — сваренный, переваренный; англ. *protein*), — это биополимеры, мономерами которых являются аминокислоты.

Аминокислоты — это органические соединения, в молекуле которых содержатся карбоксильные ($-\text{COOH}$) и аминные ($-\text{NH}_2$) группы, которые связаны с одним и тем же атомом углерода (см. рис. 2.2). Аминокислоты отличаются друг от друга только одной частью молекулы, которую называют радикалом ($-\text{R}$). Аминокислоты соединяются между собой в цепь за счет amino- и карбоксильной групп пептидной связью (прочная ковалентная связь).

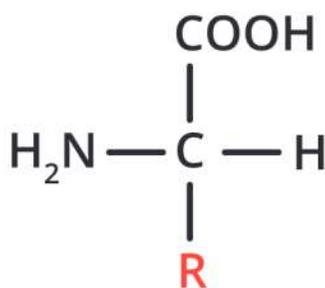


Рис. 2.2. Общая структура аминокислоты

В структуре белков обнаружено 20 аминокислот. По способности синтезироваться в организме человека аминокислоты подразделяют на *незаменимые*, *заменимые* и *полузаменимые*. К незаменимым аминокислотам относят *гистидин*, *лейцин*, *изолейцин*, *лизин*, *метионин*, *фенилаланин*, *треонин*, *триптофан*, *валин*. Заменимыми аминокислотами являются *аланин*, *аргинин*, *аспарагин*, *аспарагиновая кислота*, *цистеин*, *глутаминовая кислота*, *глутамин*, *глицин*, *пролин*, *серин*, *тирозин*.

Известно четыре уровня организации молекулы белка: первичная, вторичная, третичная и четвертичная структуры.

Первичная структура белка (полипептид) — это линейная последовательность аминокислот, соединенная между собой пептидными связями.

Вторичная структура белка (α -спираль) — это дальнейшее закручивание первичной структуры в спираль, где формируются водородные связи между аминокислотами. Эта структура характерна для таких фибриллярных белков, как *актин*, *миозин*, *кератин*, *коллаген*.

Третичная структура белка (глобулярная) представляет собой шарообразную структуру, которая образуется вследствие гидрофобных и электростатических взаимодействий, а также дисульфидных связей. К глобулярным белкам относят ферменты, *альбумин*, *глобулин*.

Четвертичная структура белка формируется за счет объединения нескольких глобулярных структур в единый комплекс. В этом случае образуются гидрофобные, водородные и ионные взаимодействия. Примером такой структуры белка может быть *гемоглобин*, содержащий четыре разные глобулы и геминовую группу.

Функции белков разнообразны (табл. 2.5).

Таблица 2.5. Функции внутриклеточных и тканевых белков организма

Функция белков		Внутриклеточные белки	Тканевые белки
Каталитическая/ферментативная	Ускорение биохимических реакций	<ul style="list-style-type: none"> • ДНК-полимераза. • РНК-полимераза. • Рибонуклеаза 	<ul style="list-style-type: none"> • Трипсин. • Амилаза. • Мальтаза

Окончание табл. 2.5

Функция белков		Внутриклеточные белки	Тканевые белки
Структурная/ механическая	Обеспечение прочности и эластичности тканей	<ul style="list-style-type: none"> Белки клеточной мембраны, органоидов. Белки ДНК 	<ul style="list-style-type: none"> Коллаген Кератин
Транспортная	Транспорт макромолекул в клетку с помощью специальных транспортных белков мембран	<ul style="list-style-type: none"> Мембранные белки. Мембранная АТФаза 	<ul style="list-style-type: none"> Гемоглобин. Миоглобин. Транскортин. Липопротеиды
Регуляторная/ гормональная	Регуляция обмена веществ внутри клеток. Регуляция обмена веществ в разных клетках целого организма	<ul style="list-style-type: none"> Гистоны. Белки-репрессоры 	<ul style="list-style-type: none"> Инсулин. Глюкагон. Соматотропин. Лютропин
Защитная	Защита организма от вторжения других организмов или вредных веществ	<ul style="list-style-type: none"> Белки клеточной мембраны 	<ul style="list-style-type: none"> Иммуноглобулины Интерлейкины
Двигательная	Сокращение микронитей клетки. Мышечное сокращение	<ul style="list-style-type: none"> Актин. Миозин 	<ul style="list-style-type: none"> Актин. Миозин
Запасующая/ трофическая	Запасной материал	<ul style="list-style-type: none"> Овальбумин. Ферритин 	<ul style="list-style-type: none"> Казеин
Рецепторная	Избирательное связывание различных регуляторов на поверхности клеточных мембран или внутри клетки	<ul style="list-style-type: none"> Регуляторная субъединица протеинкиназы. Цитозольный рецептор эстрадиола 	<ul style="list-style-type: none"> Гормоны медиаторов, циклических нуклеотидов. Глюкагоновый рецептор

2.3.2. Углеводы

Углеводы (англ. *carbohydrates*) — это органические соединения с общей формулой $C_n(H_2O)_m$, где $n > 3$, которые содержат карбонильную группу и несколько гидроксильных групп. Углеводы первого и второго порядка — это полимеры, мономерами которых являются *моносахариды* (табл. 2.6, 2.7).

Таблица 2.6. Общая характеристика углеводов

Углевод	Свойство	Строение	Пример
Моносахариды	Кристаллическая форма, хорошо растворимы в воде,	Одна молекула, которая может включать:	Пентозы: <ul style="list-style-type: none"> рибоза $[C_5H_{10}O_5]$, дезоксирибоза $[C_5H_{10}O_4]$

Окончание табл. 2.6

Углевод	Свойство	Строение	Пример
	имеют сладкий вкус	3 (триозы), 4 (тетрозы), 5 (пентозы), 6 (гексозы) атомов углерода	Гексозы: <ul style="list-style-type: none"> • глюкоза $[C_6H_{12}O_6]$, • фруктоза $[C_6H_{12}O_6]$, • галактоза $[C_6H_{12}O_6]$
Полисахариды первого порядка	Кристаллическая форма, хорошо растворимы в воде, имеют сладкий вкус	3–4 остатка моносахаридов	Дисахариды: <ul style="list-style-type: none"> • сахароза $[C_{12}H_{22}O_{11}]$, • мальтоза $[C_{12}H_{24}O_{12}]$, • лактоза $[C_{12}H_{22}O_{11}]$
Полисахариды второго порядка	Не имеют кристаллической формы, нерастворимы в воде	Состоят из большого числа остатков моносахаридов	Гликоген $[(C_6H_{10}O_5)_n]$, <ul style="list-style-type: none"> • крахмал $[(C_6H_{10}O_5)_n]$, • целлюлоза $[(C_6H_{10}O_5)_n]$, • хитин $[(C_8H_{13}O_5N)_n]$

Таблица 2.7. Функции углеводов в организме

Название функции	Описание
Энергетическая	При распаде углеводов высвобождаемая энергия рассеивается в виде тепла или накапливается в молекулах АТФ. При окислении 1 г углеводов выделяется 17 кДж энергии (4,1 ккал). Углеводы обеспечивают около 50–60 % суточного энергопотребления организма, а при мышечной деятельности на выносливость — до 70 %. В организме используется свободная глюкоза или запасенные углеводы в виде гликогена (особенно для деятельности мозга)
Пластическая	Моносахариды входят в состав нуклеотидов, АТФ и АДФ. Отдельные углеводы являются структурными компонентами клеточных мембран. Продукты превращения глюкозы (глюкуроновая кислота, глюкозамин и др.) входят в состав полисахаридов и сложных белков хрящевой и других тканей
Запасное питательное вещество	Углеводы накапливаются в тканях (скелетные мышцы, печень и др.) в виде гликогена. Систематическая деятельность мышц приводит к увеличению запасов гликогена, что повышает энергетические возможности организма
Специфическая	Отдельные углеводы являются антикоагулянтами и участвуют в свертывании крови. Другие углеводы являются рецепторами цепочки гормонов и оказывают противоопухолевое действие
Защитная	Сложные углеводы входят в состав компонентов иммунной системы. Мукополисахариды находятся в слизи, которая покрывает многие органы (поверхность сосудов носа, бронхов, пищеварительного тракта, мочеполовых путей) и защищают от проникновения бактерий и вирусов
Регуляторная	Клетчатка пищи не поддается процессу расщепления в кишечнике, однако активирует перистальтику кишечного тракта, функцию ферментов пищеварительного тракта

2.3.3. Липиды

Липиды (от др.-греч. λίπος — жир) — это органические соединения, включающие жиры и жироподобные вещества. Молекулы *простых липидов* состоят из спиртов и жирных кислот, а *сложных липидов* — из спирта, высокомолекулярных жирных кислот и других компонентов (табл. 2.8). Они обладают близкими физико-химическими свойствами: нерастворимостью в воде и хорошей растворимостью в органических растворителях (бензин, хлороформ, спирт, эфир) [Fallah A. et al., 2018].

Таблица 2.8. Классификация липидов

Простые липиды (состоят из остатков жирных кислот и спиртов)		
Нейтральные кислоты	Триглицериды	
	Являются производными глицерина и образуются при присоединении к нему высших жирных кислот. Получаются из продуктов расщепления пищевых жиров и являются формой сохранения жиров в организме человека. Основная часть пищевых жиров (98 %) является триглицеридами. Жир также сохраняется в организме в виде триглицеридов	
	Жирные кислоты	
	Насыщенные жирные кислоты	Продукты, в которых содержится больше всего насыщенных жиров, это свиное сало и жир, куриный, говяжий и бараний жир, сливочное масло и маргарин
	Ненасыщенные жирные кислоты	Ненасыщенные жирные кислоты содержатся в растительных источниках. По типу связи их подразделяют: 1) на <i>мононенасыщенные</i> (оливковое масло); 2) <i>полиненасыщенные</i> (льняное масло)
Воски	<i>Сложные эфиры</i>	Пчелиный воск выделяется специальными железами медоносных пчел
	<i>Спирты</i>	Соединения гидроксила (–ОН), связанные с атомом углерода
Сложные липиды (соединение триглицерида с другими химическими веществами)		
Фосфолипиды — глицерин, соединенный с одной или двумя жирными кислотами и фосфорной кислотой		Входят в структуру клеточной мембраны
Гликолипиды — соединения жировых и углеводородных компонентов		Входят в состав липидного слоя плазматических мембран
Липопротеиды — комплексы жиров и белков		Содержатся в плазме крови

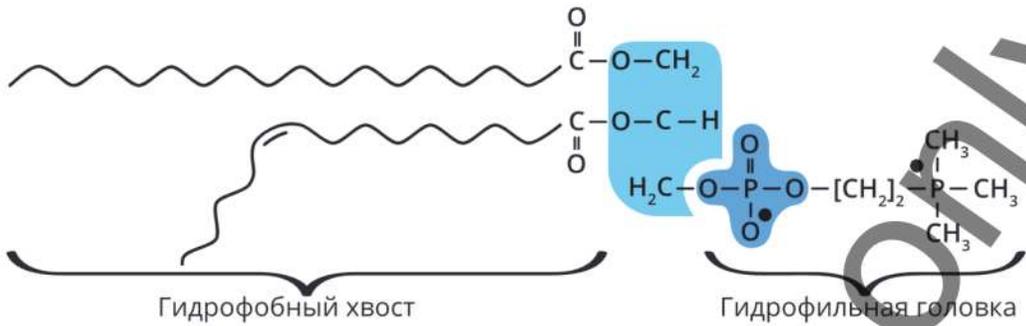


Рис. 2.3. Структура молекулы фосфолипида

Молекула липида состоит из гидрофильной головки, в состав которой входит глицерин, остаток фосфорной кислоты (фосфолипид) или углевод (гликолипид), и двух гидрофобных хвостов, состоящих из остатков жирных кислот (рис. 2.3).

В организмах липиды выполняют ряд важных функций (табл. 2.9).

Таблица 2.9. Функции липидов в организме

Название функции	Характеристика
Энергетическая	При окислении жиров высвобождается большое количество энергии, которая идет на образование АТФ. В форме липидов хранится значительная часть энергетических запасов организма, которые расходуются при недостатке питательных веществ. При полном распаде 1 г жира выделяется 38,9 кДж энергии, что примерно в 2 раза больше, чем при окислении углеводов и белков
Структурная	Фосфолипиды принимают участие в построении мембран клеток всех органов и тканей (фосфолипиды, гликолипиды, липопротеиды). Они участвуют в образовании многих биологически важных соединений
Защитная	Накапливаясь в подкожной клетчатке и вокруг некоторых органов (почек, кишечника), жировой слой защищает организм и его отдельные органы от механических повреждений
Теплоизоляционная	Благодаря низкой теплопроводности слой подкожного жира помогает сохранить тепло
Регуляторная	Многие гормоны являются производными холестерина, например половые (тестостерон у мужчин и прогестерон у женщин) и кортикостероиды. Производные холестерина, витамин D играют ключевую роль в обмене кальция и фосфора. Желчные кислоты участвуют в процессах пищеварения. В миелиновых оболочках аксонов нервных клеток липиды являются изоляторами при проведении нервных импульсов
Источник метаболической воды	Окисление 100 г жира дает примерно 105–107 г воды. Эта вода очень важна для некоторых обитателей пустынь, в частности для верблюдов, способных обходиться без воды 10–12 сут: жир, запасенный в горбе, используется именно в этих целях. Необходимую для жизнедеятельности воду медведи, сурки и другие животные, впадающие в спячку, получают в результате окисления жира

2.3.4. Нуклеиновые кислоты

Нуклеиновые кислоты — это полимеры, мономерами которых являются нуклеотиды. К ним относятся дезоксирибонуклеиновая кислота (*deoxyribonucleic acid*, DNA) и рибонуклеиновая кислота (*ribonucleic acid*, RNA) — ДНК и РНК соответственно.

Нуклеотиды, как ДНК, так и РНК, имеют общий принцип строения и состоят из азотистого основания, моносахарида (*дезоксирибозы* и *рибозы* соответственно) и остатка фосфорной кислоты (см. рис. 2.4). Фосфатная группа прикреплена к 5'-атому углерода моносахаридного остатка, а органическое соединение — к 1'-атому. В химический состав нуклеиновых кислот входят сложные высокомолекулярные соединения (табл. 2.10).

Таблица 2.10. Химический состав дезоксирибонуклеиновой (ДНК) и рибонуклеиновой (РНК) кислот

Нуклеиновая кислота	Азотистое основание	Сахар	Нуклеозид	Кислота (нуклеотид)
ДНК	Цитозин	Дезоксирибоза	Дезоксицитидин	Дезоксицитидиловая
	Тимин		Дезокситимидин	Дезокситимидиловая
	Аденин		Дезоксиаденозин	Дезоксиадениловая
	Гуанин		Дезоксигуанозин	Дезоксигуаниловая
РНК	Цитозин	Рибоза	Цитидин	Цитидиловая
	Урацил		Уридин	Уридиловая
	Аденин		Аденозин	Адениловая
	Гуанин		Гуанозин	Гуаниловая

Первичная структура нуклеиновых кислот. Первичная структура ДНК и РНК образуется одинаково. Нуклеотиды соединяются между собой в направлении 3' → 5' фосфодиэфирными связями (см. рис. 2.5). Далее пространственные модели этих молекул выстраиваются несколько иначе.

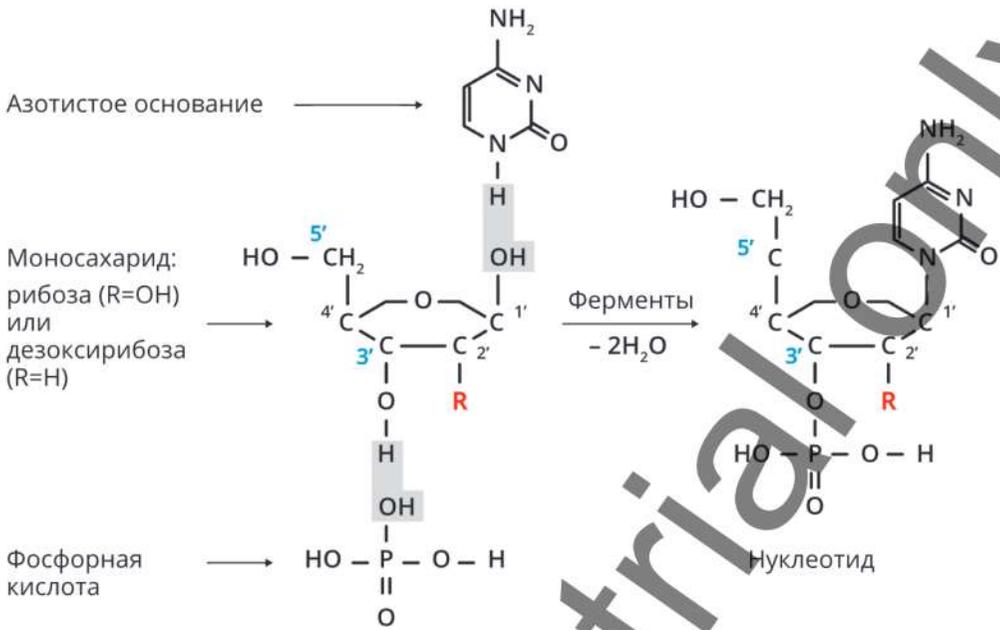
2.3.4.1. Дезоксирибонуклеиновая кислота

Структура ДНК

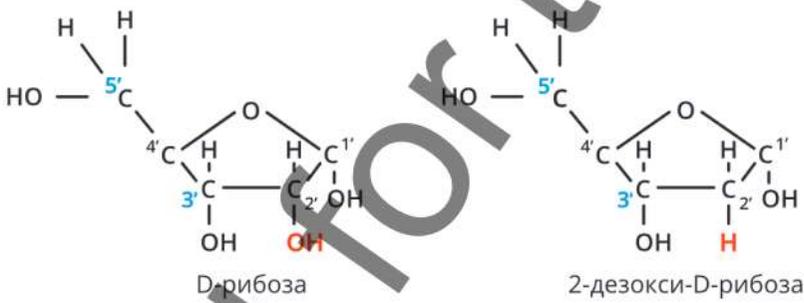
Вторичная структура ДНК (двойная спираль) — две антипараллельные полинуклеотидные цепи связываются между собой водородными связями, которые образуются между комплементарными друг другу азотистыми основаниями (см. рис. 2.6). Аденин образует пару только с тиминном, а гуанин — с цитозином (правило Чаргаффа). Пара А–Т соединена двумя водородными связями, а пара G–C — тремя.

Правило Чаргаффа (правило комплементарности) заключается в том, что к какому бы организму ДНК ни относилась, какой бы длины она ни была, в ней всегда равное количество:

A

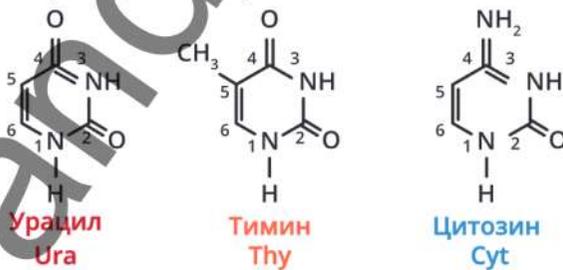


B



B

Пиримидиновые нуклеиновые основания



Пуриновые нуклеиновые основания

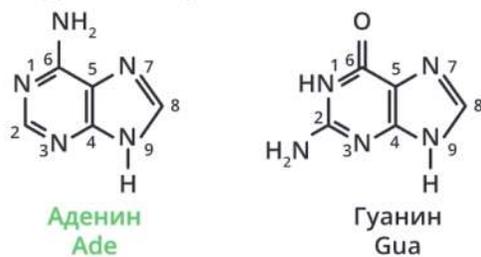


Рис. 2.4. Структура нуклеотида:

A — формирование нуклеотида; **B** — формула моносахаридов; **B** — формула азотистых оснований

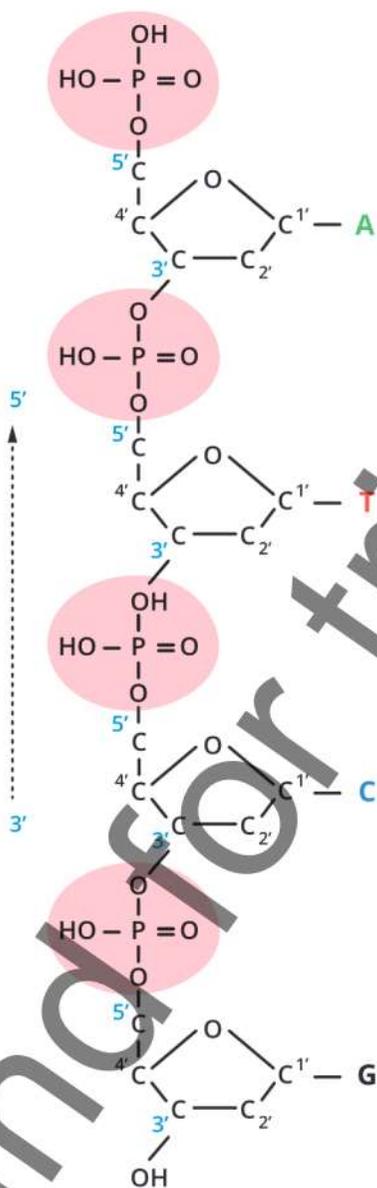
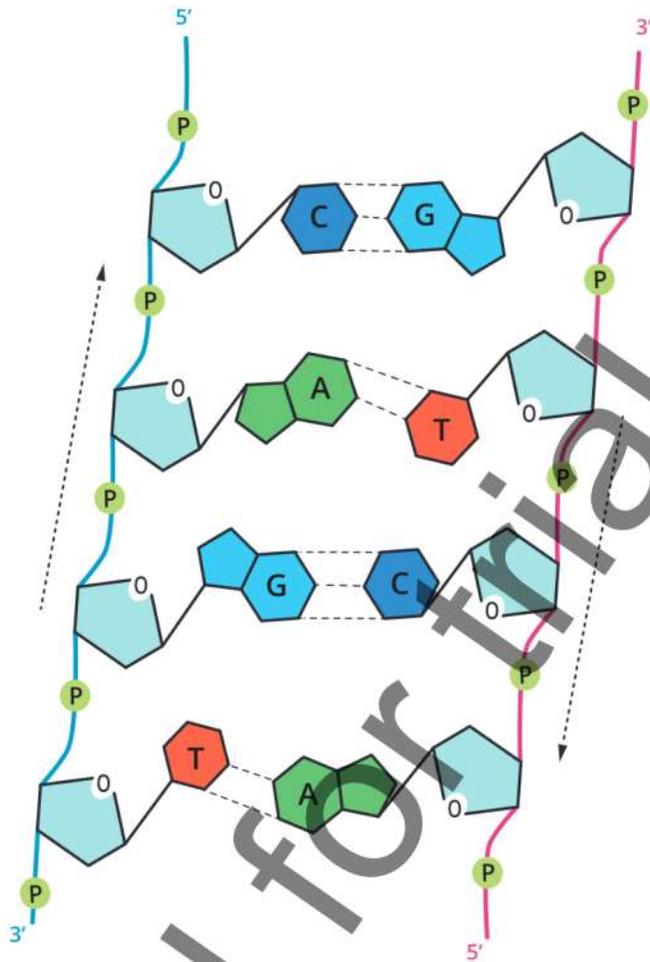


Рис. 2.5. Первичная структура нуклеиновых кислот

- аденина и тимина, а гуанина и цитозина: $A = T$, $G \equiv C$ соответственно;
- пуринов и пиримидинов: $A + G = T + C$;
- оснований с аминогруппами в положении 6 и оснований с кетогруппами в положении 6: $A + C = T + G$.

Модель структуры ДНК, предложенная Д. Уотсоном и Ф. Криком, — это две параллельные неразветвленные полинуклеотидные цепи, которые закручиваются между собой в двойную спираль (см. рис. 2.7). Эта спираль, в свою очередь, закручивается вокруг воображаемой оси. Цепи антипараллельны и направлены в противоположные стороны так, что 3'-конец одной цепи находится напротив 5'-конца другой цепи [Акифьев А. П. и др., 2005].

А



Б

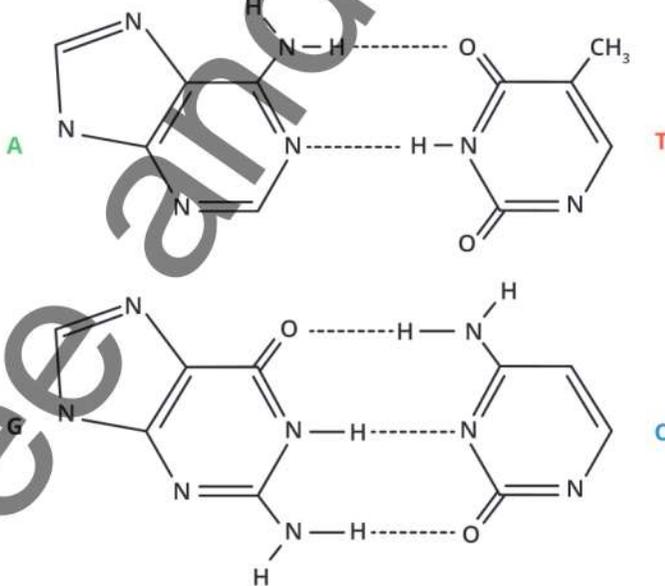


Рис. 2.6. Формирование вторичной структуры ДНК:

А — направление цепей ДНК; Б — образование водородных связей между азотистыми основаниями нуклеотидов

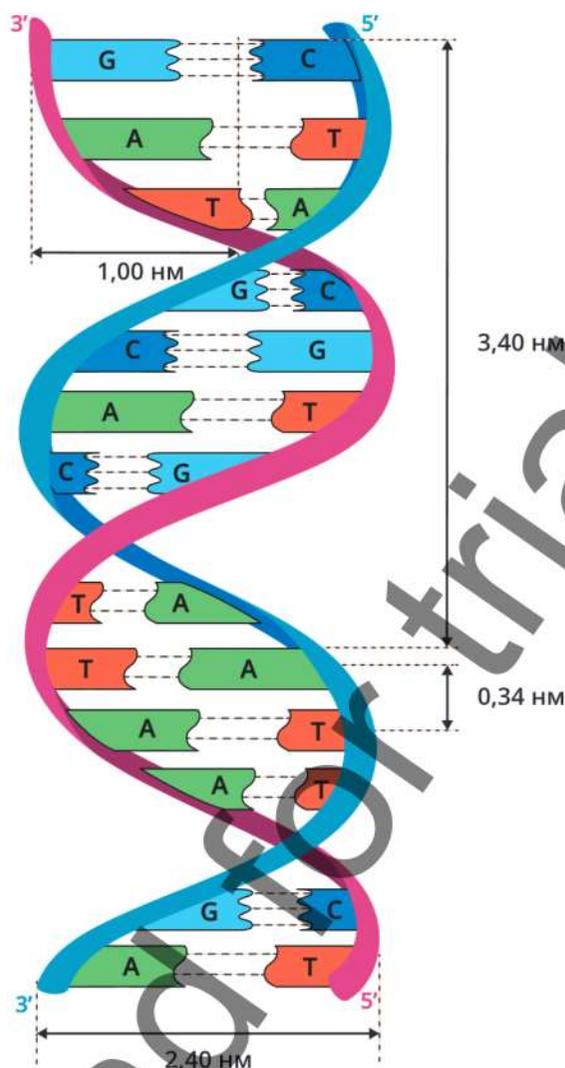


Рис. 2.7. Модель ДНК Д. Уотсона и Ф. Крика (В-форма)

Ширина двойной спирали составляет от 22 до 24 Å, или 2,2–2,4 нм, длина каждого нуклеотида — 3,3 Å (0,33 нм). Такое строение молекулы ДНК обеспечивает ее уникальную способность к самовоспроизведению (репликации), самовосстановлению (репарации) и хранению и реализации наследственной информации.

В зависимости от различных условий вторичная структура ДНК бывает спирализована в разной степени. Эта конформационная структура ДНК непостоянна. Однако принято различать несколько типов спирализации ядерной ДНК (см. табл. 2.11).

А-форма ДНК имеет более компактную форму, чем В-форма, нуклеотидная цепь наклонена вдоль продольной оси молекулы. Преобладает в концентрированных растворах с высокой ионной силой либо в сухой ДНК. А-форма ДНК необходима в тех процессах, где образуются ДНК-РНК комплексы, т. к. РНК может принимать только А-форму спирали из-за наличия ОН-группы. Данная форма более устойчива к ультрафиолетовому (УФ) излучению.

Таблица 2.11. Характеристика различных форм вторичной структуры ДНК

Форма ДНК	Тип спирали	Диаметр спирали, нм	Расстояние между парами оснований, нм	Число пар оснований на одном витке спирали	Угол между плоскостями оснований и осью спирали, град.
A	Правозакрученная	2,37	0,23	11	70
B		2,54	0,34	10	90
C		1,90	0,30	9	~95
Z	Левозакрученная	1,84	0,38	12	100

В-форма ДНК — наиболее часто встречающаяся конформация ДНК *in vivo*. Известна как модель Уотсона—Крика [Watson J. D., 2001].

Z-форма — зигзагообразная ДНК, состоящая из поочередно расположенных пуринов и пиримидинов. Она обнаружена в хромосомах дрозофилы и, возможно, участвует в регуляции сверхспирализации ДНК.

D-форма — правозакрученная ДНК. Она может проявляться только в участках ДНК, лишенных гуанина. Число п. о. на виток в такой молекуле меньше, чем в более распространенных формах А, В и С.

H-форма ДНК может образовываться любой гомопурино-гомопиримидиновой последовательностью, являющейся зеркальным повтором, или H-палиндромом.

Третичная структура ДНК представляет собой сверхспирализованную молекулу.

Четвертичная структура ДНК — это свехспирализованная нить в комплексе с гистоновыми и негистоновыми белками (рис. 2.8). Нить ДНК наматывается вокруг белкового каркаса и формирует нуклеосому, или нуклеосомный кор. Далее эта структура становится еще более компактной [Breaker R. R., 2014].

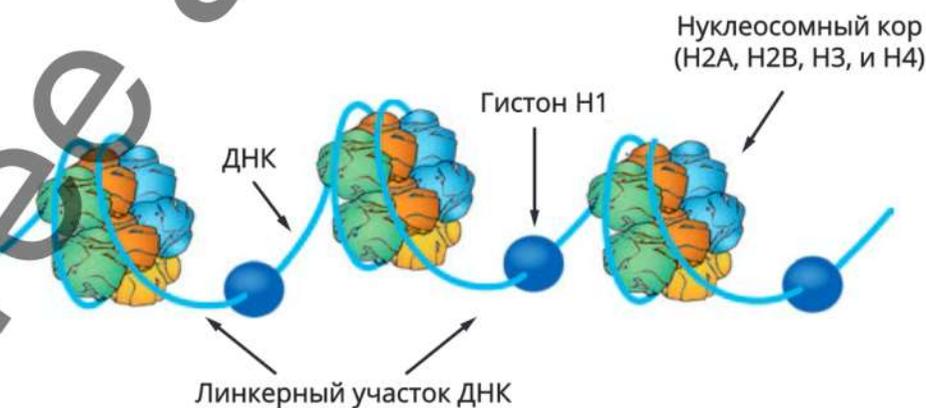


Рис. 2.8. Небольшой участок четвертичной структуры ДНК

Функции ДНК

1. Хранение наследственной информации.
2. Передача наследственной информации из поколения в поколение. Генетическая информация в соматических клетках организма передается посредством митоза, наследственная информация от родителей к детям передается посредством мейоза.
3. Передача наследственной информации на РНК.

ДНК имеет способность расплетаться. Этот процесс называется денатурацией.

Свойства ДНК

Денатурация ДНК (плавление, диссоциация) — процесс разрушения водородных связей под воздействием различных факторов ($t^{\circ}\text{C}$, pH и др.). Обычно денатурация ДНК происходит при температуре 94°C (рис. 2.9) и носит обратимый характер. Восстановление вторичной структуры ДНК называется *ренатурацией* (*отжиг*, *реассоциация*), происходит при медленном понижении температуры. Эта информация имеет важное значение при разработке молекулярно-цитогенетических и молекулярно-генетических методов анализа.

Другие виды ДНК в организме человека

ДНК митохондрий (мтДНК) иначе называют *25-й хромосомой человека* (см. рис. 2.10). Она составляет менее 1 % всей клеточной ДНК. В каждой соматической клетке содержится около 1000 митохондрий. В сумме мтДНК составляют примерно 5 % от общего количества ДНК в организме; содержат кольцевую двухцепочечную суперскрученную ДНК без белков. Часто она более тяжелая за счет большого содержания **G–C** пар [Szczepanowska K., 2015].

У человека геном митохондрий содержит мтДНК, которая состоит из 16 569 нуклеотидов и кодирует две рибосомные РНК, 22 транспортных РНК и 13 полипептидов. Эти полипептиды участвуют в реакциях *окислительного фосфорилирования*. Гены митохондрий человека не несут *интронных* последовательностей. Геном митохондрий был полностью секвенирован в 1981 г.

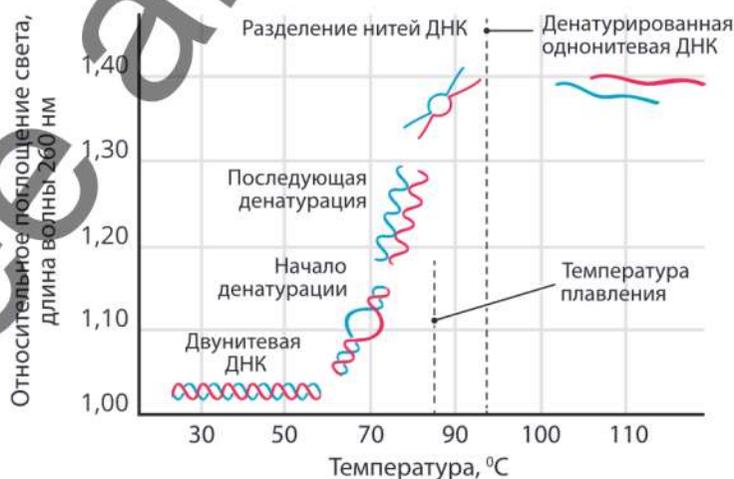


Рис. 2.9. Этапы денатурации ДНК при изменении температурного режима *in vitro*

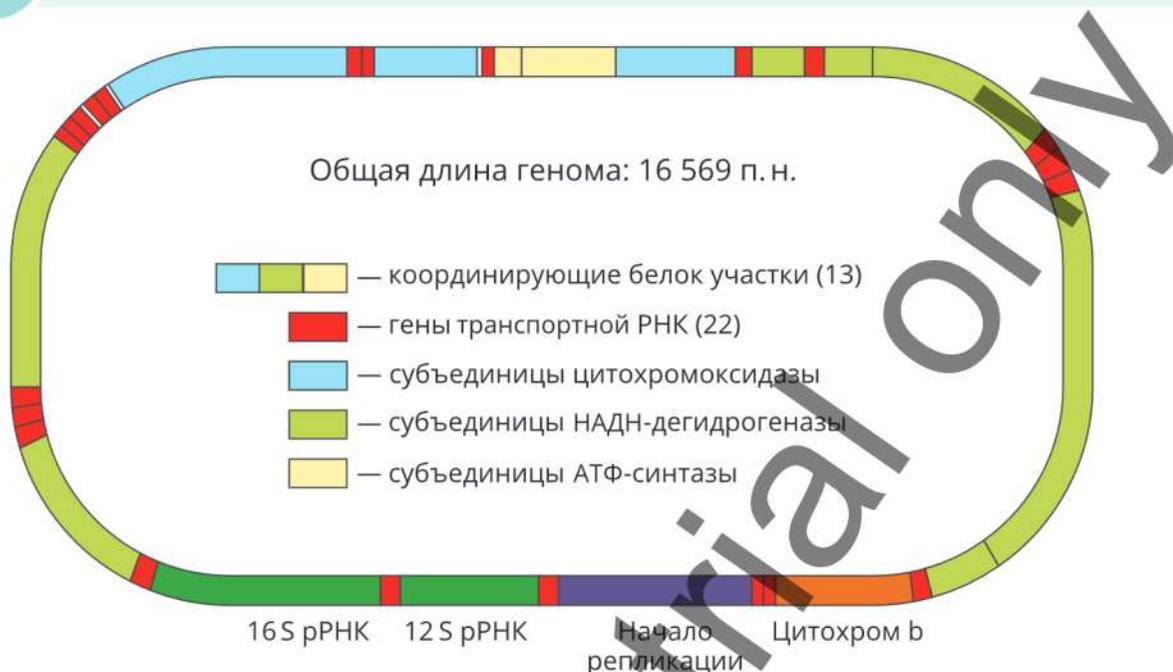


Рис. 2.10. Митохондриальная ДНК

АТФ — аденозинтрифосфат; **НАДН** — никотинамидадениндинуклеотид; **рРНК** — рибосомные нуклеиновые кислоты (16 S и 12 S).

Митохондриальная ДНК наследуется только по материнской линии. В цитоплазме женской половой клетки (яйцеклетки) — тысяча митохондрий; мтДНК сперматозоидов не попадают в оплодотворяемую яйцеклетку.

Свободная внеклеточная ДНК (свДНК) находится во внеклеточных жидкостях в виде таких структур, как микропузырьки, микрочастицы, апоптотические тельца, экзосомы, гистоновые комплексы. Эта ДНК может быть как ядерной, так и митохондриальной. В основном содержится в плазме крови, попадая туда из опухолевых или неопухолевых соматических клеток, подвергающихся процессам апоптоза и некроза. В организме человека к семейству свДНК относят:

- ДНК из эритробластов, ядра которых энуклеируются в процессе дифференцировки в эритроциты;
- ДНК из лимфоцитов в процессе их апоптотической гибели;
- ДНК эмбрионов в крови матери;
- бактериальную и вирусную ДНК.

Повышенный по сравнению с нормой уровень свДНК необходимо считать диагностическим сигналом о развитии, наличии того или иного заболевания [Fuchs T.A., et al., 2010].

ДНК эгоистичная. К ней обычно относят мобильные генетические элементы (МГЭ) (табл. 2.12). Мобильные элементы, или *транспозоны* (*Transposable Elements, TE, transposon*), — это ДНК-фрагменты, способные размножаться и перемещаться в геноме различным образом. Мобильные элементы генов обнаружены

Таблица 2.12. Характеристика мобильных генетических элементов у эукариот и прокариот

Тип	Состав и характеристика	Пример	Вариант перемещения по геному	Значение для генома
Эукариоты				
ДНК-транспозоны автономные	Фланговые инвертированные повторы TIR (<i>Tandem Inverted Repeats</i>) 150–700 п. н. и дупликация сайта встраивания 5–6 п. н. Транслоказы, цистеин и АТФ-аза	Полинтоны (<i>Polintons</i>)	Путем вырезания и реинтеграции в новое место генома — внехромосомная репликация, обратная транскрипция, трансляция	Участвуют в мутациях и необходимы для приобретения новых адаптивных признаков
Ретроэлементы LTR (<i>Long Terminal Repeats</i> — длинные концевые повторы), содержащие ретротранспозоны	Нет фланговых повторов и дупликаций сайта встраивания	Хелитроны (<i>Helitrons</i>)	Путем вырезания и реинтеграции в новое место генома, репликация по типу катящегося кольца, обратная транскрипция, трансляция	Участвуют в горизонтальном переносе генетического материала между удаленными таксонами и влияют на геном хозяина за счет механизмов перетасовки экзонов (<i>exon-shuffling</i>) и «захвата» генов (<i>gene capture</i>)
LTR, не содержащие ретротранспозоны	Обратная транскриптаза, интеграза. Длина — 100–1800 п. н. Внутренний промотор РНК-полимеразы II. Содержит единственную открытую рамку считывания (<i>Open Reading Frame, ORF</i>) длиной 1350 п. н.	THE (<i>Transposon-like Human Elements</i>) — транспозонподобные элементы у человека	Репликативная транспозиция — копирование и встраивание	Образуют промежуточные формы РНК, синтезируемые промотора в LTR
LTR, не содержащие ретротранспозоны	Обратная транскриптаза, эндонуклеаза, содержат одну или две открытые рамки считывания	LINE, SINE (соответственно Long/Short Interspersed Nuclear Element — длинные/короткие диспергированные ядерные элементы) Alu-повторы у человека	Образует промежуточные формы РНК, синтезируемые с соседнего промотора	16% геномной ДНК, являются мутациями и онкогенами. Рекомбинация последовательностей автономных мобильных элементов одного класса. Длина 70–600 п. н., внутренняя полимераза II.

Окончание табл. 2.12

Тип	Состав и характеристика	Пример	Вариант перемещения по геному	Значение для генома
Прокариоты				
Вставочные элементы	Ген транспозаза и инвертированные повторы (<i>Inverted Repeats, IR</i>), длина — 700–2500 п. н.	IS (<i>Inserted Sequences</i>)-элементы	Транспозиция (перемещение) элемента связана с репликацией	Являются причиной наследственных болезней и некоторых форм рака
Простые транспозоны	Гены устойчивости к антибиотикам, тяжелым металлам	Транспозон (<i>Tn</i>) ³	Транспозиция (перемещение) элемента связана с репликацией и включает стадию транспозиции	Играют роль в эволюции бактерий
Сложные транспозоны	Гены устойчивости к антибиотикам, тяжелым металлам, на концах — измененные IS	<i>Tn</i> 10	Обмен генами между отдаленными видами бактерий	
Умеренные фаги		Фаг λ (лямбда)	Обеспечивается ферментной системой, которая состоит из клеточных белков и белков, кодируемых геномом фага	Вносят изменения в структуру и функции бактериального генома
Эписомы	IS либо Tn-элементы	<i>F-эписома Escherichia coli</i> — факторы фертильности (конъюгации бактерий)	С помощью реципрокного кроссинговера	Обладают свойством трансмиссивности

во всех изученных живых организмах — от бактерий до млекопитающих. У человека примерно 42 % генома состоит из ретротранспозонов и около 2–3 % — из ДНК-транспозонов [Hughes S. H., 2015]. Внутренние регуляторные части мобильных элементов могут выступать как *cis*-регуляторы экспрессии.

ДНК бактерий составляет около 80 % в нуклеоиде, а в ядре эукариот только 50 %. ДНК свернута в петли по 40 тыс. п. н. в каждой петле-домене. Основания петель защищены от вращения ДНК с одной петли на другую. В геноме бактерий примерно 100 таких доменов.

2.3.4.2. Рибонуклеиновая кислота

Структура РНК

Как описывалось ранее, первичная структура РНК представляет собой линейные полинуклеотиды, которые соединяются между собой фосфодиэфирными связями (см. рис. 2.5). В качестве пентозы — рибоза, а одно из азотистых оснований — урацил — заменяет тимин в молекуле ДНК (см. табл. 2.10).

Вторичная и третичная структуры зависят от функций той или иной молекулы РНК.

Вторичная структура РНК представляет собой спирализованные петли — «шпильки» в отдельных участках цепи. Эти петли образуются за счет водородных связей между азотистыми основаниями, согласно правилу Чаргаффа, по принципу комплементарности. Участки цепи РНК в таких спиральных структурах антипараллельны. Наличие спирализованных участков характерно для большинства типов РНК.

Третичная структура РНК возникает путем взаимодействия спирализованных участков вторичной структуры. В этом случае образуются дополнительные водородные связи между азотистыми основаниями нуклеотидов, возможно, достаточно удаленными друг от друга. Также могут возникнуть связи между ОН-группами остатков рибозы и азотистыми основаниями.

В РНК очень высоко содержание *минорных* оснований и нуклеозидов, а именно:

- дигидроуридина — в урациле нет одной двойной связи;
- псевдоуридина — урацил иначе связан с рибозой;
- диметиладенина и диметилгуанина — в азотистых основаниях по две дополнительные метильные группы.

Самые крупные РНК (от 75 до нескольких тысяч нуклеотидов) на несколько порядков короче, чем хромосомная ДНК.

Виды РНК и их функции

Существует много видов РНК, которые выполняют различные функции (см. табл. 2.13) [Russo I. et al., 2018].

Таблица 2.13. Виды РНК и их функции в клетках

Вид РНК	Процесс	Функция
мРНК — матричные, или информационные	Трансляция	Кодируют полипептидную цепочку — первичную структуру белков
рРНК — рибосомные		Формируют структуру рибосомы и катализируют синтез аминокислотной цепи
тРНК — транспортные		Адаптеры между мРНК и аминокислотами
мяРНК — малые ядерные	Сплайсинг	Образование <i>сплайсосомы</i>
spoРНК — малые ядрышковые	Процессинг	Участвуют в процессинге и химической модификации рРНК
scaРНК — малые РНК из телец Кохаля		Используются для модификации малой ядерной и малой ядрышковой РНК
miРНК — микроРНК	Регуляции трансляции	Регулируют экспрессию генов и блокируют трансляцию отдельных мРНК
siРНК — малые интерферирующие РНК		Выключают экспрессию генов, управляют деградацией отдельных мРНК
РНК-праймер	Репликация	Участвует в начале элонгации* репликации
Другие некодирующие РНК		Синтез теломер, инактивация X-хромосомы, транспорт белков в эндоплазматическую сеть

* Собственно синтез.

Характеристика некоторых основных видов РНК

Матричная (информационная) РНК представляет собой линейную структуру (рис. 2.11, А): 5'-участок (*кэп*) — это нетранслируемый участок для связи с рибосомой, инициирующий кодон AUG. 3'-конец (*поли(А)-хвост*) — также нетранслируемый

А

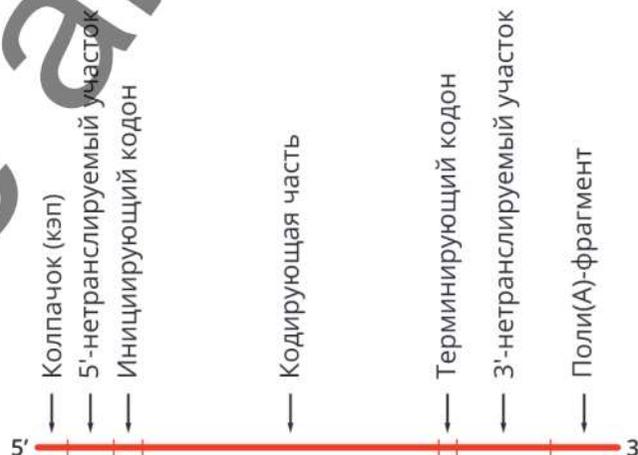
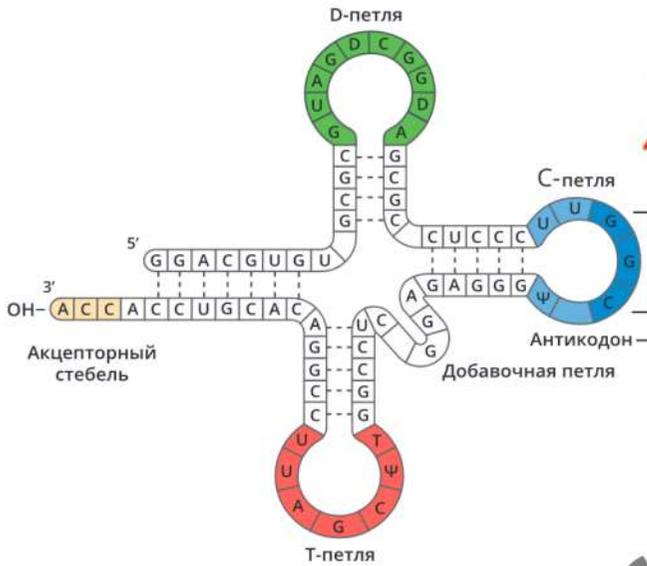


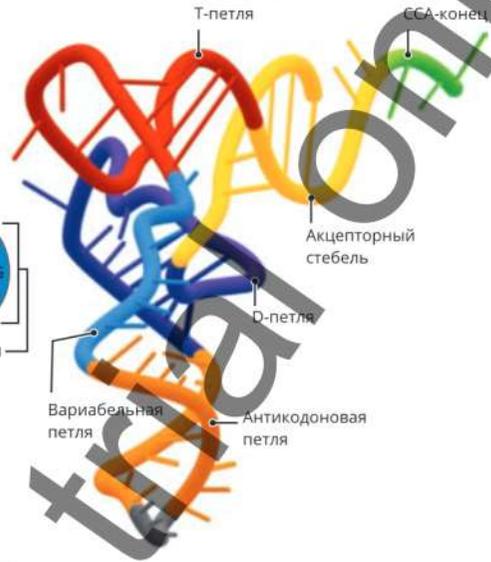
Рис. 2.11. (начало) Структура некоторых видов РНК:

А — матричная РНК;

Б Вторичная структура тРНК



Третичная структура тРНК



В

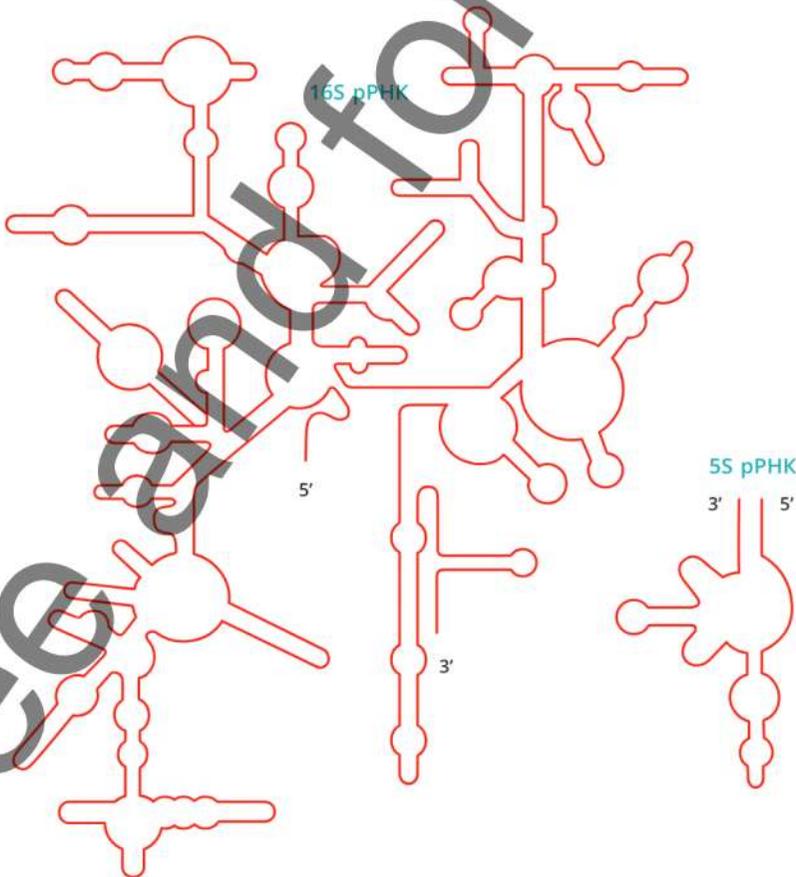


Рис. 2.11. (окончание) Структура некоторых видов РНК:

Б — транспортная РНК (вторичная и третичная структуры); В — рибосомная РНК (рРНК) прокариот

участок, состоящий из 150–200 нуклеотидов. Кодонами терминации на мРНК являются UAA, UAG, UGA. Модифицированные мРНК эукариот — моноцистронные и несут информацию о структуре только одной полипептидной цепи. У прокариот зрелые мРНК — полицистронные, т. е. синтезируют разные полипептидные цепи. Время жизни — короткое [Avci-Adali M. et al., 2014].

Транспортная РНК. Вторичная структура тРНК имеет структуру «клеверного листа» с 4 двухцепочечными и пятью одноцепочечными участками (рис. 2.11, Б). Имеет длину от 73 до 93 нуклеотидов. 3'-конец состоит из четырех нуклеотидов — *акцепторный участок* (7 п. н.), на который присоединяется определенная аминокислота. *Антикодонная петля* — это участок из семи нуклеотидов в середине цепи [Chen C. Y. et al., 2008]. Содержит минорные нуклеозиды: дигидроуридин, псевдоуридин, инозин, метилинозин, метидилуридин. Дигидроуридиловая и псевдоуридиловая петли для связывания соответственно с ферментом и рибосомой образуют пространственную структуру РНК. Добавочная петля составляет от 3–5 до 24 п. н. Время жизни тРНК длительное.

Рибосомная РНК в комплексе с белками формирует малую и большую субъединицы рибосомы (рис. 2.11, В). У эукариот **28 S, 5 S, 5,8 S рРНК** входят в состав большой субъединицы, а **18 S рРНК** — в состав малой субъединицы (у прокариот **26 S, 5 S** и **16 S рРНК** соответственно). Во вторичной структуре много двухцепочечных участков и петель, большое содержание гуанина и цитозина. Содержит минорные нуклеозиды, метилированные по рибозе. Является мишенью для антибиотиков — ингибиторов трансляции. Почти вся рРНК находится в виде магниево-соли, что необходимо для поддержания структуры рибосомы. Время жизни — длительное [Gestland R. F. et al., 2006].

Реализация наследственной информации

3.1. Геном

Геном (англ. *genome*) — это суммарно вся ДНК организма. Геном человека (лат. *Homo sapiens*) представлен 23 парами хромосом/ДНК, находящимися в ядре и мтДНК (табл. 3.1, 3.2). Все виды ДНК содержат вместе примерно $3,2 \times 10^9$ п. н., и только около 1,5 % генома кодирует белки. Большая часть генома состоит из коротких мобильных частей ДНК — *мобильных генетических элементов*. Интересно, что с эволюционной сложностью организма растет и доля ДНК, не кодирующей белки.

Таблица 3.1. Структура генома человека

Состав	Доля, %
ДНК с повторяющимися последовательностями, содержащая транспозоны и связанные последовательности	44,0
Экзоны (области гена, кодирующие белки)	1,5
Интроны («молчащие» участки, не участвующие в экспрессии гена) и регуляторные последовательности	24,0
Уникальные некодирующие ДНК	15,0
Повторяющаяся ДНК, не связанная с транспозонами	15,0
Alu-повторы	10,0

Ядерный геном человека подразделили на два основных участка:

- с уникальной последовательностью пар нуклеотидов;
- с повторяющимися последовательностями пар нуклеотидов.

Каждый из этих участков составляет примерно 50 % от общей массы ДНК в клетке.

Таблица 3.2. Характеристика участков генома человека*

Участки генома	Количество, п. н.
Ген	27 000
Экзон	145
Интрон	3365
ДНК для кодирования 430 аминокислот	1300

* Цит. по [Human Genome Sequencing Consortium, 2001].

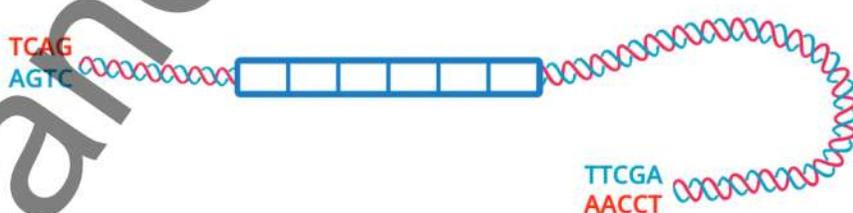
По числу повторов различают *умеренно повторяющиеся* (до 1000 повторов в одном локусе) и *высокоповторяющиеся* (более 1000 повторов в одном локусе) последовательности ДНК. Повторы могут локализоваться в одном или нескольких локусах в одной или разных хромосомах. Одна и та же последовательность встречается в разных локусах различное число раз. Такие последовательности называют *гипервариабельно тандемными*.

Повторяющиеся последовательности ДНК подразделяются на *прямые, тандемные, диспергированные повторы* (рис. 3.1). Они обычно локализуются в центромерных и теломерных районах хромосом, выявляются при цитогенетическом исследовании с избирательным окрашиванием прицентромерного гетерохроматина (подробнее см. табл. 11.7).

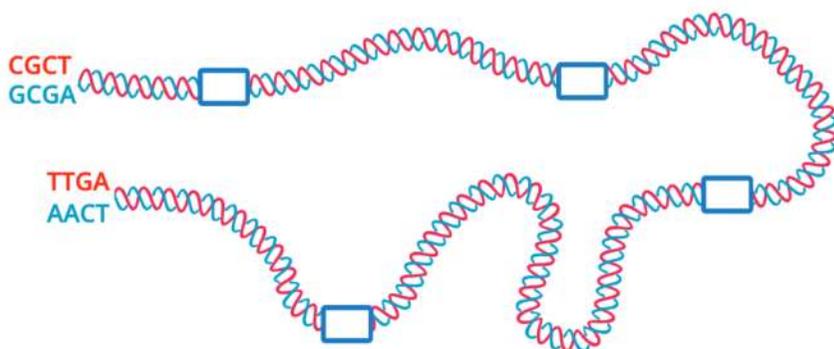
Виды повторов. Роль повторов не вполне ясна — возможно, структурная.

К *диспергированным повторам* относят транспозоны (2–3 % генома человека) и ретротранспозоны (42 % генома человека).

Тандемные повторы



Диспергированные повторы

**Рис. 3.1.** Виды повторяющихся последовательностей ДНК

Тандемные повторы различаются по длине и их числу (табл. 3.3).

Таблица 3.3. Типы тандемных повторов

Сателлиты	Мини-сателлиты	Микросателлиты
Более 100 нуклеотидов	От 7 до 100 нуклеотидов ATGCGTAGCTAGCAGTAG CTGACGTACATGCTAACA TGCTAACATGCTAACATG CTAACATGCTAACATGCT AACATGCTAACATGCT...	От 1 до 6 нуклеотидов GTAGCT

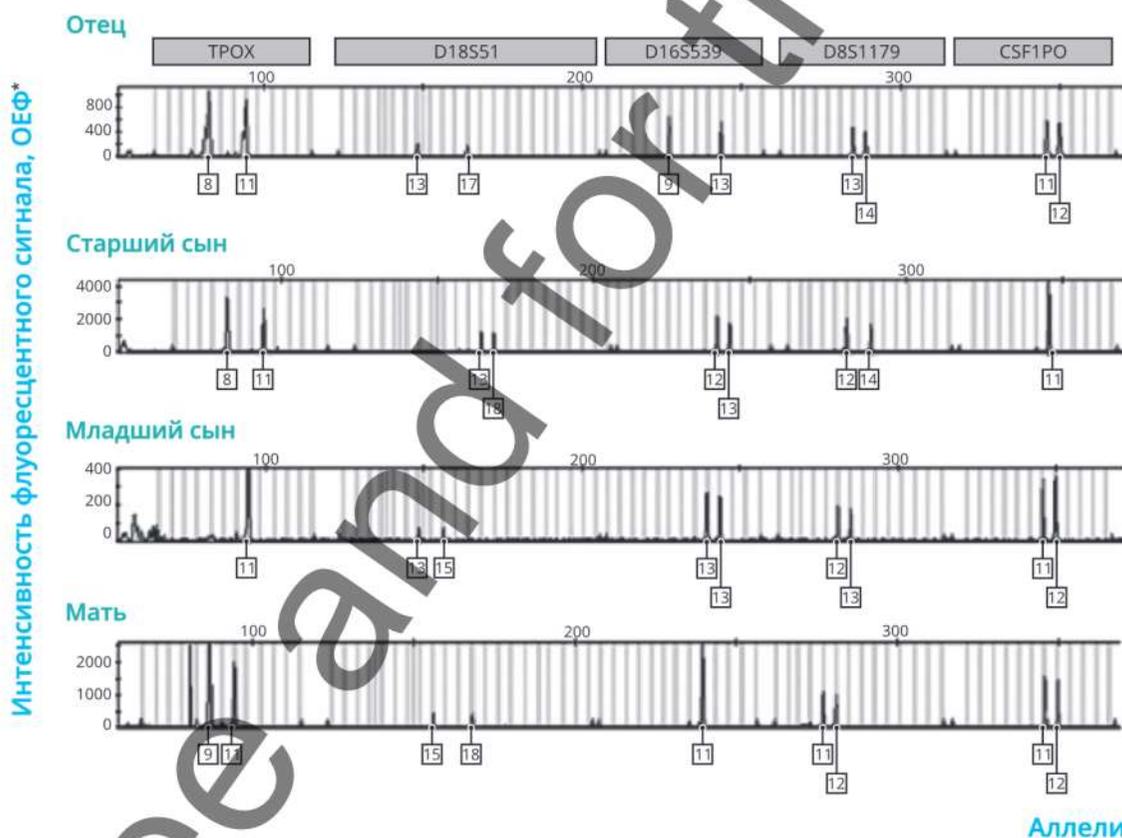


Рис. 3.2. Результаты молекулярно-генетического исследования образцов ДНК семьи по микросателлитным локусам генов *TPOX*, *D18 S51*, *D16 S539*, *D8 S1179*, *CSF1PO***

RFU (Relative Fluorescent Units) — относительная единица флуоресценции.

** Цит. по материалам сайта компании «ГОРДИЗ» (РФ): <http://gordiz.ru/index.php>

Тандемные повторы, состоящие из 2–8 п. н., называются микросателлитами, повторы в диапазоне от 10–100 т. п. н. — *мини-сателлитами*. Мини- и микросателлитные повторы разбросаны по всему геному и для каждого человека представляют уникальную комбинацию [Garrido-Ramos M.A. et al., 2017]. ДНК сателлитная располагается в участках прицентромерного гетерохроматина в метафазных хромосомах и в хромоцентрах интерфазных ядер. В этих же областях расположены умеренные повторы генов рибосомной ДНК. Длина повторяющегося мотива сателлитной ДНК не имеет каких-либо ограничений. Она варьирует от двух до нескольких сотен пар.

Выявление таких комбинаций говорит о генетическом полиморфизме каждого человека и активно используется при медико-генетическом обследовании, идентификации личности, в судебной практике. На **рис. 3.2** представлены результаты исследования микросателлитных локусов в генах *TPOX*, *D18 S51*, *D16 S539*, *D8 S1179*, *CSFIPO* с использованием молекулярно-генетических методов анализа у всех членов одной семьи. Пики на графиках указывают на передачу определенной нуклеотидной последовательности ДНК от одного из родителей детям.

3.2. Ген

Ген (англ. *gene*) — это нуклеотидная последовательность, фрагмент молекулы ДНК/хромосомы, в котором закодирована информация о биосинтезе одной полипептидной цепи с определенной аминокислотной последовательностью.

Ген является элементарной единицей наследственности, функциональной единицей генетического материала [Ashburner M. et al., 2000]. Гены располагаются в хромосомах линейно. Они содержат информацию о последовательностях аминокислот в полипептидной цепи и нуклеотидов в молекулах всех типов РНК.

В геноме человека гены объединены в кластеры, и в каждом кластере имеются *псевдогены*, которые образуются из дублированных генов. В них одна из копий приобретает мутации, которые делают невозможной ее экспрессию [Ogata H. et al., 1999].

3.2.1. Свойства гена

1. Ген *дискретен* в своем действии, т. е. обособлен в своей активности от других генов.
2. Ген *специфичен* в своем проявлении, т. е. отвечает за строго определенный признак организма.
3. Ген может действовать *дозированно*, т. е. усиливать степень проявления признака при увеличении числа доминантных аллелей.
4. Один ген может влиять на развитие разных признаков — это множественное, или *плейотропное*, действие гена.
5. Разные гены могут оказывать одинаковое действие на развитие одного и того же признака — это множественные гены, или *полигены*.

6. Ген может *взаимодействовать с другими генами*, что приводит к появлению новых признаков. Такое взаимодействие осуществляется опосредованно — через синтезированные под их контролем продукты своих реакций.
7. Действие гена может быть *модифицировано* изменением его местонахождения (*эффект положения*) или воздействием различных факторов среды.

3.2.2. Классификация генов

На сегодняшний день существует несколько классификаций генов. Гены подразделяют на две основные группы: по функциональным особенностям и способу реализации наследственной информации (экспрессии) (табл. 3.4).

Таблица 3.4. Классификация генов по их функциям и особенностям экспрессии

Классификация генов			
По функции		По особенности экспрессии	
Структурные гены	Кодируют белки, тРНК, рРНК	Конститутивные гены	Постоянно активные
Регуляторные гены	Регулируют активность генов	Индукцибельные гены	Активны в определенный период
		• Гены «домашнего хозяйства»	Обеспечивают основные функции всех клеток
		• Гены «роскоши»	Тканеспецифические

3.3. Генетический код

Генетический код — это единая система записи последовательности аминокислот полипептидной цепи в виде последовательности нуклеотидов ДНК и РНК [Koonin E. V. et al., 2009]. Генетическому коду присущи определенные свойства (табл. 3.5). Общепризнано его представление в виде таблицы (см. рис. 3.3).

Таблица 3.5. Свойства генетического кода

Свойство	Описание
Универсальность	Независимо от уровня организации и систематического положения организмов ядерные гены всех организмов одинаковым образом кодируют информацию о белках
Триплетность	Три нуклеотида (<i>кодона</i>) кодируют одну аминокислоту

Окончание табл. 3.5

Свойство	Описание
Избыточность (вырожденность)	Одна аминокислота может кодироваться несколькими триплетами (аминокислот — 20, а триплетов — 64). Исключение составляют метионин и триптофан, которые кодируются только одним триплетом. Триплеты UAA, UAG, UGA являются стоп-кодонами. Триплет AUG, стоящий в начале цепи ДНК, выполняет функцию инициирования считывания — старт-кодона
Однозначность	Каждому кодону соответствует только одна определенная аминокислота
Коллинеарность	Последовательность нуклеотидов в гене точно соответствует последовательности аминокислот в белке
Непрерываемость	Процесс считывания, начавшись на определенном кодоне, идет непрерывно, триплет за триплетом, до стоп-кодона

	U		C		A		G			
U	UUU	Фенилаланин (Phenylalanine)	UCU	Серин (Serine)	UAU	Тирозин (Tyrosine)	UGU	Цистеин (Cysteine)	U	
	UUC		UCC		UAC		UGC		C	
	UUA	Лейцин (Leucine)	UCA		UAA	Стоп-кодон (The stop codon)	UGA	Стоп-кодон (The stop codon)	A	
	UUG		UCG		UAG		UGG		G	
C	CUU	Лейцин (Leucine)	CCU	Пролин (Proline)	CAU	Гистидин (Histidine)	CGU	Аргинин (Arginine)	U	
	CUC		CCC		CAC		CGC		C	
	CUA		CCA		CAA	Глутамин (Glutamine)	CGA		CGG	A
	CUG		CCG		CAG		G			
A	AUU	Изолейцин (Isoleucine)	ACU	Треонин (Threonine)	AAU	Аспарагин (Asparagine)	AGU	Серин (Serine)	U	
	AUC		ACC		AAC		AGC		C	
	AUA		ACA		AAA	Лизин (Lysine)	AGA	Аргинин (Arginine)	A	
	AUG	ACG	AAG		G					
G	GUU	Валин (Valine)	GCU	Аланин (Alanine)	GAU	Аспарагиновая кислота (Aspartic acid)	GGU	Глицин (Glycine)	U	
	GUC		GCC		GAC		GGC		C	
	GUA		GCA		GAA	Глутаминовая кислота (Glutamic acid)	GGA		GGG	A
	GUG		GCG		GAG		G			

Рис. 3.3. Таблица генетического кода

3.4. Экспрессия генов

Экспрессия генов — это реализация наследственной информации (рис. 3.4). Для того чтобы информация, закодированная на участке ДНК, реализовалась в какой-либо

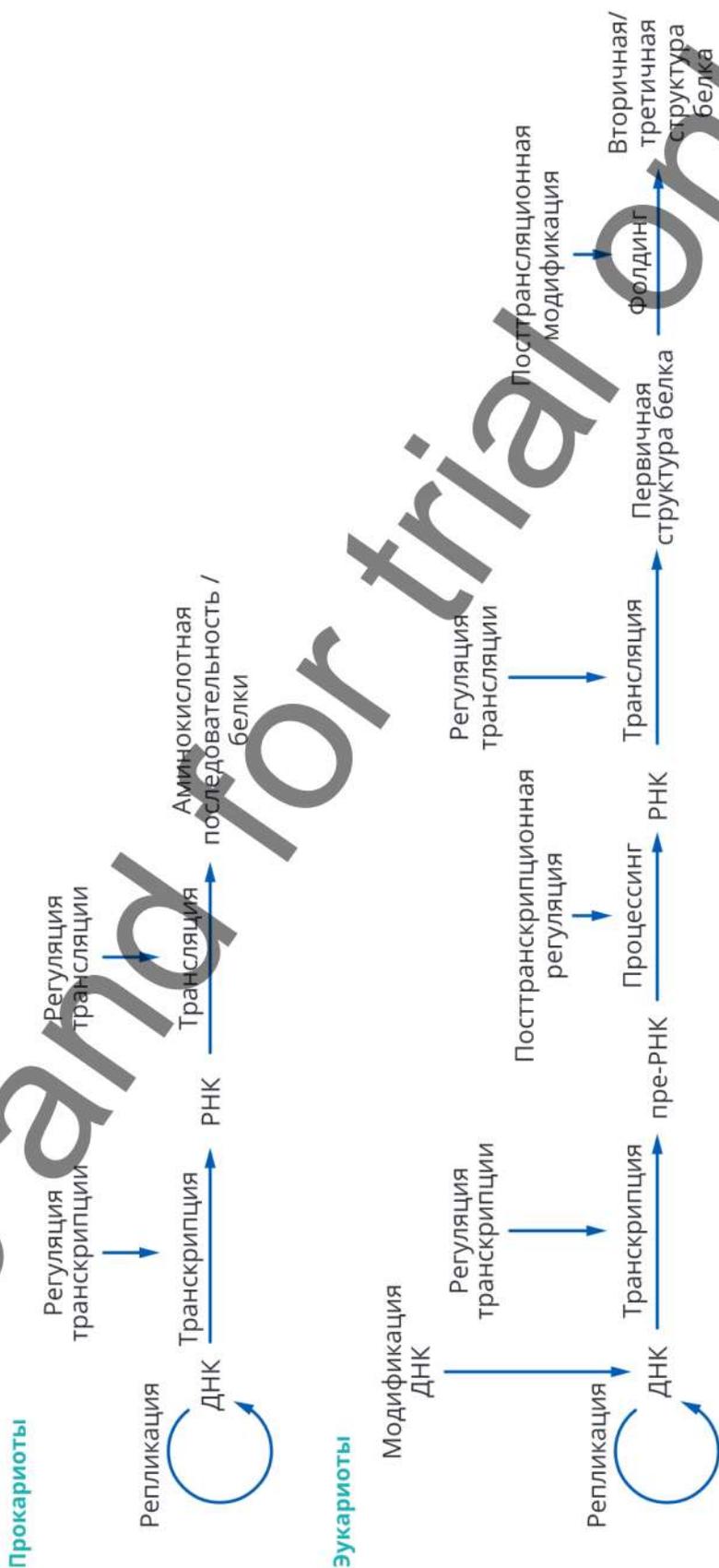


Рис. 3.4. Схемы реализации наследственной информации

признак, должны произойти несколько сложных процессов [Hartwell L. H. et al., 2008].

Центральная догма молекулярной биологии гласит, что *генетическая информация при реализации передается от нуклеиновых кислот к белку, но не наоборот*. При этом возможна передача ДНК → ДНК (репликация), ДНК → РНК (транскрипция) и РНК → белок (трансляция). Также существуют процессы передачи информации, свойственные только некоторым вирусам: РНК → ДНК (*обратная транскрипция*) и РНК → РНК (*репликация РНК*).

Представленная на [рис. 3.4](#) последовательность процессов, необходимых для реализации наследственной информации у прокариот и эукариот, закодированной в гене, будет подробно рассмотрена далее для каждого из них.

3.5. Репликация — синтез ДНК

Репликация — это процесс синтеза дочерней молекулы ДНК на матрице родительской молекулы ДНК.

Каждая цепь двухцепочечной ДНК «служит матрицей при синтезе комплементарной цепи, и в результате образуются две пары цепей, в каждой из которых только одна является родительской» [Watson J. D., Crick F. H. C., 1953; Watson J. D., 2003].

Несмотря на некоторые особенности синтеза ДНК прокариотической и эукариотической клеток, процесс репликации во всех клетках происходит по следующим основным принципам ([рис. 3.5](#)).

1. **Матричность** — каждая дочерняя цепь ДНК использует в качестве матрицы одну исходную родительскую цепь ДНК. При этом матрицами являются обе цепи ДНК.
2. **Комплементарность** — каждая дочерняя цепь ДНК синтезируется по принципу комплементарности. *Правило Чаргаффа* гласит, что водородные связи между пуриновыми и пиримидиновыми азотистыми основаниями нуклеотидов образуются по принципу комплементарности (аденин соответствует гуанину, а тимин — цитозину).
3. **Антипараллельность** — синтез всей цепи или его определенного участка всегда идет в направлении от 5'-конца к 3'-концу. Синтезируемая новая дочерняя цепь всегда антипараллельна матричной.
4. **Полуконсервативность** — две цепи оказываются полуобновленными, т. е. одна — исходная родительская, а вторая — новосинтезированная. Ранее существовали еще две гипотезы синтеза молекулы ДНК ([рис. 3.6](#)): *консервативная репликация* (молекула ДНК служит матрицей для образования совершенно новой молекулы ДНК, в результате одна из образующихся клеток получает исходную молекулу ДНК, а другая — вновь синтезированную) и *дисперсная репликация* (ДНК распадается на короткие фрагменты, используемые в качестве

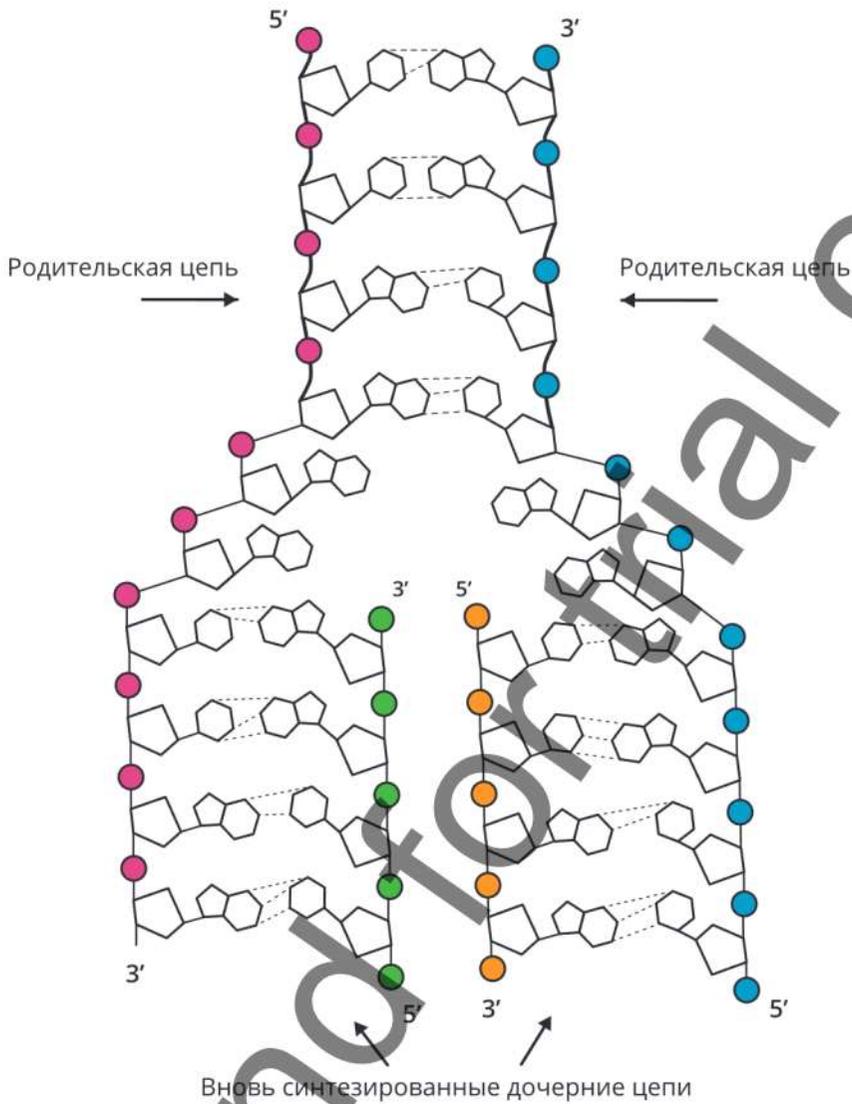


Рис. 3.5. Процесс репликации, по основным принципам синтеза ДНК

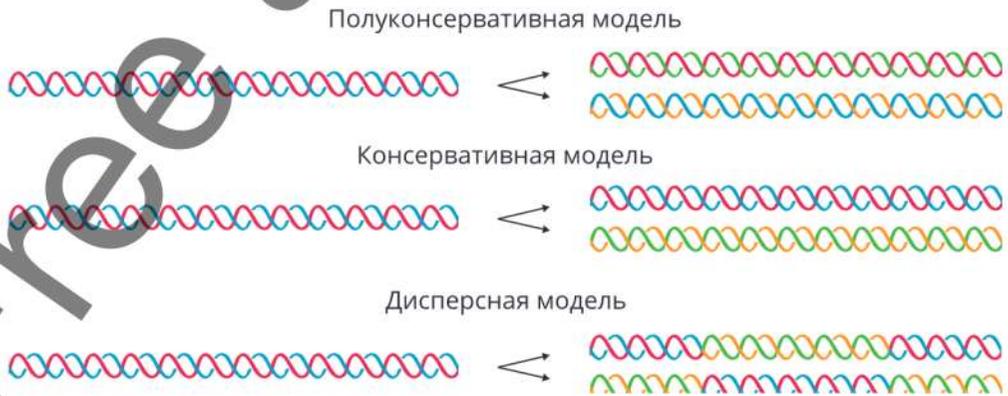
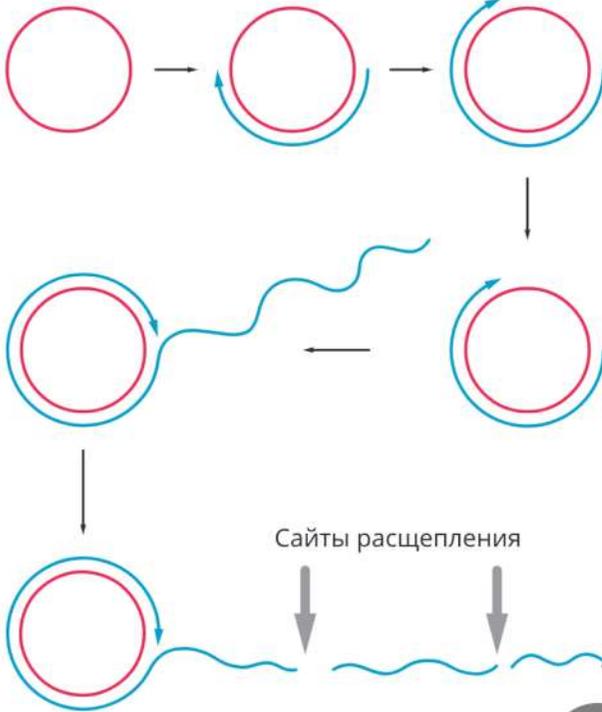


Рис. 3.6. Модели синтеза ДНК

Однонитевая молекула ДНК



Двунитевая молекула ДНК



Рис. 3.8. Репликация кольцевых молекул ДНК

Единицей репликации является *репликон* — участок ДНК между двумя **ori**-сайтами, т. е. от одной точки «начала» репликации до следующей.

Ниже представлены схемы способов репликации одно- и двунитевой кольцевой молекулы ДНК (рис. 3.8).

Репликация хромосомной ДНК прокариот проходит в двух противоположных направлениях по принципу «катящегося кольца» (рис. 3.9). Бактерии во время быстрого роста непрерывно реплицируют свою ДНК, и новый этап репликации начинается до окончания предыдущего.

Репликация эукариот проходит в S-фазу клеточного цикла. Продолжительность S-фазы составляет в среднем восемь часов. Репликация митохондриальной ДНК эукариот не зависит от фаз клеточного цикла.

Точка **ori** Репликационная вилка

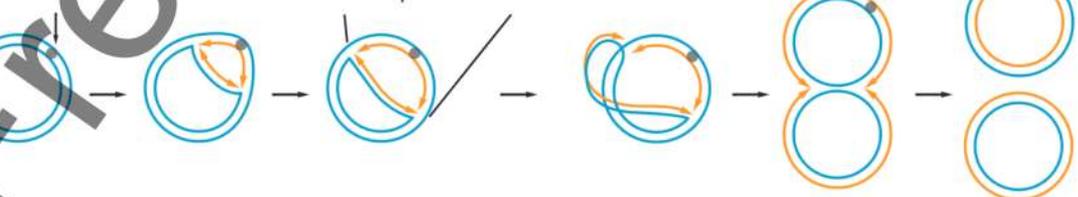


Рис. 3.9. Репликация хромосомной ДНК прокариот

Сайты ДНК, богатые нуклеотидами с гуанином и цитозином, реплицируются на ранней стадии S-фазы клеточного цикла. Эти фрагменты входят в R-полосы эухроматина и экспрессируют гены «домашнего хозяйства», функционирующие во всех типах клеток организма. Гетерохроматиновые участки ДНК, богатые нуклеотидами с аденином и тиминем (G-полосы), экспрессируют небольшое количество генов и реплицируются на поздней стадии S-фазы. Так как гены с большим числом нуклеотидов, содержащих **аденин** и **тимин** и входящих в состав факультативного гетерохроматина, активны лишь в определенных клетках, то их репликация проходит на ранней стадии S-фазы только в тех клетках, в которых они экспрессируются.

Для синтеза новой цепи ДНК необходимы дезоксирибонуклеозидтрифосфаты: АТФ, гуанозинтрифосфат (ГТФ), тимиадинтрифосфат (ТТФ), цитидинтрифосфат (ЦТФ). В отличие от дезоксинуклеозидмонофосфатов, входящих в состав нативной ДНК, эти субстраты с трифосфатами нужны для образования межнуклеотидной связи.

3.5.1. Ферментативный и белковый комплексы репликации

Репликация ДНК возможна только с участием сложного ферментативного комплекса (табл. 3.6, 3.7). При этом имеются некоторые сходство и различие в ферментах прокариот и эукариот. Действие ферментного комплекса обуславливает развитие одной цепи с небольшим опережением (*лидирующая*), а другой — с опозданием (*запаздывающая*). Запаздывающая цепь имеет вид отдельных коротких фрагментов — 1500–2000 нуклеотидов (фрагменты Оказаки).

Таблица 3.6. Характеристика ферментативного и белкового комплексов, участвующих в репликации ДНК

Белок/фермент	Свойство/функция
Белок <i>DnaA</i>	Узнает точки начала репликации — <i>ori</i> -сайты, богатые парами нуклеотидов с аденином и тиминем
Геликаза (<i>Helikase, DnaB</i>)	АТФ-зависимый фермент, расплетает двойную спираль. Происходит разрыв водородных связей между азотистыми основаниями нуклеотидов. Продвижение геликаз идет вместе с репликативной вилкой. У бактерий имеется две геликазы — <i>Rep</i> и <i>DnaB</i> . Геликаза <i>Rep</i> продвигается от 3'-к 5'-концу цепи ДНК, служащей матрицей для ведущей цепи ДНК. Геликаза <i>DnaB</i> перемещается по противоположной цепи, служащей для синтеза запаздывающей цепи
Топоизомераза I (<i>Topoisomerase I</i>)	Устраняет суперспирализацию нерасплетенных еще участков ДНК. Путем одноцепочечного разрыва создает шарнир, вокруг которого молекула ДНК, находящаяся перед вилкой, может свободно вращаться. Это снимает механическое напряжение, возникающее при раскручивании двух цепей в репликативной вилке, что служит необходимым условием для ее непрерывного движения

Окончание табл. 3.6

Белок/фермент	Свойство/функция
Топоизомераза II (<i>Topoisomerase II</i>)	Уменьшает число сверхвитков в ДНК на единицу за один акт. Вносит временные разрывы в обе комплементарные цепи ДНК. Пропускает двухцепочечный сегмент той же самой или другой молекулы ДНК через разрыв, а затем соединяет разорванные концы. В результате за один акт снимаются два сверхвитка
SSB-белки (<i>Single-strand binding protein</i>)	Связываются с одноцепочечной ДНК по всей длине разделившихся цепей, не закрывая азотистых оснований, и предотвращают их комплементарное скручивание и образование «шпилек». Они удерживают матричные цепи ДНК в репликативной вилке в одноцепочечном состоянии, а также защищают одноцепочечную ДНК от действия нуклеаз
Праймаза (<i>Primase</i>) — DnaG-белок	ДНК-зависимая РНК-полимераза участвует в синтезе РНК-праймеров для запуска синтеза ведущей цепи ДНК и фрагментов Оказаки на запаздывающей цепи ДНК. Праймаза активируется ДНК-геликазой и находится с ней в комплексе, который называется <i>праймазой</i>
Лигаза (<i>Ligase</i>)	Катализирует сшивание одноцепочечных фрагментов ДНК. Соединяет фрагменты ДНК при репликации, репарации и рекомбинации
ДНК-полимераза (<i>DNA polymerases</i>)	Катализируют синтез дочерних цепей на матрице ДНК по принципу комплементарности
Теломераза (<i>Telomerase</i>)	Участие в достраивании теломерных участков ДНК только у эукариот. Добавляет особые повторяющиеся последовательности ДНК (TTAGGG у позвоночных) к 3'-концу цепи ДНК на участках теломер. Этот фермент препятствует укорочению теломер, что связывают с процессом старения клеток [Зверева М.Э. и др., 2010].

Таблица 3.7. Характеристика ДНК-полимераз прокариот и эукариот

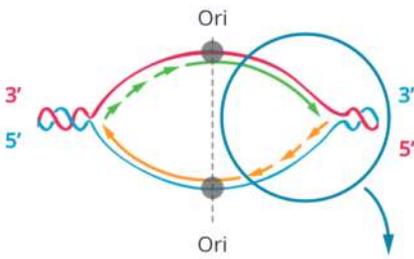
Тип ДНК-полимеразы (<i>Pol</i>)	Функции
Прокариоты	
I (<i>Pol I</i>)	Представлена одним полипептидом с тремя активностями: <ul style="list-style-type: none"> • полимеразной — катализирует перенос нуклеотидов к 3'-концу праймера ДНК или РНК и спаривание комплементарного нуклеотида; • 3'-5'-эксонуклеазной — удаляет 3'-концевые ошибочно встроенные нуклеотиды, препятствуя образованию мутаций; • 5'-3'-эксонуклеазной — удаляет 5'-концевые нуклеотиды
II (<i>Pol II</i>)	<i>Pol II</i> присоединяет нуклеотиды значительно менее эффективно, чем <i>Pol I</i> , и не обладает 5'-3'-эксонуклеазной активностью. Следовательно, <i>Pol II</i> может заполнять пробелы между фрагментами ДНК, спаренными с матричной цепью, но не способна отщеплять РНК-нуклеотиды от фрагментов Оказаки или осуществлять <i>ник</i> -трансляцию (смещение разрыва). Присутствует в клетке в меньших количествах. Участвует в репарации

Окончание табл. 3.7

Тип ДНК-полимеразы (Pol)	Функции
III (Pol III)	Pol III-холофермент — ключевой фермент: <ul style="list-style-type: none"> • не обладает 5'-3'-экзонуклеазной активностью; • для репликации отстающей цепи ему необходимо участие Pol I, чтобы произошло удлинение продукта, образовавшегося при участии Pol III, и удаление РНК-праймеров на 5'-конце фрагментов Оказаки; • существует в двух формах: в одной форме катализирует синтез непрерывной ведущей цепи, а в другой — синтез прерывистой отстающей
IV, V (Pol IV, V)	Восстановление структуры ДНК в необычных условиях
Эукариоты	
α (Pol α)	Синтез ядерной ДНК
β (Pol β)	Участвуют в репарации ДНК
γ (Pol γ)	Синтез митохондриальной ДНК
δ (Pol δ)	При синтезе ядерной ДНК: <ul style="list-style-type: none"> • связана с белком PCNA (<i>proliferating cell nuclear antigen</i>) — ядерный антиген пролиферации клеток. Этот белок прикрепляет комплекс полимераз к синтезируемой цепи; • обладает экзонуклеазной активностью (т. е. может работать от 3'-к 5'-концу, когда в строящуюся цепь включается неправильный нуклеотид)
ε (Pol ε)	Участвуют в репарации ДНК

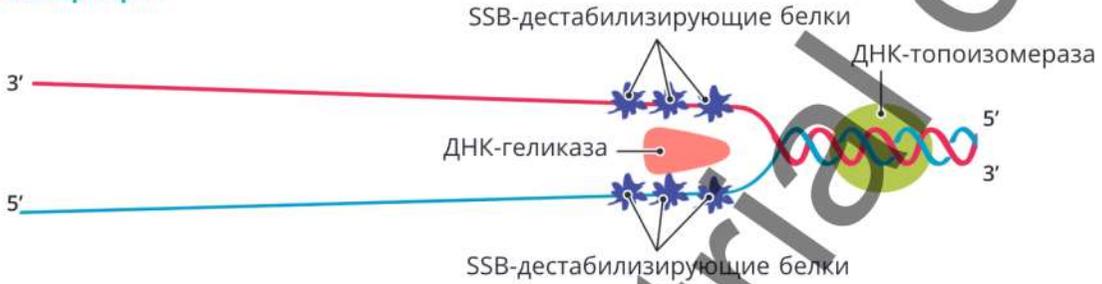
Основной фермент репликации — ДНК-полимераза не способна начинать синтез новой цепи с ее первого нуклеотида, она может лишь удлинять уже имеющуюся цепь, присоединяя к ее 3'-концу новые нуклеотиды. Поэтому для начала реакции требуется *затравка* в виде РНК-праймера (*RNA primer*) — короткого олигонуклеотида длиной 10–15 нуклеотидов. РНК-праймер синтезируется РНК-праймазой и служит как стартовая молекула. Для синтеза РНК-затравки необходимы рибонуклеозидтрифосфаты [Walsh E. et al., 2013; Sedy B. et al., 2016]. После синтеза нескольких десятков нуклеотидов РНК-праймер удаляется ДНК-полимеразой и замещается ДНК. В отстающей цепи перед синтезом происходит такой же процесс, дающий начало синтезу фрагментов Оказаки. РНК-затравки по завершении процесса репликации удаляются. Образовавшиеся на их месте бреши бывают застроены комплементарными дезоксирибонуклеозидтрифосфатами. Разрывы между сегментами ДНК затем ковалентно соединяются ДНК-лигазой.

Ферменты *нуклеазы* выявлены во всех живых организмах. Они воздействуют на нуклеиновые кислоты и катализируют расщепление межнуклеотидных связей (рис. 3.10). По способу воздействия нуклеазы делят на *эндонуклеазы* и *экзонуклеазы*.

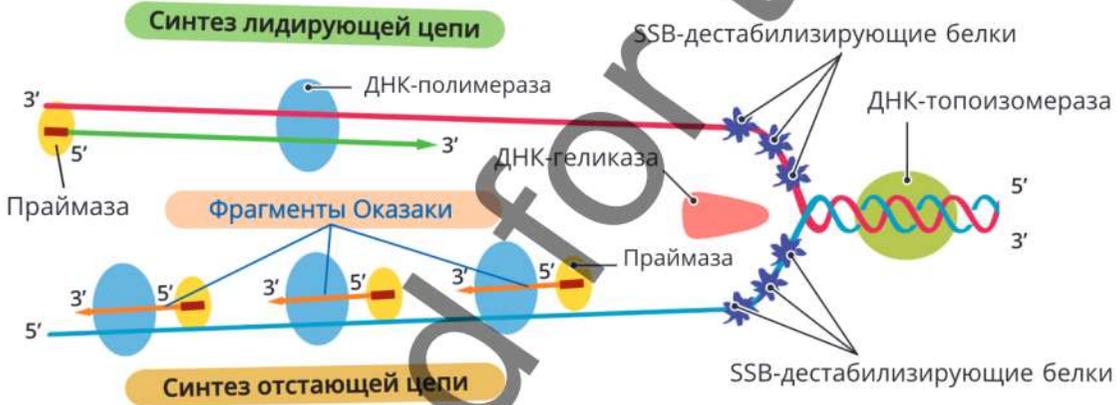


	— РНК-праймер
Ферменты:	
	— Праймаза
	— ДНК-полимераза
	— ДНК-геликаза
	— SSB-дестабилизирующие белки
	— ДНК-топоизомераза
	— ДНК-лигаза

1. Инициация



2. Элонгация



3. Терминация

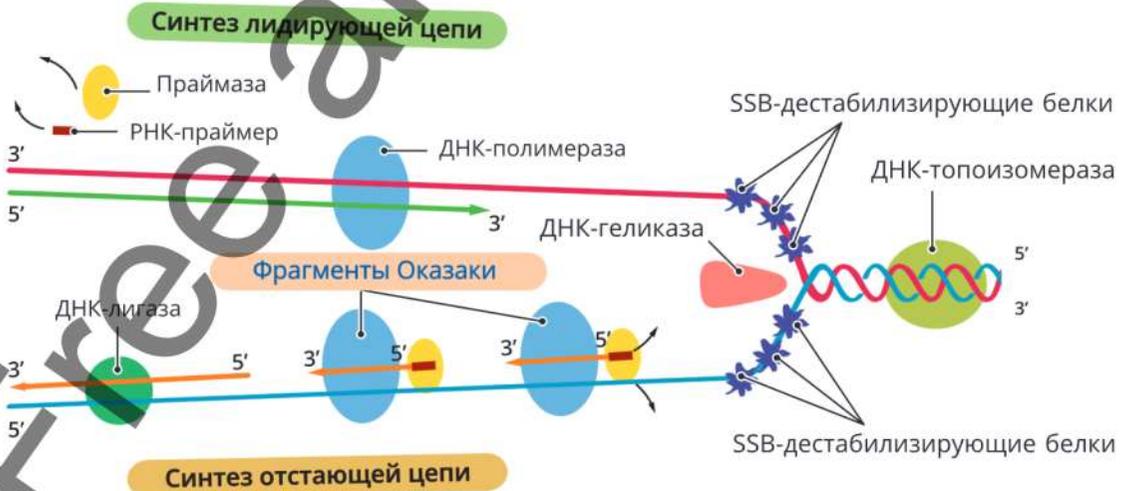


Рис. 3.10. Функционирование ферментов в репликативной вилке

Эндонуклеазы (*endonuclease*) расщепляют полинуклеотид между внутренними звеньями полимерной цепи. Структурно-специфические эндонуклеазы (*Structure specific endonucleas, SSE*) распознают вторичные структуры ДНК, а не первичные последовательности, и играют ключевые роли во время репарации ДНК и в репликационном стрессе.

Экзонуклеазы (*exonuclease*) вызывают деградацию молекул ДНК и РНК, отщепляя концевые мононуклеотиды от полинуклеотидной цепи. Экзонуклеаза одного человека (EXO1), перемещаясь в направлении 5' → 3', способствует регуляции контрольных точек клеточного цикла, поддержанию стабильности репликационной вилки и пострепликативных путей репарации ДНК [Александровская Н. И. и др., 2012].

3.5.2. Этапы репликации

Процесс репликации в клетках прокариот и эукариот проходит в несколько этапов (табл. 3.8).

Таблица 3.8. Этапы репликации, характерные для клеток прокариот и эукариот

Этап	Описание
Инициация (начало репликации)	Начинается с узнавания <i>ori</i> -сайта белком DnaA. Происходит денатурация ДНК — расплетение двойной спирали вместе с репликативной вилкой. Геликаза начинает разрушать водородные связи между азотистыми основаниями нуклеотидов. В нерасплетенных участках происходит сверхспирализация ДНК. Для ее устранения функционируют топоизомеразы I и II. SSB-белки связываются с одноцепочечной ДНК по всей длине, предотвращают образование «шпилек» или петель и защищают от действия нуклеаз
Элонгация (собственно синтез)	РНК-праймер синтезируется РНК-праймазой с использованием рибонуклеозидтрифосфатов [Bell S. P. et al., 2002]. После синтеза нескольких десятков нуклеотидов РНК-праймер удаляется ДНК-полимеразой и замещается дочерней ДНК. В синтезе фрагментов Оказаки также участвует РНК-затравка в комплексе с РНК-праймазой. Далее они удаляются, и синтез продолжается ДНК-полимеразой с участием дезоксирибонуклеозидтрифосфатов
Терминация (завершение репликации)	ДНК-лигаза соединяет фрагменты Оказаки между собой. В активно делящихся клетках эукариот дополнительно функционирует теломераза, которая достраивает теломерные участки линейных хромосом

3.5.3. Сравнение репликации у прокариот и эукариот

Репликация ДНК в клетках прокариот и эукариот имеет как сходство, так и различие [Arias E.E. et al., 2007] (табл. 3.9).

Таблица 3.9. Различия в репликации ДНК в клетках прокариот и эукариот

Прокариоты	Эукариоты
Репликация проходит	
В цитоплазме (нуклеоплазме)	В ядре в S-фазу клеточного цикла
Комплекс белков и ДНК	
Отсутствует	Есть гистоновые и негистоновые белки
Число точек начала репликации (точка origin)	
1	Много
Длина фрагментов Оказаки	
1000–2000 п. н.	150–200 п. н.
Число репликонов	
Один репликон со средним размером 4200 п. н.	Несколько тысяч, расположенных на расстоянии 50 000–300 000 п. н.
Средняя скорость репликации	
1000–2000 нуклеотидов/с 100 000 п. н. / мин	100–200 нуклеотидов/с 500–5000 п. н. / мин
Хромосома реплицируется за 40 мин	Хромосомы реплицируются за 1–2 ч
Ферменты репликации	
Полимеразы являются только экзонуклеазами	Полимеразы являются не только экзонуклеазами
ДНК-полимеразы (I, II, III, IV, V)	ДНК-полимеразы (α , β , γ , δ , ϵ)

3.5.4. Репликация в митохондриях

В отличие от ядерной ДНК, которая реплицируется только во время клеточного деления, митохондриальная ДНК реплицируется постоянно, вне зависимости от клеточного цикла и, кроме того, в неделящихся клетках (скелетные мышцы и центральные нейроны) [Copeland W.C., 2014]. В репликации участвуют ферменты ядерного генома, основным из них является ДНК-полимераза γ . Несколько топоизомераз участвуют в снятии напряжения с цепей мтДНК. ДНК-лигаза III участвует в репликации и в репарации. Митохондриальный фактор терминации транскрипции (*Mitochondrial Transcription Termination Factor 1*, MTERF1) может оказывать влияние на задержку репликации [Lee W.T. et al., 2015].

3.6. Регуляция репликации

В процессе репликации может встречаться такое явление, как *репликативный стресс*, т. е. замедление роста репликативной вилки [Mazouzi A. et al., 2014; Munk S. et al., 2017].

Причинами возникновения стресса выступают:

- повторяющиеся последовательности ДНК;
- повреждения вторичной структуры ДНК;
- столкновения между репликативно-транскрипционными комплексами;
- изменение уровня компактизации хроматина;
- фрагильные сайты;
- ферменты (ATR- и ATM-киназы);
- активация онкогенов (например, *HRAS*, *c-Myc*) [Magan D. et al., 2015].

Фрагильные сайты (от англ. *fragile* — ломкий, хрупкий) — ломкие участки хромосом человека, склонные к образованию разрывов. Различают *наследуемые* (редкие) и *конститутивные* (обычные) фрагильные сайты. В геноме человека наблюдается около 200 обычных ломких сайтов размером от 1 до 10 мегабаз (Мб)*. Редкие ломкие участки встречаются только у 5 % популяции. Обычные фрагильные сайты могут быть индуцированы афидиколином — ингибитором ДНК-полимераз α , δ и ϵ . Обычные фрагильные сайты подвержены репликативному стрессу, вызванному двойными разрывами ДНК. Фрагильные сайты являются очагом возникновения сестринских хроматидных обменов, транслокаций и *делеций* [Zeman M. K. et al., 2016].

Репликативно-транскрипционные комплексы. У высших эукариот репликация и транскрипция — скоординированные процессы. Гены (≥ 800 кб*) чаще всего располагаются в обычных фрагильных сайтах, и их транскрипция по времени занимает более одного клеточного цикла. В основном она происходит в фазе G_1 клеточного цикла [Bleichert F. et al., 2017]. В таких генах транскрипция переходит в S-фазу, т. е. увеличивает вероятность конфликта между транскрипционными и репликационными комплексами. Формируются ДНК–РНК-гибриды. Столкновения между процессом транскрипции и вилкой репликации могут быть причиной геномной нестабильности [Wu Z. et al., 2014].

Ферменты — *киназы* **ATR** (*serine/threonine protein kinase*) и **ATM** (*ataxia telangiectasia mutated*) — являются центральными компонентами ответа на повреждения ДНК. **ATR** отслеживает повреждения ДНК и при их обнаружении активирует остановку клеточного цикла в контрольной точке (*cell cycle checkpoint*). **ATR** активируется в присутствии одноцепочечной ДНК, которая появляется также при остановке работы вилки репликации. У высших эукариот однонитевые разрывы ДНК вызывают **ATR**-зависимый ответ, в то время как двунитевые разрывы приводят к процессам, зависимым от **ATM** [Akamatsu Y. et al., 2015].

* Мб и кб — единицы измерения для выражения длины молекул нуклеиновых кислот: 1 килобаза (кб) равна 1000 нуклеотидов в РНК и одноцепочечной ДНК или пар нуклеотидов (п. н.) в двухцепочечной ДНК; 1 мегабаза (Мб) равна 1 млн п. н.

3.7. Транскрипция — синтез РНК

Транскрипция (лат. *transcriptio* — переписывание) — процесс синтеза всех типов РНК с использованием одной из нитей ДНК в качестве матрицы с помощью ДНК-зависимой РНК-полимеразы (рис. 3.11).

Транскрипция как прокариотической, так и эукариотической клеток имеет следующие основные принципы:

1. **Матричность.** Одна из нитей ДНК является матрицей для синтеза РНК. Она имеет направление первичной структуры от 3' → 5' и называется матричной; нить, выстроенная в направлении 5' → 3', называется антисмысловой.
2. **Комплементарность.** РНК-полимераза синтезирует новую нить РНК, где аденину, входящему в состав нуклеотида ДНК, соответствует урацил в составе нуклеотида РНК, соответственно, цитозину — гуанин (А-У, G-C, C-G, T-A).
3. **Асимметричность.** Транскрибируется лишь одна из цепей ДНК — матричная, антисмысловая цепь не транскрибируется.
4. **Антипараллельность.** Синтезируемая цепь РНК направлена антипараллельно транскрибируемому участку.
5. **Униполярность.** Синтез всей цепи РНК всегда идет в направлении от 5'-конца к 3'-концу.
6. **Отсутствие потребности в заправке.** Транскрипция начинается с нуклеотид-трифосфата и не требует олигонуклеотидов в качестве заправки.

Важно отметить, что для синтеза РНК необходимы молекула ДНК как матрица, рибонуклеозидтрифосфаты, РНК-полимераза и другие белки, а также энергия АТФ и определенная среда.

В прокариотических клетках процесс транскрипции проходит в цитоплазме с высокой скоростью (30 нуклеотидов/с) и сопряжен с трансляцией и последующей деградацией мРНК. В эукариотической клетке транскрипция проходит в ядре,

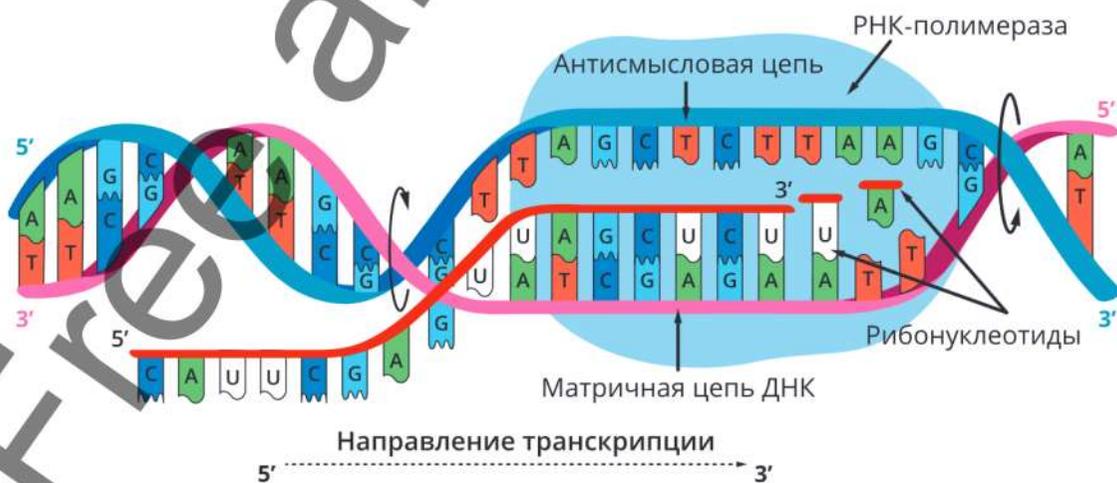


Рис. 3.11. Транскрипция РНК на матрице ДНК

синтезированная молекула РНК модифицируется и далее через ядерные поры выходит в цитоплазму, где уже происходят трансляция, фолдинг, деградация белка. Этот процесс свойствен практически всем ядродержащим клеткам — как делящимся, так и неделящимся. В ядродержащих эритроцитах также проходят транскрипция и последующий синтез белков.

3.7.1. Транскриптон

Единицей транскрипции является *транскриптон*. Структура транскриптона прокариот и эукариот различается (рис. 3.12). У прокариот транскриптомом является *оперон*, у эукариот — *моноцистронный транскрипт* и транскриптомом выступает ген. Кодировующий участок транскриптона эукариот состоит из *экзонов* — участков, кодирующих первичную структуру белка, и *интронов* — неактивных, или «молчащих», участков. Кодировующий участок всегда начинается с экзона и заканчивается им же. Гены эукариот собраны в *кластеры* — семейства. Внутри этих кластеров между генами находятся *спейсеры* (англ. *spacer* — область). Спейсеры занимают большую часть кластера и являются нетранскрибируемыми.

Транскрипция начинается с участка гена — *промотора*, на который садится РНК-полимераза. Структура промотора прокариотической и эукариотической клеток различается (рис. 3.13).

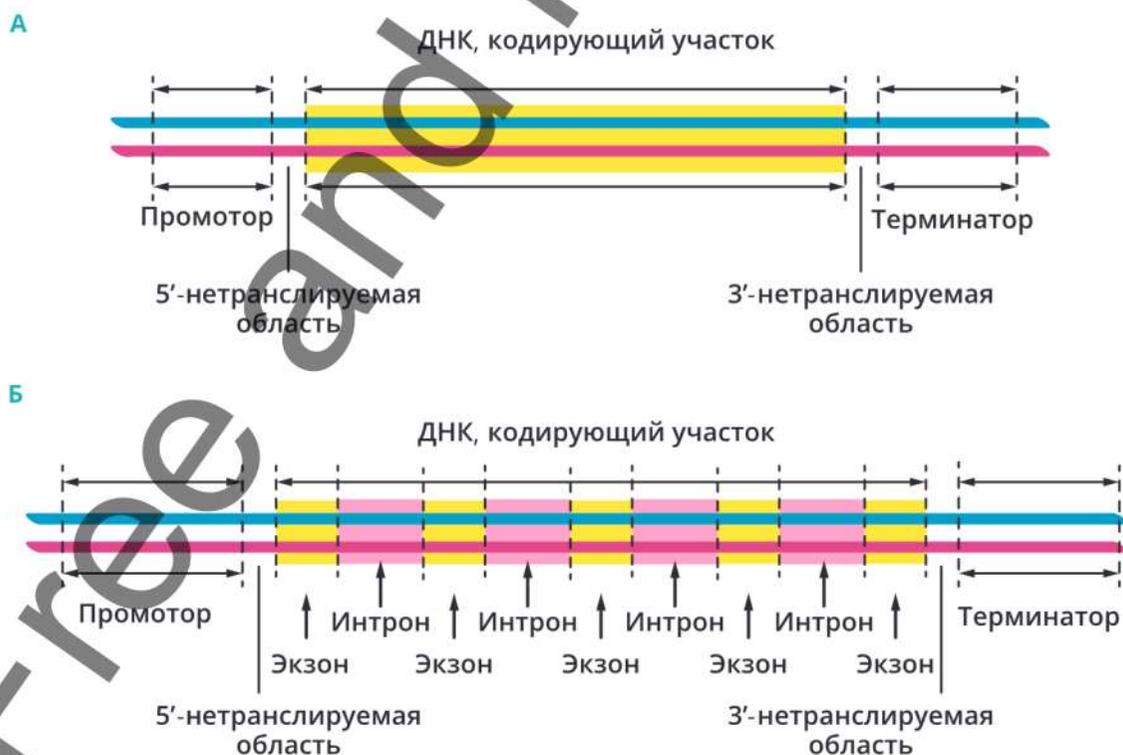


Рис. 3.12. Структура транскриптона прокариот (А) и эукариот (Б)

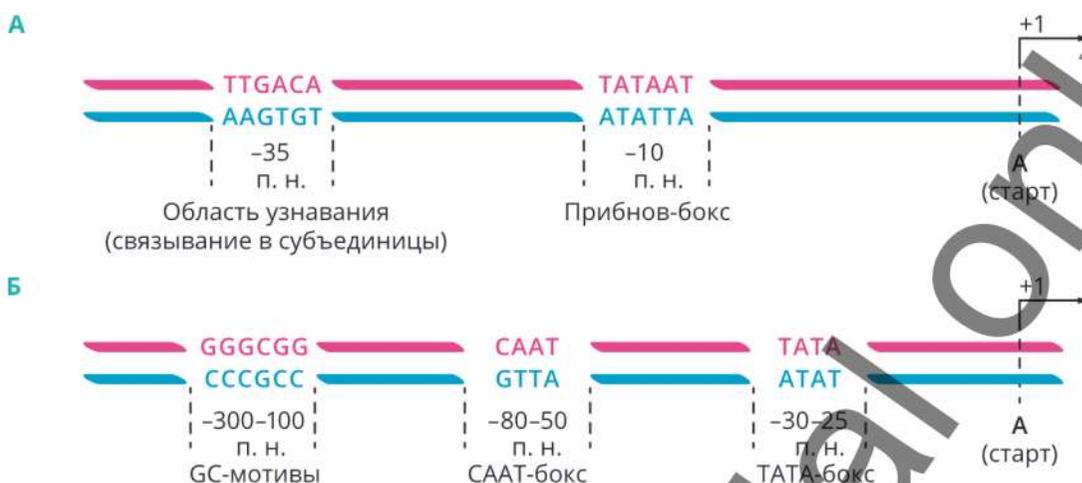


Рис. 3.13. Структура промотора прокариот (А) и эукариот (Б)

GC-мотив — участок ДНК; CAAT- и TATA-боксы — консервативные регуляторные элементы промотора.

Промоторы эукариот бывают содержащие и не содержащие TATA-бокс (подробнее — см. п. 3.7.3). TATA-бокс содержащие наблюдаются практически в 24 % генов человека и находятся на расстоянии 27–30 п. н. от *кэл-сайта*. Положение TATA-элемента строго определяет сайт инициации транскрипции, т. е. 5'-конец транскрипта. При повреждении или удалении TATA-элемента образуется набор молекул РНК с разными 5'-концами. Отдельные нуклеотидные замены в TATA-элементе могут приводить к резкому снижению эффективности транскрипции. В случае TATA-бокс не содержащих промоторов в инициации транскрипции участвуют различные транскрипционные факторы.

3.7.2. Ферментативный и белковый комплексы транскрипции

Транскрипция возможна только с участием ферментов и белков. Основной фермент транскрипции — РНК-полимераза. У прокариот — единая РНК-полимераза, которая транскрибирует любые гены и состоит из шести субъединиц (см. табл. 3.10).

У эукариот несколько типов РНК-полимераз. Эти ферменты функционируют в комплексе с белками, которые называются *транскрипционными факторами* (ТФ) (*Transcription Factor*, TF) (см. табл. 3.11). В геноме человека обнаружено более 2600 белков, имеющих ДНК-связывающий домен, и большинство из них предположительно являются факторами транскрипции. Около 10 % всех генов в геноме кодируют транскрипционные факторы, являясь самым большим семейством белков человека. В свою очередь, РНК-полимеразы состоят из большого числа субъединиц. Например, фермент PolIII человека содержит более 10 субъединиц, слабо ассоциирующих друг с другом. Фермент PolIII содержит 17 субъединиц, а PolII состоит из 14 субъединиц. Некоторые из них принадлежат к основным факторам транскрипции (*General Transcription Factor*, GTF) [Trautinger B.W., 2005].

Таблица 3.10. Структура РНК-полимеразы прокариот

Субъединица		Функция
Кор-фермент (<i>Core enzyme</i>)	β	Связывание нуклеотидфосфата и построение полинуклеотидной цепочки
	β'	Связывание с ДНК
	2α	Участвует в узнавании промотора
	ω	Защита фермента от денатурации
Холофермент (<i>Holoenzyme</i>)	Core + σ	Специфическая посадка на промотор

Таблица 3.11. Ферменты и белки, участвующие в транскрипции РНК эукариот

Тип РНК-полимеразы (<i>Pol</i>)	Функция
I (<i>Pol I</i>)	Синтез 18 S рРНК, 28 S рРНК, 5,8 S рРНК
II (<i>Pol II</i>)	Синтез мРНК, мяРНК
III (<i>Pol III</i>)	Синтез тРНК, 5 S рРНК
IV (<i>Pol IV</i>)	Синтез митохондриальной РНК

Тип факторов транскрипции (<i>TF</i>)	Функция
РНК-полимераза I	
RRN3 (RNA polymerase I-specific transcription factor — РНК-полимераза I-специфический фактор транскрипции, ядерный антиген пролиферации клеток)	Связь между факторами инициации и РНК-полимеразой
TBP (TATA-box-binding protein — белок, связывающийся с TATA-боксом)	Универсальный базальный фактор инициации
UBF (<i>Upstream Binding Factor</i> — восходящий фактор связывания)	Стимулирует инициацию и контролирует элонгацию
РНК-полимераза II	
TBP	Связывается с TATA-боксом — участком промотора
TFIID (<i>Transcription factor D for Pol II</i> — транскрипционный фактор D для полимеразы 2)	Узнает промотор. Помогает TBP узнать промотор и активировать транскрипцию
TFIIA	Стабилизирует связывание TFIID с промотором
TFIIB	Стабилизирует комплекс РНК-полимераза-TFIIF, ориентирует полимеразу в сайте инициации
TFIIF	Стабилизирует взаимодействие РНК-полимеразы II с TBP и TFIIB, активизирует TFIIE и TFIIH
TFIIE	Модулирует киназную активность и регулирует TFIIH

Окончание табл. 3.11

Тип факторов транскрипции (ТФ)	Функция
<i>TFIIH</i>	Расплетает ДНК в промоторе, высвобождает полимеразу с промотора. Участвует в репарации ДНК
РНК-полимераза III	
<i>TFIIIA</i>	Содержит домены цинковых пальцев и взаимодействует с участками ДНК, которые содержат комплементарную третичную структуру
<i>TFIIB</i>	Узнает промоторную область и связан с <i>TBP</i>
<i>TFIIC</i>	Взаимодействует с сайтами связывания и с <i>TFIIB</i>

Транскрипционные факторы, связывающиеся с ДНК, могут влиять на транскрипцию генов через несколько механизмов:

1. В большинстве изученных к настоящему времени случаев ТФ стимулируют формирование комплекса преинициации на ТАТА-боксе — инициаторном элементе за счет взаимодействия их транс-активирующих доменов с компонентами базального транскрипционного комплекса (либо непосредственно, либо через коактиваторы/медиаторы).
2. Некоторые ТФ вызывают изменения структуры хроматина, делая его более доступным для РНК-полимераз.
3. Другие ТФ являются вспомогательными, создавая оптимальную конформацию ДНК для действия других транскрипционных факторов.
4. Известны ТФ, которые подавляют транскрипцию за счет непосредственного действия своих ингибирующих доменов либо нарушают совместное функционирование комплекса транскрипционных факторов внутри регуляторной области гена (промотора, энхансера).
5. Наконец, имеются ТФ, которые сами не связываются с ДНК, а объединяются в более сложные комплексы посредством белок-белковых взаимодействий.

Процесс транскрипции подразделяют на следующие этапы: *инициацию* (начало), *элонгацию* (синтез) и *терминацию* (окончание).

3.7.3. Транскрипция в клетках прокариот

Инициация. Транскрипция начинается с промоторного участка ДНК (см. рис. 3.14). Несмотря на вариабельность промоторов, среди прокариот есть несколько консервативных элементов в позициях -10 и -35 от точки инициации транскрипции, где происходит связывание РНК-полимеразы (холофермент) с промотором. Консенсус (последовательность из шести нуклеидов) в позиции -10 называется ТАТА-бокс (ТАТААТ) [Seshasayee A. S. et al., 2011]. Консенсус в позиции -35 имеет вид ТТGACA, распознается и связывается с σ -субъединицей РНК-полимеразы. Двухцепочечная ДНК расплетается,

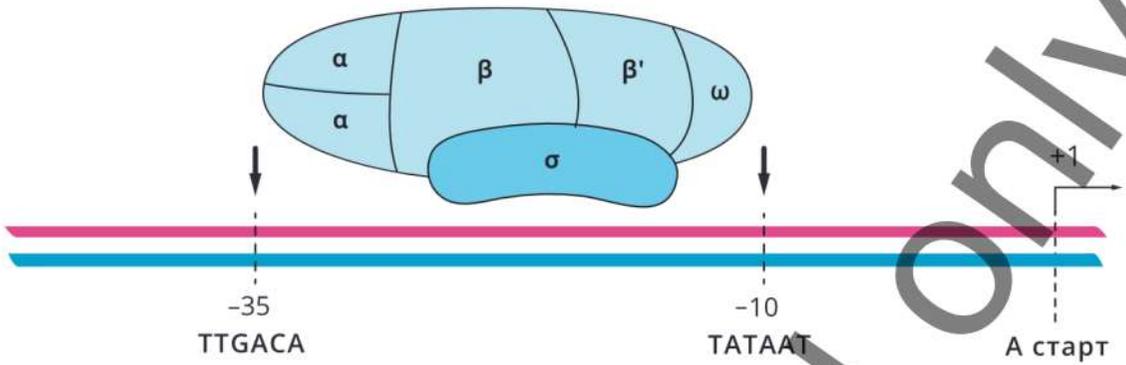


Рис. 3.14. Инициация транскрипции прокариот, связывание холофермента (2α, β, β', ω, σ субъединиц) с промотором
Связывание холофермента с промотором.

и образуется так называемый открытый комплекс. Начинается синтез РНК по принципу комплементарности в направлении 5'→3'. После синтеза приблизительно 10 нуклеотидов происходит отсоединение σ-субъединицы от холофермента [Browning D.F. et al., 2016].

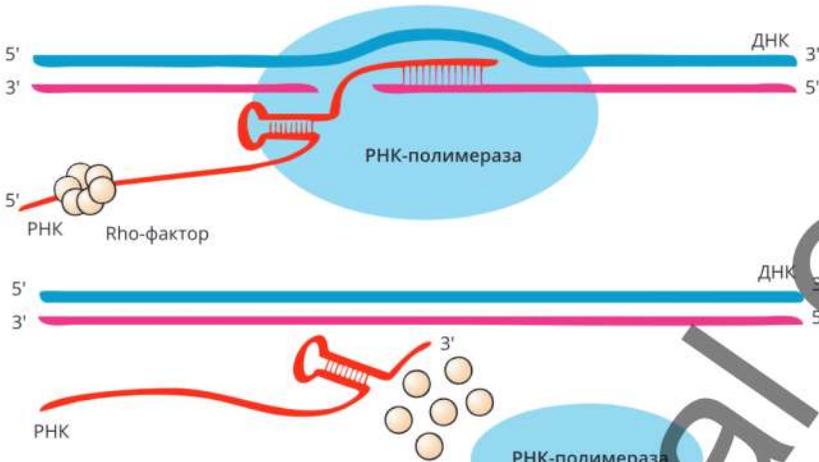
Элонгация. Кор-фермент РНК-полимеразы, который состоит из пяти субъединиц (см. табл. 3.10), перемещается по матричной цепи ДНК и синтезирует молекулу РНК. После этого структура ДНК восстанавливается.

Терминация. Окончание синтеза РНК происходит на определенном участке гена, который называется терминатором. Терминация бывает **Rho-зависимая** и **Rho-независимая** (рис. 3.15). При **Rho-независимой** терминации РНК-полимераза доходит до богатых **CG** участков. Формируется шпилька, или петля, за которой располагается несколько урацилов. Это препятствует дальнейшему продвижению фермента, и транскрипция останавливается. **Rho-зависимая** терминация проходит с участием **Rho**-белка. Этот белок присоединяется к РНК с затратой энергии АТФ, дестабилизирует водородные связи между нуклеотидами ДНК и РНК. Происходит отсоединение синтезированной молекулы РНК [Bidnenko V. et al., 2017].

3.7.4. Транскрипция в клетках эукариот

Инициация. Белок ТВР (*TATA binding protein*) связывается с ТАТА-боксом в промоторном участке гена, далее к нему присоединяются ТАФ-белки (*TBP activating factors*), и так образуется один из транскрипционных комплексов (TFIID) (см. рис. 3.16). TFIIA и TFIIВ связываются с TFIID. Это обеспечивает начало транскрипции и определяет направление процесса. РНК-полимераза II вместе с остальными факторами — TFIIF, TFIIЕ, TFIIН — также присоединяется, и образуется закрытый комплекс. TFIIН плавит ДНК, и тогда TFIIЕ стабилизирует транскрипционный глазок, и образуется открытый комплекс. Матричная цепь ДНК открыта для инициации синтеза цепи РНК. Синтезируется пара рибоолигонуклеотидов, и далее РНК-полимераза начинает синтез [Vannini A. et al., 2012].

A



Б

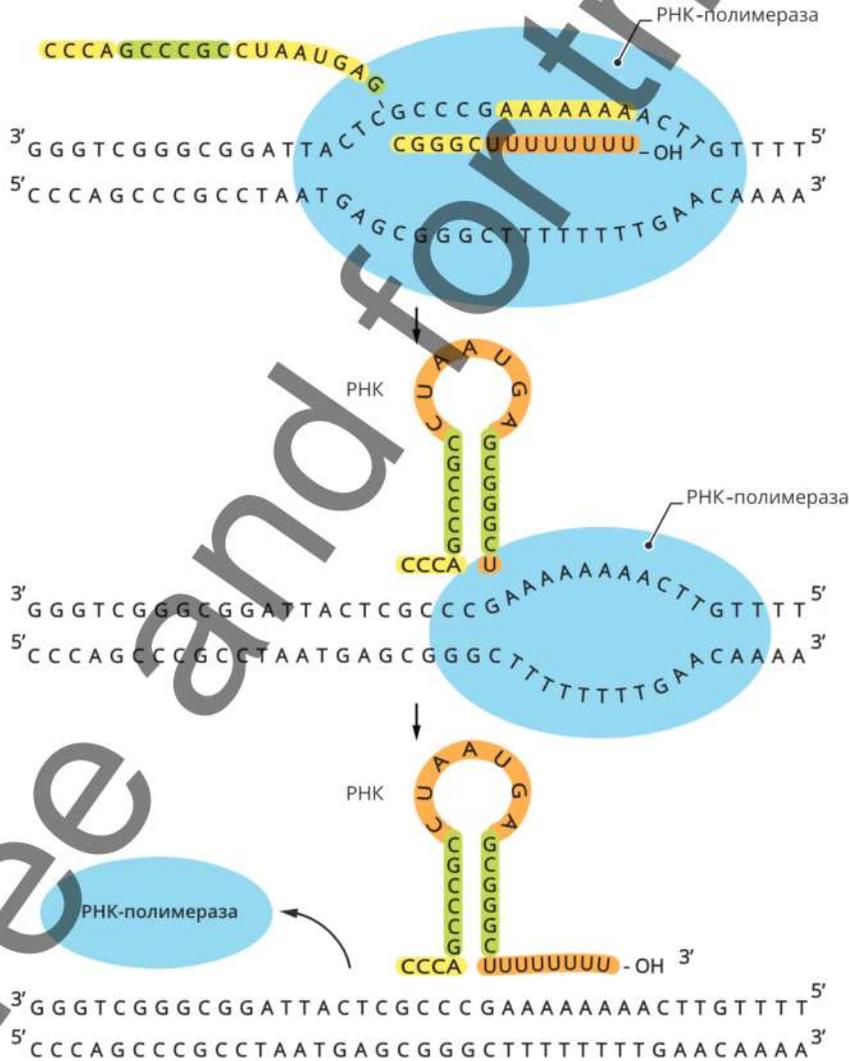


Рис. 3.15. Схема Rho-зависимой (A) и Rho-независимой (Б) термации транскрипции у прокариот

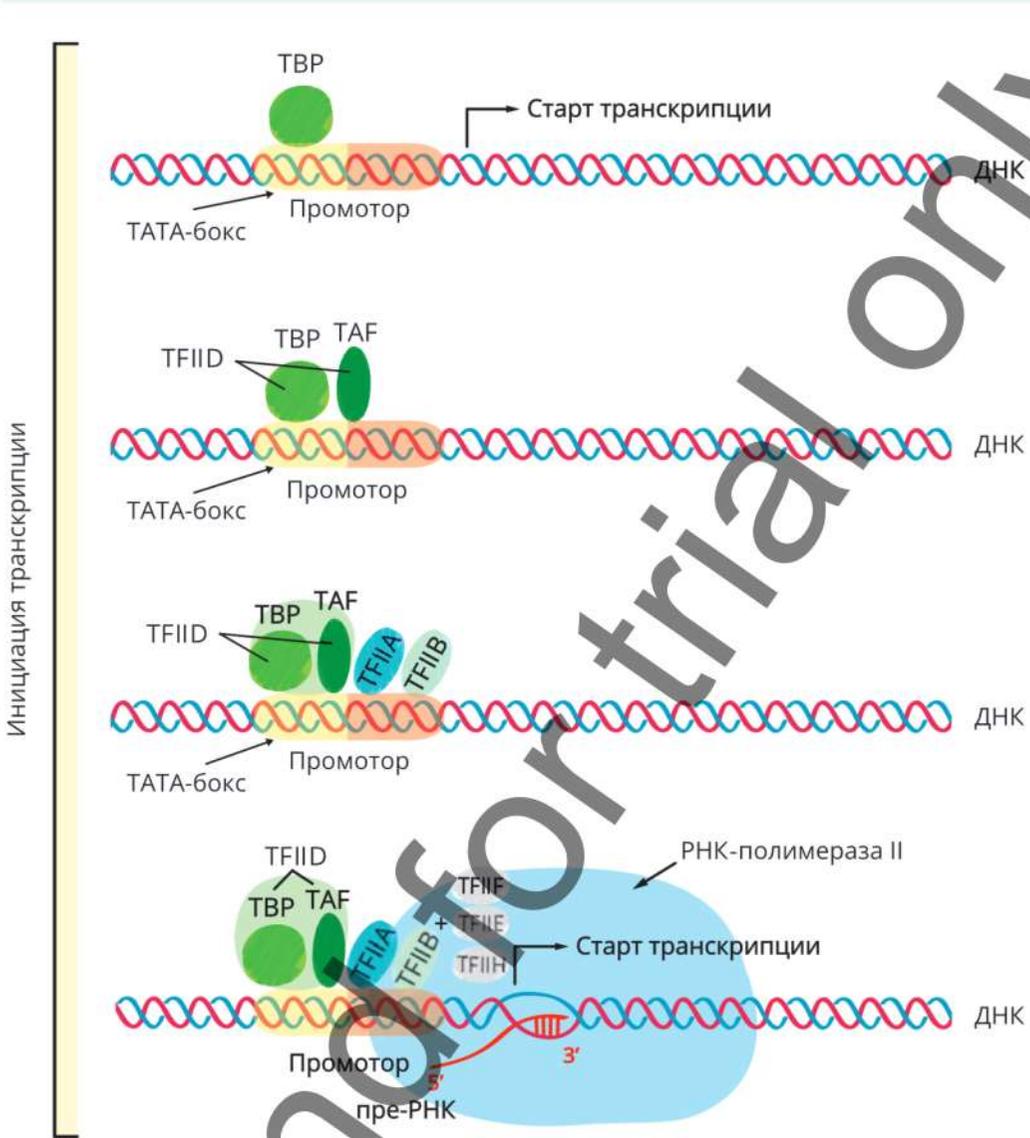
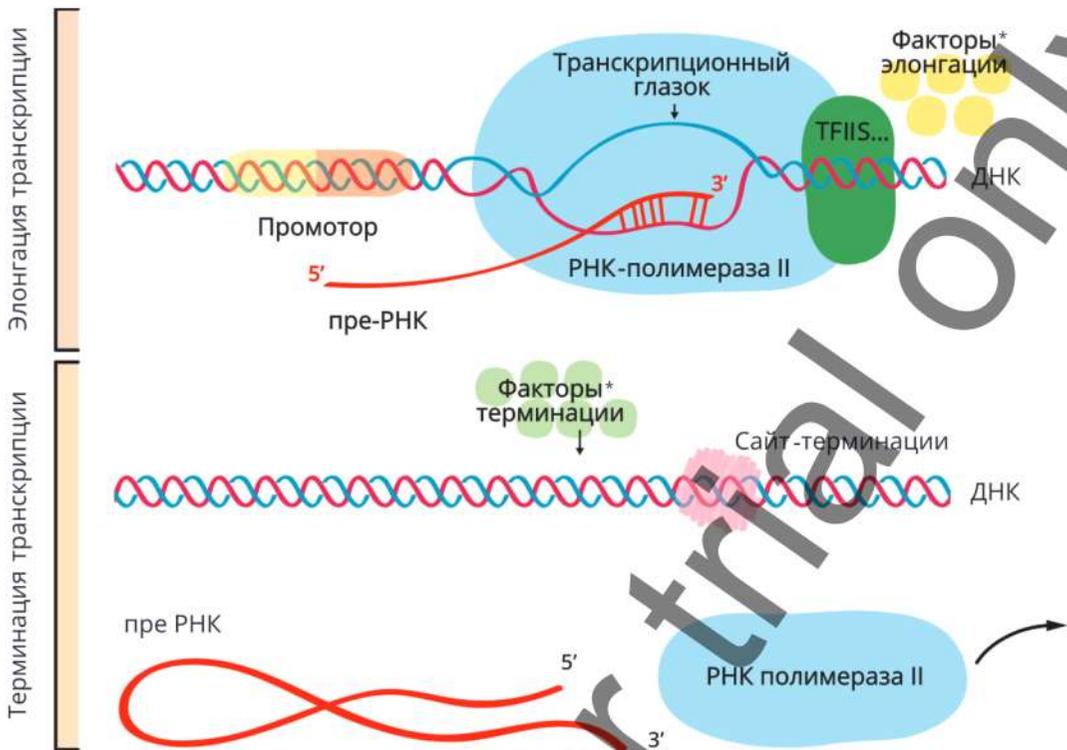


Рис. 3.16. Процесс транскрипции в клетках эукариот

* Факторы представлены в сокращенной схеме.

Элонгация. После синтеза нескольких нуклеотидов фермент останавливается, и к нему присоединяется несколько факторов элонгации (TFIIS и др.). Факторы элонгации повышают активность РНК-полимеразы, облегчают расхождение цепей ДНК и снижают вероятность остановок РНК-полимеразы. На стадии элонгации в области транскрипционной вилки одновременно разделены примерно 18 п. н. ДНК. Растущий конец цепи РНК образует временную гибридную спираль, около 12 пар нуклеотидных остатков, с матричной цепью ДНК. По мере продвижения РНК-полимеразы по матрице впереди нее происходит расхождение, а позади — восстановление двойной спирали ДНК [Ciesla M. et al., 2018].

Терминация. Завершается синтез РНК в определенных участках ДНК-матрицы — сайтах терминации транскрипции (см. рис. 3.15). Сайты терминации богаты парами



GC, и денатурация (раскручивание) таких участков идет очень тяжело. Движение РНК-полимеразы замедляется, и это служит толчком к прекращению транскрипции. Известны два механизма терминации транскрипции:

- 1) с участием факторов терминации;
- 2) по модели «торпедо».

В первом случае связывание факторов терминации с РНК-полимеразой облегчает отделение транскрипта от ДНК-матрицы. Терминация по модели «торпедо» заключается в том, чтобы остановить работу полимеразы после расщепления мРНК факторами полиаденилирования. Для этого белок Xм2 (5'–3' экзонуклеаза Xм2) связывается с остатком РНК, расщепляет ее, добирается до РНК-полимеразы и освобождает ДНК [Arndt K. M. et al., 2015].

3.7.5. Сравнение транскрипции у прокариот и эукариот

Процессы транскрипции в клетках прокариот и эукариот имеют существенные различия (табл. 3.12).

Таблица 3.12. Различия транскрипции в клетках прокариот и эукариот

Прокариоты	Эукариоты
Транскрипция проходит	
В цитоплазме	В ядре
Транскриптон	
Оперон	Ген
<i>Кодирующий участок транскриптона</i>	
Только экзонная часть	Последовательность экзонов и интронов
<i>Разная структура активных участков промотора</i>	
<i>Разные способы терминации транскрипции</i>	
Скорость транскрипции	
~ 40 нуклеотидов/с	Скорость непостоянная
Ферменты и белки	
Одна РНК-полимераза	Несколько РНК-полимераз и факторы транскрипции
В результате образуется	
зрелая РНК	пре-РНК

Обратная транскрипция была обнаружена при выявлении фермента обратной транскриптазы (ревертазы) 50 лет назад. Позже было выявлено, что некоторые типы вирусов, так называемые ретротранспозоны, реплицируются, используя этот фермент, который копирует РНК в ДНК. Деятельность иммунной системы связана с процессом обратной транскрипции для защиты всего генома и отдельных клеток от ретровирусной инфекции.

3.7.6. Транскрипция в митохондриях

Транскрипция мтДНК проходит полностью симметрично. Обе цепочки мтДНК транскрибируются с одинаковой скоростью с единственного промоторного участка [Fisher R.P. et al., 1985]. На каждой из цепей образуются две разные гигантские молекулы

РНК, каждая содержит полную копию одной цепи ДНК. Известно, что в митохондриях синтезируются 22 молекулы тРНК и малые рРНК [Asin-Cayueta J. et al., 2007].

В митохондриях клеток человека участвует своя мтРНК-полимераза — **POLRMT** (*human mitochondrial RNA polymerase*) [Gaspari M. et al., 2004; Posse V. et al., 2015]. Во время транскрипции также функционируют митохондриальные факторы транскрипции — **TFAM** (*transcription factor A mitochondrial*), **TFB1M** или **TFB2M** (*transcription factor B mitochondrial*), **MTERF1** (*mitochondrial transcription termination factor*) [Barshad G. et al., 2018].

3.8. Регуляция транскрипции

3.8.1. Регуляция транскрипции в клетках прокариот

Оперон (лат. *operor* — работаю, действую) — функциональная единица генома у прокариот, группа структурных генов. Транскрипция этих генов происходит с общего промотора и регулируется одиночным оператором. В опероне не бывает спейсеров — участков нетранскрибируемой ДНК, расположенных между тандемно повторяющимися генами [Washburn R.S. et al., 2015].

В состав оперона входят *цистроны* (*cistron*) — это гены, которые кодируют совместно или последовательно работающие белки и объединяются под одним или несколькими промоторами. Опероны по количеству цистронов делят на моно-, олиго- и полицистронные, содержащие, соответственно, только один, несколько или много цистронов (генов).

Работа оперона регулируется *геном-регулятором*, который не входит в состав самого оперона. Ген-регулятор является конститутивным геном, и его экспрессия происходит постоянно, т. к. нет оператора. Этот ген кодирует синтез *регуляторного белка*, который выполняет функцию или *репрессора*, или активатора синтеза РНК.

Лактозный оперон

Лактозный оперон (англ. *lac operon*) — пример катаболизирующего оперона (см. рис. 3.17, табл. 3.13). Он регулирует экспрессию генов метаболизма лактозы у *кишечной палочки* (*Escherichia coli*), которая использует в качестве источника углерода глюкозу (см. табл. 3.14). Если в среде культивирования заменяют глюкозу на лактозу, то гены *Z*, *Y*, *A* синтезируют ферменты, принимающие участие в расщеплении лактозы (см. рис. 3.18). В отсутствие лактозы (индуктора) РНК-полимераза не может присоединиться к промотору, т. к. белок-репрессор связывается с оператором (см. рис. 3.19, А). В этом случае не происходит транскрипции структурных генов оперона. В присутствии лактозы белок-репрессор присоединяется к ней и изменяет свою конформационную структуру. РНК-полимераза связывается с промотором и транскрибирует структурные гены (см. рис. 3.19, Б).

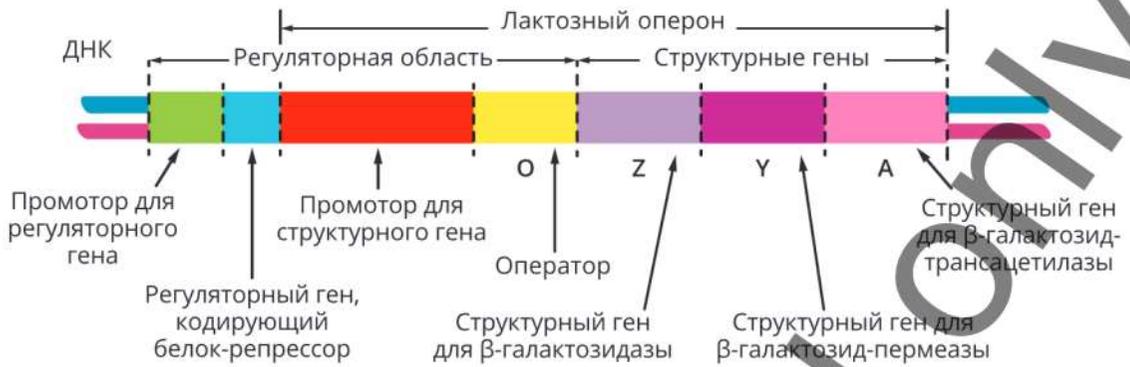


Рис. 3.17. Структура лактозного (*lac*) оперона

Таблица 3.13. Структура лактозного оперона и его регуляторной области

Регуляторная область оперона		Структурный ген оперона	
I	Ген, участвующий в синтезе белка-репрессора	Z	β-галактозидаза
P	Промотор	Y	β-галактозид-пермеаза
O	Оператор	A	β-галактозид-трансацетилаза
A	Активатор		
T	Участок ДНК, где происходит терминация		

Таблица 3.14. Регуляция лактозного оперона

Фермент	Условие	Регуляция
Негативная		
Лактоза	Отсутствие	Белок-репрессор связывается с оператором (O) и блокирует транскрипцию (рис. 3.19)
	Присутствие	Лактоза связывается с белком-репрессором, изменяет его конформационную структуру, и происходит транскрипция
Позитивная		
Глюкоза	Снижение концентрации	Комплекс белка CAP (<i>catabolite activator protein</i>), активирующего катаболизм, и циклического АМФ (аденозинмонофосфат) связывается с промотором, активируя транскрипцию оперона

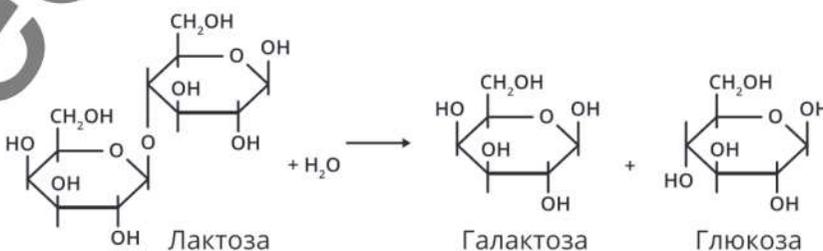


Рис. 3.18. Расщепление лактозы на глюкозу и галактозу

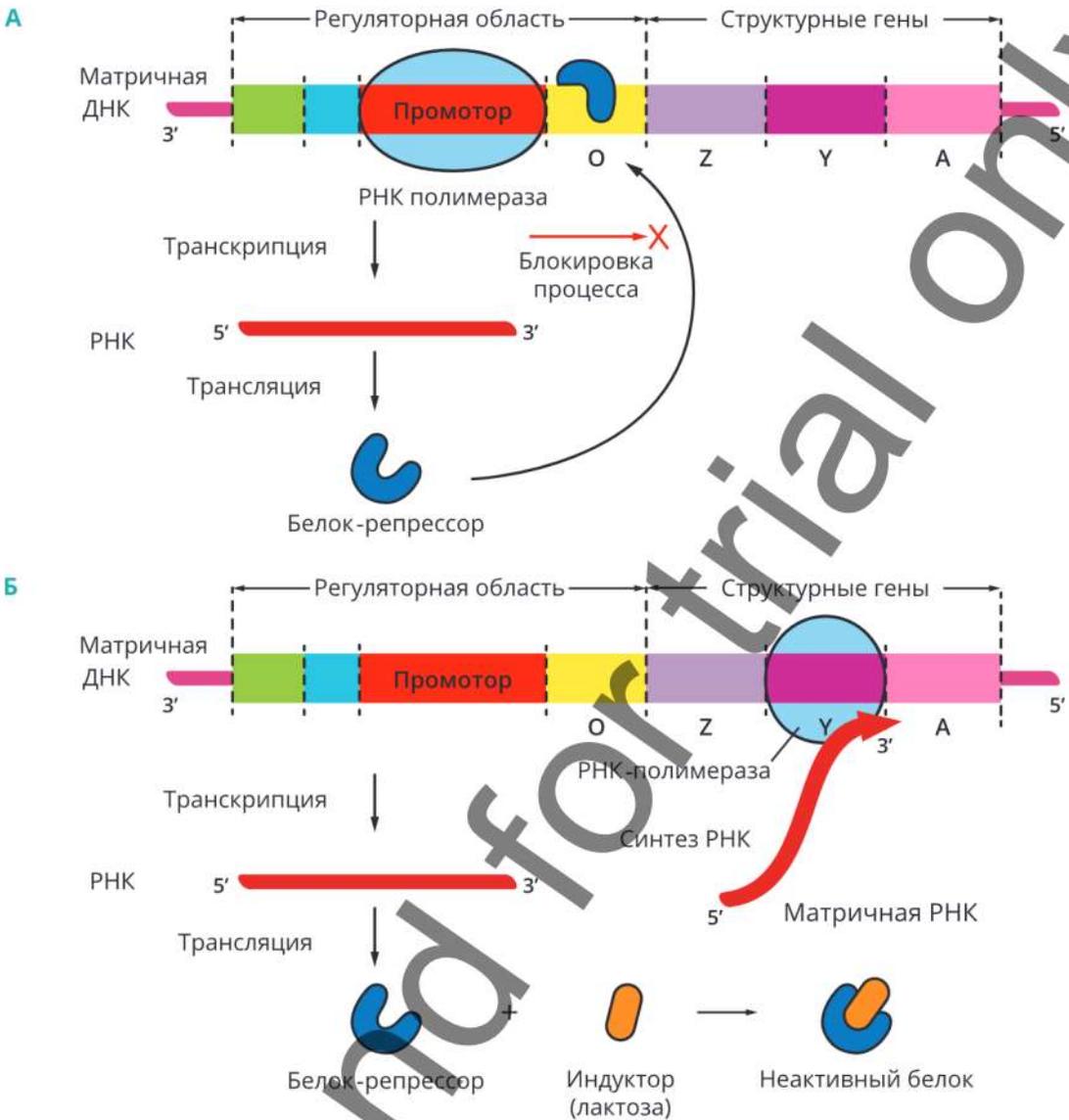


Рис. 3.19. Механизм регуляции лактозного оперона

3.8.2. Регуляция транскрипции в клетках эукариот

Регуляция транскрипции в клетках эукариот происходит при активной работе регуляторных элементов, а также с участием различных эпигенетических механизмов.

Регуляция транскрипции с участием регуляторных элементов

К регуляторным элементам относятся *цис*- и *транс*-регуляторы, которые взаимодействуют между собой. Цис-регуляторы — это определенные участки ДНК (см. рис. 3.20), регулирующие экспрессию генов на молекуле с регулируемым ими геном (см. табл. 3.15). Транс-регуляторы — это белки, которые изменяют активность генов на молекуле ДНК, которая не несет регулируемый ген. Важную роль в регуляции

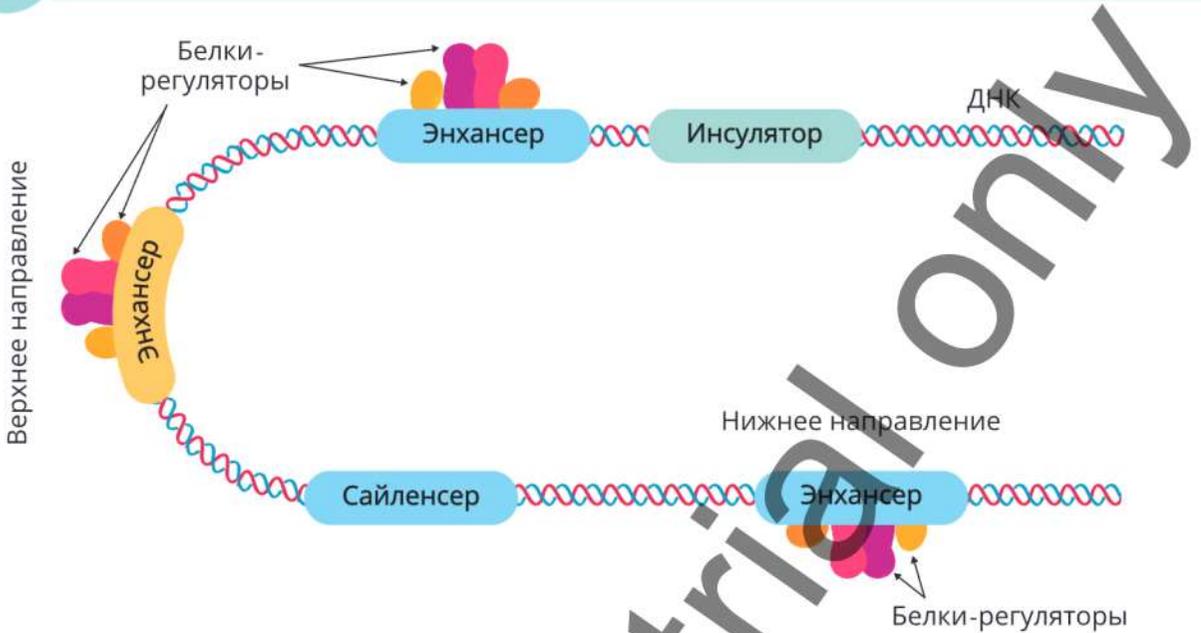


Рис. 3.20. Цис-регуляторы ДНК

инициации транскрипции у эукариот играет процесс освобождения промотора от нуклеосом. Было идентифицировано 295 676 цис-регуляторных последовательностей, включающих в себя: 53 834 возможных промотора, 234 764 потенциальных энхансера, 111 062 инсулятора [Mogged D., 2009].

Таблица 3.15. Цис-регуляторные элементы ДНК, действующие при транскрипции эукариотической клетки

Цис-регуляторы	Функция/характеристика	
Промотор (<i>promoter</i>)	Участок ДНК, где начинается транскрипция	
Энхансер (<i>enhancer</i>)	Усиливает транскрипцию гена	<ul style="list-style-type: none"> • Около 10–20 п. о. • Способны регулировать на больших расстояниях. • Ориентированы в любом направлении ($5' \rightarrow 3'$ или $3' \rightarrow 5'$). • При взаимодействии с промотором гена образуется петля.
Сайленсер (<i>silencer</i>)	Подавляет транскрипцию гена	<ul style="list-style-type: none"> • Связываются с одним или несколькими регуляторными белками. • Могут находиться перед геном или после него
Инсулятор (<i>insulator</i>)	Изолирует ген от действия энхансеров и сайленсеров	
Терминатор (<i>terminator</i>)	Участок ДНК, где заканчивается транскрипция	

3.9. Процессинг — модификация РНК

Процессинг — это модификация РНК, более характерная для клеток эукариот. Изначально при транскрипции синтезируется *пре*-РНК и далее идет модификация или созревание этой молекулы до зрелой РНК, готовой выйти из ядерных пор в цитоплазму. У прокариот процессингу подвергаются тРНК и рРНК в отличие от мРНК [Wu X. et al., 2017].

Различают несколько способов модификации РНК: *кэпирование*, *полиаденилирование* и *сплайсинг* (табл. 3.17).

Таблица 3.17. Виды процессинга

Название	действие
Кэпирование	Модификация 5'-конца
Полиаденилирование	Модификация 3'-конца
Сплайсинг (альтернативный, ауто- и транс-сплайсинг)	Вырезание интронов и соединение экзонов

Различные способы модификации РНК приводят к образованию в ядре зрелых молекул РНК.

3.9.1. Процессинг пре-матричной РНК

Первичные транскрипты мРНК, прежде чем будут использованы в ходе трансляции (синтеза первичной структуры белка), подвергаются ряду ковалентных модификаций, которые необходимы для функционирования мРНК в качестве матрицы.

3.9.1.1. Кэпирование (модификация 5'-конца)

Модификации пре-мРНК начинаются на стадии элонгации. Когда длина первичного транскрипта достигает примерно 30 нуклеотидных остатков, происходит кэпирование его 5'-конца, или модификация гуанилового нуклеотида (рис. 3.22, А). Кэпирование осуществляют три фермента: *фосфатаза*, *гуанилтрансфераза*, *метилтрансфераза* (табл. 3.18) [Galloway A. et al., 2018].

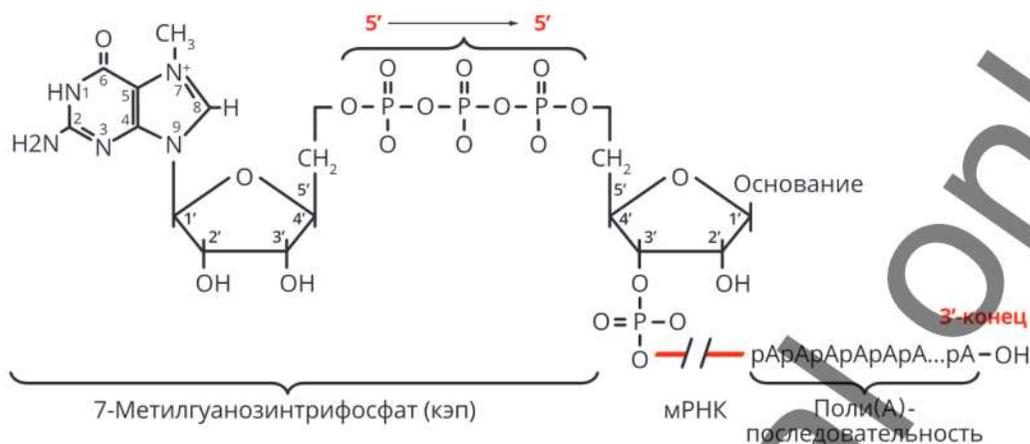


Рис. 3.22. Кэпирование (А) и полиаденилирование (Б)

Таблица 3.18. Функции ферментов кэпирования

Фермент	Функция
Фосфатаза	Удаляет фосфат с 5'-конца новосинтезированной РНК
Гуанилтрансфераза	Гидролизует <i>макроэргическую</i> связь в молекуле ГТФ (гуанозинтрифосфат) и присоединяет нуклеотиддифосфатный остаток 5'-фосфатной группой к 5'-концу синтезированного фрагмента РНК с образованием 5'-5'-фосфодиэфирной связи
Метилтрансфераза	Совершает метилирование остатка гуанина в составе ГТФ с образованием <i>N7-метилгуанозина</i> и таким образом завершает формирование кэпа

Роль модифицированного 5'-конца:

- обеспечивает инициацию трансляции;
- удлинняет время жизни мРНК, защищая ее от действия 5'-экзонуклеаз в цитоплазме;
- необходим для инициации синтеза белка, т. к. иницирующие триплеты **AUG**, **GUG** распознаются рибосомой при условии, если присутствует кэп;
- требуется для работы сплайсосомы, обеспечивающей удаление интронов.

3.9.1.2. Полиаденилирование (модификация 3'-конца)

В процессинге пре-матричной РНК 3'-конец большинства транскриптов, синтезированных РНК-полимеразой II, подвергается модификации. Образуется поли(А)-последовательность (поли(А)-хвост), которая состоит из 100–200 остатков аденозина (рис. 3.22, Б). Основным ферментом, участвующим при полиаденилировании, является поли(А)-полимераза. Она функционирует и в комплексе с белками — факторами **CPSF** и **CstF** (см. табл. 3.19). Ферменты, осуществляющие кэпирование и полиаденилирование, избирательно связываются с РНК-полимеразой II, и в отсутствие полимеразы неактивны. Лишенные поли(А)-участка молекулы мРНК быстро разрушаются в цитоплазме клеток эукариот рибонуклеазами [Edmonds M., 2002].

Таблица 3.19. Функции ферментов и факторов полиаденилирования

Фермент и фактор	Функция
CPSF (<i>cleavage and polyadenylation specificity factor</i>) — фактор специфичности расщепления и полиаденилирования	Связан с последовательностью $-AAUAAA-$ на растущей цепи РНК
Фермент поли(А)-полимераза	<ul style="list-style-type: none"> • Проявляет экзонуклеазную активность. • Разрывает 3'-фосфоэфирную связь после появления в цепи РНК специфической последовательности $-AAUAAA-$
CstF (<i>cleavage stimulation factor</i>) — фактор стимуляции расщепления	<ul style="list-style-type: none"> • Связывание с участком, обогащенным GU, за пределами участка расщепления. • Стимуляция расщепления

Модификация 3'-конца, т. е. наличие поли(А)-последовательности на 3'-конце:

- облегчает выход / транспорт мРНК из ядра;
- замедляет ее гидролиз в цитоплазме и защищает молекулы мРНК от быстрой деградации.

3.9.1.3. Сплайсинг

В РНК эукариот транскрибируются все составляющие гена, т. е. и интроны, и экзоны. Далее из новосинтезированной РНК удаляются последовательности интронов, а экзоны присоединяются в процессе *сплайсинга* (*to splice* — сшивать, сращивать). Очень длинные молекулы пре-мРНК (около 5000 нуклеотидов) после сплайсинга превращаются в более короткие молекулы цитоплазматической мРНК, т. е. можно сказать, что сплайсинг — это модификация кодирующей части транскрипта эукариот.

Экзомная (кодирующая) часть генома человека значительно меньше интронной (некодирующей) части транскрипта. При этом кодирующая часть транскрипта начинается с экзона и заканчивается им же. Есть четкие «границы» — специфичные последовательности между экзонами и интронами: на 5'-конце — богатые нуклеотидами с $-GT-$, а на 3'-конце — богатые нуклеотидами с $-AG-$ (рис. 3.23). Эти участки называются *сайтами сплайсинга*.

Вырезание интронов протекает при участии малых ядерных РНК (мяРНК — snRNA) в комплексе с белками. Такие молекулы мяРНК (U1, U2, U3, U4, U5, U6), обогащенные уридилем (U), короткие, около 200 нуклеотидов (табл. 3.20). Каждая мяРНК связана примерно с семью белковыми субъединицами и образует *малые ядерные рибонуклеопротеиды* — мяРП (*small nuclear ribonucleoprotein, snRNP*). Комплекс молекул мяРНК и белков в процессе сплайсинга пре-мРНК называется *сплайсосомой*.

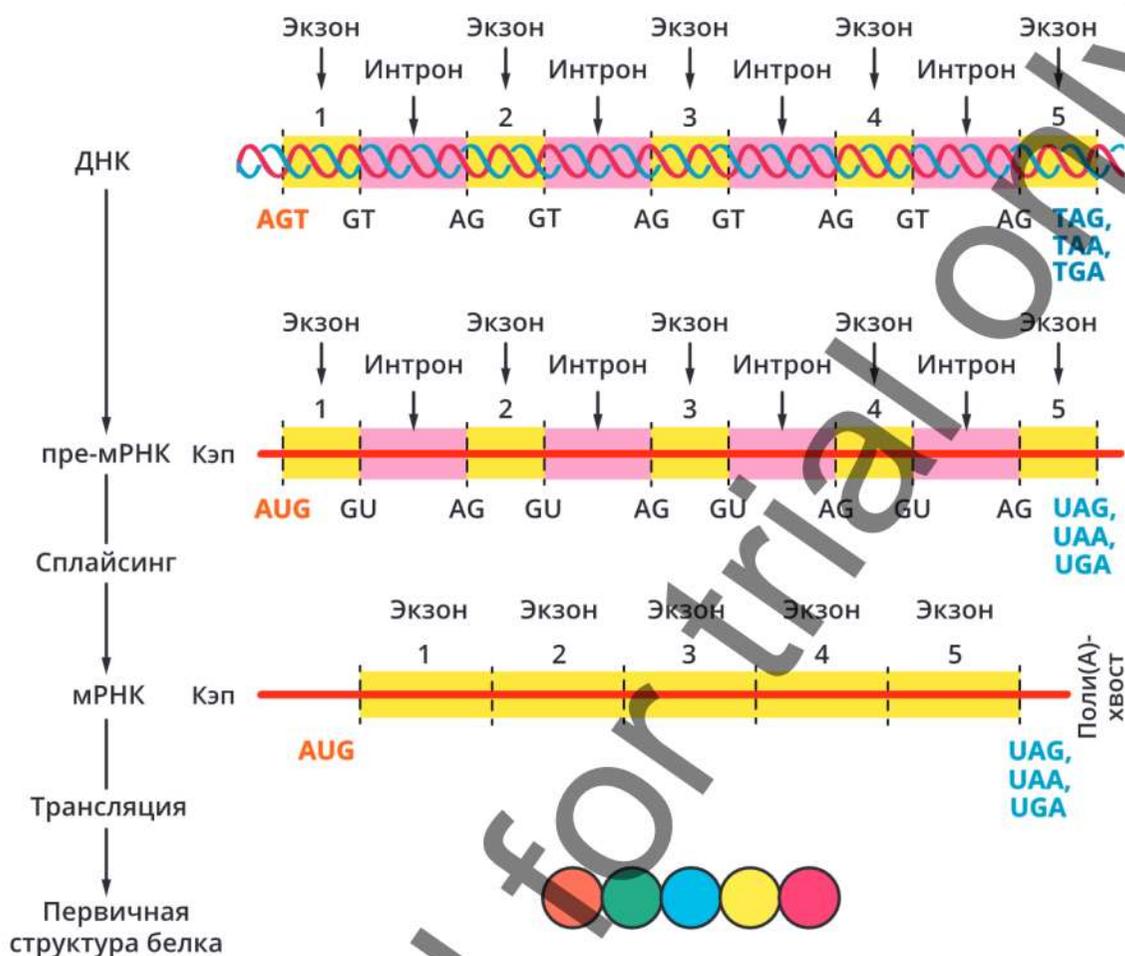


Рис. 3.23. Процесс сплайсинга пре-матричной РНК

AGT — ангиотензиноген; UAA, UAG, UGA, TAG, TAA, TGA — триплеты, стоп-кодоны; AUG — триплет, старт-кодон; AG и GU — динуклеотиды.

Таблица 3.20. Компоненты сплайсосомы

Компоненты малых ядерных РНК (мяРНК) и рибонуклеопротеидов (мяРНП)	Свойство/функция
U1 мяРНП	Образует комплементарные пары с 5'-сайтом
U2 мяРНП	Вытесняет ВВР и U2AF, образует комплементарные пары с консенсусной последовательностью
U2A (Auxiliary Factor U2 — вспомогательный фактор U2)	Узнает участок точки расхождения
U4	Активные компоненты сплайсосомы, участвуют в подготовке пре-мРНК для первой реакции фосфорилирования
U5	
U6	
ВВР (Branch-point Binding Protein)	Белок, связывающийся с точкой расхождения

В конце каждого события сплайсинга удаляется один интрон в виде «лассо», а два экзона соединяются (рис. 3.24). В этом событии участвуют пять вспомогательных молекул РНК, 200 белков и много молекул АТФ. Существуют последовательности нуклеотидов (*консенсусные*), которые сигнализируют о начале сплайсинга, т. е. о местонахождении 5'- и 3'-сайтов сплайсинга и точки ветвления последовательности интрона [Blencowe V.J., 2006].

Существует несколько типов сплайсинга (рис. 3.25):

- *Аутосплайсинг* — последовательное вырезание интронов и сшивание экзонов.
- *Альтернативный сплайсинг* — соединение экзонов в разных комбинациях, что приводит к экспрессии новых типов белков.
- *Транс-сплайсинг* — соединение экзонов различных РНК.

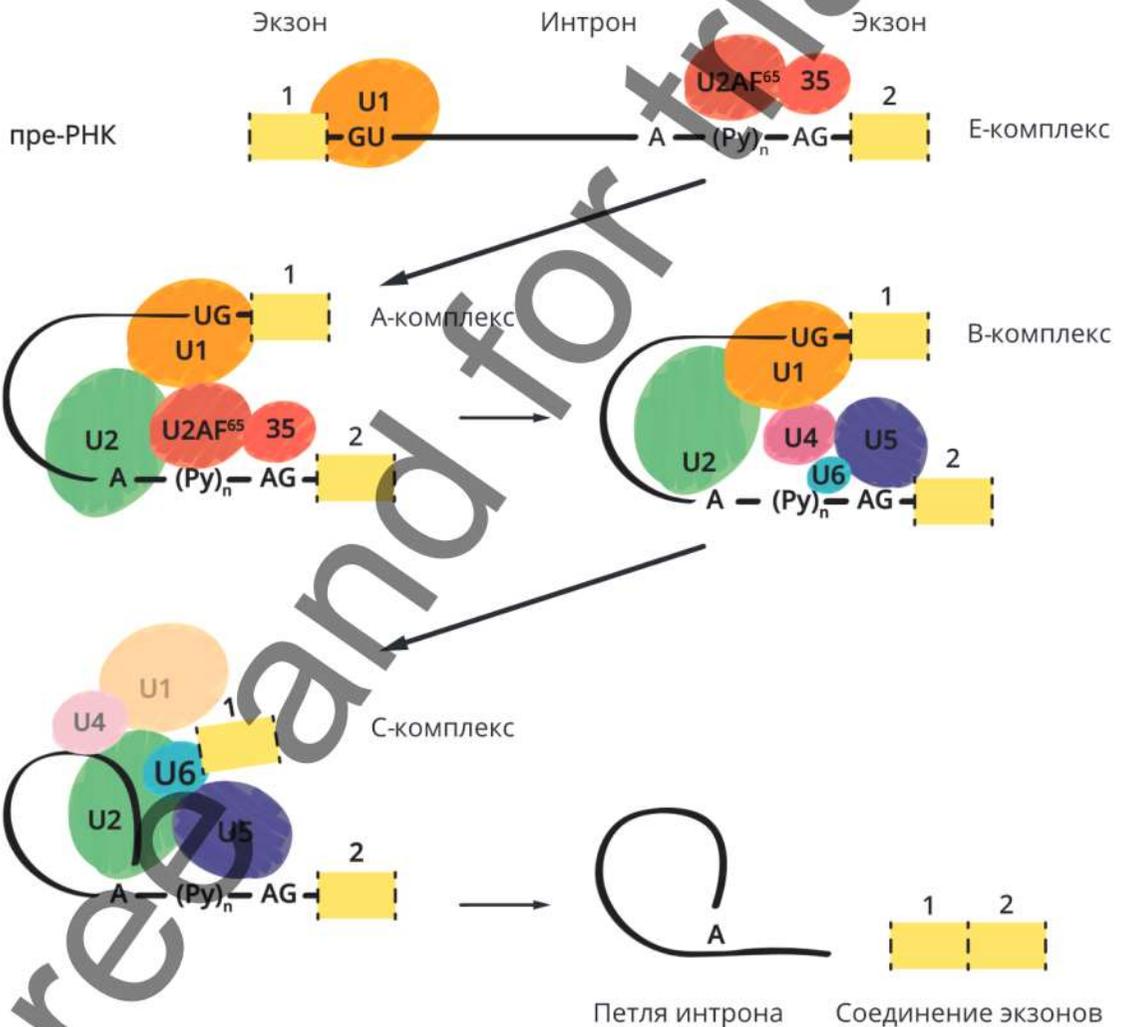


Рис. 3.24. Процесс образования сплайсосомы

U1, U2, U4–U6 — молекулы (компоненты) малых ядерных (сплайсеосомальных) РНК; AG и GU — динуклеотиды; A и G — нуклеотиды; U2AF³⁵ и U2AF⁶⁵ — субъединицы фактора сплайсинга U2AF; (Py)_n — полипиримидиновая последовательность перед 3'-концевым сайтом сплайсинга.

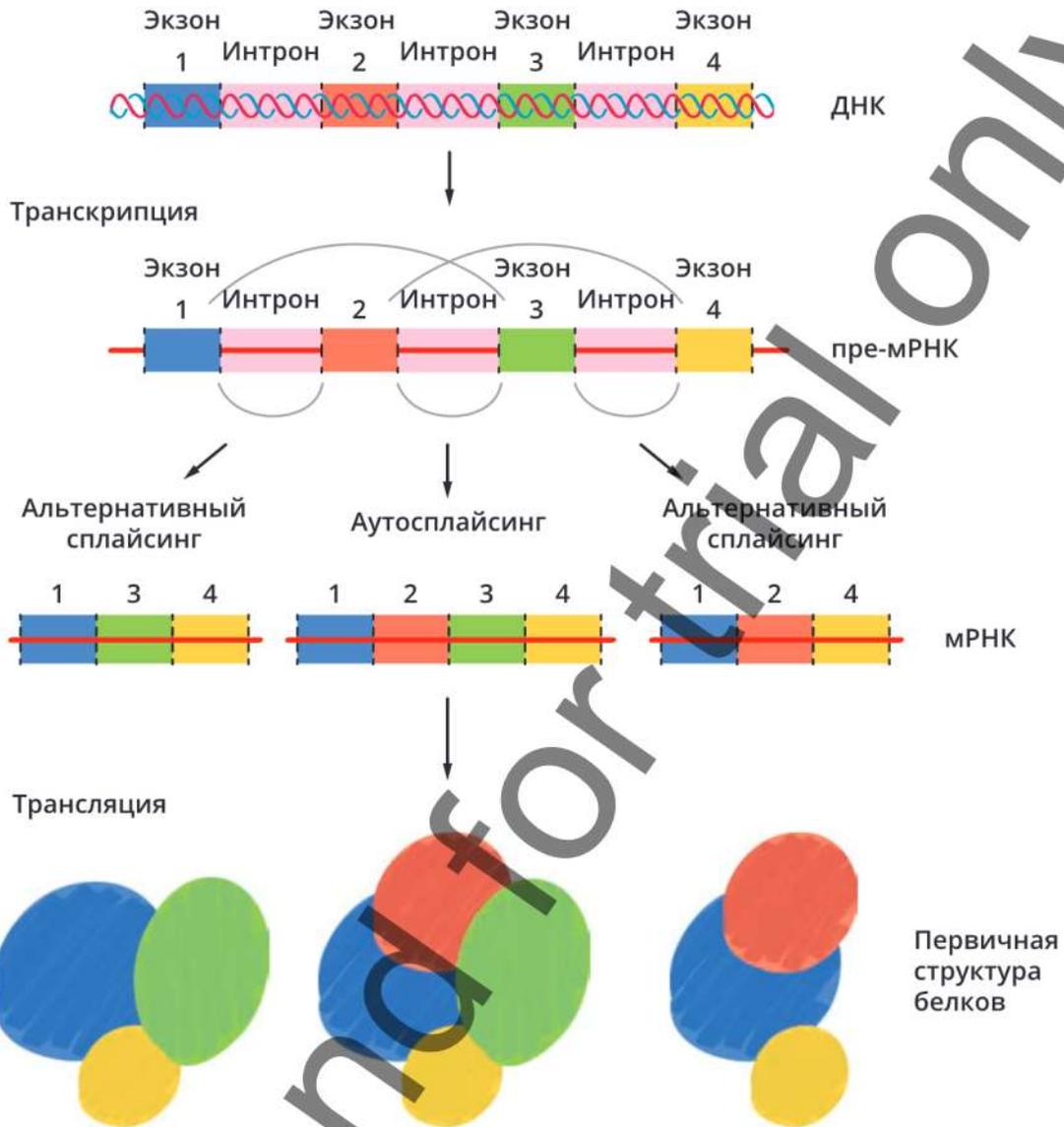


Рис. 3.25. Типы сплайсинга

3.9.2. Процессинг пре-рибосомной и пре-транспортной РНК

С участием ферментов *рибонуклеаз* происходит разрезание пре-рРНК (45 S) на зрелые рРНК — 28 S, 18 S, 5,8 S (см. рис. 3.26).

Специальными ферментами *РНКазами* из пре-тРНК удаляются последовательности нуклеотидов на 3'- и 5'-концах молекулы (см. рис. 3.27). Далее с участием фермента *нуклеотидилтрансферазы* к 3'-концу присоединяется *ССА*-последовательность. Это способствует формированию акцепторного 3'-конца в зрелой молекуле РНК. Антикодонная петля формируется с участием фермента *эндонуклеазы*. Также происходят вырезание интронов и модификация отдельных нуклеотидов [Moore L. D. et al., 2013].

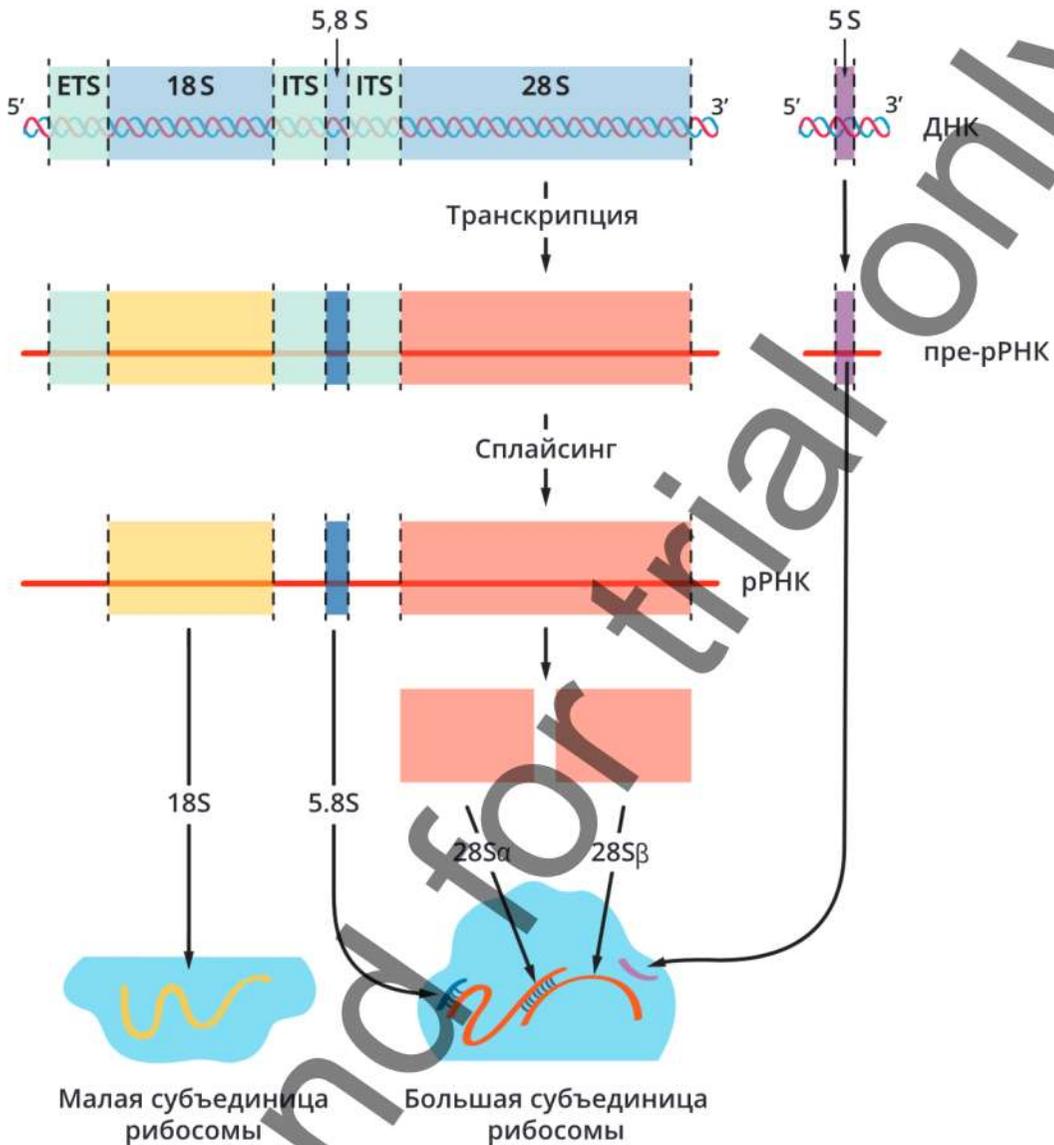


Рис. 3.26. Процессинг рРНК эукариот

3.9.3. Процессинг в митохондриях

В митохондриях процессинг идет с участием ферментов нуклеаз, которые разрезают из одной цепи две рРНК, большую часть тРНК и примерно 10 РНК, содержащих поли(А)-конец. Из транскрипта второй цепочки образуется только 8 тРНК и 1 РНК, содержащая поли(А)-конец. Почти весь (90 %) транскрипт не содержит полезной информации и деградирует. Первые стадии процессинга осуществляют ферменты: *mtРНК-аза Р* (5'-эндонуклеазное связывание) и *РНК-аза Z* (связывание 3'-конца). Созревание тРНК происходит за счет добавления триплета ССА к 3'-концу при помощи фермента тРНК-нуклеотидилтрансферазы. Аминокислота может быть присоединена к триплету ССА

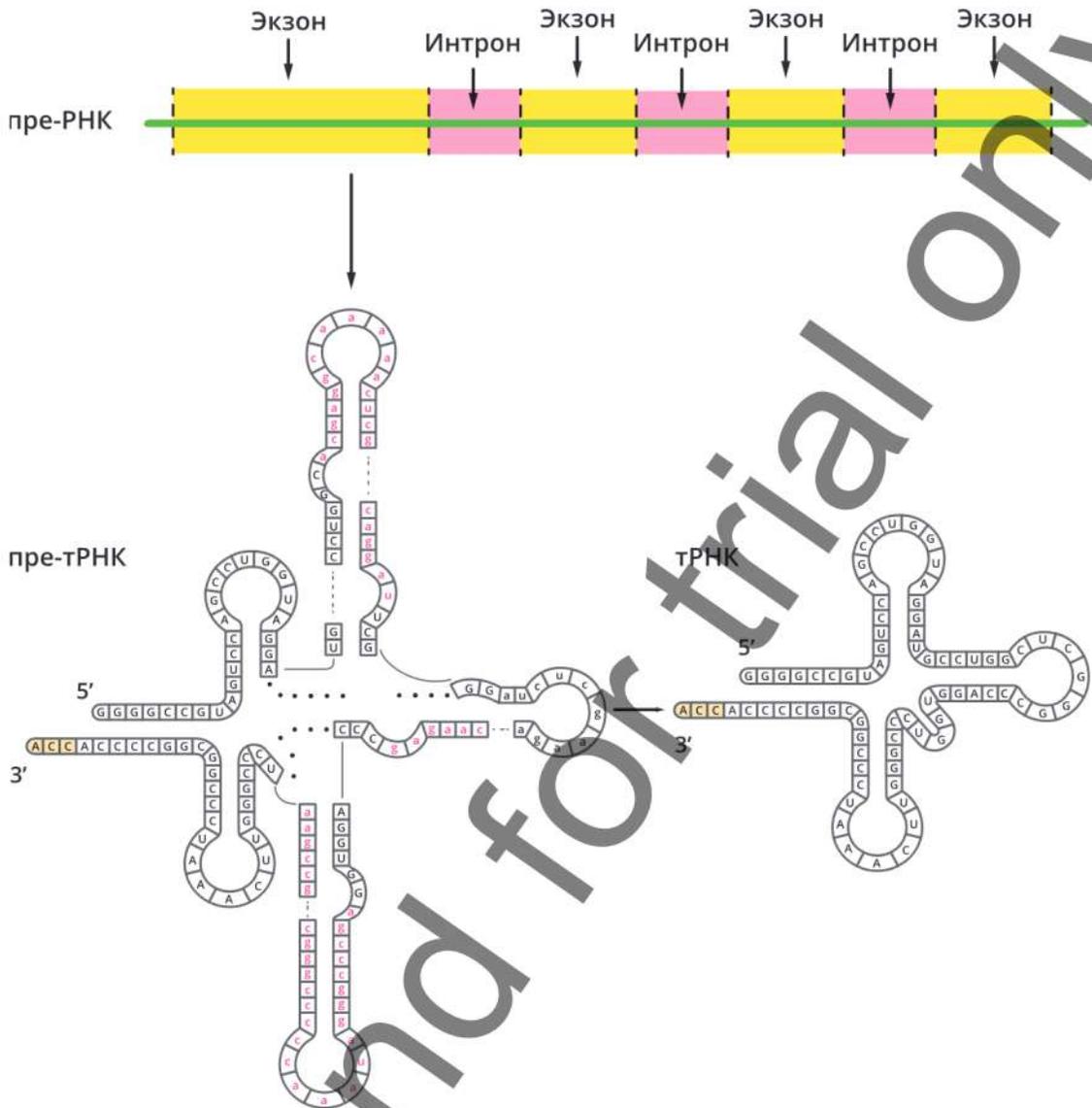


Рис. 3.27. Процессинг тРНК эукариот

с помощью фермента аминоксил-РНК-синтетазы. РНК, содержащие поли(А), являются митохондриальными мРНК, хотя кэп на 5'-конце у них отсутствует, но поли(А)-хвост на 3'-конце добавляется митохондриальной поли(А)-полимеразой.

3.9.4. Процессинг тРНК и рРНК в клетках прокариот

Как отмечалось ранее, в клетках прокариот процессингу подвергаются только тРНК и рРНК (см. рис. 3.28). Осуществляются эти процессы с участием фермента РНК-азы III. Молекула мРНК у прокариот процессингу не подвергается [Mikeska T. et al., 2014].

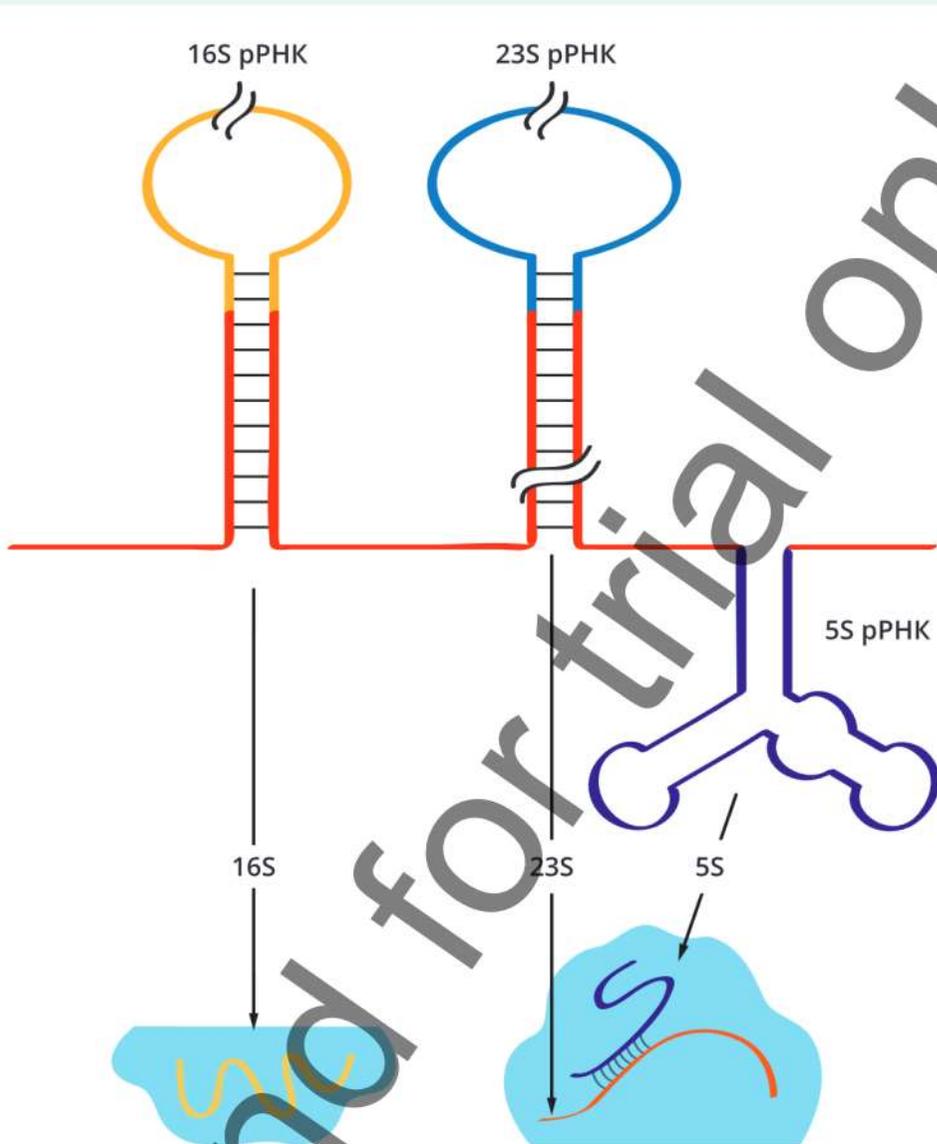


Рис. 3.28. Процессинг рРНК прокариот

3.10. Трансляция — синтез первичной структуры белка

Трансляция (от лат. *translatio* — перевод) — процесс синтеза аминокислотной (полипептидной) цепи на матрице РНК, осуществляемый рибосомой. Трансляция в клетках и прокариот, и эукариот происходит в цитоплазме, по принципу матричности. В трансляции участвуют молекулы мРНК, тРНК, рРНК, аминокислоты, ферменты, множество белков — факторов трансляции, АТФ, ГТФ и др.

Главный участник трансляции — рибосома. Как уже описывалось ранее, рибосома — это немембранный органоид, который представляет собой нуклеопротеид.

В рибосоме отношение рРНК и белков составляет 50 : 50 у высших животных и (60 : 65) / (35 : 40) у бактерий. Рибосомная РНК составляет около 70 % всей РНК клетки. Состав рибосом прокариот и эукариот различается по типам как рРНК (табл. 3.21), так и белков — факторов трансляции (табл. 3.22) [Noller H.F., 2005; Dever T.E. et al., 2012].

Таблица 3.21. Структура рибосом эукариот и прокариот

Клетки	Константа седиментации* частиц, S	рРНК	Белки	рРНК	Белки
		Большая субъединица		Малая субъединица	
Эукариоты	80	60 S		40 S	
		28 S, 5 S, 5,8 S	50	18 S	33
Прокариоты	70	50 S		30 S	
		23 S, 5 S	34	16 S	21

* Седиментация — свободное оседание частиц в вязкой среде под действием гравитационного поля.

Таблица 3.22. Факторы трансляции прокариот и эукариот

Фактор инициации	Фактор элонгации	Фактор терминации
Прокариоты		
IF1, IF2, IF3 <i>Prokaryotic initiation factor</i>	EF1(Tu) — <i>elongation factor thermo unstable</i>	RF1, RF2, RF3 <i>Prokaryotic release factors</i>
	EF2(Ts) — <i>elongation factor thermo stable</i>	
	EF3(G) — <i>elongation factor G</i>	
Эукариоты		
eIF1, eIF2, eIF3, eIF4A, eIF4B, eIF4C, eIF4E, eIF5 <i>Eukaryotic translation initiation factor</i>	eEF1, eEF2 <i>Eukaryotic elongation factor</i>	eRF1, eRF <i>Eukaryotic release factors</i>

В процессе трансляции большая и малая субъединицы рибосомы объединены в единый комплекс (см. рис. 3.29). Активными центрами рибосомы являются следующие участки:

- A** — аминокил-тРНК связывающий сайт (акцепторный участок);
- P** — пептидил-тРНК связывающий сайт (донорный участок);
- E** — участок отсоединения тРНК от рибосомы;
- M** — участок связывания с мРНК;
- ПТФ** — пептидил-трансферазный центр.

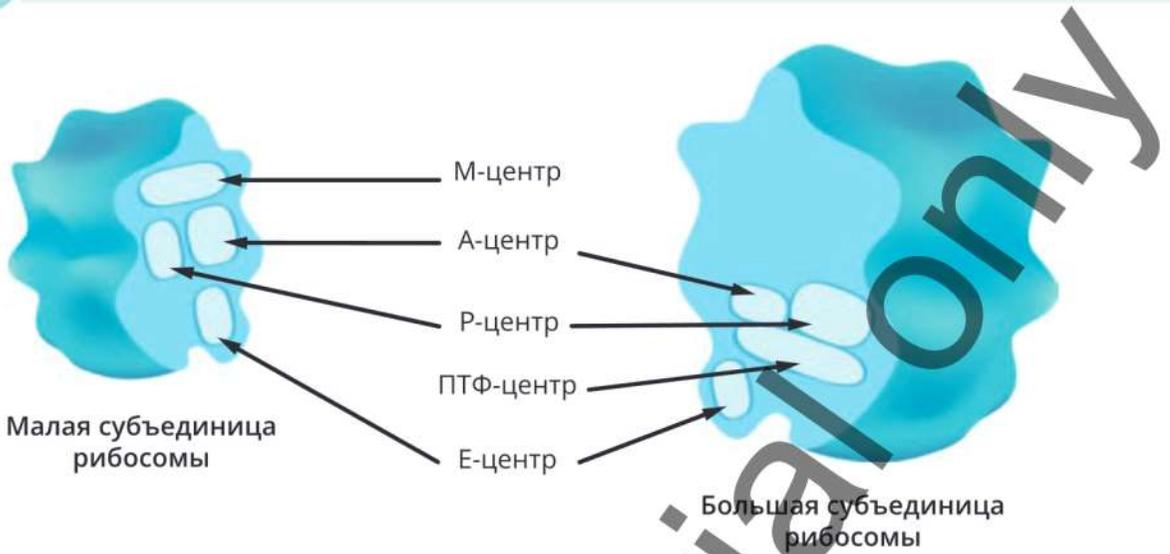


Рис. 3.29. Активные центры рибосомы



Рис. 3.30. Структура аминоксил-тРНК

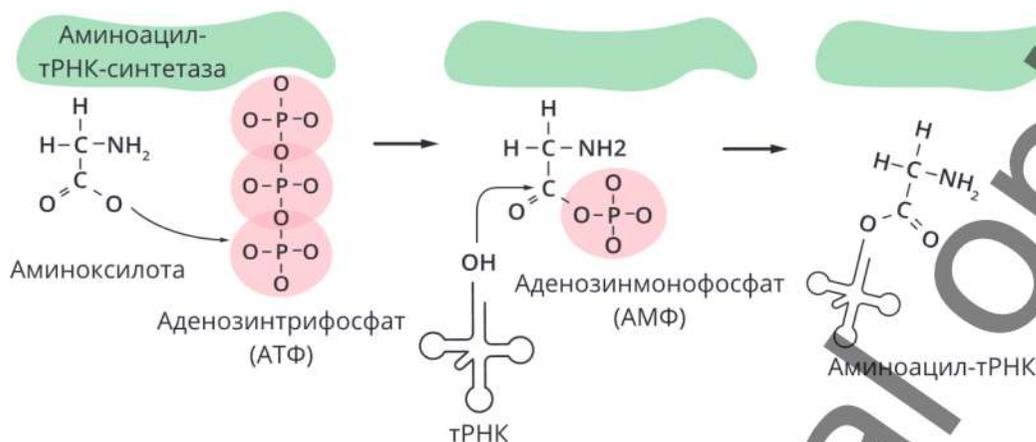


Рис. 3.31. Схема образования аминоксил-тРНК с участием аминоксил-тРНК-синтетазы

Трансляция подразделяется на три этапа: *инициация* — узнавание рибосомой стартового кодона и начало синтеза, *элонгация* — синтез белка, *терминация* — узнавание стоп-кодона и отделение молекул.

Однако до начала инициации происходит образование *аминоацил-тРНК* (рис. 3.30). Для каждой аминокислоты существует своя тРНК. Аминокислота ковалентно присоединяется к 3'-концу молекулы с помощью специфичного для каждого типа тРНК фермента *аминоацил-тРНК-синтетазы* (рис. 3.31). Для каждой аминокислоты существует своя аминоксил-тРНК-синтетаза.

3.10.1. Трансляция в клетках прокариот

Инициация трансляции у прокариот

1. Образование водородных связей по принципу комплементарности между азотистыми основаниями нуклеотидов на **мРНК** и **рРНК**. Комплементарное взаимодействие происходит между *последовательностями Шайна—Дальгарно* и анти-Шайна—Дальгарно и необходимо для размещения старт-кодона мРНК в **P-сайт** рибосомы для начала биосинтеза белка [Gualerzi C.O. et al., 2015].

Последовательность Шайна—Дальгарно — это сайт связывания рибосом на молекуле **мРНК** прокариот, обычно на расстоянии около 10 нуклеотидов до стартового кодона **AUG** (см. рис. 3.32). Консенсусом является последовательность из шести нуклеотидов **AGGAGG**.

Комплементарная последовательность анти-Шайна—Дальгарно: консенсус **CCUCCU** располагается на 3'-конце молекулы **16 S рРНК**.

2. С малой субъединицей рибосомы (**30 S**) связываются факторы инициации трансляции **IF2-GTP**, **IF1**, **IF3**.
3. С **30 S** рибосомы связывается инициаторная формилметионил-тРНК (**fMet-tRNA**), которая соответствует инициаторному кодону **AUG** на мРНК. **IF2**-фактор способствует этому связыванию.



Рис. 3.32. Последовательность Шайна—Дальгарно на матричной РНК различных бактерий и анти-Шайна—Дальгарно на рибосомной РНК

ara B — арабинозный оперон гена *B*; *gal I* — галактозный оперон гена *I*; *lac I* и *lac Z* — лактозные опероны генов *I* и *Z*; *trip E* — триптофановый оперон гена *E*; *trip L leader* — лидерная область триптофанового оперона.

4. К образовавшемуся пре-инициаторному комплексу затем присоединяется большая субъединица рибосомы (50 S). **IF2**-фактор стимулирует взаимодействие с 50 S рибосомной субъединицей.
5. После сборки рибосомы **IF2** покидает комплекс. Во время этого процесса GTP (*гуанозинтрифосфат*), связанный с **IF2**, гидролизуется до **GDP** (*гуанозиндифосфат*) и **Pi** (*пирофосфат*). Образованный 70 S инициаторный комплекс готов к элонгации трансляции. **IF1** и **IF3** также покидают этот комплекс.

Время, необходимое для посадки рибосом, составляет несколько секунд. Рибосомы транслируют мРНК со скоростью приблизительно 12 аминокислот в секунду.

Элонгация трансляции у прокариот

В пептидильном участке (**P-сайт**) рибосомы находится пептидил-тРНК. Аминоацильный участок (**A-сайт**) свободен (рис. 3.33). Один цикл элонгации трансляции прокариот состоит из трех основных этапов: *связывание с рибосомой аминоацил-тРНК, образование пептидной связи между аминокислотами и транслокация рибосомы на один кодон* [Talavera A. et al., 2018].

Факторами элонгации трансляции являются регуляторные белки, которые взаимодействуют с рибосомами и обеспечивают процесс элонгации трансляции (см. табл. 3.22, 3.23):

- **EF-Tu** осуществляет вход аминоацил-тРНК в свободный A-сайт рибосомы;
- **EF-Ts** выступает в качестве фактора нуклеотидного обмена на **EF-Tu**, катализируя освобождение GDP от EF-Tu;
- **EF-G** катализирует перемещение тРНК и мРНК в рибосоме в конце каждого раунда полипептидной элонгации.

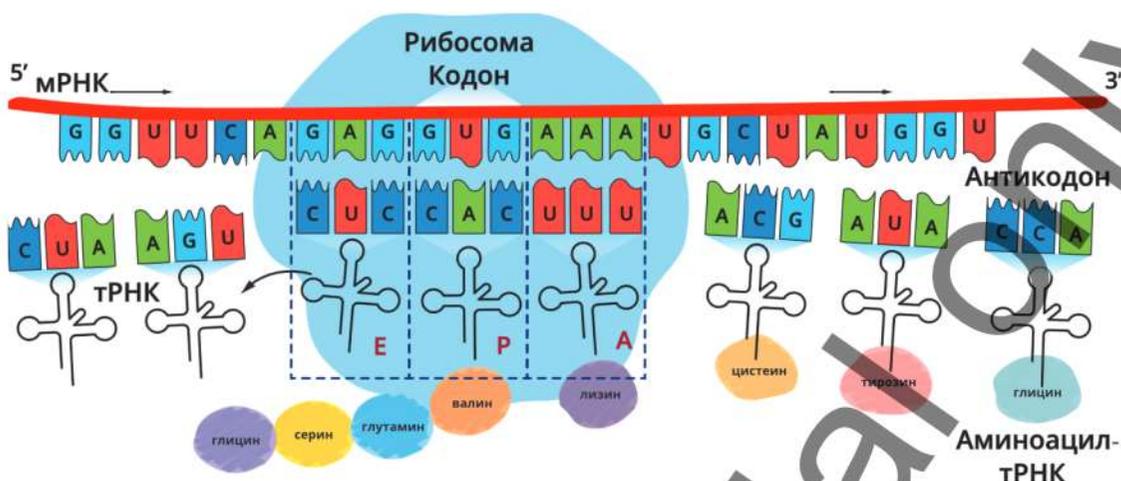


Рис. 3.33. Схема элонгации трансляции в клетках прокариот

А и Р — аминокислотный и пептильный участки; Е — участок выхода (*exit*) транспортной РНК (тРНК); мРНК — матричная РНК.

Таблица 3.23. Этапы элонгации трансляции

Этап	Описание
I	Аминоацил-тРНК связывается с А-сайтом рибосомы. В Р-сайте находится пептидил-тРНК, а в А-сайте — аминоацил-тРНК. Антикодональный участок аминоацил-тРНК образует водородные связи с кодоном мРНК по принципу комплементарности
II	Происходит образование пептидной связи между аминокислотами пептидил- и аминоацил-тРНК. Аминокислотная цепь удлиняется на одну аминокислоту
III	Происходит транслокация рибосомы. тРНК из Р-сайта перемещается в Е-сайт, пептидил-тРНК — из А-сайта в Р-сайт. А-сайт остается свободным, и к этому участку присоединяется следующая аминоацил-тРНК

Терминация трансляции у прокариот

В А-участке оказывается один из трех терминирующих кодонов — UAG, UAA или UGA. Из-за отсутствия тРНК, которые отвечают этим кодоном, полипептидил-тРНК остается связанной с Р-участком. Факторы терминации RF-1 и RF-2 катализируют отсоединение полипептидной цепи от тРНК, отделение их обоих от рибосомы, а 70 S-рибосомы — от мРНК. Если терминирующим кодоном является UAA, то эффективность процесса терминации оказывается наибольшей, поскольку этот кодон узнают оба фактора — RF-1 и RF-2 [Korostelev A.A., 2011].

Роль факторов терминации в трансляции у прокариот:

- RF-1 узнает в А-участке кодон UAA или UAG;
- RF-2 включается в том случае, когда в А-участке оказывается UAA или UGA;
- RF-3 облегчает работу двух других факторов.

3.10.2. Трансляция в клетках эукариот

Принцип трансляции у эукариот такой же, как и у прокариот. Однако есть ряд различий.

Трансляция у эукариот происходит не во всей цитоплазме клетки, а в отдельных областях цитоплазмы, условно называемых «трансляционными компартментами» (табл. 3.24). Компартментализация трансляции обеспечивает высокую скорость биосинтеза белка и широкие возможности регуляции этого процесса [Hinnebusch A. G. et al., 2012].

Таблица 3.24. Трансляция полипептидной последовательности на рибосомах, находящихся в разных участках клетки

Расположение рибосом	Доля от всех синтезируемых белков клетки, %
Связанные с гранулярной эндоплазматической сетью	3–15
Связанные с цитоскелетом	35–45
В несвязанном состоянии в цитозоле	20–40

Синтез рибосом у эукариот происходит в ядрышке. Рибосомы эукариот включают четыре молекулы рРНК (см. табл. 3.21). Три из них синтезируются РНК полимеразой I в виде единого предшественника (45 S) в ядрышке, который затем подвергается сплайсингу.

У эукариот сайт трансляции является первый AUG кодон, в зависимости от нуклеотидного контекста вокруг AUG. Консенсусная последовательность Козак включает 4–6 нуклеотидов, предшествующих старт-кодону, и 1–2 нуклеотида непосредственно после старт-кодона [Spitka R. et al., 2013]. У млекопитающих эта последовательность — GCCRCCaugG, в которой наиболее консервативными нуклеотидами являются R (пурин, обычно A) на позиции –3 относительно AUG и G в позиции +4 относительно AUG. Позже были выявлены «эукариотический консенсус» CCRCCAUGG и консенсусная последовательность инициации трансляции у позвоночных (GCC)GCCA/GCCATGG. Последовательности, составляющие окружение AUG, могут способствовать эффективности трансляции, обеспечивая подходящее окружение для инициации. Последовательность Козак не является сайтом связывания рибосомы (*ribosomal binding site, RBS*) в отличие от прокариотической последовательности Шайна—Дальгарно.

Во время инициации трансляции у эукариот существует два основных механизма нахождения рибосомой стартового AUG кодона: *кэп-зависимый* и *кэп-независимый*.

Кэп-зависимый (сканирующий) механизм. Малая субъединица рибосомы садится на 5'-конец мРНК в области кэпа и движется вдоль молекулы мРНК, «сканирует» кодоны в поисках инициаторного AUG.

Кэп-независимый (внутренняя инициация) механизм. Внутренняя инициация осуществляется за счет элементов IRES (*Internal Ribosomal Entry Site*) — участка мРНК с выраженной вторичной структурой, позволяющей ему направлять рибосомы на стартовый AUG.

У эукариот возможна *реинициация* трансляции, когда после окончания трансляции рибосома с белковыми факторами не диссоциирует от мРНК, а перескакивает с 3'- на 5'-конец мРНК и начинает инициацию еще раз.

Трансляция большинства мРНК эукариот, имеющих кэп и поли(А)-хвост, требует участия до 13 общих эукариотических факторов инициации (**eIF**) (см. табл. 3.22).

Инициация трансляции включает события между диссоциацией рибосомы во время терминации в предыдущем цикле трансляции и сборкой рибосомы, готовой к элонгации, на старт-кодоне мРНК.

Во время инициации происходят следующие основные события:

- диссоциация и анти-ассоциация рибосомных субъединиц;
- выбор инициаторной метионил-тРНК (Met-tRNA);
- связывание 5'-кэпа;
- связывание 3'-поли(А)-хвоста;
- сканирование;
- выбор правильного старт-кодона;
- объединение субъединиц рибосомы на старт-кодоне.

Элонгация проходит с участием факторов элонгации **eEF1**, **eEF2**.

У эукариот найден только один фактор терминации трансляции — **eRF**, способный «читать» все три терминирующих кодона.

3.10.3. Трансляция в митохондриях

Процесс трансляции в митохондриях очень схож с таковым в клетках прокариот. Но есть и свои особенности: митохондриальная трансляция использует всего 22 вида тРНК [Hammarsund M. et al., 2001; Smits P., 2010]. В результате образуется небольшое количество митохондриальных белков [Gaur R. et al., 2008; Tsuboi M., 2009]. Кодонами терминации служат **AGA** и **AGG**, а инициаторными кодонами трансляции — не только **AUG**, но и **AUA**, **AUU** [Huynen M.A et al., 2012].

3.11. Регуляция трансляции

Механизмы регуляции на стадии трансляции необходимы для быстрого реагирования на изменения потребности клетки в данном белке [Kozak M., 1992; Спиринов А. С., 2000].

Различные механизмы регуляции трансляции направлены на то, чтобы:

- позволить или не позволить синтез полипептидной цепи по мРНК. В случае подавления только некоторые уже построенные мРНК будут являться матрицами при синтезе белковых молекул. Такие мРНК хранятся в неактивной форме;

- если трансляция уже осуществляется, она могла бы проходить с разной скоростью. Скорость синтеза первичной структуры белка зависит от числа рибосом, задействованных в этом процессе. Чем больше рибосом — тем больше молекул белка будет синтезировано.

Регуляция трансляции главным образом происходит через регуляцию ее инициации [Arava Y. et al., 2005]. Существует три основных способа регуляции трансляции (табл. 3.25). Клетки прокариот и эукариот обладают как общими особенностями регуляции, так и различными их путями, которые обусловлены спецификой их мРНК и аппарата инициации трансляции. Так, тотальная регуляция за счет модификации факторов инициации характерна, по-видимому, только для эукариот [Mauro V.P. et al., 2016].

Таблица 3.25. Основные способы регуляции трансляции

Способ	Механизм	Прокариоты	Эукариоты
Позитивная регуляция, или «дискриминация мРНК»	Сродство мРНК и рибосом во время инициации	Есть	Есть
Негативная регуляция, или «трансляционная репрессия»	Связывание белков-репрессоров с мРНК и рибосомой	Есть	Есть
Тотальная регуляция	Регуляция всей совокупности мРНК клетки посредством модификации факторов инициации	Нет	Есть

Дискриминация мРНК — это сродство мРНК и рибосом во время инициации. У прокариот дискриминация мРНК идет с участием «слабых» или «сильных» мРНК (на них нанизывается много рибосом с образованием плотных полирибосом). Различная сила мРНК определяет соотношение синтеза различных белков в клетке. Белки, требуемые в большом количестве, кодируются «сильными» мРНК (структурные белки мембран, рибосомные белки, факторы элонгации, белки оболочки вирусов и др.). Регуляторные белки и специализированные ферменты синтезируются «слабыми» мРНК [Woese C.R., 2001].

У эукариот дискриминация мРНК обусловлена разным сродством факторов инициации с мРНК.

Дискриминацию мРНК можно рассматривать как механизм конститутивного контроля соотношения продуктов белкового синтеза. Так, если белок имеет четвертичную структуру, построенную из разных субъединиц в различном соотношении, то сила мРНК, кодирующих эти субъединицы, координирована с пропорцией субъединиц в структуре.

Трансляционная репрессия — это подавление трансляции с помощью специальных белков-репрессоров. Эти белки специфически садятся на участки связывания мРНК

и субъединиц рибосомы при инициации трансляции. Их действие — либо уменьшение скорости инициации, либо полное блокирование трансляции [Shuo Gu et al., 2010].

В большинстве случаев в месте связывания белка-репрессора с мРНК имеется нестабильная двуспиральная структура — шпилька, которая легко расплетается иницирующей рибосомой. Белок-репрессор связывается со шпилькой, что является барьером для функционирования рибосомы [Hershey J. W. B. et al., 2012].

Репрессором может быть сам белок, кодируемый данной мРНК. В результате получается *регуляция* по типу обратной связи. Обычно это происходит при синтезе избыточного количества белка на данной мРНК.

Тотальная регуляция — это активация специальной *фосфокиназы*, которая фосфорилирует фактор инициации **eIF2**. Это приводит к подавлению инициации трансляции всех мРНК клетки.

Сигналами для активации фосфокиназы в клетке являются:

- тепловой шок;
- другие виды стрессовых воздействий;
- недостаток ростовых факторов;
- аминокислотное голодание;
- недостаток железа;
- вирусные инфекции.

Подавление синтеза белка в этих условиях является следствием именно активации фосфокиназы и катализируемого ею фосфорилирования **eIF2**. Степень подавления белкового синтеза может варьировать в зависимости от уровня стресса [Robichaud N. et al., 2018].

Существуют и другие механизмы регуляции трансляции у эукариот.

В процессе *маскирования мРНК эукариот* — соответствующая мРНК становится недоступной для инициации трансляции. Маскирование, как и типичная трансляционная репрессия, осуществляется белками и зависит от внешних сигналов (*эффлекторов*). Маскирование и демаскирование мРНК являются особенно характерными во время:

- гаметогенеза (оогенеза и сперматогенеза);
- раннего эмбрионального развития;
- клеточной дифференцировки;
- гормонального включения или выключения функций.

Например, в оогенезе происходит запасание некоторых материнских мРНК в маскированной форме, и часть этих мРНК демаскируется в ответ на оплодотворение яйцеклетки, обеспечивая белковый синтез на самых ранних стадиях *эмбриогенеза*: дробления, бластуляции и ранней гастрюляции.

Наиболее интересным моментом в маскировании мРНК является то, что маскирующий белок связывается не с 5'-проксимальным участком инициации трансляции на мРНК, а с нетранслируемым хвостом мРНК — с 3'-проксимальной некодирующей областью, так называемой 3'-UTR (*3'-UnTranslated Region*). В пределах 3'-UTR имеется специальная посадочная площадка для маскирующего белка — *сегмент маскирования*. Связывание маскирующего белка с сегментом маскирования 3'-UTR приводит к блокаде событий.

РНК-интерференция (RNA silencing) — это подавление экспрессии генов у эукариот в процессе трансляции. Процесс индуцируется короткими (20–30 п. н.) двуниевыми молекулами РНК, которые называются *микроРНК (мкРНК — silencing RNA, siRNA)*. Фермент *Dicer (рибонуклеаза из семейства РНК-азы III)* разрезает двухцепочечную РНК. При этом образуются мкРНК, которые связываются с каталитически активными белками, такими как нуклеазы и **RISC** (RNA — induced silencing complex), комплексе RISC и мкРНК специфически разрушает мРНК и предотвращает трансляцию. Гены мкРНК чаще всего располагаются между белок-кодирующими генами. Комплементарно либо частично комплементарно связываются с мРНК, что приводит к ее разрушению или ингибированию трансляции [Mello C. C. et al., 2004].

Биологическая роль РНК-интерференции заключается:

- в регуляции экспрессии генов после транскрипции;
- подавлении активности МГЭ;
- защите от вирусов;
- контроле развития организма;
- изменении структуры гетерохроматина.

Время жизни мРНК также является важной частью регуляции трансляции. Известно, что мРНК — моноцистронная молекула. Распад этой молекулы проводят не *5'-РНК-азы*, а *3'-РНК-азы*, где все мРНК содержат поли(А)-фрагменты из 200 нуклеотидов.

У эукариот время жизни мРНК варьирует от 10 мин до 2 сут. Короткоживущими являются мРНК регуляторных белков. У них в 3'-некодирующей части находятся *-AU-богатые области (AU-rich elements, ARE)*, которые влияют на скорость разрушения поли(А)-фрагмента. Связывание ряда белков из семейства **RBP** (*RNA-binding proteins*) с **ARE**-областью индуцирует деградацию мРНК. Гены раннего ответа с широким спектром внешних сигналов, включая онкогены и цитокины, имеют относительно короткое время жизни из-за **ARE**-элементов в их мРНК.

3.12. Посттрансляционная модификация белка

Посттрансляционную модификацию белка называют *фолдингом* (англ. *folding* — укладка). **Фолдинг** — это сложный спонтанный процесс сворачивания первичной структуры белка (полипептидной цепи) в уникальную пространственную структуру — *третичную* (рис. 3.34).

Фолдинг протекает в несколько стадий. Сначала быстро образуется вторичная структура за счет водородных связей, и затем также быстро — третичная структура. После этого происходит медленная стадия образования специфической конформации в основном за счет гидрофобных взаимодействий [Kleizen B. et al., 2004].

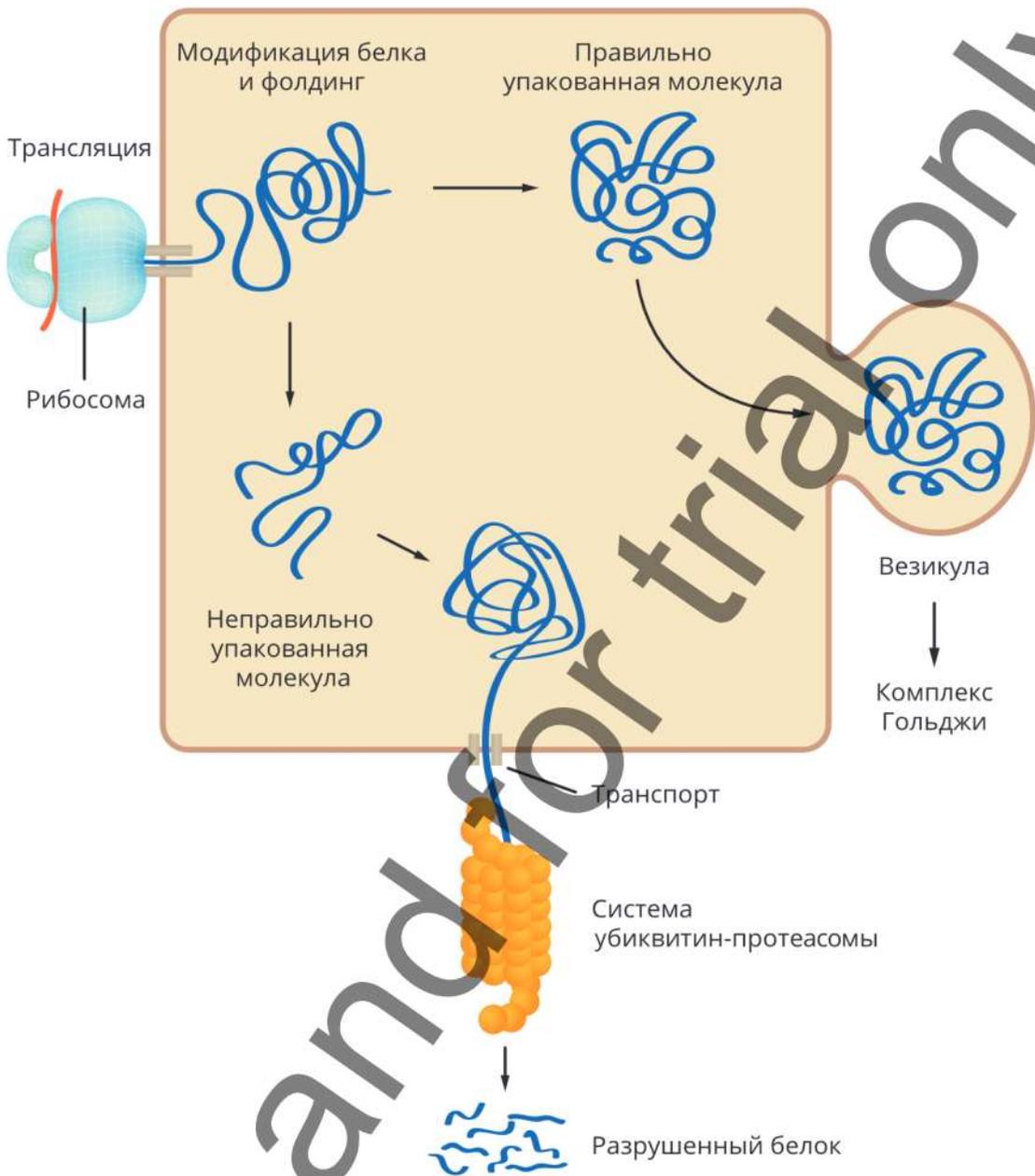


Рис. 3.34. Формирование третичной структуры белка

Большинство только что синтезированных белков может сворачиваться самостоятельно. Но в некоторых случаях в фолдинге участвуют специальные белки-шапероны (англ. *chaperones*). Они, начиная с трансляции, отслеживают и сопровождают конформационную структуру белка на всем протяжении жизни клетки.

Функции белков-шаперонов:

- помогают вновь синтезированной полипептидной цепи найти правильную форму;
- контролируют весь процесс фолдинга;

- ускоряют процесс фолдинга;
- стабилизируют частично денатурированные молекулы белка;
- сортируют то, что еще можно спасти;
- переносят белки через мембраны.
- помогают в сборке олигомерных белков;
- участвуют в переключении конформации белков с неактивной на активную, т. к. искусственные белки могут быть неактивны.

Функционирование шаперонов в клетках прокариот и эукариот не имеет принципиальных отличий. У эукариот фолдинг белков происходит в эндоплазматическом ретикулуме. В нем содержатся необходимые для фолдинга белки *шапероны* и ферменты [Kaiser C. M. et al., 2011]. Также он обладает уникальным окислительным потенциалом, облегчающим образование дисульфидных связей в процессе укладки белка. Из эндоплазматического ретикулума белки с корректной укладкой отправляются к месту назначения. Белки с нарушенной укладкой подвергаются деградации.

Также в фолдинге участвуют *шаперонины* — сложные белки, состоящие из многих субъединиц. Субъединицы шаперонинов принадлежат к группе больших молекулярных шаперонов (60 кДа) и собираются в тороидальную структуру, состоящую из двух колец. Шапероны связываются с полностью или частично развернутой молекулой, защищают гидрофобные группы и передают ее шаперонину [Тарантул В.З., 2016].

Многие белки-шапероны участвуют в фолдинге только что созданных белков в тот момент, когда они «вытягиваются» из рибосомы. Другие начинают экспрессироваться в ответ на разные типы клеточного стресса. Многие шапероны являются *белками теплового шока* (*Heat Shock Protein, Hsp*).

Известно, что повышение температуры сильно влияет на фолдинг белка. При тепловом шоке в клетке резко увеличивается содержание белков теплового шока.

К этим белкам относят:

- цитозольные белки теплового шока **Hsp70** и **Hsp60**;
- белок, который связывается с тяжелой цепью иммуноглобулинов (BiP), и ядерный нуклеоплазмин, обеспечивающий сборку нуклеосом;
- Hsp70 — часть антиапоптозного сигнального пути;
- стероидный рецептор, находящийся в цитоплазме и связанный с **Hsp90**.

Шапероны и шаперонины могут функционировать вместе. Они участвуют в исправлении поврежденной структуры белка. Если исправить не удастся, белок должен быть разрушен в протеасоме, где происходит деградация 80–90 % внутриклеточных белков. Деградация белков в протеасоме важна для протекания таких процессов, как клеточный цикл, регуляция экспрессии генов, ответ на окислительный стресс [Beissinger M. et al., 1998].

Протеасома (от англ. *protease* — протеиназа и лат. *soma* — тело) — сложный белковый комплекс со множеством субъединиц, образующий полость. Протеасомы выделяют в виде индивидуальных частиц с *коэффициентами седиментации 20 S и 26 S*. Основная функция протеасомы состоит в разрушении ненужных или дефектных белков. Процесс протекает во время химической реакции — протеолиза, при котором происходит разрыв пептидных связей. Сложная молекула расщепляется до более

коротких пептидов (4–25 аминокислотных остатков). В дальнейшем они, в свою очередь, могут быть расщеплены до отдельных аминокислот. Протеасома присутствует в клетках эукариот (в цитозоле и ядре), архей и некоторых бактерий. В человеческой клетке насчитывается около 30 000 протеасом [Kubelka J. et al., 2004].

Дегградация (расщепление, регрессия) белка протеасомой происходит с участием маленького консервативного белка убиквитина (от англ. *ubiquitous* — вездесущий). Убиквитин-протеасомный путь дегградации белков проходит с помощью ферментов — убиквитин-лигаз (E1, E2, E3). Одна или несколько мономеров убиквитина присоединяются к боковым аминогруппам белка-мишени с помощью ковалентной связи [Hershko A. et al., 2000] (рис. 3.35). Это служит для убиквитин-лигаз сигналом

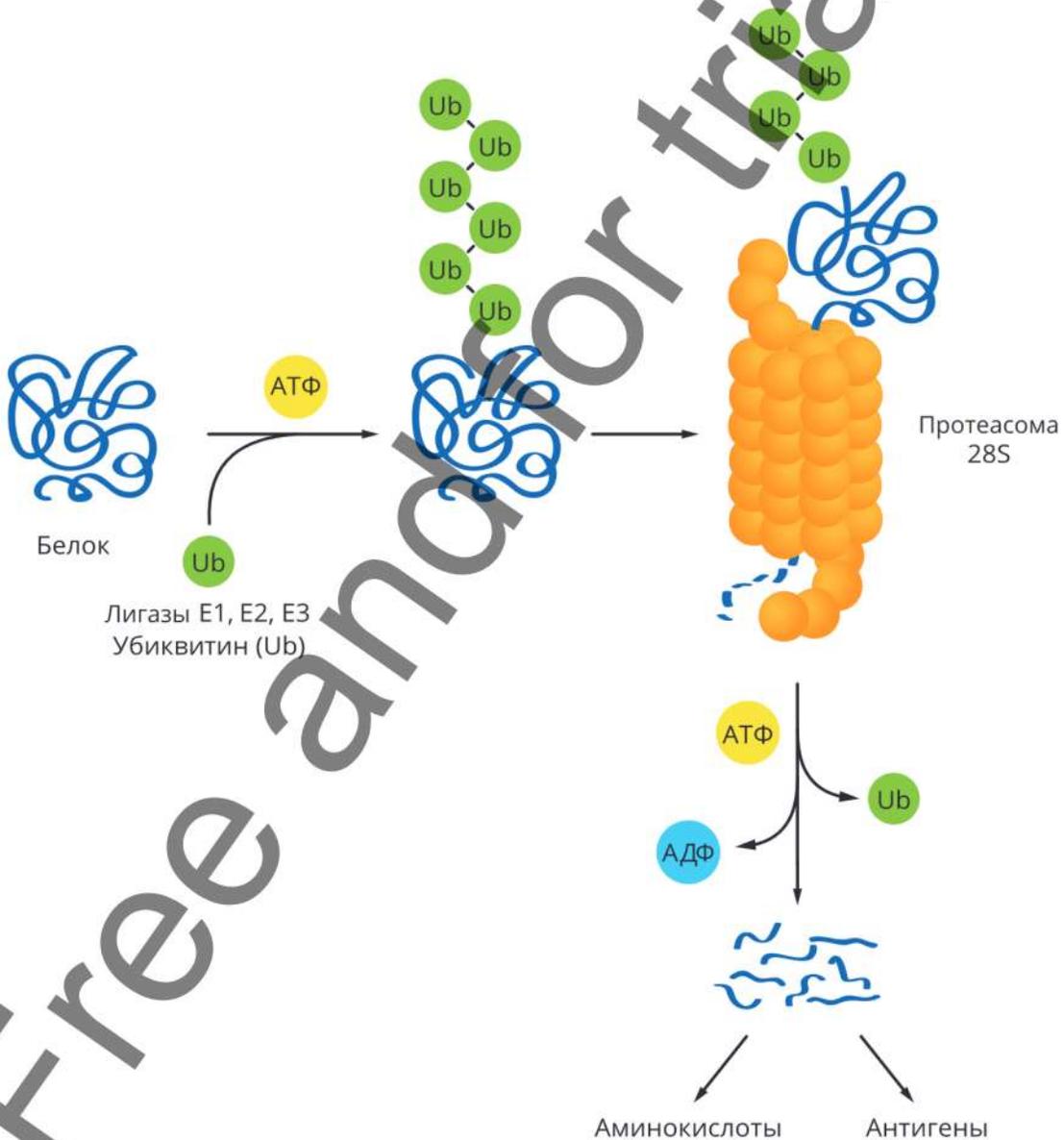


Рис. 3.35. Механизм дегградации белка

для дальнейшего присоединения молекул убиквитина к белку. Образуется полиубиквитиновая цепь. Такой убиквитинилированный белок транспортируется к протеасоме, где цепь убиквитинов удаляется, что позволяет целевому белку развернуться и загрузиться внутрь протеасомы, где он деградирует с помощью трех треониновых протеаз.

Система убиквитинилирования вовлечена в такие важные процессы, как пролиферация, развитие и дифференцировка клеток, реакция на стресс и патогены, репарация ДНК [Wolf D. H. et al., 2004].

3.13. Эпигенетические модификации

Эпигенетика (др.-греч. ἐπι- — приставка, обозначающая пребывание на чем-либо или помещение на что-либо) — область биологии и генетики, которая изучает обратимые механизмы изменения в нуклеиновых кислотах без изменения их нативной структуры.

Эпигенетические изменения отличаются от генетических (табл. 3.26).

Таблица 3.26. Характеристика изменений генома

Генетические изменения	Эпигенетические изменения
<ul style="list-style-type: none"> • Необратимые (мутации). • Нарушение первичной структуры ДНК. • Стабильно наследуемые в ряду клеточных поколений 	<ul style="list-style-type: none"> • Обратимые. • Не затрагивают изменений первичной структуры ДНК. • Бывают долговременными и кратковременными. • Множество взаимосвязанных механизмов

Эпигенетическая регуляция — это процесс, приводящий к изменению активности гена без изменений в его кодирующей последовательности (рис. 3.36, см. табл. 3.27).

К эпигенетическим изменениям в процессах развития организма (см. табл. 3.28) относят:

- модификацию ДНК;
- модификацию гистоновых белков;
- модификацию негистоновых белков хроматина;
- ремоделирование хроматина и др.

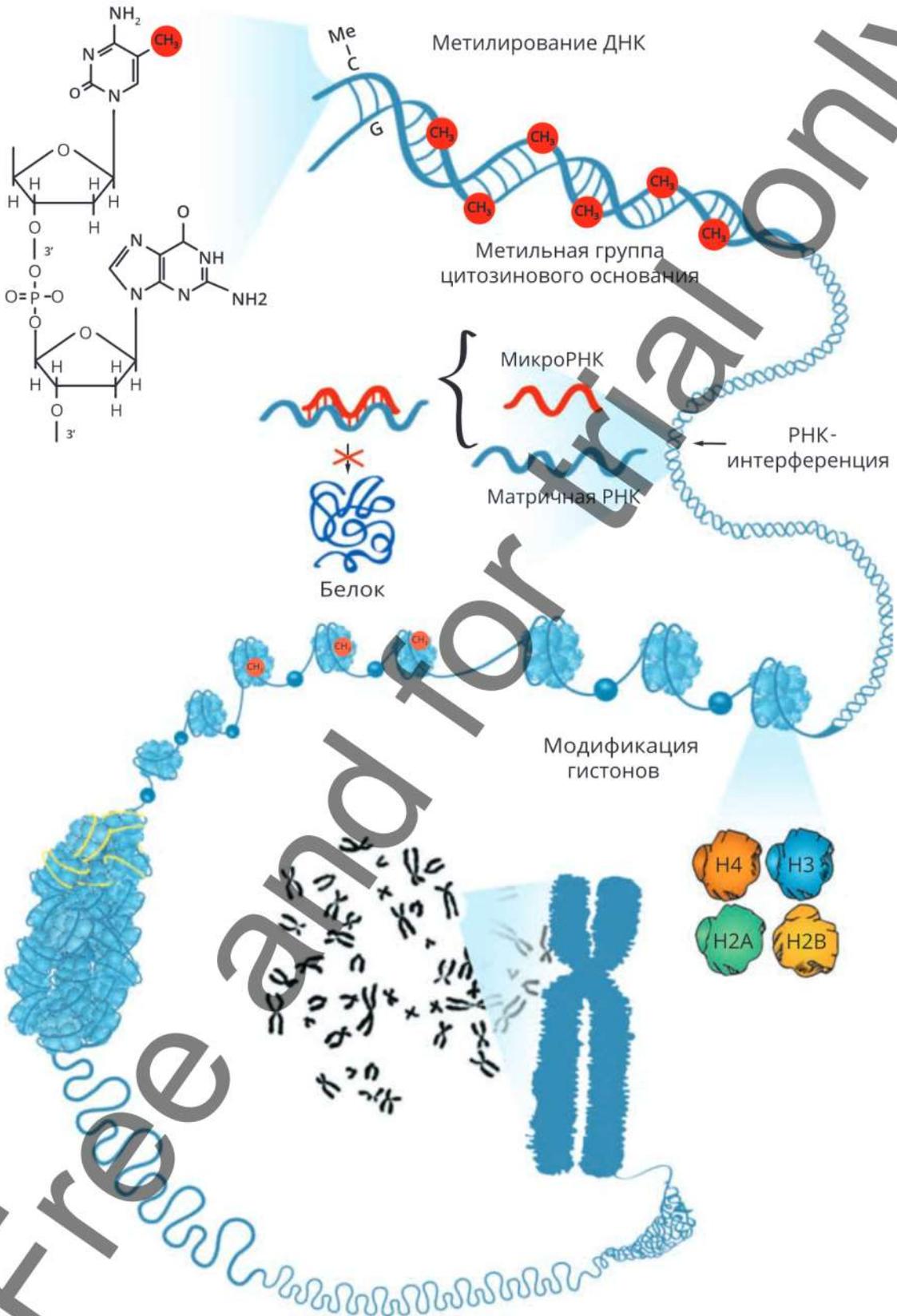


Рис. 3.36. Полногеномные эпигенетические модификации

Таблица 3.27. Уровни эпигенетической регуляции

Уровень	Молекула/вещество	Процесс
Геном	ДНК	<ul style="list-style-type: none"> • Метилирование. • Повторяющиеся последовательности. • Транспозиции генетического материала
Транскриптом	РНК	<ul style="list-style-type: none"> • Регуляторные мотивы пре-мРНК. • Антисмысловые РНК. • Нетранслирующиеся РНК. • Микро-РНК. • Двухцепочечные РНК
Протеом	Белки	<ul style="list-style-type: none"> • Метилирование/деметилирование лизина 4 и 9 гистона H3. • Ацетилирование/деацетилирование гистонов

Таблица 3.28. Примеры эпигенетических модификаций

Пример	Характеристика
Феномен клеточной памяти	В эмбриогенезе после дробления следует дифференцировка клеток. Дифференцировка клеток во взрослом организме. Их геномы сохраняются в неизменном состоянии, изменяется лишь характер экспрессии генов
Центромеры	У эукариот не существует консенсусной последовательности для центромерной ДНК. Центромерная ДНК представлена сателлитами. Важна не последовательность ДНК, а набор белков и модификации хроматина (наследуются эпигенетически)
Различия между близнецами	Фенотипические различия, проявляющиеся у близнецов с возрастом, связаны с эпигенетическими изменениями
Инактивация X-хромосомы	Наблюдается в геноме клеток женского организма (гомогаметный пол) случайно
Наследование состояния гена в течение нескольких поколений организмов	У многоклеточных метилирование ДНК в области промотора гена может передаваться следующему поколению
Старение	Одним из механизмов старения является накопление метилированных участков ДНК и белков, что приводит к инактивации или ослаблению экспрессии многих генов
Онкогенез	При канцерогенезе важную роль играют не только мутации, приводящие к экспрессии онкогенов и супрессии антионкогенов, но и перепрограммирование генома с помощью эпигенетических механизмов

3.13.1. Модификация ДНК

К основной модификации ДНК относится *метилирование ДНК*, которое не нарушает способности к комплементарному взаимодействию, но стабилизирует двойную спираль ДНК и распознается многочисленными белками.

Процесс метилирования ДНК заключается в присоединении метильной группы к цитозину в составе **СрG**-динуклеотида в позиции C^5 цитозинового кольца. За процесс метилирования ДНК отвечают три фермента — *ДНК-метилтрансфераза 1* (DNMT1), *ДНК-метилтрансфераза 3a* (DNMT3a), *ДНК-метилтрансфераза 3b* (DNMT3b). Эти ферменты расположены в клетке неравномерно, в основном в промоторной и спейсерной областях.

Показано, что цитозин метилируется значительно чаще, чем аденин. Этот процесс может происходить без участия ферментов, и тогда цитозин метилируется в мотиве (на участке) **СрG** (рис. 3.37).

Метилирование ДНК в основном присуще эукариотам. Около 60–70 % всех **СрG**-динуклеотидов у млекопитающих метилированы. У человека процент метилированной ДНК клеток зависит от типа ткани и других факторов [Klose R.J. et al., 2006].

Неметилированные **СрG**-динуклеотиды сгруппированы в **СрG**-островки. Эти островки присутствуют в 5' регуляторных областях многих генов. Например, при онкопатологии различных органов в опухолевых тканях наблюдается аномальное гипер- и гипометилирование **СрG**-островков в промоторных областях генов. Это приводит к устойчивой репрессии транскрипции. Репрессия транскрипции в этом случае опосредована белками, которые способны связываться с метилированными **СрG**-динуклеотидами.

У человека насчитывают около 45 000 **СрG**-островков. Практически один **СрG**-островок имеет 60 % генов. Во всех генах «домашнего хозяйства» присутствуют **СрG**-островки.

В большинстве случаев метилирование промоторных областей гена приводит к подавлению активности гена. Показано, что даже незначительные изменения в степени метилирования ДНК могут существенно влиять на уровень экспрессии генов.

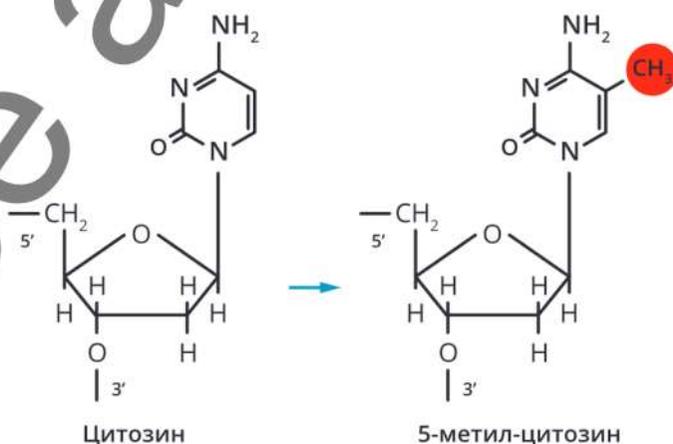


Рис. 3.37. Метилирование цитозина

3.13.2. Свойства CpG-островков

CpG-островки или *гиперметилированы*, или *гипометилированы*.

CpG-островки встречаются обычно в промоторных участках гена, во внутригенных (чаще гиперметилированы) и межгенных участках.

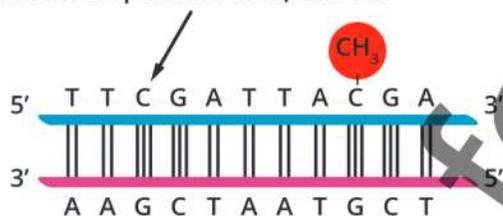
CpG в промоторах обычно неметилированы, что важно для прохождения синтеза РНК (метилирование промотора приводит к блоку транскрипции).

Статус метилирования стабилен и поддерживается в дальнейшем для закрепления определенного *паттерна (системы) экспрессии генов* (рис. 3.38).

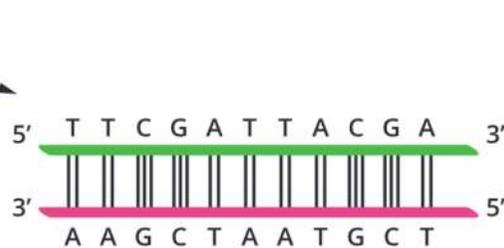
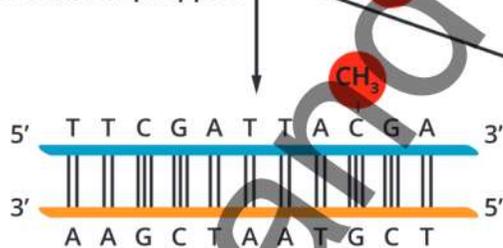
В клетках организма известны две системы метилирования с участием разных метилаз: метилирование *de novo* и поддерживающее метилирование (табл. 3.29).

Метилирование *de novo* способствует возникновению изменчивости в профиле метилирования, поддерживающее — является основой для уже сформированного профиля метилирования, которое активируется при каждом клеточном делении.

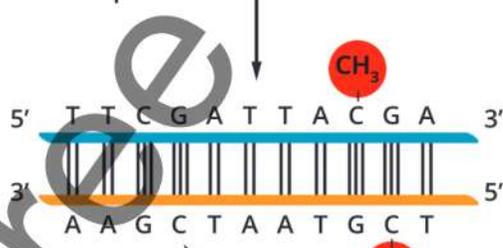
Неметилированный цитозин



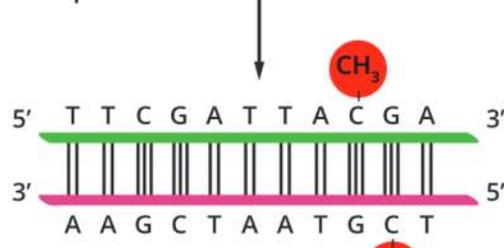
Репликация ДНК



Метилирование



Метилирование



Не распознается ДНК-метилтрансферазой

Рис. 3.38. Механизм наследования паттерна метилирования

Таблица 3.29. Участки ДНК, подвергшиеся метилированию

Гиперметилованный	Гипометилованный
<ul style="list-style-type: none"> • Сателлиты и другие повторяющиеся последовательности. • Транспозоны, провирусные копии. • Последовательности гетерохроматина. • Транскрипционно неактивные гены. • Гены «опухолевой инвазии» и другие онкогены. • Импринтированные гены 	Транскрипционно активные гены

Основными функциями участков метилированной ДНК являются:

- поддержание структуры хроматина и стабильности хромосом;
- формирование профиля экспрессии, характерного для данного типа клеток;
- тканеспецифичное ненаследуемое долговременное подавление экспрессии генов на уровне транскрипции;
- сайленсинг повторенных и интегрированных чужеродных последовательностей;
- защита от эффектов встраивания чужеродной ДНК.

3.13.3. Характеристика метилированной ДНК

Биологические функции метилированной ДНК:

- *геномный импринтинг* — это экспрессия (метилование ДНК в промоторах определенных генов); осуществляется в зависимости от того, от какого родителя поступили аллели;
- инактивация X-хромосомы;
- регуляция структуры хроматина;
- регуляция генной экспрессии;
- репликация ДНК;
- канцерогенез;
- клеточная дифференцировка;
- выключение трансгенов (silencing).

Роль метилирования ДНК в организме человека заключается:

- в совместной работе с другими системами над контролем экспрессии генов;
- регуляции экспрессии тканеспецифичных генов;
- клеточной дифференцировке;
- репликации ДНК;
- процессах репарации ДНК;
- защите генома от мобильных генетических элементов;
- поддержании конформации и целостности хромосом в районах с малой плотностью генов.

Изменчивость организма

Изменчивость организма — это возникновение индивидуальных фенотипических или фенотипических особенностей между особями одного вида (рис. 4.1).



Рис. 4.1. Классификация изменчивости

Фенотипическая (ненаследственная) изменчивость характеризуется изменением в пределах фенотипа без вторжения в генотип. Подразделяется на онтогенетическую и модификационную.

Генотипическая (наследственная) изменчивость характеризуется изменением генотипа/генома, при этом фенотип не всегда изменяется. Такая изменчивость подразделяется на: комбинативную, цитоплазматическую и мутационную [Zhang X.S., Hill W.G., 2005].

4.1. Онтогенетическая изменчивость

Онтогенетическая изменчивость — это фенотипические изменения признаков и свойств организма в процессе индивидуального развития, которые наследственно обусловлены [Yurov Y. B. et al., 2010]. Формирование фенотипа организма связано со «*стилем жизни*» (*life style*) человека, т. е. с особенностями взаимодействия генотипа со множеством внешних факторов.

Онтогенез (от греч. *οντο* — сущее и *γένεσις* — развитие) — индивидуальное развитие организма от образования зиготы до смерти организма.

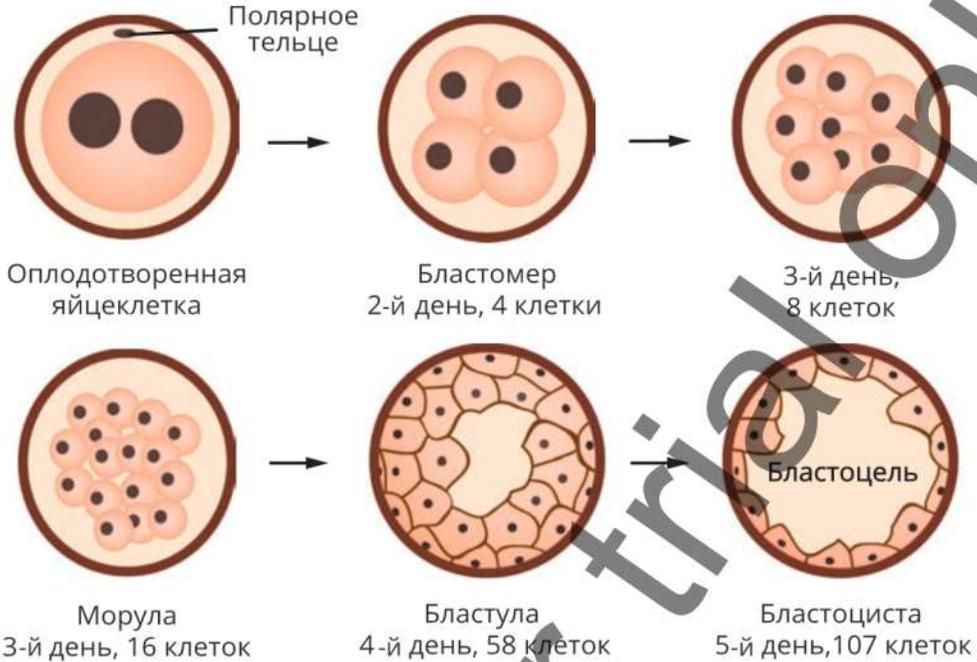
Выделяют три периода онтогенеза.

1. *Про́генез* (предзиготный период) — это период образования, созревания и формирования половых клеток родителей, которые пройдут стадию оплодотворения и сформируют зиготу.
2. *Эмбриональный*, или *пренатальный*, период (зародышевый) — развитие организма от зиготы до рождения (табл. 4.1 и рис. 4.2).
3. *Постэмбриональный*, или *постнатальный*, период (послезародышевый) — от рождения организма до смерти (см. табл. 4.2). Этот период включает в себя следующие этапы:
 - *дорепродуктивный* — до полового созревания;
 - *репродуктивный* — взрослое состояние, в котором организм выполняет свою главную биологическую задачу: воспроизведение особей нового поколения; в этом периоде начинаются жизненные циклы потомков;
 - *пострепродуктивный* — старение и смерть организма.

Таблица 4.1. Краткая характеристика периодов внутриутробного развития человека

Период	Время после оплодотворения, нед.	Стадия	Процесс
Герминтативный, или начальный	1-я	Дробление зиготы	Деление эмбриональных стволовых клеток с высокой скоростью. При этом в клеточном цикле отсутствует G1-период и роста клетки не происходит
Эмбриональный, или зачатковый	2–3-я	Бластулы. Гастролы. Нейрулы	Закладка трех зародышевых листков и далее — осевых органов
Предплодный	4–8-я	Эмбрион	Формирование зачатков всех систем органов и плаценты
Плодный	с 9-й	Плод	Рост плода и дальнейшее формирование у него органов и систем органов

А



Б

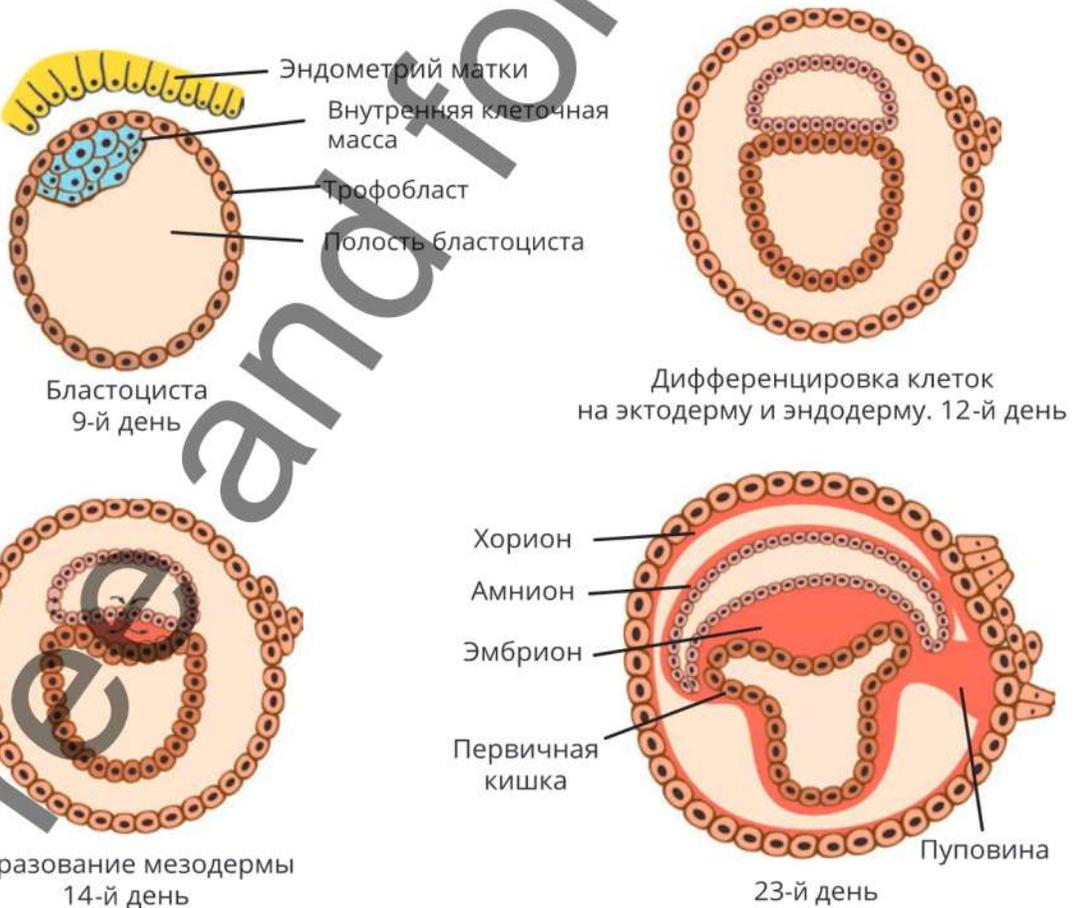


Рис. 4.2. Основные стадии эмбрионального развития человека

В



Причиной онтогенетической изменчивости является **регуляция активности различных генов в течение жизни**. Происходит *репрессия* и *дерепрессия* определенных генов, эпигенетическая регуляция их активности.

В *оогенезе* (*овогенезе*) в клетках синтезируется большое количество разных видов РНК. Их активация начинается сразу после оплодотворения и продолжается на всех этапах развития зародыша. Гены самого зародыша начинают функционировать у человека на стадии двух бластомеров, и затем продукты их деятельности регулируют развитие зародыша. На ранних этапах эмбрионального развития деление эмбриональных стволовых (*тотипотентных*) клеток регулируется как материнскими, так и зародышевыми генами. На стадии бластоцисты эмбриобласты (*плюрипотентные клетки*) уже способны дифференцироваться в любую клетку взрослого организма.

Начиная со стадии гастрюлы развитие организма регулируется только продуктами деятельности собственных генов зародыша.

Таблица 4.2. Возрастные этапы развития человека в постнатальном периоде

№ п/п	Период	Возраст	
1	Новорожденный	1–10 дней	
2	Грудной возраст	10 дней — 1 год	
3	Раннее детство	1–3 года	
4	Первое детство	4–7 лет	
5	Второе детство	мальчики девочки	8–12 лет 8–11 лет
6	Подростковый возраст	мальчики девочки	13–16 лет 12–15 лет
7	Юношеский возраст	юноши девушки	17–21 год 16–20 лет
8	Зрелый возраст		
	1-й период	мужчины женщины	22–35 лет 21–35 лет
	2-й период	мужчины женщины	36–60 лет 36–55 лет
9	Пожилой возраст	мужчины женщины	61–74 года 56–74 года
10	Старческий возраст	75–90 лет (мужчины и женщины)	
11	Долгожители	90 лет и старше	

Регуляция экспрессии генов в процессе развития организмов осуществляется на всех этапах синтеза белка как по типу индукции, так и по типу репрессии, причем контроль на уровне транскрипции определяет время функционирования и характер транскрипции данного гена.

Наиболее интенсивно регуляция экспрессии генов при онтогенетической изменчивости осуществляется во время эмбрионального развития (табл. 4.3). В регуляции активности генов решающую роль играют эпигенетические механизмы, такие как метилирование генома. В прогенезе в первичных половых клетках происходит деметилирование генома. В процессе оплодотворения и после геном родителей деметилируется с разной скоростью. Отцовский геном деметилируется активно, а материнский — пассивно. Далее в первые несколько дней эмбриогенеза на стадии дробления происходит активное метилирование генома (рис. 4.3). Этот процесс длится до имплантации бластоцисты в эндометрий матки. После чего устанавливается распределение метильных групп в геноме — паттерн метилирования. Паттерн метилирования поддерживается в ряду клеточных поколений, что способствует специфичности экспрессии генов в онтогенезе.

Таблица 4.3. Регуляция генов и свойства клеток в эмбриогенезе

Зигота	Начало репликации, транскрипции и трансляции	Дерепрессия
Стадия двух бластомеров	Начало синтеза всех типов РНК	Общие гены
Морула	Клетки тотипотентны, т. е. могут дифференцироваться	
Бластоциста	Утрата тотипотентности (клетки детерминированы к образованию зародышевых и внезародышевых структур)	
Гастроула	Наличие зародышевых листков и стволовых клеток	Тканеспецифические гены
Органогенез	Формирование органов и тканей	

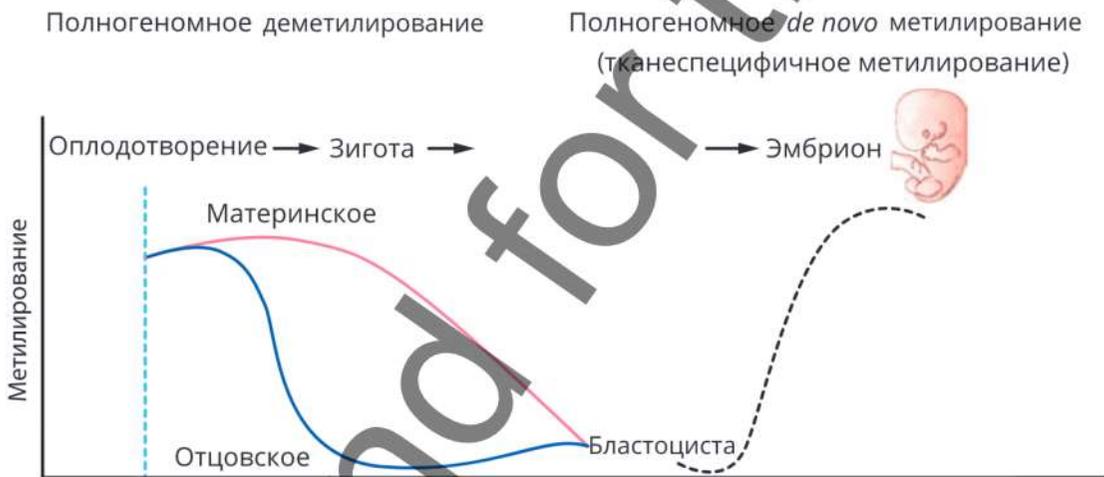


Рис. 4.3. Метилирование и деметилирование генов в раннем эмбриогенезе

4.2. Модификационная изменчивость

Модификационная изменчивость — это способность организма меняться фенотипически без изменения генотипа. Степень выраженности признаков (чаще всего количественных) может быть разной в зависимости от условий окружающей среды. При одних условиях степень выраженности признака может быть усилена, при других — ослаблена. Например: изменение числа эритроцитов при изменении парциального давления кислорода, цвета кожи в зависимости от инсоляции, объема и жирности молока у женщин во время лактации, изменение мышечной массы у спортсменов.

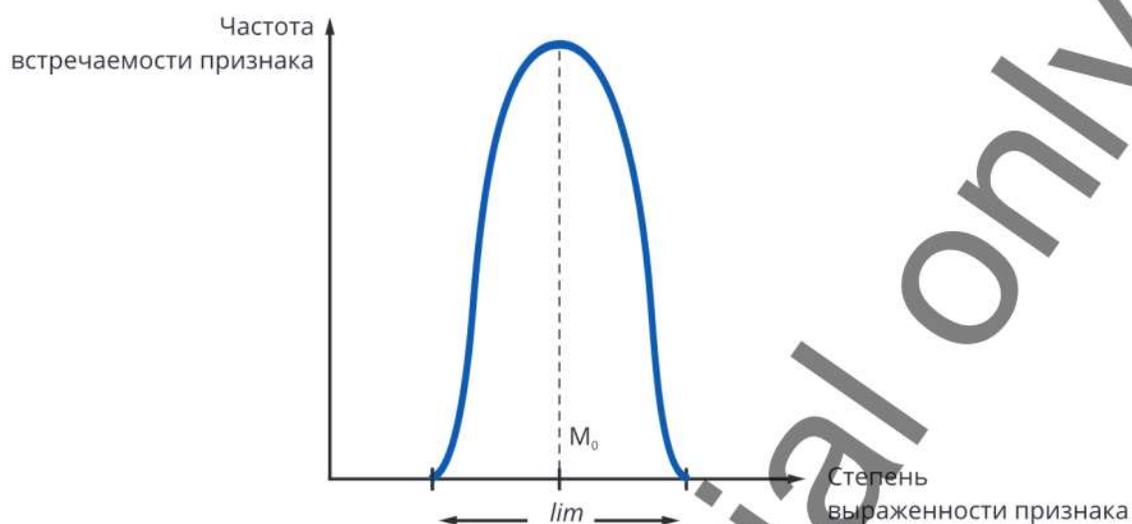


Рис. 4.4. Пределы (*lim*) нормы реакции

M_0 — наиболее часто встречающееся значение признака; *lim* — пределы нормы реакции.

Пределы варьирования признака, ограниченные действием генотипа, называют *нормой реакции* (рис. 4.4). Норма реакции может быть широкой (рост человека) и узкой (размеры сердца, мозга и других органов).

Модификационная изменчивость является адаптацией организма к условиям окружающей среды.

Характерные особенности модификаций:

- обратимость: изменения исчезают при смене специфических условий окружающей среды, спровоцировавших их групповой характер;
- изменения в фенотипе не наследуются.

Фенокопией называют изменение признака под влиянием внешних факторов в процессе его развития, зависящего от определенного генотипа.

4.3. Комбинативная изменчивость

Комбинативная изменчивость — это особенность каждого организма/генотипа, которая определяется новыми сочетаниями аллелей генов в генотипе. Например, рождение фенотипически непохожих детей у одних родителей.

Причинами комбинативной изменчивости (рис. 4.5) являются:

- независимое расхождение хромосом во время мейоза;
- случайная встреча половых гамет, а вследствие этого и сочетания хромосом во время оплодотворения;
- рекомбинация генов вследствие конъюгации и *кроссинговера* (см. гл. 6, п. 6.4).

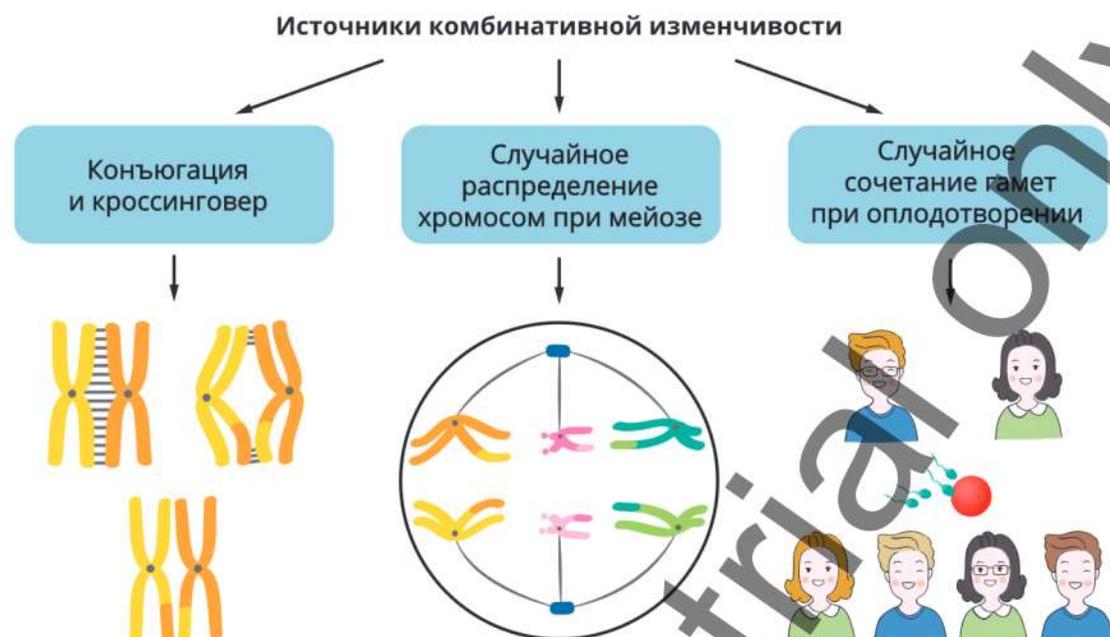


Рис. 4.5. Причины комбинативной изменчивости

4.4. Цитоплазматическая изменчивость

Цитоплазматическая изменчивость обеспечивается генами, расположенными в митохондриальной ДНК. При этом генетический контроль за ними осуществляется генами, расположенными на хромосомной ДНК. В основе этой изменчивости лежат мутации в генах митохондриальной ДНК. Они наследуются только по материнской линии, т. к. при оплодотворении в зиготе остается вся цитоплазма женской гаметы.

4.5. Мутационная изменчивость

Причиной мутационной изменчивости является мутация (мутации). **Мутация** — это стойкое качественное внезапное изменение в генотипе/геноме организма [Kimura M., 2007].

Обычно мутации возникают вследствие воздействия на геном **мутагенных факторов**, стресса, повышенного шума и др. Их воздействие на живые организмы приводит к появлению мутаций с частотой, превышающей *спонтанный уровень* мутаций (см. табл. 4.4).

Таблица 4.4. Классификации мутаций

Критерий классификации	Тип
Уровень изменения наследственного материала	Генные, хромосомные, геномные
Проявление в фенотипе	Морфологические, биохимические, физиологические
Происхождение	Спонтанные, индуцированные мутагенами
Влияние на жизнеспособность организма	Летальные, полuletальные, условно летальные
Тип клеток	Соматические и генеративные
Локализация в клетке	Ядерные, цитоплазматические

Мутации обладают следующими свойствами:

- возникают внезапно, скачкообразно;
- передаются из поколения в поколение вследствие или митоза, или мейоза;
- они ненаправленные, т. е. под действием одного фактора может мутировать любой участок хромосомы;
- одни и те же мутации могут возникать повторно.

В следующей главе более подробно будут рассмотрены понятия *мутагенного фактора*, *мутации* и др., а также их взаимосвязь с возникновением заболевания [Houle D. et al., 1996; Zhang X.S., Hill W.G., 2005, Kimura M., 2007].

Мутагены. Репарация ДНК. Мутации

5.1. Мутагены среды

Факторы, способные вызывать мутации, называются *мутагенными*. Их воздействие на живые организмы приводит к появлению мутаций с частотой, превышающей уровень спонтанных мутаций.

К мутагенным факторам относят: *физические, химические и биологические мутагены* [Абилев С. К. и др., 2015].

5.1.1. Физические мутагены

Здесь рассматриваются некоторые основные типы физических мутагенов, после воздействия которых на основную мишень — ДНК клетки — образуются различные типы мутаций [UNSCEAR, 1986].

Ионизирующее излучение — любое излучение, взаимодействие которого со средой приводит к образованию электрических зарядов разных знаков (см. [рис. 5.1](#)). Разные виды излучения имеют различную проникающую способность, зависящую от носителя и энергии излучения.

Альфа-излучение (α -излучение) — это поток относительно тяжелых частиц (ядер гелия (He), состоящих из двух протонов и двух нейтронов), испускаемых при ядерных превращениях. Имеет малую длину пробега частиц и характеризуется слабой проникающей способностью — задерживается даже листком бумаги. Оно практически не способно проникнуть через наружный слой кожи, образованный отмершими клетками, и поэтому не опасно до тех пор, пока радиоактивные вещества, испускающие α -частицы, не попадут внутрь организма через органы дыхания, пищеварения или открытые раны и ожоговые поверхности. Каждая α -частица способна ионизировать до 100 000 молекул внутри организма.



Рис. 5.1. Типы ионизирующего излучения

Бета-излучение (β-излучение) — поток β-частиц (электронов и позитронов), обладающих большей проникающей способностью в сравнении с α-излучением. Пробег β-частиц в воздухе может достигать нескольких метров, а в биологической ткани — нескольких сантиметров. Однако β-активные радионуклиды легко задерживаются тонким листом металла. Наиболее опасны они при попадании внутрь организма.

Гамма-излучение (γ-излучение) имеет внутриядерное происхождение и представляет собой довольно жесткое электромагнитное излучение. Распространяясь со скоростью света, γ-лучи имеют высокую проникающую способность. Их может задержать лишь толстая свинцовая или бетонная плита. Чем выше энергия γ-излучения и соответственно меньше длина его волны, тем выше проникающая способность.

Рентгеновское излучение (X-лучи) имеет атомное происхождение, оно образуется в возбужденных атомах при переходе электронов с удаленных орбит на более близкую к ядру орбиту или возникает при торможении заряженных частиц в веществе.

Несмотря на различное происхождение, рентгеновское и γ-излучение имеют одинаковую природу, и поэтому их называют *фотонным излучением*. Под действием фотонного излучения происходит *облучение всего организма*. Оно является основным поражающим фактором при воздействии на организм излучения от внешних источников. Далее кратко представлена характеристика некоторых видов излучения (табл. 5.1).

Ультрафиолетовые лучи поглощаются входящими в состав ДНК пуринами и пиримидинами, переводя их в возбужденное состояние. Они индуцируют в ДНК повреждения, которые могут репарироваться [Rastogi R. P. et al., 2010].

Таблица 5.1. Группа нуклидов по видам излучения, представляющих опасность при аварийных выбросах на атомных электростанциях

Излучение	Радиоактивные изотопы
α	U^{235} , U^{236} , U^{238} , Pu^{239} , Pu^{241} , Ra^{223} , Ra^{226} , Th^{232} , Np^{237}
β	Sr^{89} , Sr^{90} , Y^{91} , Sr^{95} , Pr^{117}
γ	Co^{57} , Co^{60} , Zn^{63} , Zr^{95} , Nb^{95} , Ru^{103} , Ru^{106} , Sb^{125} , I^{131} , Cs^{134} , Cs^{137} , Ce^{141} , Ce^{144}

Примечание: например, период полураспада изотопов: I^{131} — до года, Cs^{137} — 30 лет, Sr^{90} — 90 лет.

К физическим мутагенам относится также температурный фактор. Так, оптимальным температурным условием для протекания митоза является диапазон температур 28–30 °С. Температуры выше 41 °С приводят к нарушению клеточного цикла.

5.1.2. Химические мутагены

Химические мутагены — это вещества химической природы, способные индуцировать мутации. Установлено, что мутагенной активностью обладает несколько тысяч химических соединений [Oliveira P.A. et al., 2007; Nersesyan A. et al., 2016]. Человек и другие живые организмы сталкиваются со множеством химических веществ, используемых в значительных объемах в промышленности, сельском хозяйстве, медицине и быту. Существуют также природные химические мутагены.

В клетке основной мишенью действия мутагенов являются ДНК и некоторые белки. Некоторые мутагены вызывают мутации, не связываясь ковалентно с ДНК. В этом случае матричный синтез на ДНК протекает с ошибками. В синтезируемой нити ДНК оказывается на один нуклеотид больше или меньше обычного, и возникают мутации. Существуют мутагены, ингибирующие синтез предшественников ДНК. В результате происходит замедление или даже остановка синтеза ДНК.

Химические мутагены делят:

- на *мутагены прямого действия* (соединения, реакционная способность которых достаточна для химической модификации ДНК, РНК и некоторых белков);
- *мутагены непрямого действия* (промутагены — вещества, которые сами по себе инертны, но превращаются в организме в мутагены в основном в результате ферментативного окисления).

Химические соединения делят на несколько групп (см. табл. 5.2).

Аналоги оснований по молекулярной структуре похожи на основания ДНК. Они приводят к мутациям: находясь в разных альтернативных состояниях, могут спариваться с нормальными основаниями.

Таблица 3.2. Характеристика групп химических соединений

Вещества	Пример	Действие	Результат
Аналоги оснований	5-бромурацил	В нормальном состоянии спаривается с аденином, а в редком, таутомерном, — с гуанином. В связи с этим возникает <i>транзиция</i> , когда 5-бромурацил включается в ДНК в нормальном состоянии, а при репликации ДНК превращается в таутомерную форму	Возникает транзиция
Вещества, модифицирующие основания	Азотистая кислота (HNO ₂)	Осуществляет окислительное дезаминирование, т. е. удаляет аминогруппы (-NH ₂) из таких оснований, как гуанин, цитозин, аденин. Гуанин → ксантин, но, т. к. это пуриновое основание, мутация не проявляется. После модификации цитозина получается урацил, в итоге происходит транзиция от С-Г к Т-А в ходе репликации. Также азотистая кислота модифицирует аденин в гипоксантин — основание, спаривающееся с цитозином, а не с тиминном	Транзиция А-Т в Г-С
	Гидроксиламин (NH ₂ OH)	Специфично реагирует с цитозином, добавляя гидроксильную группу (-OH), в результате чего он спаривается уже с аденином, а не с гуанином	Транзиция С-Г в Т-А
	Метилтансульфонат (MMS)	Алкилирует гуанин, т. е. добавляет группы -СН ₂ или -СН ₂ СН ₃ к кислороду в 6-й позиции, в результате образуется O ₆ -алкилгуанин или O ₆ -метилгуанин, которые будут спариваться с тиминном, а не с цитозинном	Транзиция Г-С в А-Т
Интеркалирующие агенты	<ul style="list-style-type: none"> • Акридин. • Профлавин. • Этидиумбромид 	Если интеркалирующий агент встраивается между основаниями в матричной цепи ДНК, дополнительное основание включается во вновь синтезируемую цепь	Мутация сдвига рамки считывания

Агенты, модифицирующие основания, — это химические соединения, изменяющие структуру и свойства оснований. К ним относятся дезаминирующие, алкилирующие, гидроксимирующие соединения.

Интеркалирующие агенты встраивают основания в одной или обеих цепях ДНК.

Вещества, применяемые в промышленности

В связи с нехваткой природных материалов их постепенно стали заменять синтетическими, получаемыми на химическом производстве (табл. 5.3).

Таблица 5.3. Примеры мутагенов, применяемых в промышленности

Вещества (формула)	Производство/содержание
Мономер винилхлорида $\text{CH}_2=\text{CHCl}$	Синтетические смолы
Эпихлоргидрин $\text{C}_3\text{H}_5\text{ClO}$	<ul style="list-style-type: none"> • Эпоксидные смолы. • Лекарства
Стирол C_8H_8 (фенилэтилен, винилбензол, этенилбензол)	<ul style="list-style-type: none"> • Полиэфирные пластмассы. • Полихлорпреновые эластомеры
Тяжелые и другие металлы (соединения свинца, цинка, ртути, хрома)	<ul style="list-style-type: none"> • Воздух промышленных городов. • Пищевые продукты (достигают в них критического уровня)

Группой риска являются лица, работающие на химических предприятиях и активно контактирующие с этими веществами. У них наблюдаются повышенные уровни aberrаций хромосом по сравнению с лицами, не находящимися на этих предприятиях.

Вещества, применяемые в сельском хозяйстве

На сегодняшний день многолетнее использование в сельском хозяйстве химических веществ привело к повышению урожайности. Однако наряду с этим произошло загрязнение окружающей среды. В основном это *пестициды* и *другие химические соединения*, число которых доходит до 400 типов. Приблизительно 65 % этих веществ имеют мутагенную активность.

Современные пестициды относятся к разным классам химических соединений и обладают различным характером действия (см. табл. 5.4). Представители одного и того же класса характеризуются, как правило, общими специфическими свойствами и одним механизмом действия на организм.

В государственном каталоге пестицидов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации, перечислены следующие **гербициды**: десиканты, инсектициды и акарициды сельскохозяйственные, моллюскоциды, нематодциды, репелленты, родентициды сельскохозяйственные, феромоны, фумиганты, фунгициды.

Таблица 5.4. Примеры пестицидов, приводящих к цитогенетическим нарушениям

Название пестицида		Синонимы	Эмпирическая формула
Русское	Английское		
Тирам (ТМТД)	Thiram	Бис(диметилтиокарбомойл)-дисульфид, тетратион А, ферназон, кунитекс, номерзан, тиурам Д, аатирам, помазод, аапикол, рипомол, тиносан, тулизан, тирадин, тигам Ц, тьюадс, арозон, терзан, туадс, тутан	$C_6H_{12}N_2S_4$
Цирам	Ciram	Диметил-бис, дитиокарбамат цинка, азира, корозат, метаза, померсол, фулказин-ультра, цимат, церлат и др.	$C_6H_{12}N_2S_4Zn$
Цинеб	Cineb	Аспор, кипцин, лонакол, парцат	$C_4H_6N_2S_4Zn$
Беномил	Benomyl	Фундазол [N-[1-(бутилкарбомойл)-бензоимидазолил-2]-O-метилкарбомат]	$C_{14}H_{18}N_4O_3$
Полихлорпрен	Polichlorprenas	Хлоропреновый каучук	$(-CH_2CCl=CH-CH_2)_n$
Полихлоркамфен	Polychlorocamphene	Токсафен, полихлоркамфан, октахлоркамфен, муртокс, мелипакс, фенантокс, аллотокс, хлорфен, меликапс	$C_{10}H_{10}Cl_8$
Которан	Cotoran	Фторметурон, флуометурон	$C_{10}H_{11}F_3N_2O$

Лекарственные препараты

Некоторые лекарственные препараты обладают мутагенным действием и индуцируют различные типы мутаций в клетках модельных животных и человека *in vitro* и *in vivo*. Например, *цитостатики* и *антиметаболиты* используют для лечения онкологических заболеваний и в качестве иммунодепрессантов. К ним можно причислить препараты алкилирующего действия, такие как тиофосфамид, циклофосфан, тренимон, милерон, сарколизин, дипин и др.

К другой группе можно отнести препараты *противосудорожные* (барбитураты), *психотропные* (клозепин), *гормональные* (эстрадиол, прогестерон, оральные контрацептивы), *смеси для наркоза* (хлоридин, хлорпропанамид). Эти средства индуцируют

хромосомные aberrации (в 2–3 раза выше спонтанного уровня) у людей, регулярно принимающих данные препараты или контактирующих с ними.

Мутагенной активностью обладает и ряд *противоопухолевых антибиотиков* (актиномицин Д, адриамицин, блеомицин и др.).

Табачный дым

Табачный дым содержит генотоксичные соединения, способные индуцировать мутации в соматических клетках (т. е. является канцерогеном), что может привести к развитию опухолей. Показано, что в 70–95 % случаев причина возникновения рака легкого связана с курением. Относительный риск развития рака легкого зависит от количества выкуриваемых сигарет, однако продолжительность курения является более существенным фактором, чем число ежедневно выкуриваемых сигарет. Под воздействием табачного дыма в половых клетках проявляется генотоксический эффект, что может быть причиной наследуемых дефектов.

Изучение активности конденсатов табачного дыма показало, что он вызывал *сестринские хроматидные обмены* (СХО) в лимфоцитах человека *in vitro*. Сигаретный дым и его конденсаты индуцировали рецессивные, сцепленные с полом, летальные мутации у дрозофилы. Большинство исследователей связывают мутагенную активность табачного дыма с содержанием в нем высокомутагенных продуктов пиролиза белков и аминокислот, а также нитрированных ароматических углеводов. Кроме того, табачный дым содержит специфичные *нитрозамины*, представляющие собой нитрозированные производные алкалоидов табака. Нитрозированными производными никотина являются 4-(метилнитроамино)-1-(3-пиридил)-1-бутанон и N'-нитрозонорникотин, получившие в литературе условное обозначение NNK и NNN соответственно. Кроме того, в небольшом количестве обнаружен 4-(метилнитрозоамино)-1-(3-пиридил) бутанон (NNA). NNA также образуется из норникотина.

Природные мутагены

В эту группу входят метаболиты растений и микроорганизмов — алкалоиды, микотоксины, антибиотики, флавоноиды.

5.1.3. Биологические мутагены

Механизмы образования мутаций при действии различных биологических факторов недостаточно изучены. Известно, что мутагены, содержащие нуклеиновые кислоты, могут вызывать нарушение процессов рекомбинации, что приводит к возникновению мутаций (в основном генных, реже — хромосомных).

В **табл. 5.5** представлены примеры различных типов биологических мутагенов.

Таблица 5.5. Биологические мутагены

Тип мутагена	Пример
ДНК-содержащие вирусы	Вирус простого герпеса I–VIII типов, папиллома-вирусы, аденовирусы
РНК-содержащие вирусы	Вирусы бешенства, полиомиелита, клещевого энцефалита, иммунодефицита человека, гриппа, кори
Некоторые белки	О-стрептолизин
Ряд ферментов	Рестриктазы «разрезают» цепи ДНК в месте (локусе) определенной последовательности нуклеотидов, специфичном для каждой рестриктазы
Продукты обмена веществ	Продукты окисления липидов
Транспозоны — специфические последовательности ДНК — один из классов мобильных генетических элементов	Встраиваются в геном, могут вызывать генные и хромосомные мутации

5.2. Повреждения ДНК

Ежедневно у человека возникает около 50 тыс. одонитевых разрывов, более 8 тыс. окисленных и алкилированных оснований и еще в совокупности около 100 сложных повреждений (двунитевые разрывы, межмолекулярные ковалентные сшивки ДНК–ДНК и ДНК–белок) [Chatterjee N., Walker G. C., 2017; Liu B. et al., 2016]. Различные повреждения ДНК сводят к четырем типам (табл. 5.6).

Таблица 5.6. Классификация повреждений ДНК

Тип повреждения	Характеристика
Нерепарируемые	Возникают редко
Репарируемые	Удаляются собственными системами клеток
Спонтанные	Возникают без каких-либо направленных воздействий
Индукцированные	Возникают после действия физических, химических или биологических мутагенов — экзогенных и эндогенных

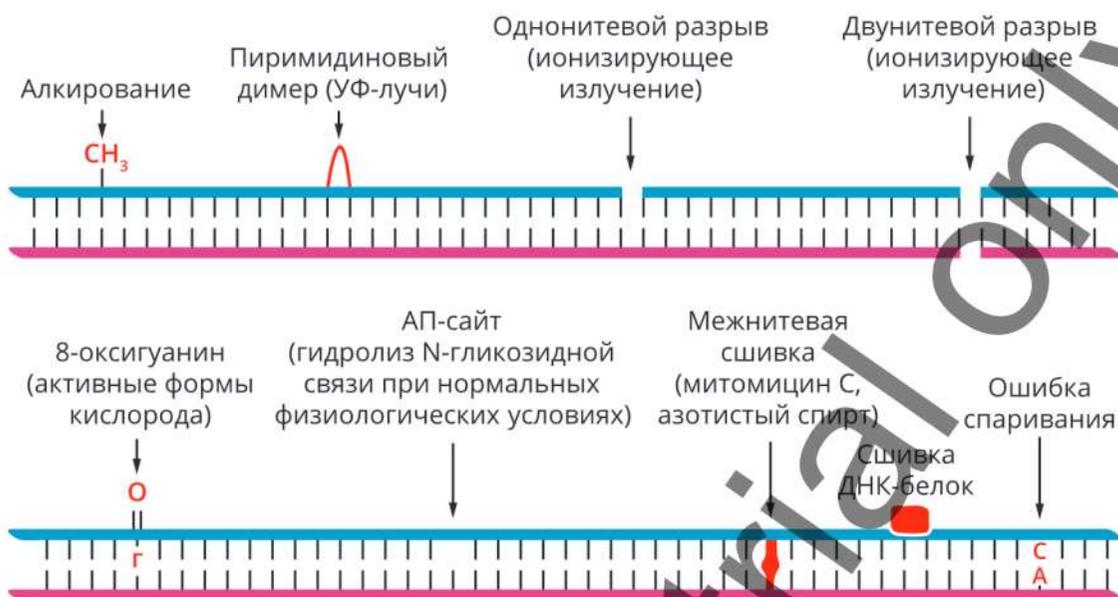


Рис. 5.2. Виды повреждения ДНК

УФ — ультрафиолетовый; АП — апурин-апиримидиновый.

При повреждениях ДНК возникают молекулярные изменения (рис. 5.2):

- 1) структуры азотистых оснований: алкилирование (чаще всего метилирование с образованием 7-метилгуанина, 1-метиладенина, O-6-метилгуанина, а также алкилированные производные тимина, аденина и цитозина);
- 2) окисление азотистых оснований (образуется 8-окси-7,8-метилгуанин);
- 3) гидролиз (дезаминирование, депуринизация, депиримидинизация);
- 4) димеризация пиримидинов (чаще всего тиминов, реже цитозинов);
- 5) разрыв цепей (одиночные и двойные разрывы);
- 6) образование аддуктов (бензо(а)пирен диол эпоксид);
- 7) межнитевые сшивки;
- 8) сшивки ДНК–белок.

5.3. Репарация ДНК

ДНК является единственной молекулой, которая способна к восстановлению — *репарации*, т. е. к исправлению спонтанных или индуцированных повреждений в ДНК за счет ряда сложных процессов [Redwood A. B. et al., 2011]. Благодаря системе репарации из 1000 повреждений ДНК различного типа лишь одно приводит к мутации. Все остальные устраняются с помощью эффективной репарации ДНК.

Известно более 150 генов, участвующих в различных этапах восстановления поврежденной ДНК. Возникновению целого ряда заболеваний, особенно онкопатологий

и наследственных заболеваний, способствует наличие мутаций или эпигенетических нарушений в этих генах.

Биологическим смыслом репарации является устранение повреждения в молекулах ДНК, которое предотвращает образование наследственно закрепленных нарушений генетического материала — мутаций.

Молекула ДНК характеризуется:

- наличием большого числа репарационных систем;
- присутствием в клетках белков, осуществляющих поиск повреждений в ДНК;
- способностью большинства репарационных систем удалять не только сами поврежденные нуклеотиды, но и рядом находящиеся участки, т. е. удалять целые области;
- нахождением в двойной спирали ДНК-неповрежденной цепи, которая служит матрицей для восстановления целостной молекулы ДНК.

Классифицировать системы репарации можно по разным признакам. Один из них — это классификация процессов репарации в разные периоды клеточного цикла. Системы репарации могут функционировать:

- до репликации ДНК (фаза G1);
- в процессе репликации ДНК (фаза S);
- после репликации ДНК (фаза G2).

Некоторые типы репарации ДНК встречаются только у эукариот или только у прокариот, а отдельные типы репарации наблюдаются и у тех, и у других (табл. 5.7).

Таблица 5.7. Виды репарации ДНК в клетках прокариот и эукариот

Прокариоты	Эукариоты
Фотореактивация	—
SOS-репарация	—
—	Репарация ошибочно спаренных нуклеотидов
—	Репарация одно- и двунитевых разрывов
Экцизионная репарация	Пострепликативная репарация
	Репарация, склонная к ошибкам

У эукариот механизмы репарации более сложные. В табл. 5.8 представлены типы повреждений ДНК, вызванных воздействием различных физических и химических мутагенов, и пути их репарации.

Существует два основных механизма восстановления повреждений ДНК — прямая и непрямая репарация. К прямой (дорепликативной) репарации относят фотореактивацию, дезалкилирование модифицированных оснований, сшивание одонитевых разрывов, прямую вставку оснований в апурин-апиримидиновый (АП) сайт. К непрямой репарации относят: эксцизионную репарацию оснований, эксцизионную репарацию нуклеотидов, репарацию ошибочно спаренных оснований (*mismatch repair*, MMR), репарацию двунитевых разрывов, SOS-репарацию.

Более подробно эти процессы описываются ниже.

Таблица 5.8. Повреждения ДНК и пути репарации у высших эукариот

Репарация	Повреждающий фактор	Типы повреждений
Эксцизионная репарация нуклеотидов (<i>nucleotide excision repair, NER</i>)	<ul style="list-style-type: none"> Полициклические ароматические гидрокарбонаты. УФ-свет 	<ul style="list-style-type: none"> 6–4 фотопродукты. Циклобутановые пиримидиновые димеры
Эксцизионная репарация оснований (<i>base excision repair, BER</i>)	<ul style="list-style-type: none"> X-лучи. Радикалы кислорода. Алкилирующие агенты 	<ul style="list-style-type: none"> Дезаминирование и алкилирование оснований. Одностранные разрывы.
Гомологичная рекомбинация	<ul style="list-style-type: none"> Ионизирующая радиация. Гидроксимочевина. УФ-лучи 	<ul style="list-style-type: none"> Двустранные разрывы ДНК
Негомологичная рекомбинация	<ul style="list-style-type: none"> X-лучи. Противоопухолевые препараты 	
Репарация ошибочно спаренных оснований (<i>mismatch repair</i>)	Ошибки репликации и рекомбинации	<ul style="list-style-type: none"> Ошибочно спаренные основания, инсерции, делеции

5.3.1. Прямая ДНК-репарация

Это процесс прямого восстановления исходной структуры или удаление повреждений.

Фотореактивация

Наиболее известный вид прямой репарации — фотореактивация пиримидиновых димеров (см. рис. 5.3). Она необходима в первую очередь для репарации УФ-индуцированных повреждений, среди которых преимущественно образуются пиримидин-6–4-пиримидиновые фотопродукты и циклобутановые пиримидиновые димеры. Все УФ-индуцированные повреждения вызывают нарушения структуры двойной спирали, которые и служат маркером наличия повреждений. На свободной от нуклеосом ДНК или в линкерных районах репарация идет существенно быстрее.

В 1949 г. было обнаружено, что бактерии становятся более жизнеспособными после облучения УФ-светом в летальных дозах, если затем подвергаются действию видимого света [Kelner A., 1949].

Фотореактивация

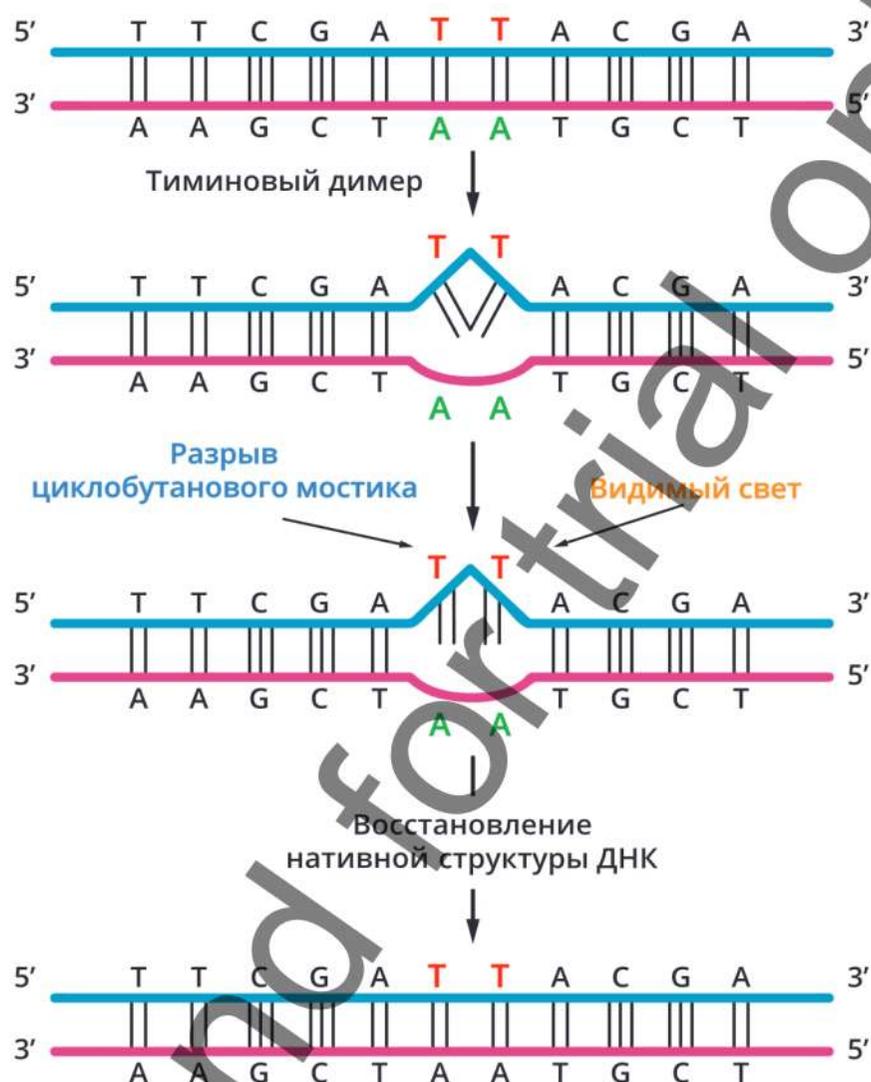


Рис. 5.3. Процесс фотореактивации ДНК

Основной эффект фотореактивации связан с действием фермента *дезоксирибозидпиримидинфототлазы*. Фермент представляет собой небольшой полипептид, ассоциированный с молекулой РНК (10–15 нуклеотидов). За 1 минуту он может расщепить 2,4 пиримидиновых димера. У *E. coli* система фотореактивации удаляет до 90 % пиримидиновых димеров. Каждый из них вызывает задержку репликации примерно на 10 секунд. Действие фермента зависит от воздействия видимого света с большой длиной волны. Наибольшая эффективность процесса характерна для длин волн от 365 до 490 нм.

Локализация УФ-индуцированных повреждений опосредована структурой хроматина. Эффективная фоторепарация требует ремоделирования хроматина.

Дезалкилирование модифицированных оснований

В клетках синтезируются белки метилтрансферазы, которые могут захватывать метильные группы от модифицированного основания и благодаря этому восстанавливать исходную структуру ДНК.

Сшивание одонитевых разрывов

Для восстановления структуры ДНК при одонитевых разрывах может оказаться достаточно работы одного фермента — ДНК-лигазы (от англ. *ligate* — соединять, перевязывать). Она катализирует ковалентное сшивание цепей ДНК в дуплексе при репликации, репарации и рекомбинации, образует фосфодиэфирные мостики между 5'-фосфорильной и 3'-гидроксильной группами соседних дезоксинуклеотидов в местах разрыва ДНК или между двумя молекулами ДНК. Реакция протекает с затратой энергии АТФ. Для образования этих мостиков лигаза использует энергию гидролиза макроэргической связи АТФ.

У высших организмов встречается несколько типов ДНК-лигазы. В этом типе репарации принимает участие ДНК-лигаза I.

Прямая вставка оснований в апуриновые сайты

Ежедневно в клетке человека от 2 до 3 тыс. пиримидиновых и пуриновых нуклеотидов (на гаплоидный геном) теряют свои азотистые основания. В результате образуются АП-сайты (апуриновые и апириимидиновые). АП-сайт — это брешь, которая создается в том месте, где была прервана ковалентная связь между основанием и сахаром. Фермент *инсертаза* может вставлять в брешь такое же основание, какое было до повреждения, и восстанавливать связь с дезоксирибозой (рис. 5.4).

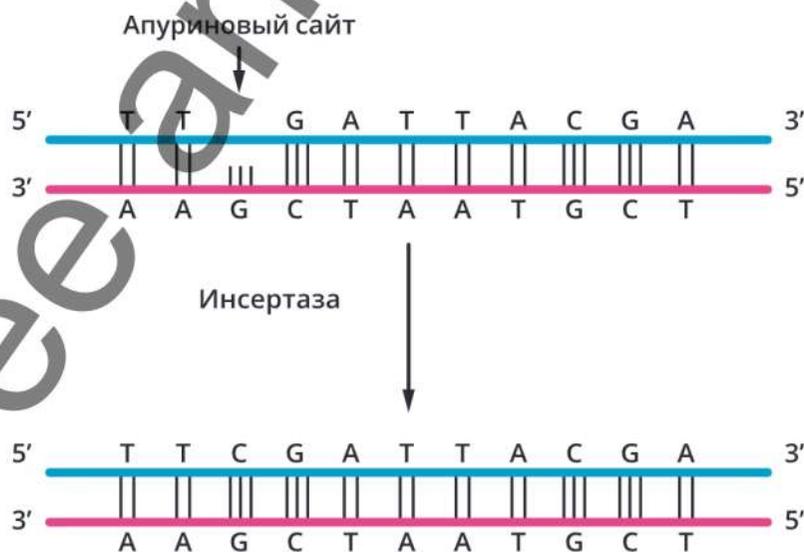


Рис. 5.4. Схема прямой вставки оснований в апуриновый сайт

5.3.2. Непрямая репарация

Экцизионная репарация нуклеотидов

Экцизия в переводе с английского языка — это вырезание, иссечение. Экцизионная репарация нуклеотидов (*nucleotide excision repair, NER*) происходит путем репарации фотопроизводных. Она исправляет пиримидиновые димеры, различные аддукты и межнитевые сшивки (рис. 5.5), т. е. система NER способна удалить из ДНК почти все возможные повреждения. Как и при фоторепарации, происходит изменение структуры хроматина в этом районе. При этом способе репарации крупный мультиферментный комплекс проверяет ДНК на наличие нарушений в двойной спирали.

Репарация с вырезанием нуклеотидов

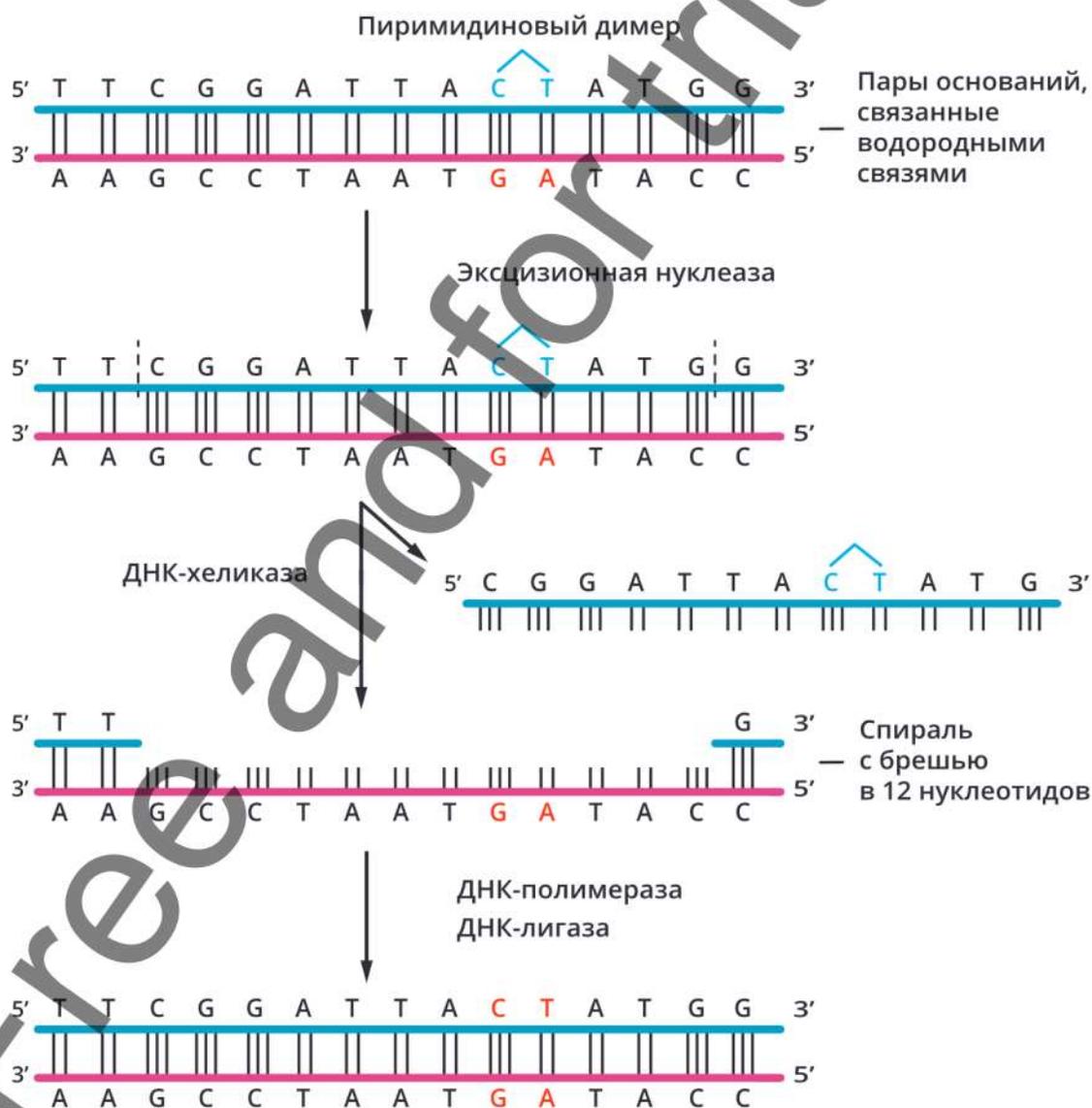


Рис. 5.5. Схема эксцизионной репарации нуклеотидов

Так, например, через несколько минут после облучения наблюдается гиперацетилирование гистона H3 *гистонацетилазой* GCN5, а также повышение общего уровня ацетилирования гистонов H3 и H4.

Мультиферментный комплекс распознает повреждение типа пиримидинового димера. Как только повреждение найдено, расщепляется фосфодиэфирная связь в сахаро-фосфатном остове по обе стороны от нарушения, и ДНК-геликаза удаляет однонитевой олигонуклеотид или часть поврежденной цепи. В результате остается брешь из 30 нуклеотидов (у человека). ДНК-полимераза заделывает брешь, и лигаза восстанавливает все связи. Эукариоты содержат по меньшей мере 15 видов ДНК-полимераз, которые различаются по числу субъединиц, молекулярной массе, ассоциации с разными вспомогательными белками и функциональному назначению.

Выделяют два варианта эксцизионной репарации нуклеотидов, различающихся на уровне начального узнавания повреждения:

1. GG–NER (*global genome nucleotide excision repair*) — осуществляет поиск и удаление объемных повреждений во всем геноме, включая нетранскрибируемые участки и молчащий хроматин.
2. TC–NER (*transcription-coupled nucleotide excision repair*) — осуществляет поиск и удаление объемных повреждений в транскрибируемых участках.

Описано множество генов, вовлеченных в процесс эксцизионной репарации нуклеотидов (*Nucleotide excision repair; NER*), основные из которых охарактеризованы в табл. 5.9.

Таблица 5.9. Гены эксцизионной репарации нуклеотидов

Локализация на хромосоме	Название гена	Синонимы	Номер в MIM*	Активность
1p35.3	<i>RPA2</i> — <i>Replication Protein A2</i>	<i>REPA2, RP-A p32, RP-A p34, RPA32</i>	179836	Участие в клеточном ответе на репликативный стресс и повреждения ДНК
2q14.3	<i>ERCC3</i> — <i>Excision Repair Cross-Complementing group 3, TFIIH core complex helicase subunit</i>	<i>XPB, BTF2, TTD2, GTF2H, RAD25, TFIIH</i>	133510	Коррекция ошибок первой стадии эксцизионной репарации нуклеотидов и кодирование АТФ-зависимой геликазы
3p25.1	<i>XPC</i> — <i>Xeroderma pigmentosum Complementation group C</i>	<i>RAD4, XP3C, p125</i>	613208	Связь с поврежденной ДНК в комплекс
5q13.2	<i>CDK7</i> — <i>Cyclin-Dependent Kinase 7</i>	<i>CAK, CAK1, CDKN7, HCAK, MO15, STK1, p39MO15</i>	601955	Субъединица транскрипционного фактора II РНК-полимеразы II

Продолжение табл. 5.9

Локализация на хромосоме	Название гена	Синонимы	Номер в MIM*	Активность
5q12.1	<i>ERCC8</i> — Excision Repair Cross-Complementing group 8, CSA ubiquitin ligase complex subunit	<i>CKN1, CSA, UVSS2</i>	609412	Кодирование белка, связанного с белками синдрома Коккейна, участие в репарации нуклеотидов, связанной с транскрипцией
5q13.2	<i>GTF2H2</i> — General Transcription Factor IIH, polypeptide 2	<i>BTF2, BTF2P44, T-BTF2P44, TFIIH, p44</i>	601748	Связь с транскрипционным фактором H РНК-полимеразы II
5q14.3	<i>CCNH</i> — cyclin H	<i>CAK, Cych, p34, p37</i>	601953	Киназная субъединица транскрипционного фактора H РНК-полимеразы II
6p21.33	<i>GTF2H4</i> — General Transcription Factor IIH, polypeptide 4	<i>P52, TFB2, TFIIH</i>	601760	Коровая субъединица p52 TFIIH; участие в репарации нуклеотидов, связанной с транскрипцией
7p21.3	<i>RPA3</i> — Replication Protein A3	<i>REPA3, RP-A p14</i>	179837	Связь с ДНК в месте надреза в процессе репликации, репарации и рекомбинации
9q22.33	<i>XPA</i> — Xeroderma pigmentosum complementation group A	<i>XP1C, XPAC</i>	611153	Участие (с <i>ERCC1</i>) в репарации нуклеотидов и связь с поврежденной ДНК в месте надреза
9q31.2	<i>RAD23B</i> homolog B, nucleotide excision repair protein	<i>HR23B, HR23B, P58</i>	600062	Участие в убиквитин-протеасомной системе и эксцизионной репарации нуклеотидов
10q11.23	<i>ERCC6</i> — Excision Repair Cross-Complementing group 6, chromatin remodeling factor	<i>ARMD5, KKN2, COFS, COFS1, CSB, CSB-PGBD3, POF11, RAD26, UVSS</i>	609413	Необходим для репарации нуклеотидов, связанной с транскрипцией, и полной репарации генома
10q24.1	<i>MMS19</i> — nucleotide excision repair, <i>S. cerevisiae</i> , homolog of	<i>CIAO4, MET18L, hMMS19</i>	614777	Участие в транскрипции и репарации нуклеотидов
11p11.2	<i>DDB2</i> — DNA Damage Binding protein 2	<i>DDBB, UV-, XPE</i>	600811	Участие в полногеномной репарации УФ-повреждений
11q12.2	<i>DDB1</i> — DNA damage binding protein 1	<i>DDBA, UV-DDB1, XAP1, XPCE, XPE, XPE-BF</i>	600045	Связь с центромерным комплексом и участие в метилировании

Окончание табл. 5.9

Локализация на хромосоме	Название гена	Синонимы	Номер в MIM*	Активность
12q24.31	<i>GTF2H3</i> — General Transcription Factor IIIH subunit 3	<i>BTF2, P34, TFBA, TFIIH</i>	601750	Участие в транскрипции в комплексе TFIID и репарации нуклеотидов, связанной с транскрипцией
13q33.1	<i>ERCC5</i> — Excision Repair 5, endonuclease	<i>COFS3-201, ERCM2, UVDR, XPG, XPGC</i>	133530	Участие в репарации нуклеотидов, связанной с транскрипцией

* Здесь и далее в таблицах: MIM — «Менделевское наследование у человека; каталог человеческих генов и генетических болезней» (онлайн-ресурс MIM — OMIM: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim> или [omim.org](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim)). Подробнее — на с. 413.

Экцизионная репарация оснований

Еще одним путем репарации фотопроизводных является эксцизия (от англ. *excision* — вырезание, иссечение) азотистых оснований (рис. 5.6) [Leandro G.S. et al., 2015]. Этот процесс называется эксцизионной репарацией оснований (*base excision repair, BER*).

Фотореактивация

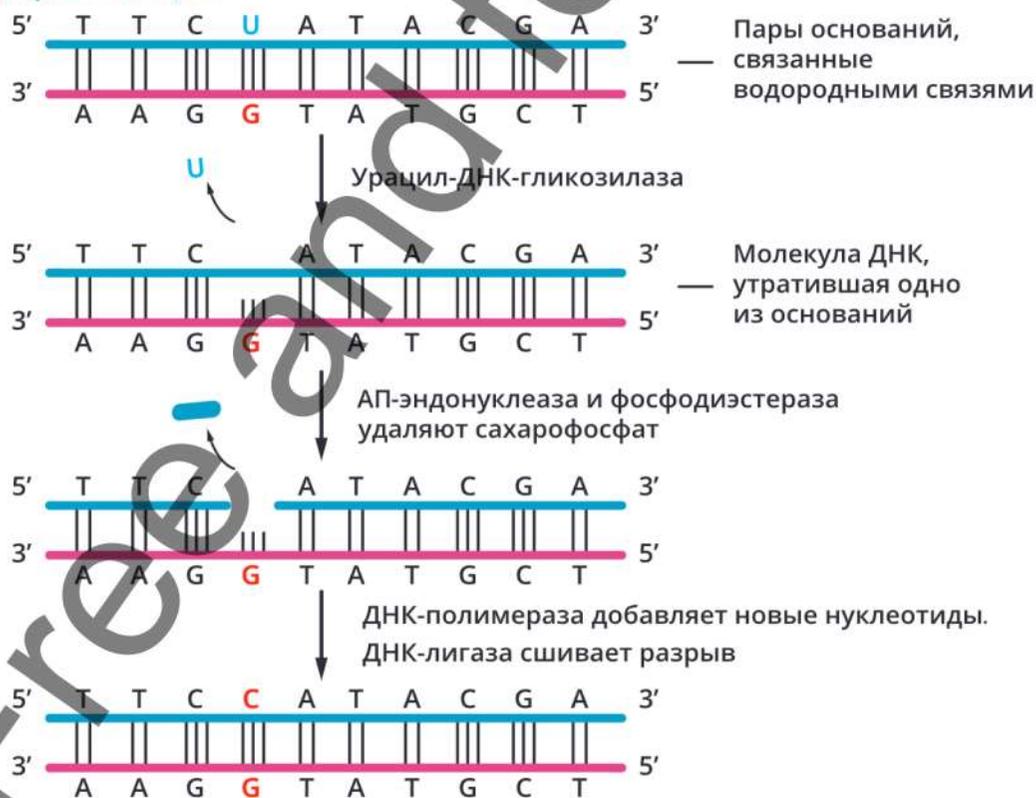


Рис. 5.6. Схема эксцизионной репарации оснований

Выделяют два пути эксцизионной репарации оснований: короткими (*short path repair*) и длинными (*long path repair*) фрагментами (табл. 5.10).

Таблица 5.10. Пути эксцизионной репарации оснований

Этап	Процесс	Фермент/белки
Репарация короткими фрагментами		
1	Распознавание и удаление поврежденного основания	ДНК-гликозилаза
2	Гидролиз 3'-5'-фосфодиэфирной связи в месте повреждения	Эндонуклеаза
3	Удаление АП-сайта после нового разрыва цепи ДНК	АП-экзонуклеаза
4	Вставка комплементарного нуклеотида	ДНК-полимераза β
5	Сшивка двух соседних фрагментов — неповрежденных и вновь синтезированных участков цепи ДНК	ДНК-лигаза
Репарация длинными фрагментами		
1	Отсоединяется от 2 до 13 нуклеотидов	Гликозилазы 1-го и 2-го типа
2	После вставки первого нуклеотида полимеразы β отсоединяется от ДНК и присоединяется к полимеразе δ или ϵ . Белок PCNA удерживает полимеразу δ на матричной цепи ДНК	Полимеразы δ и ϵ , белок PCNA
3	Три молекулы белка PCNA связываются друг с другом, что замыкает кольцо вокруг двойной спирали ДНК. Синтез идет до тех пор, пока фрагмент не достигнет нужной длины	Белок PCNA, полимеразы δ
4	Участок цепи ДНК, ранее спаренный с тем, который служит матрицей для синтеза, вытесняется, образуя свободно свешивающийся фрагмент ДНК — <i>flap</i>	Эндонуклеаза <i>FEN1</i> (<i>flap endonuclease 1</i>)
5	Специальные ферменты удаляют <i>flap</i> -фрагмент	У эукариот — <i>FEN1</i>

В этом процессе участвует армия ферментов, называемых *ДНК-гликозилазами*. В геноме человека работает 11 гликозилаз. Роль этих ферментов в процессе репарации очень сложна. Каждая из них может узнавать определенный тип азотистого основания и ускорять его гидролитическое удаление. Некоторые обладают способностью удалять только пиримидиновые основания. Эти ферменты тщательно изучаются, т. к. позволяют установить механизм репарации и понять причину возникновения ряда заболеваний. В научном мире ДНК-гликозилазы рассматривают в качестве компонентов лекарственных средств, предотвращающих повреждения ДНК. Детали процесса зависят от конкретного повреждения азотистого основания.

Описание процесса:

1. ДНК-гликозилаза узнает поврежденное основание.
2. N-гликозилаза расщепляет N-гликозидную связь между основанием и дезоксирибозой. Образовавшийся АП-сайт затем расщепляется АП-эндонуклеазой либо АП-лиазой. Удаляется нуклеотид, уже не содержащий азотистое основание.
3. Образовавшаяся брешь застраивается ДНК-полимеразой I, обладающей 5'-3' экзонуклеазной активностью.
4. Далее в ход вступает ДНК-лигаза.

В табл. 5.11 описаны основные гены, ответственные за эксцизионную репарацию оснований (*Base Excision Repair, BER*).

Таблица 5.11. Гены эксцизионной репарации оснований

Локализация на хромосоме	Название гена	Синонимы	Номер в MIM	Активность
1q42.12	<i>PARP1</i> — Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1	<i>ADPRT, ADPRT1, ARTD1, PARP, PARP-1, PPOL, pADPRT-1</i>	173870	Защита от одностранных повреждений ДНК
3p21.2	<i>PARP3</i> — Poly(ADP-Ribose) Polymerase 3	<i>ADPRT3, ADPRTL2, ADPRTL3, ARTD3, IR71, PADPRT-3</i>	607726	Связан с развитием фаз G1/S клеточного цикла
3q21.3	<i>MBD4</i> — Methyl-CpG-Binding Domain protein 4	<i>MED1</i>	603574	Специфично связан с метилированной ДНК
3p25.3	<i>OGG1</i> —8-Oxoguanine DNA Glycosylase	<i>HMMH, HOGG1, MUTM, OGH1</i>	601982	Участие в ДНК репарации одностранных разрывов
12q13.13	<i>SMUG1</i> — Single strand-selective Monofunctional Uracil-DNA Glycosylase 1	<i>FDG, HMUDG, UNG3</i>	607753	Эффективное удаление 5-метилгидрокси-урацила из одностранных ДНК
12q23.3	<i>TDG</i> — Thymine-DNA Glycosylase	<i>hTDG</i>	601423	Инициация репарации G/T или G/U в областях CpG-островков
14q11.2	<i>PARP2</i> — Poly(ADP-Ribose) Polymerase 2	<i>ADPRT2, ADPRTL2, ADPRTL3, ARTD2, PARP-2, pADPRT-2</i>	607725	Участие в репарации ДНК, регуляции апоптоза, геномной стабильности
14q12	<i>APE1</i> — Apurinic/ Apyrimidinic Endodeoxyribonuclease 1	<i>APE, APE1, APEN, APEX, APX, HAP1, REF1</i>	107748	Эффективен в коротком и длинном пути репарации

Окончание табл. 5.11

Локализация на хромосоме	Название гена	Синонимы	Номер в MIM	Активность
16p13.3	<i>MPG</i> — <i>N-Methylpurine DNA Glycosylase</i>	<i>AAG, ADPG, APNG, CRA36.1, MDG, Mid1, PIG11, PIG16, anpg</i>	156565	Участвует в удалении поврежденных оснований, в удалении пуриновых аддуктов
	<i>NTHL1</i> — <i>NTH like DNA glycosylase 1</i>	<i>FAP3, NTH1, OCTS3, hNTH1</i>	602656	Принимает участие в репарации оснований
17q12	<i>LIG3</i> — <i>Ligase III, DNA, ATP-dependent</i>	<i>LIG2alph, LIG3</i>	600940	Обязателен для репарации митохондриальной, но не для ядерной ДНК
19q13.31	<i>XRCC1</i> — <i>X-ray Repair, Complementing defective, in Chinese Hamster 1</i>	<i>RCC, SCAR26</i>	194360	Участие в репарации одностранных разрывов ДНК
Xp11.21	<i>APE2</i> — <i>APEX Nuclease (apurinic/apyrimidinic endonuclease 2</i>	<i>APE2, APEXL2, XTH2, ZGRF2</i>	300773	Участие в митохондриальной и ядерной репарации оснований

Репарация неспаренных оснований

Одной из основных ошибок, возникающих в ДНК, является неспаренная «пара» нуклеотидов. Как правило, такие ошибки возникают при репликации за счет неточной работы ДНК-полимераз. Поэтому основная активность по репарации таких ошибок наблюдается в клетке именно в связи с репликацией [Lee J. B. et al., 2014; Kunkel T. A., Erie D. A., 2015].

Ошибки репликации происходят 1 раз на 10 т. п. н. у кишечной палочки (грамотрицательная бактерия (лат. *Escherichia coli*, *E. coli*). В геноме *E. coli* в процессе инициации участвуют продукты четырех генов: *mutS*, *mutL*, *mutH*, *mutU*. Данная система репарации работает только с дочерней цепью. После окончания репликации метилазы присоединяют метильные группы к аденинам в последовательностях GATC. У эукариот ошибки репликации возникают значительно чаще.

Процесс mismatch-репарации неспаренных оснований (*mismatch excision repair*) проходит следующим образом (рис. 5.7). К некомплементарной паре присоединяется белок Mut S, с ним связывается ген *mut L* и две молекулы белка *mut H* (обладает эндонуклеазной активностью и опознает участок GATC). Белки *mut H* вносят разрывы в дочернюю цепь вблизи аденина. Если разрыв близко к 5'-концу от аденина, то присоединяется экзонуклеаза, которая расщепляет нить в направлении 5'→3'. Этот белок разрушит всю дочернюю цепь до места неправильного спаривания нуклеотидов.

Ошибка в новосинтезированной цепи

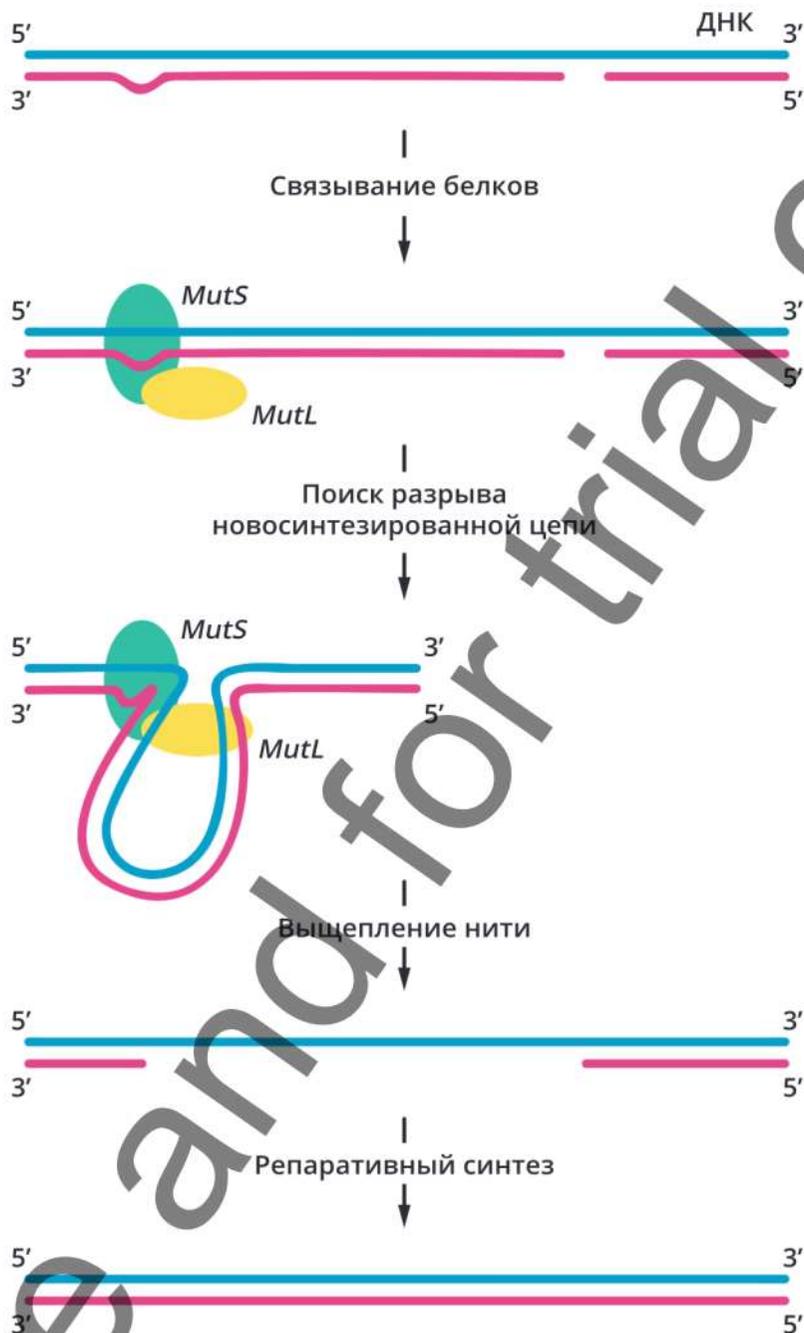


Рис. 5.7. Схема репарации неспаренных оснований

Если разрыв ближе к 3', то требуется другая экзонуклеаза, которая движется от 3' → 5'. Она работает до тех пор, пока участок mismatch не будет устранен. Далее брешь застраивается ДНК-полимеразой II, а концы воссоединяются с помощью лигаз. На сегодняшний день известны десять генов, участвующих в mismatch-репарации неспаренных оснований (см. табл. 5.12).

Таблица 5.12. Гены репарации ошибочно спаренных оснований

Локализация на хромосоме	Название гена	Синонимы	Номер в МИМ	Активность гена
1p31.1	<i>MSH4</i> — <i>MutS</i> , <i>E. Coli</i> , homolog of, 4	—	602105	Участие в мейотической рекомбинации
2p16.3	<i>MSH6</i> — <i>mutS</i> homolog 6	<i>GTBP</i> , <i>GTMBP</i> , <i>HNPCC5</i> , <i>HSAP</i> , <i>p160</i>	600678	Кодирование белка семейства <i>mutL/hexB</i> . Белок формирует гетеродимеры с <i>MLH1</i> , белком репарации ошибочно спаренных оснований
2q32.2	<i>PMS1</i> — homolog 1, mismatch repair system component	<i>HNPCC3</i> , <i>MLH2</i> , <i>PMSL1</i> , <i>hPMS1</i>	600258	Участие в пострепликативной репарации; митохондриальный гомолог <i>MutL</i>
3p22.2	<i>MLH1</i> — DNA mismatch repair protein 1	<i>COCA2</i> , <i>FCC2</i> , <i>HNPCC</i> , <i>HNPCC2</i> , <i>hMLH1</i>	120436	Участие в регуляции репарации ошибочно спаренных оснований
5q14.1	<i>MSH3</i> — <i>MutS</i> , homolog 3	<i>DUP</i> , <i>FAP4</i> , <i>MRP1</i>	600887	Узнавание ошибочно спаренных оснований
6p21.33	<i>MSH5</i> — <i>MutS</i> , homolog 5	<i>G7</i> , <i>MUTSH5</i> , <i>NG23</i> , <i>POF13</i>	603382	Участие в стабилизации и сохранении мейотической репарации двуниевых разрывов
7q22.1	<i>PMS2L1</i> — <i>PMS1</i> homolog 2, mismatch repair system component pseudogene 1	<i>PMS2L1</i> , <i>PMS2L13</i> , <i>PMS2L6</i> , <i>PMS2L7</i> , <i>PMS2L8</i> , <i>PMS3</i> , <i>PMS8</i> , <i>PMSR1</i> , <i>PMSR2</i>	605038	Псевдоген, компонент репарации ошибочно спаренных оснований
7p22.1	<i>PMS2</i> — <i>PMS1</i> homolog 2, mismatch repair system component	<i>HNPCC4</i> , <i>MLH4CL</i> , <i>PMSL2</i> , <i>PMS2</i>	600259	Соматическая инактивация гена и возможное развитие колоректального рака, ассоциированного с инактивацией системы репарации
14q24.3	<i>MLH3</i> — <i>mutL</i> homolog 3	<i>HNPCC7</i>	604395	Участие в мейотической рекомбинации

Репарация двуниевых разрывов (рекомбинация)

Механизм для устранения двуниевых разрывов (англ. *double-strand break*) распространен в соматических клетках млекопитающих [Wakasugi M. et al., 2014; Kowalczykowski S. C., 2015]. Обычно происходит ДНК-лигирование (DNA ligation, от лат. *ligo* — связываю) — формирование фосфодиэфирных связей между близлежащими

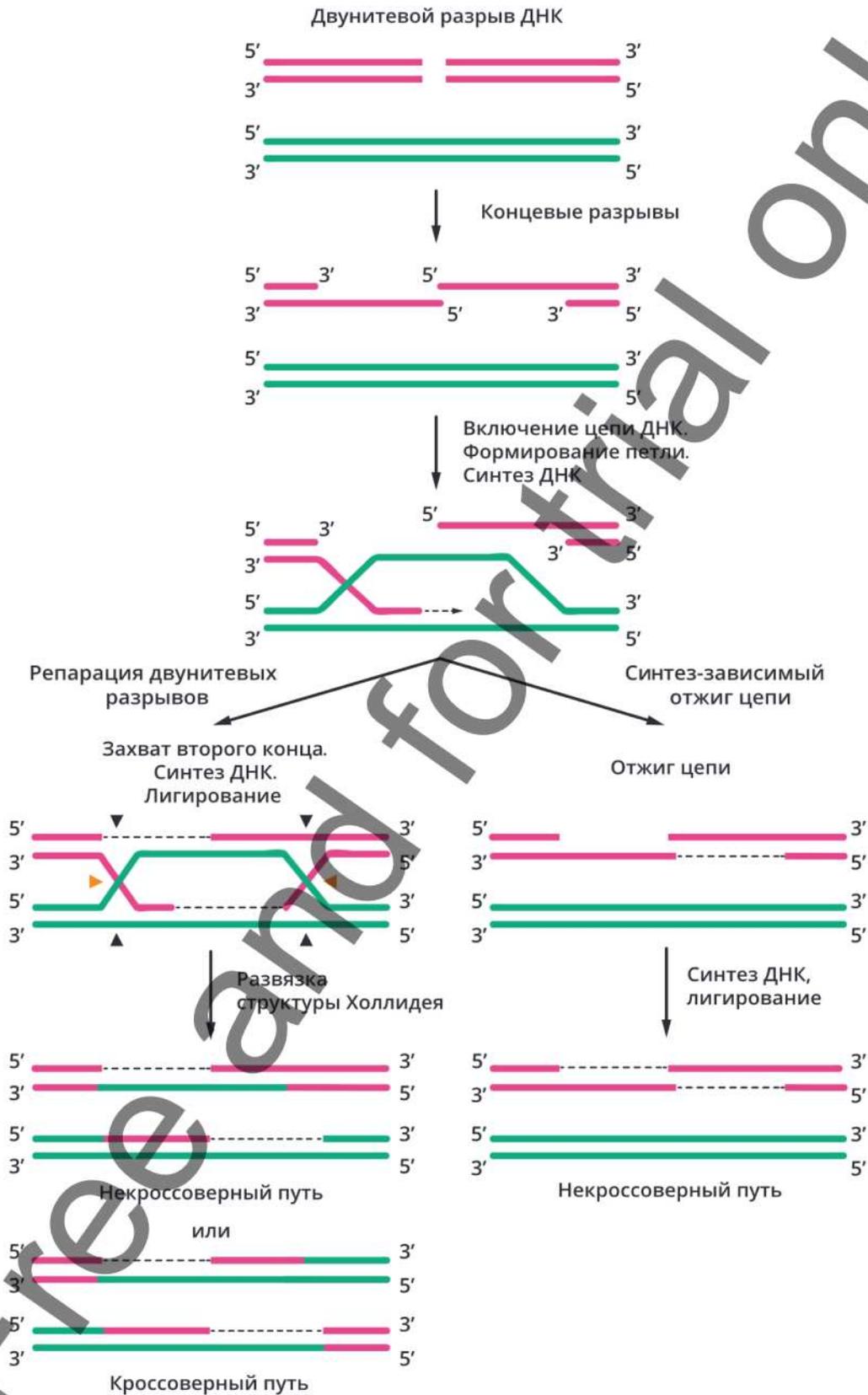


Рис. 5.8. Схема гомологичной и негомологичной рекомбинации двунитевых разрывов ДНК

нуклеотидами в молекуле ДНК через 5'-фосфатные и 3'-гидроксильные группы. При лигировании концов происходит потеря одного или двух нуклеотидов на участке соединения. Рассчитано, что в геноме соматических клеток пожилого человека содержится приблизительно 2000 таких повреждений.

Репарация двунитевых разрывов обычно протекает в виде гомологичной или негомологичной рекомбинации (см. рис. 5.8).

Гомологичная рекомбинация (Homologous recombination) используется только во время репликации и вскоре после нее в G2 и S-фазах, в качестве матрицы используется сестринская хроматида той же хромосомы [Wright W.D. et al., 2018].

Негомологичная рекомбинация, или негомологичное воссоединение концов (*non-homologous end joining*), — процесс, заключающийся в репарации двунитевых разрывов цепи ДНК. Точность такого процесса напрямую зависит от совместимости концов поврежденных участков цепи [Chang H.H.Y. et al., 2017].

В ходе этой репарации порванные концы соединяются напрямую, без использования матрицы для синтеза. Противоположные концы оборванных нитей ДНК фиксируются друг против друга и удерживаются от расхождения с помощью белков Ku. (Белок Ku — ДНК-связывающий белок и один из важных участников системы репарации двухцепочечных разрывов ДНК.). Такие двунитевые разрывы (*Double Strand Breaks, DSB*) удаляются с концов ДНК с помощью нуклеаз. Они убирают поврежденные нуклеотиды и подрезают выступающие концы нитей ДНК, подравнивая их. Затем присоединяется ДНК-полимераза μ или ДНК-полимераза λ и заполняет брешу. Завершает процесс лигаза IV, которая сшивает восстановленные фрагменты в единое целое.

Плохо организованный, неточный процесс может привести к потере нуклеотидных звеньев, транслокации участков хромосом или слиянию теломер.

В настоящее время достоверно изучено много генов гомологичной и негомологичной рекомбинаций ДНК (*DNA homologous recombination*), часть из которых описана в табл. 5.13 и 5.14.

Таблица 5.13. Характеристика генов гомологичной рекомбинации ДНК

Локализация на хромосоме	Название гена	Синонимы	Номер в MIM	Активность гена
1p34.1	<i>RAD54L — RAD54-like</i>	<i>HR54, RAD54A, hHR54, hRAD54</i>	603615	Фактор, сопутствующий рекомбинации
5q31.1	<i>RAD50 — double-strand break repair protein</i>	<i>NBSLD2, hRad50, RAD50</i>	604040	Участие (с <i>MRE11A</i>) в узнавании ДНК поврежденных, в активации клеточного цикла
7q36.1	<i>XRCC2 — X-ray repair, complementing defective, in Chinese Hamster, 2 X-ray repair cross complementing 2</i>	<i>FANCU</i>	600375	Участие в репарации разрывов ДНК

Окончание табл. 5.13

Локализация на хромосоме	Название гена	Синонимы	Номер в MIM	Активность гена
8q22.1	<i>RAD54B</i> — homolog B	<i>RDH54</i>	604289	Фактор, сопутствующий рекомбинации, ассоциирован с генами <i>BRCC1</i> и <i>BRCC2</i>
12p13.33	<i>RAD52</i> — homolog, DNA repair protein		600392	Участие в репарации двуниевых разрывов и митотической рекомбинации
13q13.1	<i>BRCA2</i> — Breast cancer 2	<i>BRCC2, BROVCA2, FACD, FAD, FAD1, FANCD, FANCD1, GLM3, PNCA2, XRCC11</i>	600185	Связывание с <i>RAD51</i> рекомбиназой, участие в репарации двуниевых разрывов ДНК
14q24.1	<i>RAD51L1</i> — <i>RAD51</i> paralog B	<i>R51H2, RAD51L1, REC2</i>	602948	Участие в митотической и мейотической рекомбинациях и репарации двуниевых разрывов
14q32.33	<i>XRCC3</i> — X-ray repair cross complementing 3	<i>CMM6</i>	600675	Участие в репарации межниевых разрывов ДНК
15q15.1	<i>RAD51</i> — <i>RAD51</i> recombinase	<i>BRCC5, FANCR, HRAD51, HsRad51, HsT16930, MRMV2A, RECA, RAD51</i>	179617	Связь с генами <i>BRCA1</i> и <i>BRCA2</i> , участие в репарации двуниевых разрывов и межниевых сшивок
17q11	<i>RAD51L3</i> — <i>RAD51</i> paralog D	<i>BROVCA4, R51H3, RAD51L3, TRAD</i>	602954	Наряду с <i>Rad51</i> участвует в сохранении целостности теломер и играет роль на ранних этапах рекомбинационной репарации ДНК
17q21.31	<i>BRCA1</i> — <i>BRCA1</i> DNA repair associated	<i>BRCA1, BRCC1, BROVCA1, FANCS, IRIS, PNCA4, PPP1R53, PSCP, RNF53</i>	113705	Участие в репарации ДНК, контроле клеточного цикла и поддержании геномной стабильности
17q22	<i>RAD51C</i> — paralog C	<i>BROVCA3, FANCO, R51H3, RAD51L2</i>	602774	Участие в рекомбинационной репарации ДНК повреждений и мейотической рекомбинации
22q13.1	<i>DMC1</i> — DNA meiotic recombinase 1	<i>DMC1H, LIM15, dj199H16.1</i>	602721	Кодирование семейства рекомбиназ, которые играют существенную роль в репарации двуниевых разрывов ДНК во время митоза и мейоза

Таблица 5.14. Характеристика генов негомологичной рекомбинации ДНК

Локализация на хромосоме	Название гена	Синонимы	Номер в МИМ	Активность гена
2q35	<i>XRCC5</i> — X-ray repair cross complementing 5	<i>KARP-1, KARP1, KU80, KUB2, Ku86, NFIV</i>	194364	Связь двуниевых разрывов ДНК и способность репарации путем негомологичного воссоединения концов
5q14.2	<i>XRCC4</i> — X-ray repair cross complementing 4	<i>SSMED</i>	194363	Участие в репарации двуниевых разрывов ДНК и в негомологичном воссоединении концов
8q11	<i>PRKDC</i> — protein kinase, DNA-activated, catalytic subunit	<i>DNA-PKc, DNA-PKcs, DNAPK, DNAPKc, DNPk1, HYRC, HYRC1, IMD26, XRCC7, p350</i>	600899	Включен в негомологичное воссоединение концов в момент репарации двуниевых разрывов и рекомбинацию во время иммунного ответа
13q33.3	<i>LIG4</i> — DNA ligase 4	<i>LIG4s</i>	601837	Эффективное соединение однострунчатых разрывов в двуниевые полидезоксинуклеотиды
22q13.2	<i>Ku70</i> — X-ray repair cross complementing 6	<i>CTC75, CTCBF, G22P1, KU70, ML8, TLA4</i>	152690	Связь свободных концов ДНК и способствование негомологичному воссоединению концов

SOS-репарация

SOS-репарация — это индуцибельная система генетической пострепликативной репарации, которая включается при появлении затруднений в синтезе ДНК, и в результате происходит увеличение транскрипции многих ферментов репарации. Такой вид самовосстановления характерен для бактерий [Bunnell B. E. et al., 2017].

Реализация SOS-репарации происходит по следующему механизму. Главными участниками являются белки, кодируемые генами *RecA* (гомолог у эукариот — **Rad51**) и *LexA*. *RecA* — полифункциональный белок, участвующий в рекомбинации ДНК. Белок *LexA* — репрессор транскрипции большой группы генов, предназначенных для репарации ДНК. При его ингибировании или разрушении SOS-репарация активизируется. Связывание **RecA** с **LexA** приводит к расщеплению последнего и соответственно к активации транскрипции генов репарации (рис. 5.9).

УФ-свет активирует синтез ко-протеазы **RecA**-белка. **RecA**-протеаза разрезает другой белок, кодируемый геном *LexA* (репрессор почти 20 генов). Разрушение **LexA**-

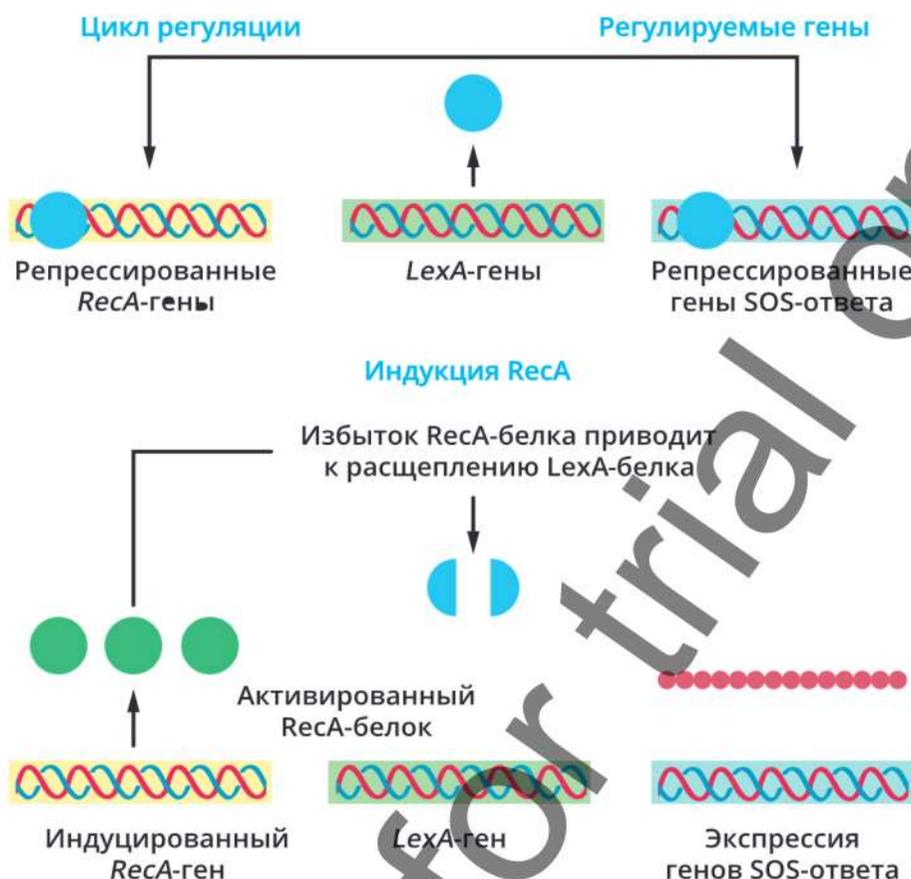


Рис. 5.9. Схема SOS-репарации

белков дает начало транскрипции многих оперонов, в частности, РНК-полимераза связывается с промотором оперона *umuD* или *umuC*. Новосинтезированные белки *umuD*, *umuC* присоединяются к комплексу ДНК-полимераза III — *RecA*-белок, изменяют его, и репликация продолжается.

Напротив поврежденного участка матричной цепи будут выстроены случайные нуклеотиды, т. е. дочерняя цепь будет нести мутации. В настоящее время идентифицировано около 40 генов, которые участвуют в SOS-ответе в результате активации их продуктов. Все эти гены являются индуцибельными.

5.4. Мутации

Мутация (лат. *mutatio* — изменение) — это стабильное изменение числа и/или структуры ДНК/хромосомы. Существуют различные классификации мутаций, которые кратко представлены в табл. 5.15.

Таблица 5.15. Классификации мутаций

Критерий классификации	Тип мутации
Происхождение мутации	<i>Спонтанные</i> — случайные
	<i>Индукцированные</i> — возникают после воздействия мутагена/ мутагенов
Локализация в клетке	<i>Ядерные</i> (хромосомная ДНК)
	<i>Цитоплазматические</i> (внехромосомная ДНК)
Локализация в разных клетках и способность к наследованию	<i>Соматические</i> — возникают в соматических клетках и передаются при митозе в другие соматические клетки организма (если не подвергаются апоптозу)
	<i>Генеративные</i> — возникают в половых клетках и могут передаваться детям по наследству
Проявление в аллелях генов и типу их взаимодействия	<i>Доминантные</i>
	<i>Рецессивные</i>
Проявление в фенотипе	<i>Биохимические</i>
	<i>Морфологические</i>
	<i>Физиологические</i>
	<i>Летальные или полублетальные</i>
Действие на организм	<i>Вредные</i>
	<i>Полезные</i>
	<i>Нейтральные</i>
Изменение числа или структуры ДНК	<i>Геномные</i> — по изменению числа хромосом
	<i>Хромосомные</i> — по изменению структуры хромосом
	<i>Генные</i> — по изменению структуры гена

Повреждения ДНК могут восстанавливаться — репарироваться. Если репарация ДНК проходит неэффективно, то можно констатировать хромосомную или генную мутацию. Если во время деления клетки (митоз или мейоз) происходит нарушение цитотомии или повреждение митотического аппарата, то возникают *геномные мутации*.

В норме в клетках нашего организма наблюдаются практически любые типы мутаций с очень низкой частотой встречаемости. Если в организме все процессы реализации наследственной информации протекают нормально, то со временем клетки с этими мутациями подвергаются *апоптозу*. Если же этого не происходит, то можно говорить о начале канцерогенеза.

5.4.1. Генетическая классификация мутаций

Геномная мутация — это изменение числа (n) хромосом. Различают *полиплоидию* и *анеуплоидию* (рис. 5.10). Полиплоидия — это кратное увеличение или умень-

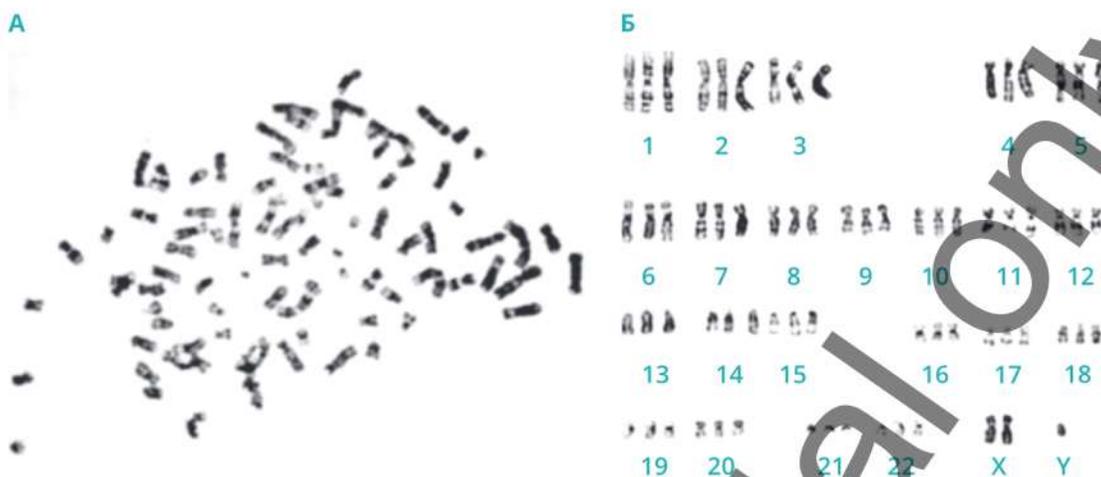


Рис. 5.10. Геномные мутации:

А — тетраплоидная метафазная пластинка ($92XXYY$); Б — триплоидная кариограмма ($69XXY$) (фото, дифференциальная окраска)

шение числа хромосом. Анеуплоидия — это изменение числа хромосом на одну или две хромосомы (табл. 5.16).

Таблица 5.16. Характеристика геномных мутаций

	Тип	Формула набора хромосом ($k \times n$) при $n = 23$	Число хромосом
	Полиплоидия	Гаплоидия	$1n$ при $k = 1$
Диплоидия		$2n$ при $k = 2$	46
Триплоидия		$3n$ при $k = 3$	69
Тетраплоидия		$4n$ при $k = 4$	92
	Тип	Формула набора хромосом ($2n \pm k$) при $k \neq n$	Число хромосом
	Анеуплоидия	Нуллисомия	$2n - 2$ при $k = 2$
Моносомия		$2n - 1$ при $k = 1$	45
Трисомия		$2n + 1$ при $k = 1$	47
Тетрасомия		$2n + 2$ при $k = 2$	48

Сокращения: n — гаплоидное число хромосом; k — коэффициент.

Причинами этих мутаций являются

- патологии митоза в соматических клетках;
- патологии мейоза в генеративных клетках;
- неравный кроссинговер.

Хромосомная мутация — изменение структуры хромосомы или хромосом. Иначе ее называют абберацией хромосом (табл. 5.17). Механизм формирования этой мутации различен (рис. 5.11).

Таблица 5.17. Типы хромосомных мутаций (аббераций хромосом)

Тип	Вид
Хроматидный	Одиночные фрагменты (<i>single fragments, sfr</i>)
	Изохроматидные фрагменты (<i>isochromatid fragments, ifr</i>)
	Хроматидные обмены (<i>chromatid exchanges, ech</i>)
Хромосомный	Нестабильные абберации
	Парные/ацентрические фрагменты (<i>double fragments, dfr / acentric fragments, afr</i>)
	Дицентрики (<i>dicentrics, dic</i>)
	Центрические и ацентрические кольца (<i>centric and acentric rings</i>)
	Центромерные разрывы (<i>centromere breaks, cbr</i>)
	Стабильные абберации
	Делеции (<i>deletions, del</i>)
	Транслокации (<i>translocation, tr</i>)
	Инверсии (<i>inversions, inv</i>)
	Инсерции (<i>insertions, ins</i>)
	Дупликации (<i>duplications, dup</i>)
	Маркерные хромосомы (<i>marker chromosomes, mar</i>)

Причиной хромосомной мутации могут быть разрывы фосфодиэфирных связей в первичной структуре ДНК и водородных связей во вторичной структуре ДНК после воздействия мутагенов.

Клетки (соматические и генеративные) с *нестабильными мутациями* хромосомного типа элиминируются в ряду клеточных поколений (рис. 5.12).

Клетки (соматические и генеративные) со *стабильными мутациями* хромосомного типа могут делиться многократно (рис. 5.13).

На рис. 5.12 представлены фотографии метафазных пластинок с абберациями, на рис. 5.13 — стабильных аббераций хромосом.

Генная мутация — изменение последовательности нуклеотидов в гене (см. табл. 5.18). Причины этих мутаций — нарушение различных молекулярных механизмов, например, ошибка ДНК-полимеразы, изменение химических связей между атомами (N, C, O, H), удаление аминогруппы (NH₂), разрыв фосфодиэфирных связей в ДНК и др.

Миссенс-мутация (*missense: mis-* — приставка, обозначающая «неправильный», «ошибочный», и *sense* — смысл, направление) — это изменение нуклеотидной последовательности, которая приводит к замене одного функционального кодона на другой. Это, в свою очередь, приводит к замене аминокислоты в полипептидной цепи.

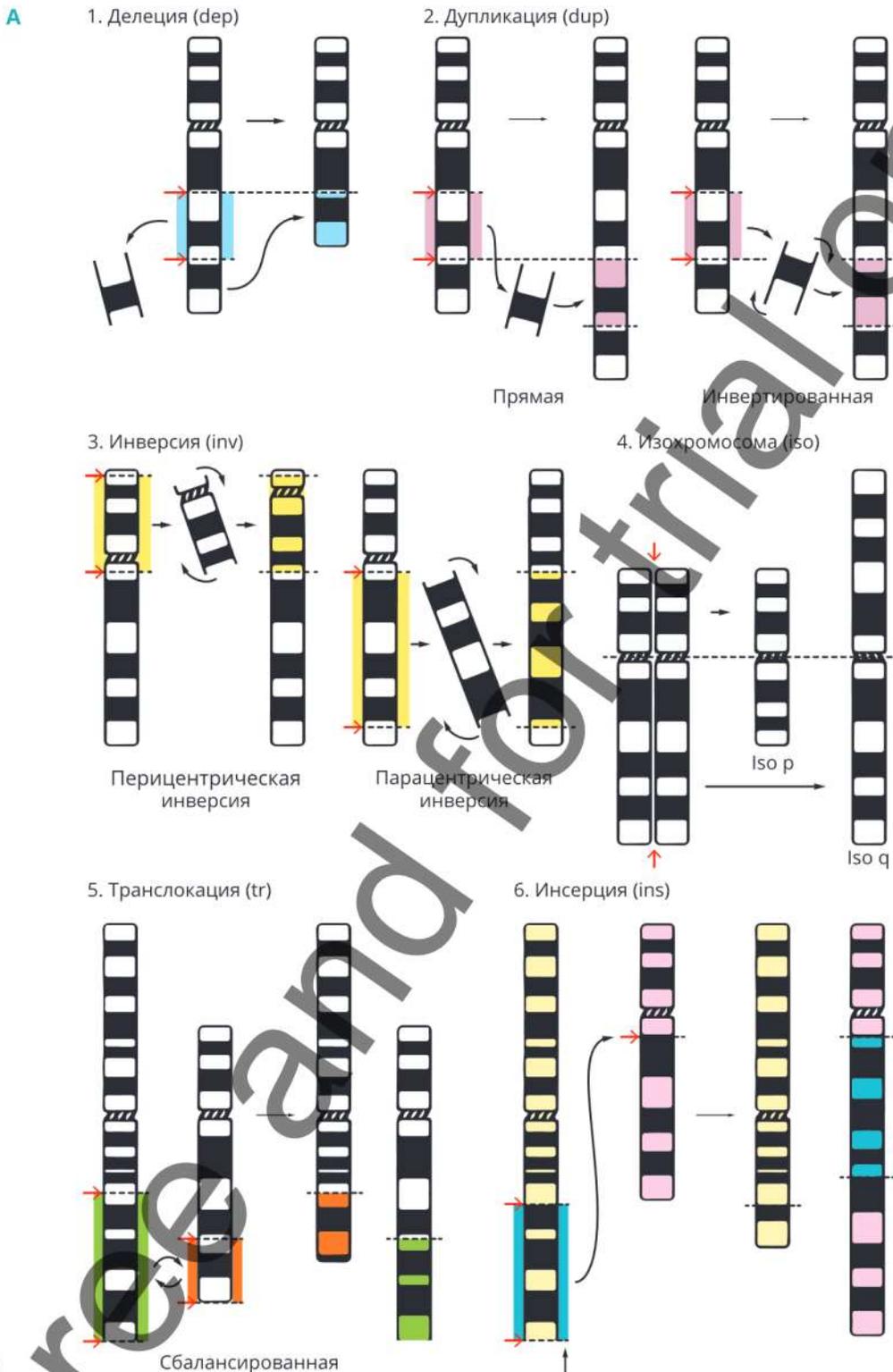


Рис. 5.11. (начало) Формирование хромосомных мутаций (аббераций хромосом):

A — стабильные абберации хромосомного типа (от 1-й до 6-й);

Сокращения: *p* и *q* — короткое и длинное плечи хромосом.

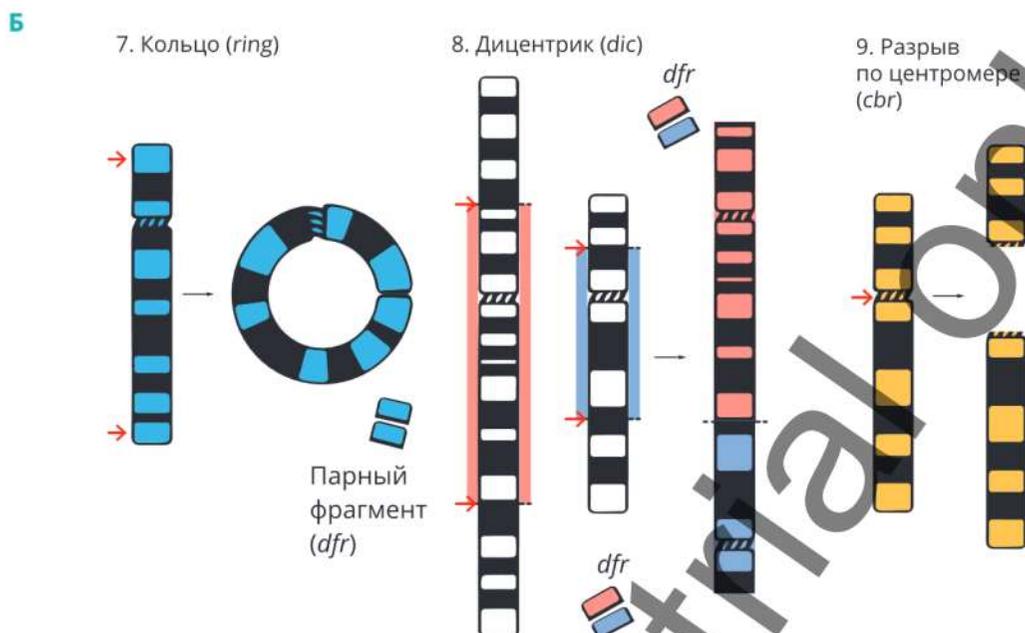


Рис. 5.11. (окончание) Формирование хромосомных мутаций (аббераций хромосом):

Б — нестабильные абберации хромосомного типа (от 7-й до 9-й)

Нонсенс-мутация (*nonsense*: частица *non* — не, нет и *sense* — смысл) — это изменение нуклеотидной последовательности в кодирующей части гена, которая превращает смысловой кодон в бессмысленный, или стоп-кодон, и наоборот: стоп-кодон — в смысловой. Вследствие такой мутации кодируемый белок может измениться в длине и функционировать неправильно.

Сеймсенс-мутация (*samesense*: *same* — такая же и *sensus* — смысл) — это замена нуклеотида с сохранением функции кодирующего триплета — кодона. Вновь образующийся кодон продолжает кодировать ту же аминокислоту.



Рис. 5.12. Метафазные пластинки с абберациями (фото, монохромно окрашенные хромосомы):

А — одиночный фрагмент (*sfr*); **Б** — парный фрагмент (*dic*); **В** — две дицентрические (*dfr*) и одна кольцевая *z* (*ring*) хромосома

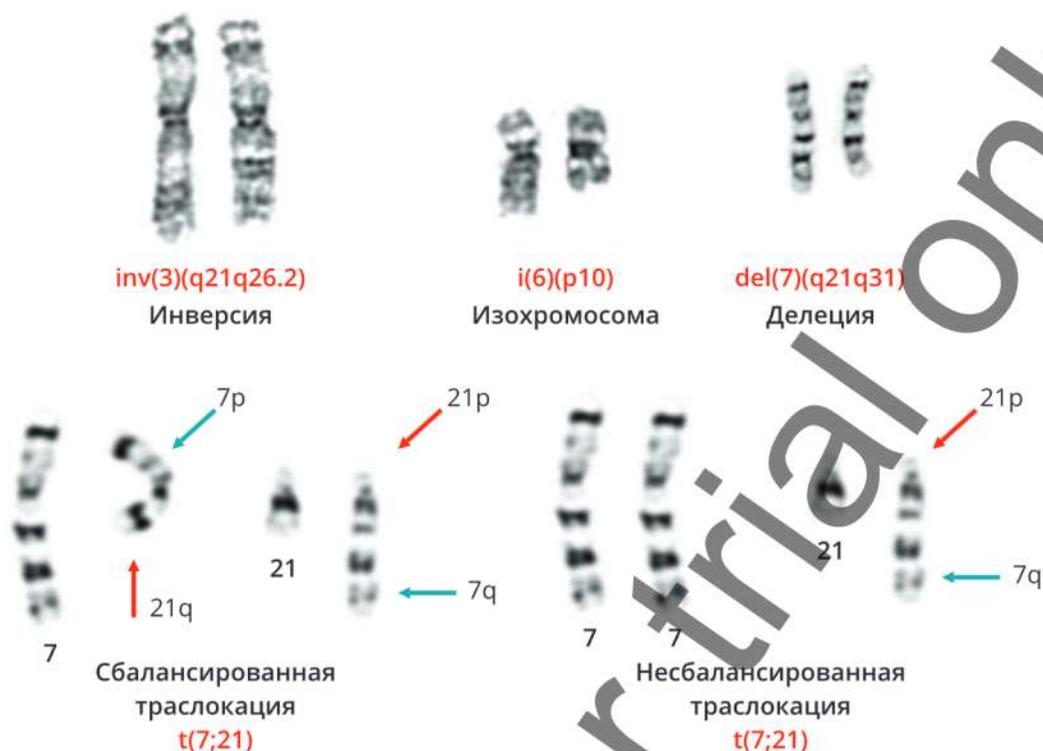


Рис. 5.13. Стабильные хромосомные aberrации хромосомного типа (фото, дифференциальная окраска)

Таблица 5.18. Типы и характеристика генных мутаций

Локализация на хромосоме	Норма («дикий» тип)	Тип генной мутации		
		миссенс	нонсенс	сеймсенс
ДНК	CGATTCACG	CGATGCACG	CGAATCACG	CGATTTACG
мРНК	GCU-AAG-UGC	GCU-ACG-UGC	GCU-UAG-UGC	GCU-AAA-UGC
Последовательность аминокислот	Arg-Lys-Trp	Arg-Thr-Trp	Arg-STOP кодон	Arg-Lys-Trp

Типы мутаций в зависимости от изменения структуры гена. Замена нуклеотида
Транзиция (от лат. *transitus* — переход, прохождение) — простая замена пурина на пурин (А–G) или пиримидина на пиримидин (Т–С).

Трансверсия — сложная замена пурина на пиримидин или пиримидина на пурин (А–С, А–Т, G–C, G–T).

Инсерция (ins) — вставка нуклеотида/нуклеотидов.

Делеция (del) — выпадение нуклеотида/нуклеотидов.

Внутригенная инверсия (inv) — поворот части гена или всего гена на 180°.

Динамическая мутация — увеличение количества тринуклеотидных повторов.

Мутации могут быть *со сдвигом рамки считывания (фреймишифты)* и *без сдвига*.

Мутации без сдвига рамки считывания происходят в результате замены нуклеотидных пар, при этом общая длина ДНК не изменяется. В результате возможна замена аминокислот, однако из-за вырожденности генетического кода структура белка может быть сохранена. Делеции и инсерции приводят к сдвигу рамки считывания (табл. 5.19).

Таблица 5.19. Примеры генных мутаций при наследственных онкопатологиях

Мутация	Ген	Локализация на хромосоме	Номер в MIM	Онкопатология (по МКБ-10*)
5382insC	<i>BRCA1</i>	17q21.31	113705	Рак молочной железы (C50), рак яичников (C56), рак желудка (C16)
185delAG	<i>BRCA1</i>	17q21.31	113705	Рак молочной железы (C50), рак яичников (C56)
4153delA	<i>BRCA1</i>	17q21.31	113705	Рак молочной железы (C50), рак яичников (C56)
1100delC	<i>CHEK2</i>	22q12.1	604373	Рак молочной железы (C50)
9318delAAAA	<i>BRCA2</i>	13q12	600185	Рак яичников (C56), синдром Линча

* Международная классификация болезней 10-го пересмотра.

Генные мутации в нуклеиновых кислотах могут также называться *точковыми* или *точечными мутациями*.

5.4.2. Полиморфизм генов

Полиморфизм — это наличие в популяции двух и более аллелей одного гена с частотой редкого аллеля выше 1 %, что обуславливает разнообразие признаков внутри вида. Так, между последовательностями ДНК двух людей, за исключением однойцевых близнецов, существуют миллионы различий.

Полиморфизм генов бывает в виде замены одного нуклеотида на другой и изменения числа повторяющихся фрагментов ДНК, которые осуществляются во всех структурных элементах генома: экзонах, интронах, регуляторных участках и т. д. Полиморфизм гена/генов характеризуется разной степенью фенотипического проявления (табл. 5.20).

Таблица 5.20. Характеристика полиморфизма гена/генов

Полиморфизм гена/генов	Пример
Фенотипически не выраженный	Полиморфные участки ДНК, используемые для идентификации личности молекулярно-генетическими методами

Окончание табл. 5.20

Полиморфизм гена/генов	Пример
Вызывающий фенотипические различия	Физиогномические различия (форма носа, цвет волос и др.)
Играющие некоторую роль в патогенезе заболевания	Полигенные (мультифакториальные) болезни
Играющие основную роль в развитии заболевания	Моногенные болезни

5.4.3. Генетический груз

Генетический груз — это накопление летальных отрицательных мутаций, передающихся из поколения в поколение. При переходе в гомозиготное состояние наблюдается выраженное снижение жизнеспособности особей или их гибель. Генетический груз может быть выявлен в любой популяции человека. Они в значительной степени отягощены различными мутациями, которые проявляются доминантно или в виде рецессивных гомозигот.

Генетический груз в популяциях подразделяют на три типа:

- 1) *сегрегационный груз* — появление слабо приспособленных гомозигот при подавляющем большинстве в популяции гетерозигот;
- 2) *мутационный груз* — появление и накопление в популяции рецессивных мутаций, которые снижают приспособленность носителей этих мутаций;
- 3) *груз дрейфа генов* — случайное увеличение концентрации рецессивного аллеля в изолированной популяции, повышение в ней доли рецессивных гомозигот. Увеличение концентраций отдельных мутаций сдерживается отбором.

5.4.4. Спонтанный уровень мутаций

Спонтанный уровень генных мутаций. Среди всех типов мутаций в соматических клетках человека чаще всего наблюдаются генные. Эти мутации могут находиться как в экзонной, так и в интронной части гена/генома. Известно, что большая часть генных мутаций локализована в интронной (некодирующей) части генома. Экспрессия генов с мутацией может явиться причиной патологии. Частота значимых генных мутаций (т. е. локализованных в экзонной части генома) в разных популяциях может быть различной.

На сегодняшний день существуют базы данных по характеристике генных мутаций в том или ином гене и взаимосвязи этой или нескольких мутаций с патологией. В этих же базах данных можно найти информацию по частоте встречаемости этой мутации или полиморфизма гена в популяции.

Спонтанный уровень хромосомных мутаций/аббераций в лимфоцитах периферической крови человека является базовой характеристикой при сравнительной оценке влияния неблагоприятных экологических факторов, обладающих мутагенным действием. Показатель спонтанного уровня частоты хромосомных аббераций в лимфоцитах человека служит своего рода точкой отсчета, с которой сравниваются результаты популяционно-цитогенетических исследований в экологически неблагоприятных районах проживания населения. Именно поэтому большое значение придается количественной оценке частоты спонтанных нарушений структуры хромосом в лимфоцитах крови человека.

На точность оценки спонтанного уровня частоты хромосомных аббераций могут влиять различные факторы. К ним можно причислить:

- медико-биологические особенности обследуемого контингента — пол, возраст, наследственная конституция, вредные привычки и др.;
- методические особенности культивирования лимфоцитов периферической крови: длительность инкубации клеток, использование различающихся по составу питательных сред, сывороток, методы фиксации клеток и приготовления препаратов хромосом, а также субъективные критерии оценки типов обнаруживаемых нарушений хромосом;
- факторы статистического порядка: размеры выборки обследуемых лиц и количество анализируемых клеток от каждого из них.

Как следствие, спонтанный уровень частоты хромосомных аббераций не представляет собой неизменную величину. При цитогенетическом анализе исследователь фактически имеет дело не с системным спонтанным уровнем, а всего лишь с его оценками, которые могут варьировать под влиянием упомянутых факторов [Sankaranarayanan K., 1998; Whitehouse C.A. et al., 2005].

Абберации хромосом при неоднократном цитогенетическом обследовании одних и тех же лиц остаются практически такими же. Цитогенетическое обследование одного и того же контрольного донора было выполнено более 200 раз в течение 12 лет [Andersson H. C., 1993]. При этом были проанализированы абберации хромосомного (дицентрики и центрические кольца) и хроматидного (одиночные фрагменты, изохроматидные фрагменты и обмены) типов, а также СХО. За 12-летний период наблюдения вариация исследуемых цитогенетических показателей была незначительной. Суммарная частота обоих типов аббераций колебалась в пределах от 0 до 4 на 100 клеток, составляя в среднем 0,79 на 100 клеток. При этом за весь период наблюдения (в 70 последовательных цитогенетических анализах при общем количестве 7000 проанализированных метафаз) лишь по одному разу были обнаружены один дицентрик и одно центрическое кольцо.

В работе Севаньяева и соавт. представлены данные цитогенетических исследований, проведенных в различных лабораториях по спонтанному уровню аббераций хромосом (табл. 5.21, цит. по [Севаньяев А. В. и др., 2013]).

Таблица 5.21. Частота спонтанного уровня aberrаций хромосом

Тип aberrаций	Число	Частота на 100 клеток	Доля от общего числа, %
Одиночные фрагменты	2480	0,530 ± 0,010	57,8
Хроматидные обмены	163	0,035 ± 0,003	3,8
Всего aberrаций хроматидного типа	2643	0,570 ± 0,010	61,6
Парные фрагменты	1371	0,290 ± 0,010	32,0
Дицентрики	214	0,046 ± 0,003	5,0
Центрические кольца	60	0,013 ± 0,002	1,4
Всего aberrаций хромосомного типа	1645	0,350 ± 0,010	38,4
Итого:	4288	0,920 ± 0,010	100,0
Аномальные моноцентрики (<i>tr, inv, ins</i> *)	93	0,020 ± 0,002	—

* *tr, inv, ins* — транслокация, инверсия, инсерция соответственно.

Спонтанный уровень геномных мутаций. В соматических и половых клетках организма могут наблюдаться *полиплоидные* и *анеуплоидные* клетки. В норме они должны подвергаться апоптозу. Средняя частота полиплоидий и анеуплоидий в соматических клетках взрослых колеблется от 0,10 до 0,25 на 100 клеток.

5.4.5. Возрастная динамика частот мутаций

Показано, что с возрастом частота мутаций в геноме повышается. Этому способствуют:

- *экзогенные* (от греч. *εξω* — вне, снаружи + *γενίδιο* — порождаемый), или внешние, факторы (мутагены среды, аномальная температура, шум и т. д.);
- *эндогенные* (*εξω* — внутри + *γενίδιο* — ген), или внутренние, факторы (спонтанно возникающие в организме химические соединения-метаболиты, которые вызывают мутагенный эффект; ошибки репликации, репарации, рекомбинации; действие генов-мутаторов и антимутаторов; транспозиция мобильных генетических элементов и др.).

Накопление мутаций с возрастом (мутационный груз) играет важную роль в таких процессах, как старение, ранняя манифестация заболеваний (особенно мультифакториальных), и при риске развития канцерогенеза и др. Мутации в генах, ответственных за репарацию ДНК, супрессию онкогенов, контроль клеточного цикла, увеличивают частоту как опухолей, так и хромосомных поломок.

Частота стабильных хромосомных aberrаций (транслокаций, инверсий, инсерций, делеций), т. е. aberrаций, не препятствующих прохождению митоза и сохраняющихся в ряду клеточных поколений, рассматривается как объективный показатель биологического возраста человека.

Было проведено полномасштабное цитогенетическое исследование уровня транслокаций методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH-метод) на базе 16 лабораторий Северной Америки, Европы и Азии среди 1933 лиц [Sigurdson A.J. et al., 2008]. Показано, что в моделях регрессии Пуассона возраст, начиная от новорожденных (пуповинная кровь) и до 85 лет, был сильно связан с частотой транслокаций ($p < 0,001$) (рис. 5.14). При этом у мужчин и женщин не было отмечено значимых различий в частотах транслокаций, что подтверждает уже имеющиеся данные (рис. 5.15). Было показано, что частота транслокаций достоверно увеличивается с возрастом у курильщиков по сравнению с некурящими ($p < 0,001$) (рис. 5.16).

Исследование возрастной динамики стабильных хромосомных aberrаций может помочь в понимании механизмов старения и канцерогенеза. Структурные хромосомные aberrации рассматриваются как наиболее вероятные события, связанные с малигнизацией. Действительно, они инициируются теми же воздействиями, что и рак, встречаются в большинстве опухолей, а иногда и определяют их клинический прогноз.

Ряд авторов [Семенов А. В., Воробцова И. Е., 2010] предлагают использовать хромосомные aberrации в качестве доклинического маркера опухоли в расчетах онкологического риска. Это особенно важно для экстраполяции кривой «доза—эффект» по выходу опухолей в область малых уровней воздействий, когда их встречаемость низка и для регистрации новообразований необходимы колоссальные эпидемиологические исследования.

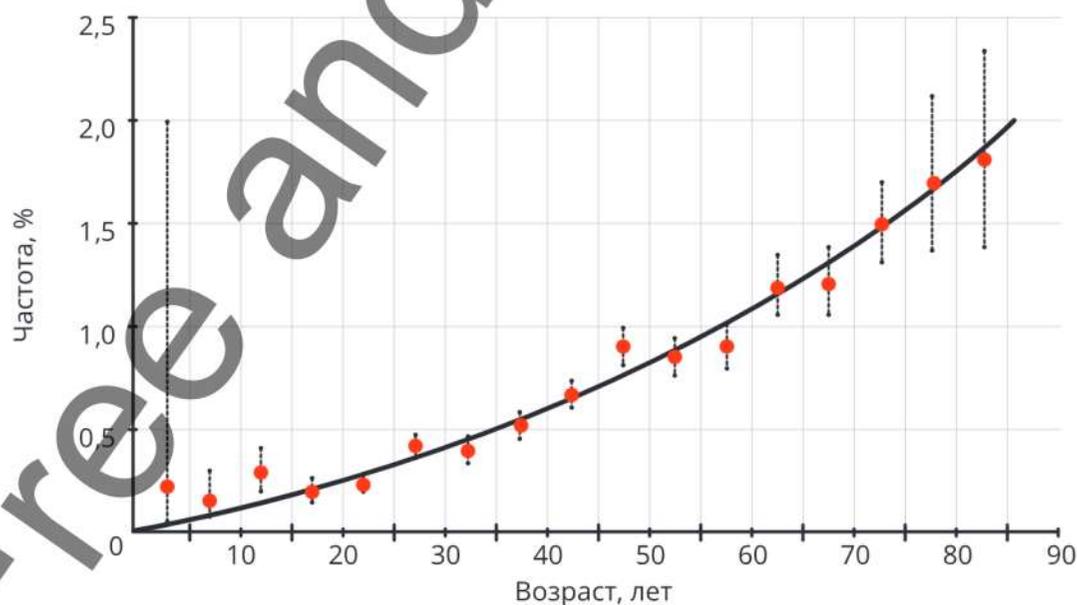


Рис. 5.14. Зависимость транслокаций (частота на 100 клеток) от возраста (цит. по [Sigurdson A.J. et al., 2008])

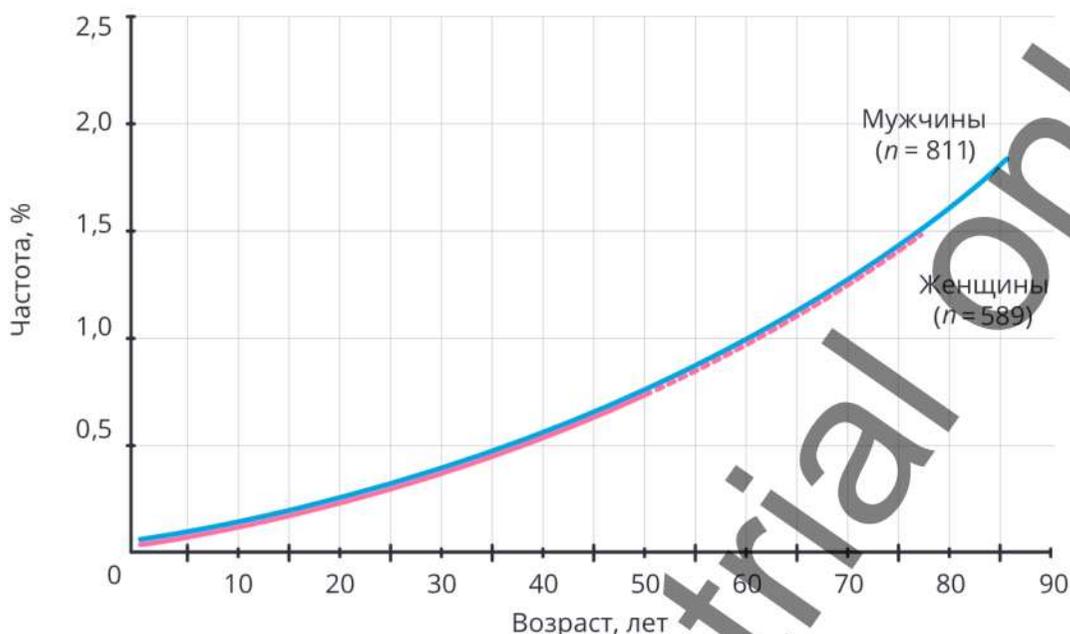


Рис. 5.15. Зависимость частоты транслокации (частота на 100 клеток) от возраста и пола (цит. по [Sigurdson A.J. et al., 2008])

Исследование возрастной динамики стабильных хромосомных aberrаций имеет и ряд практических аспектов [Воробцова И. Е., 2010].

Достоверная (т. е. полученная на большом статистическом материале) калибровочная кривая «возраст—эффект» позволяет:

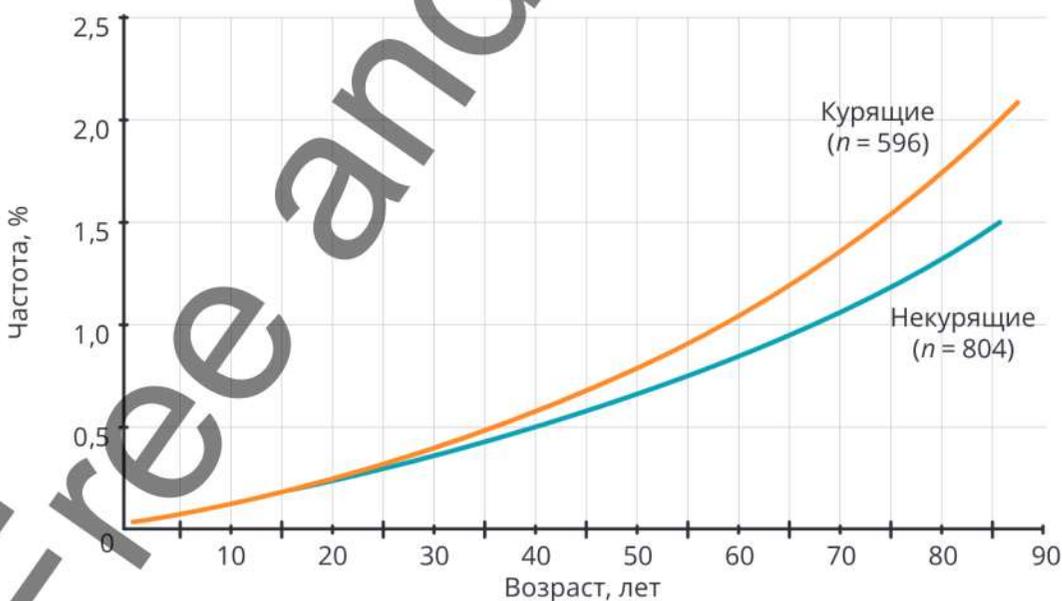


Рис. 5.16. Зависимость частоты транслокаций (частота на 100 клеток) от возраста и курения ($p < 0,001$) (цит. по [Sigurdson A.J. et al., 2008])

- 1) определять «биологический возраст» человека, и, следовательно, реальный, а не календарный риск развития у него той или иной патологии;
- 2) выявлять лиц с достоверно более высокими частотами хромосомных aberrаций по сравнению с нормой для данного возраста, чтобы затем обследовать их более детально на наличие клонов aberrантных клеток;
- 3) проводить более корректную биодозиметрию ионизирующих излучений и других *генотоксикантов* по частоте стабильных хромосомных aberrаций с учетом их возрастного накопления.

5.4.6. Мозаицизм

Организм взрослого человека насчитывает примерно 10¹⁴ клеток разных типов. Скорее всего, из всех этих клеток не найдется и двух с полностью одинаковым геномом из-за мутаций, которые накапливаются в эмбриогенезе и в течение жизни организма. Ранее считалось, что геномы всех клеток одинаковы, а различия в их облике и функциях определяются набором «работающих» генов. Процесс, когда зигота содержит два отдельных генотипа или более из-за соматической мутации во время эмбриогенеза, называется *генетическим мозаицизмом*.

Мозаицизм подразумевает существование внутри одного организма как минимум двух линий клеток с различающимся геномом: и среди соматических, и среди зародышевых клеток (рис. 5.17) [Jacobs K.B. et al., 2012]. Клетки с аномальным и нормальным генотипами могут находиться в отдельных либо во всех тканях организма.

В появлении соматического мозаицизма в нормальных клетках могут быть задействованы следующие молекулярные механизмы:

- ошибки репликации ДНК;
- ошибки в митотическом расхождении хромосом [Ju Y.S. et al., 2017];
- соматические мутации в зиготе либо на ранней стадии дробления;
- перемещение по геному ретроэлементов LINE1 (*Long interspersed nuclear element 1*) и Alu-элементы, или Alu-повторы;
- ошибки репарации поврежденной ДНК.

В первые дни эмбрионального развития при каждом делении на одну клетку приходится три мутации с заменой нуклеотидных оснований. Клетки на этом этапе часто делятся асимметрично и, таким образом, вносят разный вклад в клеточный состав в более взрослом организме.

Типы мутаций, являющиеся причиной наследственной патологии, могут возникнуть на разных стадиях эмбрионального развития (дробления, гастрюляции, нейруляции, системо- и органогенеза). Эти мутации могут быть причиной мозаичной формы наследственного заболевания. Клинические проявления этого явления зависят от множества факторов (подробнее см. гл. 8).

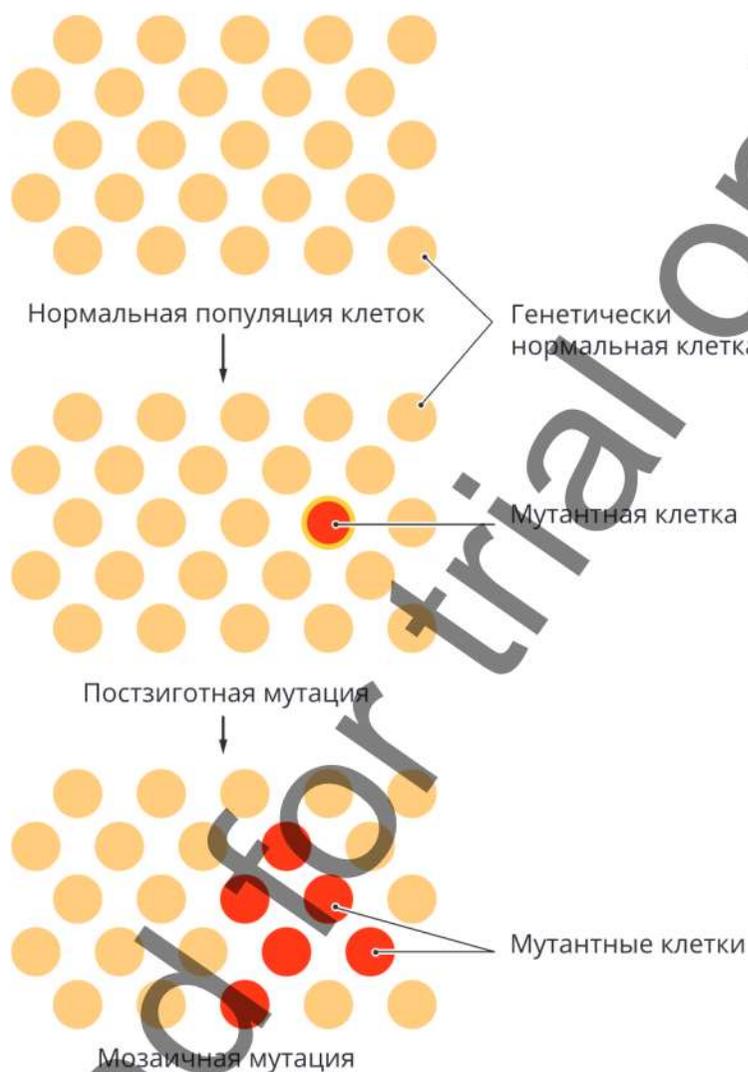


Рис. 5.17. Схема возникновения мозаичной формы мутации

5.4.7. Мультиабберрантные клетки

Клетка, содержащая множественные aberrации хромосом, называется *мультиабберрантной* или *rogue cell* [Awa A.A., Neel J.V., 1986]. Впервые такие клетки были описаны в конце 60-х годов XX века. Мультиабберрантные клетки / *rogue cells* выявляют при цитогенетическом анализе. Обычно исследователи наблюдают в одной клетке несколько дицентриков или полицентриков, центрических или ацентрических колец, атипичных моноцентриков, множество ацентрических фрагментов (см. рис. 5.18).

В организме клетки со множественными aberrациями появляются после воздействия ионизирующего излучения в различных диапазонах доз. В основном это результат воздействия или α -частиц инкорпорированных радионуклидов, или высокоэнергетических компонентов космического излучения, или мощного γ -нейтронного облучения [Anderson R.M. et al., 2005; Obe G. et al., 1997; Bochkov N.P., Katosova L.D., 1994].

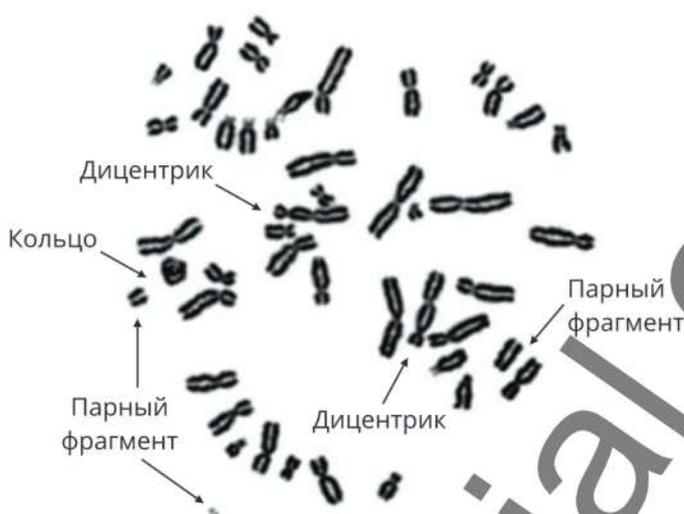


Рис. 5.18. Мультиаберрантная клетка (фото, монокромное окрашивание)

Мультиаберрантные клетки / *goque cells* встречаются достаточно редко. Их средняя частота на 1000 проанализированных клеток может варьировать от 0,04 до 0,37 в разных группах лиц, подвергшихся воздействию мутагенных факторов [Aseeva E. A. et al., 2009]. Также они наблюдаются у пациентов с онкопатологией, прошедших курс радиохимиотерапии, у лиц, перенесших острую лучевую болезнь [Ryabchenko N. I. et al., 2006; Druzhinin V. et al., 2016].

5.4.8. Хромотрипсис

Хромотрипсис (chromothripsis) определяется как механизм, посредством которого образуются от десятков до сотен локально сгруппированных перестроек ДНК, обычно в одной или нескольких хромосомах, вызванных одним событием, иногда сопровождаемым парными фрагментами (рис. 5.19) [Stephens P. J. et al., 2011]. Критерии определения хромотриптической клетки в литературе сильно варьируют. По разным данным, наблюдается от 5 до 20 повреждений на хромосому [Luijten M. N. H. et al., 2018]. Во время хромотрипса хромосома или плечо хромосомы разрушается, после чего происходит неполное и случайное восстановление фрагментов. Это может привести к появлению сильно перестроенной хромосомы или хромосомного фрагмента (рис. 5.19). В результате для каждого фрагмента хромотриптической хромосомы обнаруживаются только два, иногда три разных числа номеров копий. Кроме того, связанная с хромотрипсисом так называемая *хромоплексия* является *инклюзивной* терминологией.

Хромотрипсисные клетки имеют три основные характеристики:

- локализованные перестройки одной или нескольких хромосом;
- нарушение количества копий гена;
- потеря гетерозиготности;
- перестройка множественных фрагментов хромосомы [Morishita M. et al., 2016].

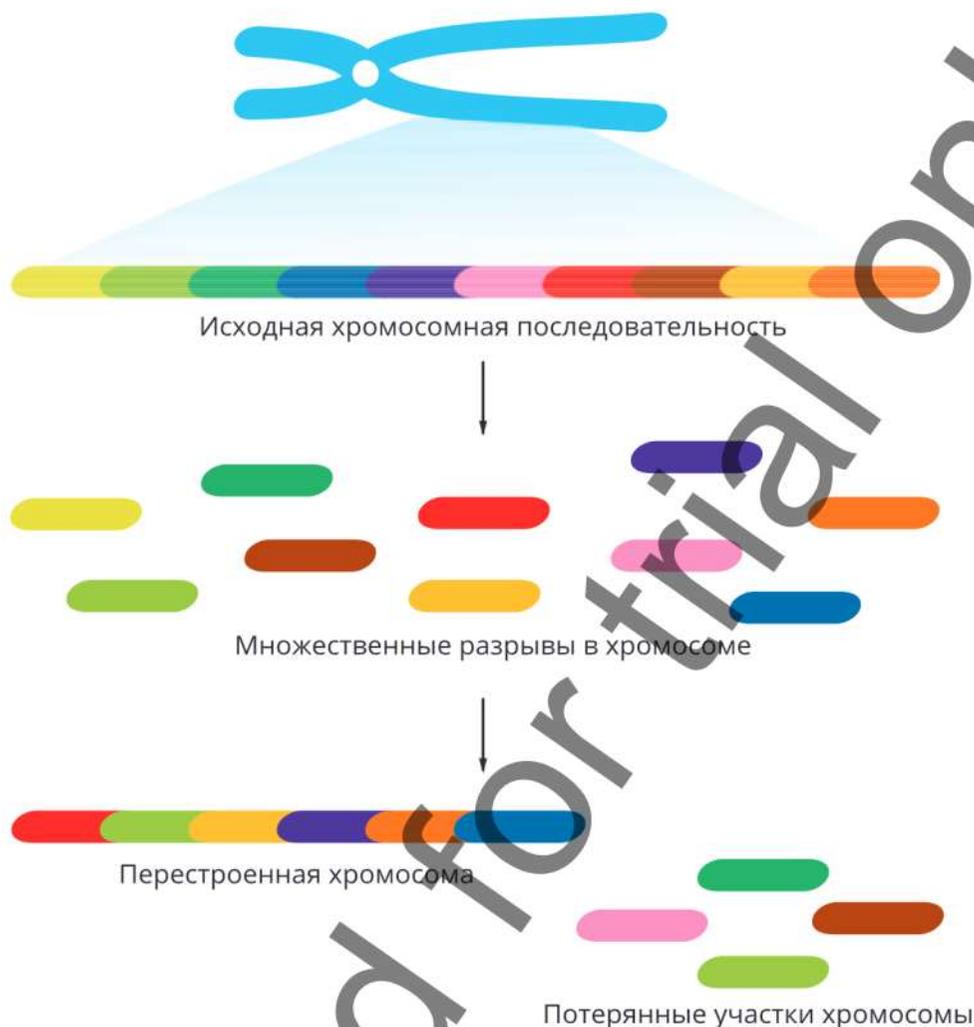


Рис. 5.19. Механизм хромотрипсиса

Этиологией хромотрипсиса является воздействие ионизирующего излучения, также обусловленное повышенной радиочувствительностью генома и ломкостью хромосом [Ly P. et al., 2017; Korbel J. O., Campbell P. J., 2013]. Хромотрипсис может быть следствием неслучайного повреждения генома после воздействия ионизирующего излучения из-за определенного распределения хромосомных территорий в интерфазе. Поэтому некоторые хромосомы более вовлечены в этот процесс и более чувствительны к воздействию ионизирующего излучения.

Хромотрипсис может быть связан с неопластическими изменениями ДНК, и предполагается, что он является ранним событием в канцерогенезе. Как сообщается, хромотрипсис встречается почти во всех типах рака с различной распространенностью. Предполагается, что это связано с хромосомной нестабильностью, вызванной мутациями в гене *TP53*, низкой способностью механизмов репарации ДНК. Кроме того, поскольку хромотрипсис вызывает хромосомные изменения и/или мутации, считается, что он тесно связан с развитием рака различных органов и систем [Hirsch D. et al., 2013].

Деление клеток

6.1. Клеточный цикл

Жизненный цикл клетки — это период выполнения клеткой различных функций: роста, дифференцировки и функционирования клеток, иногда специализации с потерей способности к делению, естественной гибели, а также период покоя.

Клеточный цикл — период жизни клетки от момента ее появления до гибели. У разных типов клеток клеточный цикл различается.

Митотический цикл клетки — это период в жизнедеятельности клетки с момента ее появления и до образования из одной материнской двух новых дочерних или новой генерации клеток; состоит из *митоза* (деление) и *интерфазы* (рис. 6.1) [Fukagawa T., Earnshaw W.C. et al., 2014].

Интерфаза (лат. *inter* + *phase* — между + фаза), **интеркинез** — это период жизненного цикла клетки между двумя последовательными митотическими делениями.

Интерфаза подразделяется на периоды: G0, G1, G2 и S (*gap* — промежуток) [Babu R. et al., 2018].

G1 (постмитотический, или предсинтетический) — это период роста и развития клетки, во время которого синтезируются белки (гистоны, структурные белки, ферменты), все виды РНК, пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды, АТФ, а также происходит образование рибосом и всех одномембранных органелл, деление митохондрий, восстанавливаются черты организации интерфазной клетки после предшествующего деления. Число хромосом (n) и молекул ДНК в хромосомах (c) одинаково ($2n2c$) [Lomiento M. et al., 2018].

G0 — клеточного цикла, в течение которого клетки находятся в состоянии относительного покоя и не делятся. Обычно клетки могут вступать в G0-период, когда происходит воздействие мутагенов и других неблагоприятных факторов (изменение температуры, стресс).

Описано, что в норме нервные клетки или клетки сердечной мышцы (кардиомиоциты) вступают в состояние покоя после окончания их дифференцировки и достижения зрелости. Они продолжают выполнять свои главные функции на протяжении всей жизни организма человека.

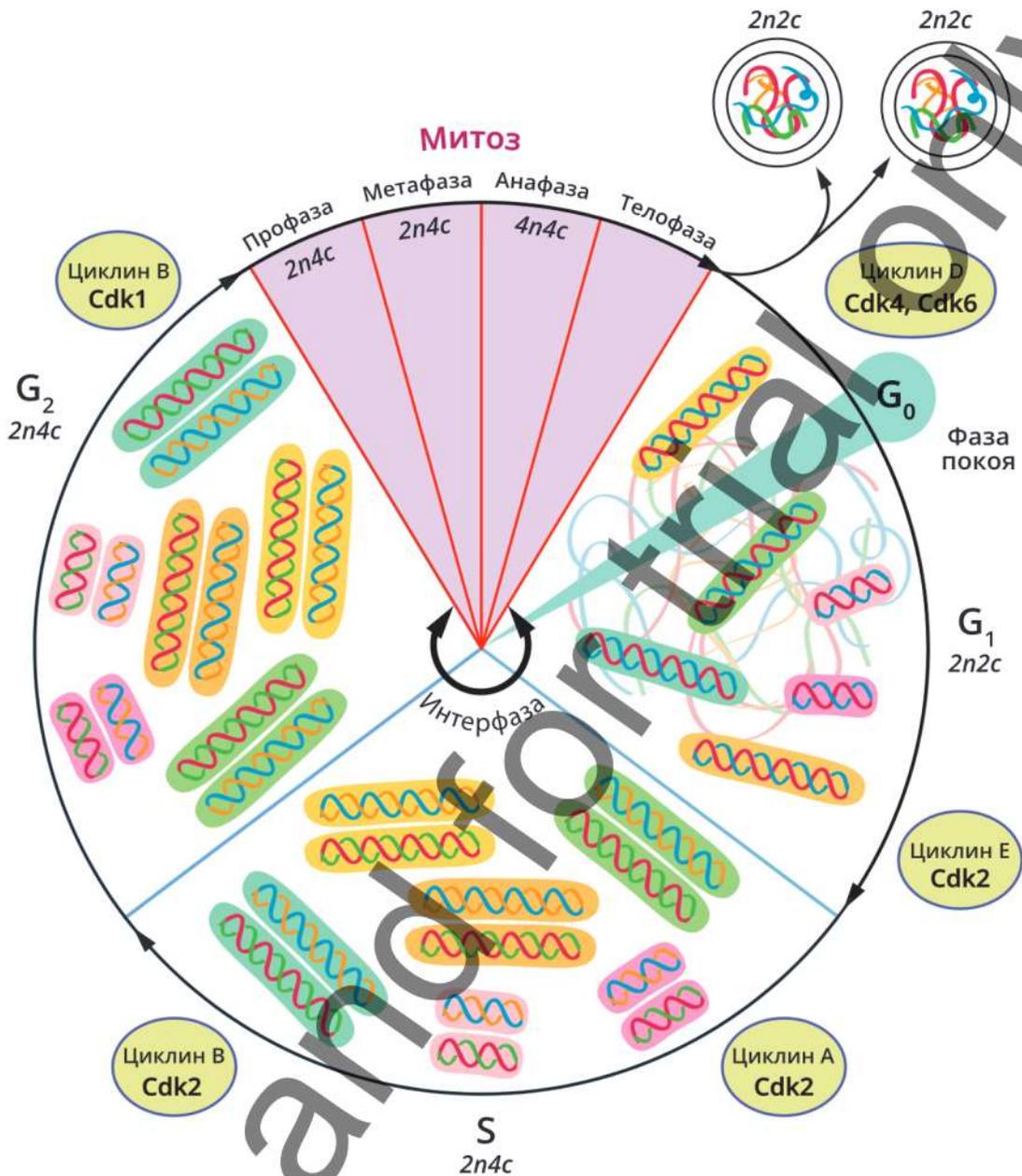


Рис. 6.1. Схема клеточного цикла

S (синтетический) — это период репликации ДНК, синтеза белков-гистонов и их миграция в ядро. Образуется centrosoma. Количество ДНК удваивается ($2n4c$) [Maier P. et al., 2016].

G₂ (постсинтетический, или предмитотический) — это период подготовки к делению клетки. Происходит интенсивный синтез цитоплазматических белков (например, белка тубулина, необходимого для формирования нитей веретена деления), синтез РНК, деление митохондрий, синтез АТФ, удвоение массы цитоплазмы, резкое возрастание объема ядра. Число хромосом (n) и молекул ДНК в хромосомах (c) составляет $2n4c$ [Wiman K. G. et al., 2017].

Во время интерфазы ДНК находится в расплетенном состоянии в виде клубка нитей, которые структурированы внутри ядра в зависимости от их активности в определенном типе ткани. Конденсация ДНК начинается в профазе митоза и доходит до сверхспирализованного состояния в виде хромосомы во время метафазы митоза [McKinley K.L. et al., 2016].

6.1.1. Регуляция клеточного цикла

Прохождение клетки по всем периодам клеточного цикла строго контролируется специальными *регуляторными белками* посредством их обратимого фосфорилирования и дефосфорилирования (табл. 6.1) [Barnum K.J., O'Connell M.J., 2014].

Они обеспечивают:

- прохождение клетки по определенному периоду клеточного цикла;
- переход из одного периода клеточного цикла в другой.

К регуляторным белкам относятся специальные белки-ферменты — *циклинзависимые протеинкиназы* (*cyclin-dependent kinases*, **Cdk**). Все они присутствуют в клетке постоянно, независимо от периода клеточного цикла. Для работы циклинзависимых протеинкиназ требуются специальные *белки-циклины*.

Циклины относятся к быстро обменивающимся белкам и присутствуют в клетках непостоянно. Например, период жизни циклинов типа D составляет 15–20 мин. Синтез каждого типа циклинов происходит в строго определенный период клеточного цикла. Это обеспечивает динамизм их комплексов с циклинзависимыми киназами. За внутриклеточную деградацию циклинов отвечает N-концевая последовательность аминокислотных остатков, названная «*боксом деградации*».

Сами по себе циклины не могут полностью активировать соответствующие Cdk. Для завершения процесса активации должны произойти специфическое фосфорилирование и дефосфорилирование определенных остатков аминокислот в полипептидных цепях этих протеинкиназ. Большую часть таких реакций осуществляет *киназа*, активирующая CDK (*Cdk activating kinase*, САК), которая представляет собой комплекс Cdk7 с *циклином H*.

Циклины делят на два семейства: **G1-циклины** (С, D и E) и **митотические** циклины (А и В).

pRb (*retinoblastoma protein*) — белок ретинобластомы, белок супрессора опухоли. Прекращает действие транскрипционных факторов.

MPF (*mitosis-promoting factor*, или *M-Phase-promoting factor*) — фактор, стимулирующий митотические и мейотические фазы клеточного цикла. MPF способствует проникновению в митоз (М-фазу) из фазы G2 путем фосфорилирования нескольких белков, необходимых во время митоза. MPF активируется в конце G2-периода фосфатазой, которая удаляет ранее ингибирующую фосфатную группу.

Таблица 6.1. Регуляция клеточного цикла

Период	Белок	Регуляция	
Интерфаза	G1-период	D1 + Cdk4 Циклин D2 + Cdk6 D3 + Cdk5	<ul style="list-style-type: none"> Запуск транскрипции гена киназы Cdk1. Воздействие на фосфорилирование белка-ингибитора pRb
		Циклин E + Cdk2	<ul style="list-style-type: none"> Регуляция второй половины G1
	R1 — точка рестрикции	Циклин C + Cdk2	<ul style="list-style-type: none"> Образование преинициаторного комплекса, который расплетает спираль ДНК и загружает ДНК-полимеразы
	G0-период	pRb	<ul style="list-style-type: none"> Блокирование стимуляции транскрипции генов, участвующих в пролиферации
	S-период	Циклин A + Cdk2 B + Cdk2	<ul style="list-style-type: none"> Контролирование репликации ДНК. Переход в G2-период
	G2-период	Циклин B + Cdk1	<ul style="list-style-type: none"> Переход в M-фазу
Циклин H + Cdk7 — активация Cdk2 в комплексе с циклином B			
Митоз	Профаза	M-Cdk	<ul style="list-style-type: none"> Фосфорилирование белков
	Прометафаза	Конденсин	<ul style="list-style-type: none"> Обеспечение конденсации хроматина, образование петель и правильной укладки ДНК в хроматиде
	Метафаза	MPF Когезины	<ul style="list-style-type: none"> Фосфорилирование нескольких белков, необходимых во время митоза
			<ul style="list-style-type: none"> Регулирование процесса разделения сестринских хроматид в ходе деления клетки
	Анафаза	Кинезины	<ul style="list-style-type: none"> Движение по микротрубочкам с использованием энергии гидролиза АТФ
Телофаза	Cdk Фосфатаза	<ul style="list-style-type: none"> Инактивация Cdk. Активация фосфатаз 	

Сверочные точки контроля клеточного цикла (точки рестрикции) (*checkpoints*) — это точки цикла деления эукариотической клетки, в которой прохождение цикла может быть остановлено до тех пор, пока не возникнут подходящие условия (см. табл. 6.2).

Таблица 6.2. Сверочные точки и их роль в процессе клеточного цикла

Название	Функция	Причина остановки цикла
G ₁ (R1) Первая точка рестрикции (старт). <i>G1 (restriction) checkpoint</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Клетка принимает решение войти в клеточный цикл. • Начинает удвоение хромосом 	<ul style="list-style-type: none"> • Двунитевые разрывы в ДНК в результате действия различных мутагенов. • Разрушение системы микротрубочек. • Неправильное соединение хромосом во время предшествующего деления
S Сверочная точка рестрикции в S-фазе. <i>The restriction point of cell cycle — S phase</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Контролирует правильность репликации ДНК 	<ul style="list-style-type: none"> • При недостатке нуклеотидов в клетках
G ₂ (R2) Сверочная точка рестрикции в G ₂ -фазе (контрольная) <i>DNA damage checkpoint</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Остановка процесса в G₂-фазе клеточного цикла 	<ul style="list-style-type: none"> • Неполная репликация ДНК. • Повреждения, пропущенные при прохождении предыдущих сверочных точек либо полученные на последующих стадиях клеточного цикла
Сверочная точка сборки веретена деления. <i>Spindle-assembly checkpoint</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Переход от метафазы к анафазе. • Окончание кариокинеза и начало цитокинеза. • Клетки задерживаются в метафазе до тех пор, пока все кинетохоры* не будут прикреплены к микротрубочкам 	<ul style="list-style-type: none"> • Разрушение неприкрепленных кинетохор лазерным пучком инициирует начало анафазы, в ходе которой происходят отставание хромосом, не прикрепленных к веретну деления, и образование из них микроядер. • Определяющую роль в индукции остановки в метафазе играют изменения взаимодействий, ассоциированных с кинетохорами белков BUB1, BUBR1, MAD1 и MAD2

* Подробнее о кинетохоре см. в гл. 7, п. 7.3.3.

Фактор роста — это внеклеточный сигнальный белок, который стимулирует рост клеток и выполняет и другие функции, например, стимуляцию выживания или пролиферацию клеток (табл. 6.3).

Таблица 6.3. Характеристика факторов роста

Название	Номер в MIM	Локализация на хромосоме	Функция	Патология
PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) Тромбоцитарный фактор роста	190040	22q13.1	Митоген для клеток мезенхимального происхождения (фибробласты, гладкомышечные клетки и глиальные клетки). Важная роль в эмбриональном развитии, пролиферации, миграции клеток и ангиогенезе*	Аномальная экспрессия гена PDGF: <ul style="list-style-type: none"> • атеросклероз; • фиброзные расстройтва; • злокачественные новообразования
VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) Белок роста эндотелия сосудов	601398	11q13.1	Сигнальный белок, вырабатываемый клетками для стимулирования ангиогенеза и васкулогенеза	Последствия повышенной экспрессии: <ul style="list-style-type: none"> • сахарный диабет; • рак яичников, молочной железы; • ревматоидный артрит
FGF (Fibroblast Growth Factor) Фактор роста фибробластов (αFGF, βFGF, KFGF, FGF-5, FGF-6, FGF-8, FGF-9)	164980	11q13.3	Многофункциональный белок, участвующий в ангиогенезе, заживлении ран и эмбриональном развитии	Повышенный уровень фактора: <ul style="list-style-type: none"> • при солидных опухолях; • лейкозах; • лимфомах
IGF1, IGF2 (Insulin-Like Growth Factor I/II) Инсулиноподобный фактор роста 1/2	147440	12q23.2	Семейство белков, играющих роль в росте и развитии клеток	Экспрессия влияет на проявление: <ul style="list-style-type: none"> • ревматических заболеваний; • сердечнососудяльных заболеваний; • синдромов, связанных с метаболизмом клетки
NGF (Nerve Growth Factor) Фактор роста нервов	162030	1p13.2	Отвечают за жизнеспособность нейронов, их развитие и активность	Снижение уровня наблюдается: <ul style="list-style-type: none"> • при нейродегенеративных заболеваниях; • шизофрении; • синдроме Альцгеймера

Окончание табл. 6.3

Название	Номер в МIM	Локализация на хромосоме	Функция	Патология
HGF (<i>Hepatocyte Growth Factor</i>) Фактор роста гепатоцитов	142409	7q21.11	Мультифункциональный цитокин, стимулирует клеточную пролиферацию	Метастазирование при раке легких, молочной железы, поджелудочной железы, кожи
TGFB1 (<i>Transforming Growth Factor, β-1</i>) Трансформирующий фактор роста β -1	190180	19q13.2	Белок из семейства цитокинов, отвечает за клеточную пролиферацию и дифференцировку	<ul style="list-style-type: none"> • Онкопатология. • Сердечно-сосудистые заболевания. • Сахарный диабет. • Синдром Марфана. • Болезнь Паркинсона
IL1 (<i>Interleukin 1</i>) Интерлейкин 1	147720	2q14.1	Активирует лимфоциты и нейтрофилы	Является медиатором воспалительных реакций
IL3 (<i>Interleukin 3</i>) Интерлейкин 3	147740	5q31.1	Белок цитокин стимулирует дифференцировку клеток-предшественниц кроветворения	Стимулирует пролиферацию стволовых клеток и большинства клеток-предшественниц многих дифференцированных клеток
IL10 (<i>Interleukin 10</i>) Интерлейкин 10	146933	11q23.3	Белок цитокин с противовоспалительным эффектом	Развитие ишемической болезни сердца
Эритропоэтин (<i>Erythropoietin</i>)	133171	19p13.2	Гормон гемопоэза***	Стимулирует пролиферацию клеток-предшественниц эритроцитов

* Ангиогенез — рост новых сосудов в уже существующей сосудистой системе.

** Васкулогенез — образование эмбриональной сосудистой системы.

*** Гемопоэз — процесс образования, развития и созревания клеток крови.

6.1.2. Нарушения в клеточном цикле

Мутации в генах, ответственных за прохождение клетки по определенной фазе, являются основной причиной нарушений процессов в клеточном цикле. Это имеет важное значение в этиологии различных типов рака [Muller S., Almouzni G., et al., 2017].

Регуляция клеточного цикла осуществляется комплексами циклинов (A, B, D, E) с циклинзависимыми киназами (CDK1, -2, -4 и -6) (см. табл. 6.1). Эти комплексы регулируются двумя классами ингибиторов клеточного цикла: белками INK4, включая p16 (INK4a) и p15 (INK4b), и семейством белков Cip/Kip, включая p21, p27 и p57.

Ряд ингибиторов может блокировать специфические комплексы циклинов и циклинзависимых киназ. Общеизвестный опухолевый супрессор белок p53, который кодируется геном *TP53*, также является частью контроля клеточного цикла. Он служит фактором транскрипции, специфически связывается с ДНК и регулирует гены-мишени, участвующие в различных клеточных процессах. Белок p53 может активировать транскрипцию ряда генов, которые индуцируют остановку клеточного цикла, или апоптоз [Chen Q. et al., 2014].

К отличительной особенности раковых клеток относят нарушения сигналов роста и нечувствительность к антивозрастным сигналам. Они могут быть связаны с aberrантной пролиферацией из-за активации классических онкогенов (например, *Myc* и *Ras*) и нарушением pRB-опосредованного регулирования перехода фазы G1 в фазу S. Потеря или инактивация RB1 происходит с разной частотой в различных типах опухолевых клеток.

6.2. Митоз

Митоз (от др.-греч. *mítos* — нить) — непрямоe деление клетки. Оно состоит из двух непохожих процессов — кариокинеза и цитокинеза.

Кариокинез — деление ядра, при котором реплицировавшиеся хромосомы распределяются по дочерним ядрам (заканчивается в анафазе).

Цитокинез — деление цитоплазмы между двумя ядрами и образование отдельных клеток (начинается в телофазе).

Митотический индекс — доля клеток в митозе [Sullivan K.F., 2001].

6.2.1. Значение митоза и его этапы

Митоз — основа всех форм бесполого размножения как у одноклеточных, так и у многоклеточных организмов. Выделяют четыре его основных этапа: профазу, метафазу, анафазу и телофазу (см. рис. 6.2, табл. 6.4) [Garzon-Coral C. et al., 2016].

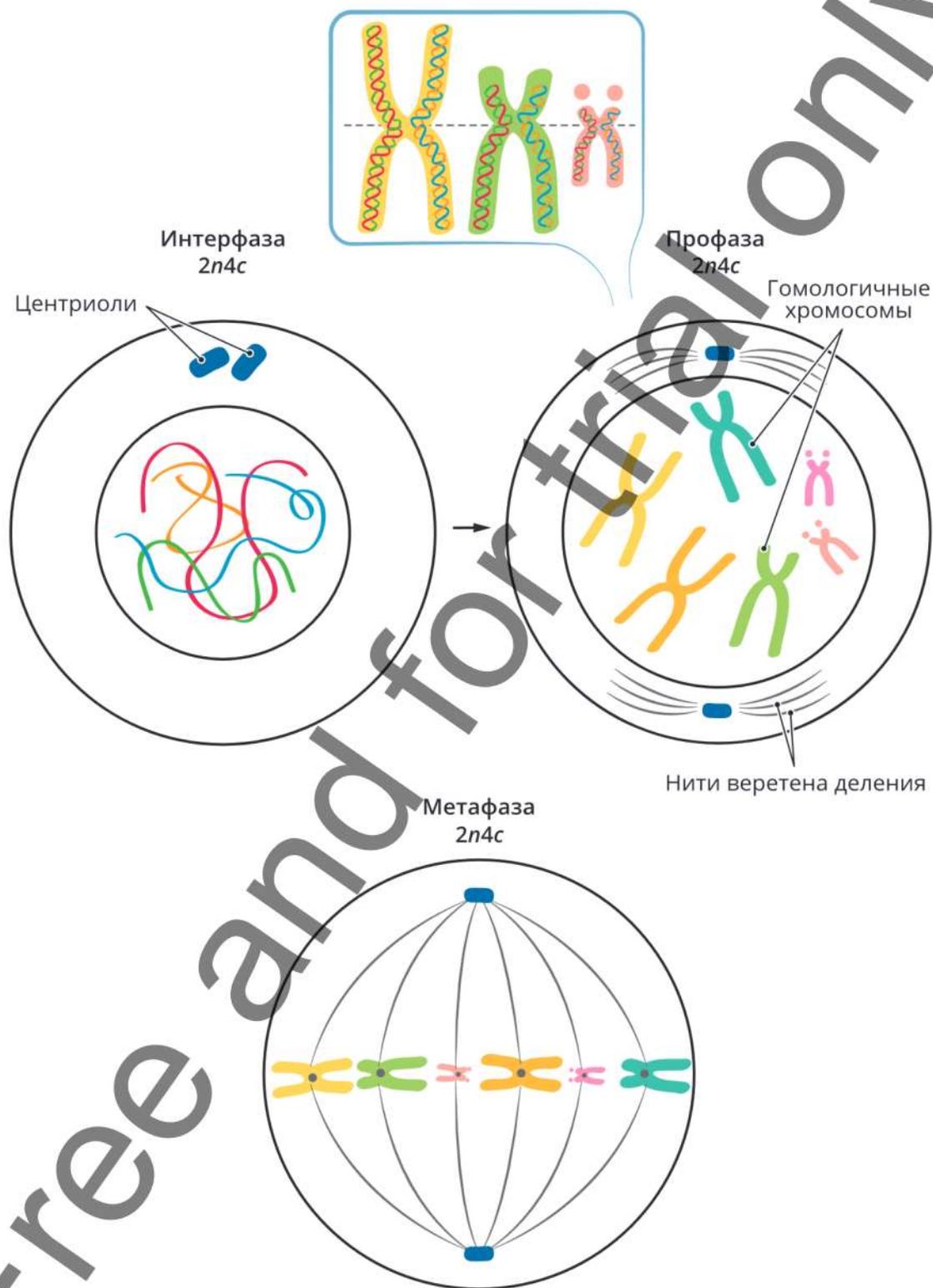
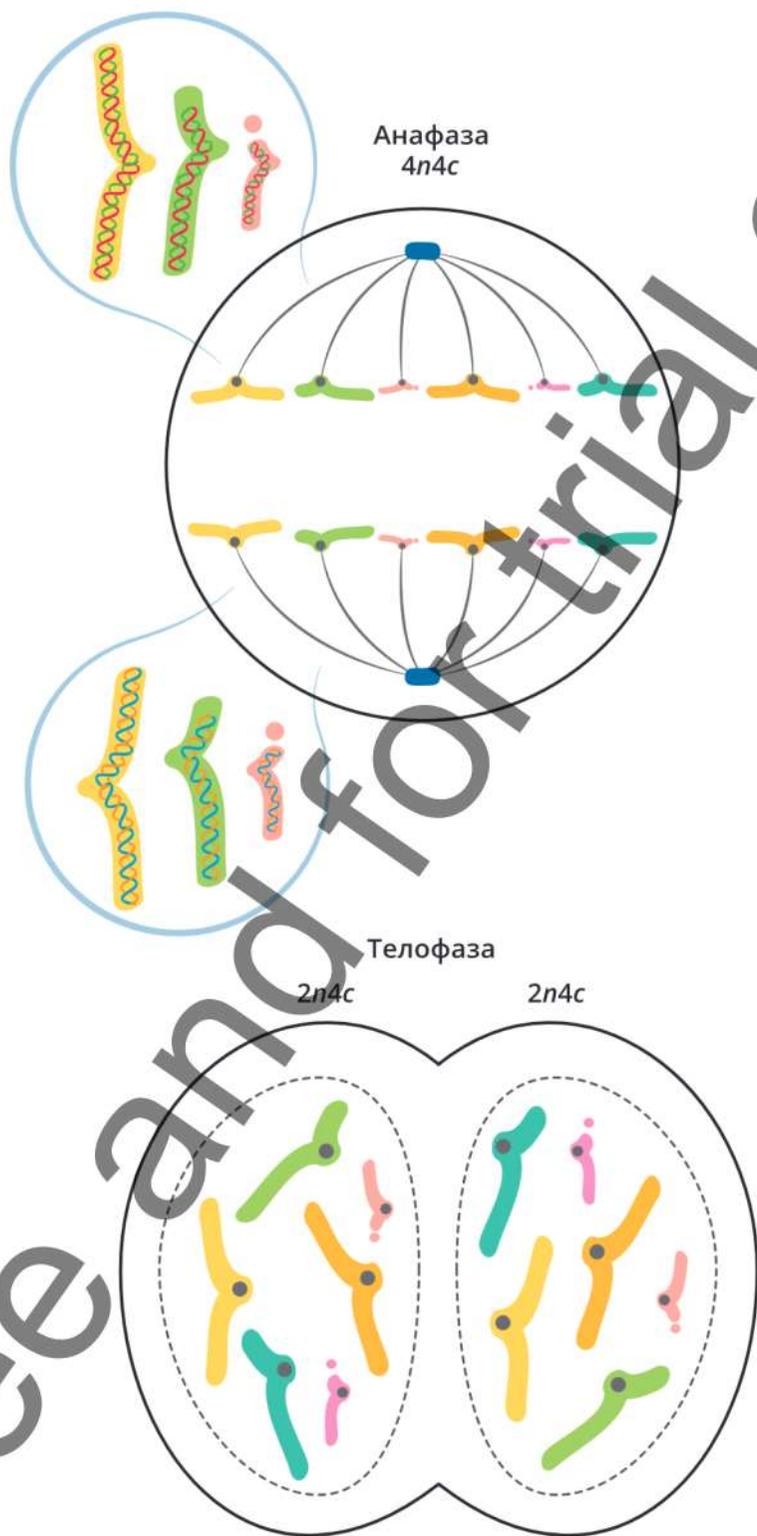


Рис. 6.2. Этапы митоза



Free and for trial only

Таблица 6.4. Характеристика этапов митоза

Период (число хромосом n и молекул ДНК c)	Процесс, происходящий в клетках
Профаза ($2n4c$)	В ранней профазе клетка начинает терять нормальную форму. Реплицированные хромосомы конденсируются за счет активности фосфорилаз, модифицирующих гистоны. Собирается веретено деления. Снижается транскрипционная активность хроматина. Происходит инактивация ядрышковых генов. Большая часть ядрышковых белков диссоциирует. Сестринские хроматиды в ранней профазе остаются спаренными по всей своей длине с помощью белков-когезинов. К поздней профазе на каждой центромере сестринских хроматид формируются зрелые кинетохоры, необходимые хромосомам для присоединения к микротрубочкам веретена деления в прометафазе
Прометафаза	Разрушается ядерная мембрана. Хромосомы с помощью кинетохор присоединяются к нитям веретена деления и активно двигаются
Метафаза ($2n4c$)	Метафаза занимает значительную часть периода митоза. Хромосомы удерживаются в экваториальной плоскости. Веретено деления совершает колебательные движения за счет натяжения кинетохорных микротрубочек. Продолжается активное обновление микротрубочек. Их численность достигает максимума. К окончанию метафазы наблюдается четкое обособление сестринских хроматид. Они остаются соединенными между собой только в центромерных участках. Плечи хроматид располагаются параллельно друг другу
Анафаза ($4n4c$)	Происходят разделение и последующее расхождение сестринских хроматид к противоположным полюсам клетки. В анафазу А хромосомы разделяются на сестринские хроматиды. Укорачиваются трубочки кинетохора. Дочерние хромосомы движутся по полюсам. В анафазу В происходит расхождение самих полюсов веретена деления
Телофаза ($2n2c$)	В ранней телофазе наблюдается деконденсация хромосом. ДНК увеличиваются в объеме. Вблизи сгруппированных индивидуальных хромосом начинается слияние мембранных пузырьков, что дает начало реконструкции ядерной оболочки. Внутри заново сформировавшихся клеточных ядер хроматин переходит в дисперсное состояние, возобновляется синтез РНК и становятся различимыми ядрышки. Параллельно с процессами образования ядер дочерних клеток в телофазе начинается и заканчивается разборка микротрубочек веретена деления

Биологическое значение митоза велико, он обеспечивает:

- точное и равномерное распределение хромосом, что приводит к тому, что все клетки единого организма генетически одинаковы;
- наследственную передачу признаков и свойств в ряду клеточных поколений при развитии многоклеточного организма;

- основу роста, развития, восстановления тканей и органов, многоклеточного организма.

В некоторых клетках наблюдаются такие способы деления, как амитоз и эндомитоз.

Амитоз — это прямое деление ядра, характерное для некоторых дифференцированных тканей: клеток скелетной мускулатуры, кожи, соединительной ткани, а также в патологически измененных тканях. Он никогда не встречается в оплодотворенных яйцеклетках, клетках нормально развивающегося эмбриона.

При амитозе происходит деление ядра на две практически равные части без образования митотического аппарата (системы микротрубочек, центриолей, структурированных хромосом). Если при этом деление заканчивается, возникает клетка с двумя ядрами. Но иногда перешнуровывается и цитоплазма [Meng F.W., Biteau B., 2017].

Эндомитоз — тип деления, при котором не происходит разделения хромосом на две дочерние хроматиды и в результате возникают полиплоидные клетки. Этот процесс происходит в интенсивно функционирующих клетках. Так, в клетках печени (гепатоцитах) полиплоидия встречается довольно часто. С генетической точки зрения эндомитоз — это геномная соматическая мутация [Cowley S.A. et al., 1992].

6.2.2. Регуляция митоза

Митоз является частью митотического/клеточного цикла клетки. Плечи сестринских хроматид связаны за счет белков — *когезинов*. Утрата когезии сестринскими хроматидами в митозе зависит от белка APC C, который приводит к разрушению *секурина*, активации *сепаразы* и разрезанию когезина вдоль плеч. Сохранность остается только в области центромеры. Когезин в области центромеры защищен от сепаразы. В начале анафазы происходит активация белка APC C, который, в свою очередь, вызывает расщепление когезинов и расхождение сестринских хроматид [Kishimoto T., 2015].

6.2.3. Патологии митоза

Патологии митоза могут быть вызваны воздействием различных мутагенных факторов, стресса и др. К основным патологиям митоза относят повреждения хромосом и митотического аппарата, а также нарушения цитокинеза.

Повреждение хромосом приводит:

- к задержке митоза в профазе;
- нарушению спирализации и деспирализации хромосом;
- раннему/преждевременному разделению хроматид в профазе;
- образованию хромосомных и хроматидных мостов;
- образованию микроядер.

Повреждение митотического аппарата (веретена деления) ведет:

- к задержке митоза в метафазе;

- рассеиванию хромосом в метафазе;
- многополюсному митозу;
- асимметричному митозу.

Нарушение цитокинеза вызывает:

- раннюю цитотомию в анафазе;
- запаздывание или полное отсутствие цитотомии.

6.3. Обновление клеток организма

С обновлением клеток и тканей нашего организма мы сталкиваемся ежедневно. Например, наши волосы выпадают регулярно, но это обычно не ведет к облысению; или мы сдаем кровь без ущерба для постепенного истощения нашей системы кровообращения. Есть и другие примеры — регенерация тканей после пореза кожи, переломов и других травм. Так, в нашем организме около $3 \cdot 10^{13}$ эритроцитов. Они обновляются каждые 4 мес. Подсчитано, что каждую минуту в нашем организме образуется около 100 млн новых эритроцитов.

Все эти примеры указывают на замещающую скорость клеток, характерную для разных тканей и в разных условиях. И, конечно, очевидно, что для многих типов клеток обновление является частью их жизненного цикла. Ниже представлены примеры клеток тканей и органов и скорость их обновления (табл. 6.5).

Таблица 6.5. Скорость обновления некоторых клеток организма

Клетки тканей и органов	Жизненный цикл (скорость обновления)
Клетки эпителия тонкой кишки	2–4 дня
Клетки эпителия желудка	2–9 дней
Нейтрофилы	1–5 дней
Эозинофилы	2–5 дней
Тромбоциты	10 дней
Эритроциты	4 мес.
Клетки шейки матки	6 дней
Альвеолы легких	8 дней
Клетки Панета	20 дней
Клетки эпидермиса кожи	10–30 дней
Клетки трахеи	1–2 мес.

Окончание табл. 6.5

Клетки тканей и органов	Жизненный цикл (скорость обновления)
Гематopoэтические стволовые клетки	2 мес.
Костные остеокласты/остеобласты	2 нед./3 мес.
Гепатоцитарные клетки печени	0,5–1 год
Адипоциты (клетки жировой ткани)	8 лет
Кардиомиоциты	0,5–30,0 % в год в зависимости от пола и возраста
Клетки хрусталика глаза	Не обновляются в течение жизни
Сперматозоиды	2 мес.
Ооциты (овоциты)	Не обновляются в течение жизни

6.3.1. Апоптоз

От своего «рождения» до гибели (апоптоза) клетки проходят определенное количество нормальных клеточных циклов. После каждого из них клетка переходит либо к новому клеточному циклу, либо к апоптозу. Таким образом, апоптоз прерывает бесконечность клеточных делений [Gewies A., 2003].

Клеточная гибель имеет важное значение в онтогенезе. Она не прекращается и у взрослых лиц. Так, в костном мозге и кишечнике взрослого человека погибают миллиарды клеток каждый час. Однако ткани остаются в целостности и сохранности, т. к. деление клетки в точности компенсирует гибель клеток [Vaux D. L. et al., 1999].

Апоптоз (*apoptosis*, от греч. ἀπό- + πῶσις — без, из, от + падение, умирание: листопад) — запрограммированная гибель клетки, регулируемая самим организмом. Апоптоз происходит в нормальных физиологических условиях, и сама клетка является активным участником этого процесса (см. рис. 6.5, А). При апоптозе происходит гибель только отдельных клеток, а не клон клеток [Archana M. et al., 2013].

Основной функцией апоптоза является элиминация дефектных (поврежденных, мутантных, инфицированных) клеток.

Апоптоз может быть индуцирован в ответ на различные сигналы как внутри клетки, так и извне (см. табл. 6.6). Сигналы могут активировать комплекс индуцирующих гибель сигналов (*Death-Inducing Signaling Complex, DISC*), который отвечает за инициаторную каспазу-8. Она активирует каскад каспаз: -3, -6, -7. Разрушение каспаз ведет к характерной морфологии апоптоза. Митохондриальный апоптозный сигнал заключается в перемещении цитохрома С клеточного цитозольного белка в цитозоль с образованием в дальнейшем *апоптосомы*. Апоптосома состоит из цитохрома С, Аraf-1, дезоксиаденозинтрифосфата (dATP), она активирует каспазу-9 (см. табл. 6.7, рис. 6.3). Существует ряд генов, играющих важную роль при апоптозе внешнего пути активации (см. табл. 6.8).

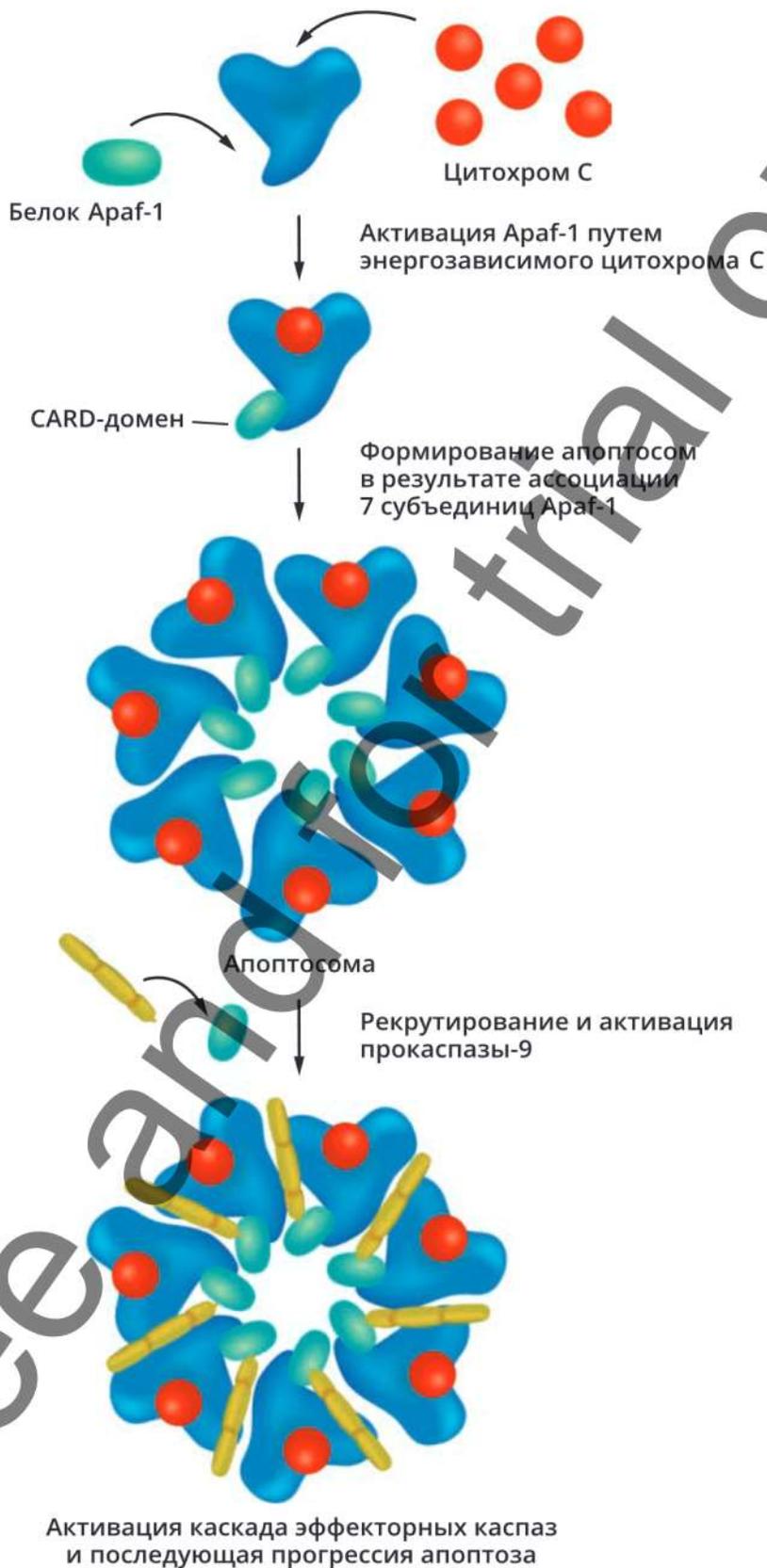


Рис. 6.3. Активация каскада эффекторных каспаз при апоптозе

Таблица 6.6. Факторы, индуцирующие апоптоз

Индукторы апоптоза	Факторы
Нерепарируемые повреждения хромосом	Различные виды облучения, химические мутагены направленного спектра действия
Аберрации хромосом	Ионизирующее излучение, химические вещества, температура
Многочисленные разрывы ДНК	Химические вещества, вирусы
Межнитевые сшивки	Химические вещества, встраивающиеся в структуру ДНК, ингибиторы топоизомераз
Неправильная сегрегация хромосом	Числовые аберрации, возникающие в мейозе, робертсоновские транслокации
Повреждения внутриклеточных мембран митохондрий	Перекисное окисление липидов, действие фосфолипаз, растяжение мембран под действием осмотического давления

Таблица 6.7. События, происходящие в клетке при апоптозе

Изменение хроматина	Морфологическое изменение клетки
<p>Хроматин:</p> <ul style="list-style-type: none"> • набухает (<i>chromatin blebbing</i>); • конденсируется; • фрагментируется. <p>Ядерные ферменты эндонуклеазы избирательно разрезают линкерные участки ДНК, что приводит к образованию моно- и олигонуклеосомных фрагментов ДНК</p>	<p>Клетка:</p> <ul style="list-style-type: none"> • теряет свою форму, становится округлой; • уменьшается в объеме; • разрушается ее ядерная оболочка; • цитоплазматическая мембрана сморщивается, проницаемость не нарушается (см. рис. 6.4)

Клетка распадается (в среднем за 90 мин) на *апоптотические тельца* — фрагменты, окруженные мембраной. Соседние клетки или *макрофаги* поглощают (*фагоцитируют*) их до того, как они успеют выплеснуть содержимое наружу, т. е. воспалительной реакции не возникает. В процесс апоптоза включены митохондрии, ядро, лизосомы и эндоплазматическая сеть. Морфологически регистрируемый процесс апоптоза продолжается 1–3 ч.

В организме взрослого человека ежедневно в результате апоптоза гибнет 50–70 млрд клеток. Апоптоз наиболее часто наблюдается в течение обычного клеточно-го обновления, при поддержании тканевого гомеостаза, в эмбриогенезе, при индукции и поддержании иммунологической толерантности, тканевой атрофии [Kam P.C.A., Ferch N.I., 2000]. С помощью апоптоза гибнут миллионы клеток крови, эпидермиса кожи, слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта и др. После овуляции погибает часть фолликулярных клеток яичника, после лактации — клетки молочных желез.

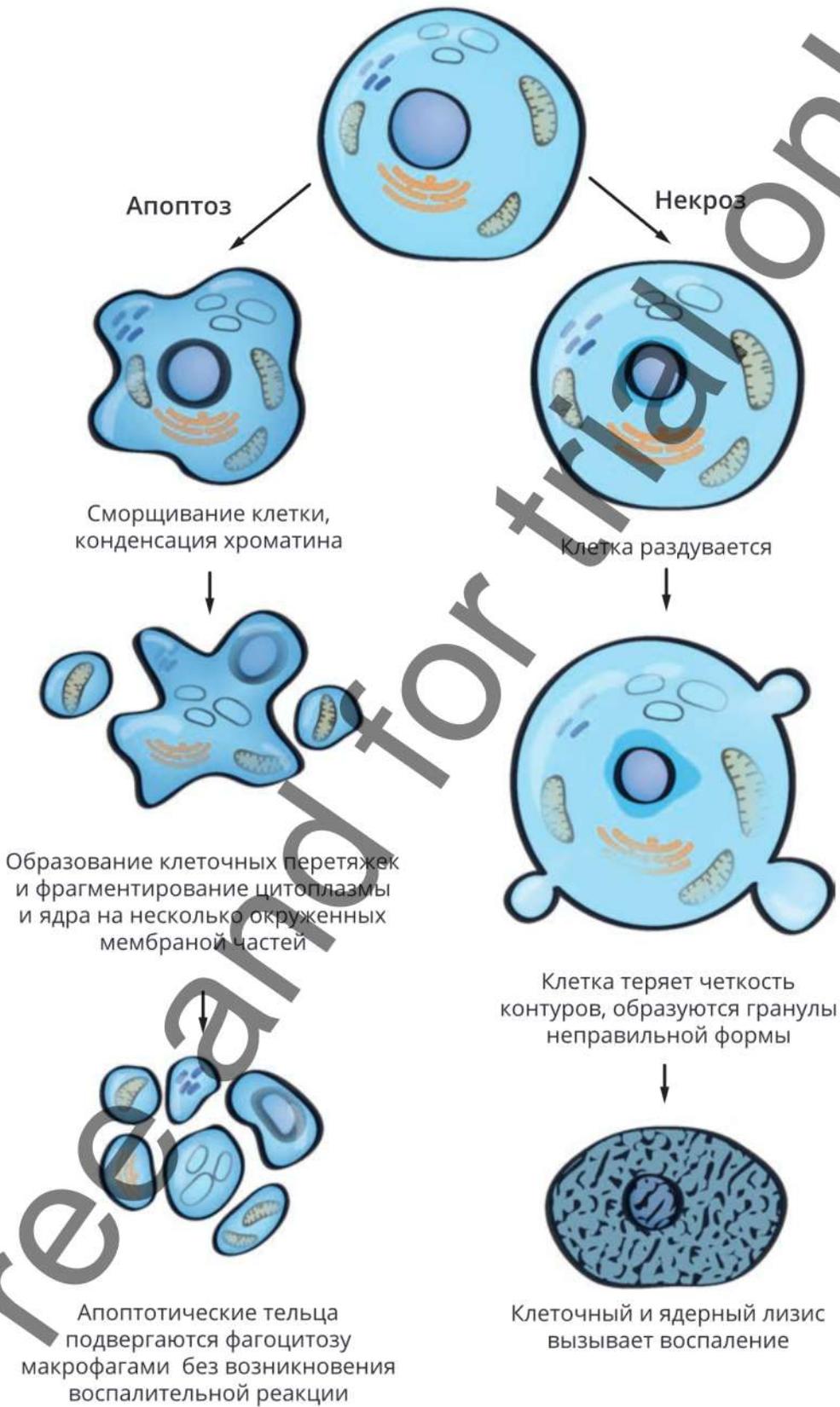


Рис. 6.4. Морфологические изменения клетки при апоптозе и некрозе

Таблица 6.8. Характеристика генов апоптоза

Локализация на хромосоме	Название гена	Синонимы	Номер в MIM	Активность гена
1q24.3	<i>FASLG</i> — <i>Fatty acid synthetase ligand</i>	<i>ALPS1B, APT1LG1, APTL, CD178, CD95-L, CD95L, FASL, TNFSF6, TNLG1A</i>	134638	Рекомбинантный, участие в индукции апоптоза
1p36.31	<i>TNFRSF25</i> — <i>TNF receptor superfamily member 25</i>	<i>APO-3, DDR3, DR3, GEF720, LARD, PLEKHG5, TNFRSF12, TR3, TRAMP, WSL-1, WSL-LR</i>	603366	Возможное участие в регуляции гомеостаза лимфоцитов, стимулировании активности белка NF- κ B и регуляции апоптоза
2q33.1	<i>CFLAR</i> — <i>CASP8 and FADD like apoptosis regulator</i>	<i>CASH, CASP8AP1, CLARP, Casper, FLAME, FLAME-1, FLAME1, FLIP, FLICE, MRIT, c-FLIP, c-FLIPL, c-FLIPR, c-FLIPS, cFLIP</i>	603599	Возможное вовлечение в тканевой гомеостаз в качестве основного регулятора апоптоза
2q36.3	<i>AGFG1</i> — <i>ArfGAP with FG repeats 1</i>	<i>HRB, RAB, RIP</i>	603453	Ключевая сигнальная молекула в процессе некроза, которая играет важную роль в развитии, ответе на тканевое повреждение и при антивирусном иммунитете
3q26.31	<i>TNFSF10</i> — <i>TNF-superfamily member 10</i>	<i>APO2L, Apo-2L, CD253, TL2, TNLG6A, TRAIL</i>	603598	Индукция апоптоза в широком спектре трансформированных клеточных линий различного происхождения
5p21.33	<i>TNF-α</i> — <i>Tumor necrosis factor alpha</i>	<i>DIF-alpha, TNFA, TNFSF2, TNLG1F, TNF</i>	191160	Участие в метаболизме липидов, коагуляции, резистентности к инсулину и в эндотелиальной дисфункции

Окончание табл. 6.8

Локализация на хромосоме	Название гена	Синонимы	Номер в MIM	Активность гена
8p21.3	<i>TNFRSF10A</i> — TNF receptor superfamily member 10a	<i>APO2, CD261, DR4, TRAILR-1, TRAILR1</i>	603611	Участие в передаче сигнала клеточной гибели
8p21.3	<i>TNFRSF10B</i> — TNF receptor superfamily member 10b	<i>CD262, DR5, KILLER, KILLER/DR5, TRAIL-R2, TRAILR2, TRICK2, TRICK2A, TRICK2B, TRICKB, ZTNFR9</i>	603612	Объединение противоположных сигналов белкового фолдинга для связывания стресса эндоплазматической сети и апоптозной гибели клеток
10q23.31	<i>FasR</i> — Cell surface death receptor	<i>ALPS1A, APO-1, APT1, CD951, FASTM, TNFRSF6, FAS</i>	134637	Индукция клеточной гибели — автономный апоптоз
11q13.3	<i>FADD</i> — Fas-associated via death domain	<i>GIG3, MORT1</i>	602457	Универсальный адапторный белок в процессе апоптоза, который связывает все домены клеточной гибели из семейства TNF
12p13.31	<i>TNFRSF1A</i> — TNF receptor superfamily member 1A	<i>CD120a, FPF, TBP1, TNF-R, TNF-R-1, TNF-R55, TNFAR, TNFR1, TNFR55, TNFR60, p55, p55-R, p60</i>	191190	Цитокин, который вызывает широкий спектр биологических ответов и опосредован связыванием с клеточными рецепторами
16q22.1	<i>TRADD</i> — TNF receptor-associated via death domain	<i>Hs.89862</i>	603500	Приводит к TNF-индуцированному апоптозу и активации ядерного фактора (<i>factor kappa-B, NF-kB</i>)
17q12	<i>AATF</i> — apoptosis antagonizing transcription factor	<i>BFR2, CHE-1, CHE1, DED</i>	608463	Является строительным белком, который направляет каспазу-3 на определенный субстрат и облегчает деградацию в момент апоптоза
17p13.1	<i>TNFSF12</i> — TNF superfamily member 12	<i>APO3L, DR3LG, TNLG4A, TWEAK</i>	602695	Индукция апоптоза в клетках рака толстого кишечника

6.3.2. Некроз

Некроз — отмирание клеток и тканей в живом организме или случайная их гибель, вызванная воздействием самых разнообразных факторов: различных мутагенов (в том числе токсинов, выделяемых болезнетворными микроорганизмами), изменения температуры и др. Наглядный пример некроза лимфоцитов периферической крови после тестирующего γ -облучения в дозе 2 Гр представлен на [рис. 6.5, Б](#). Некротическая гибель клеток может также происходить в результате их механического повреждения, нарушения кровоснабжения и иннервации тканей, при аллергических реакциях [Chen Q. et al., 2014].

В поврежденных клетках происходят следующие процессы:

- нарушение проницаемости мембран;
- остановка синтеза белков;
- прекращение иных процессов обмена веществ;
- разрушение ядра, органоидов;
- гибель всей клетки.

Особенностью некроза является то, что он поражает целые группы клеток (например, при инфаркте миокарда из-за прекращения снабжения кислородом отмирает участок сердечной мышцы, содержащий множество клеток) [Kung G. et al., 2014]. Обычно отмирающие клетки подвергаются атаке лейкоцитов, при этом некротические клетки разбухают и разрываются, содержимое выливается на соседние клетки, и возникает воспалительная реакция.

Сравнение апоптоза и некроза представлено в [табл. 6.9](#).

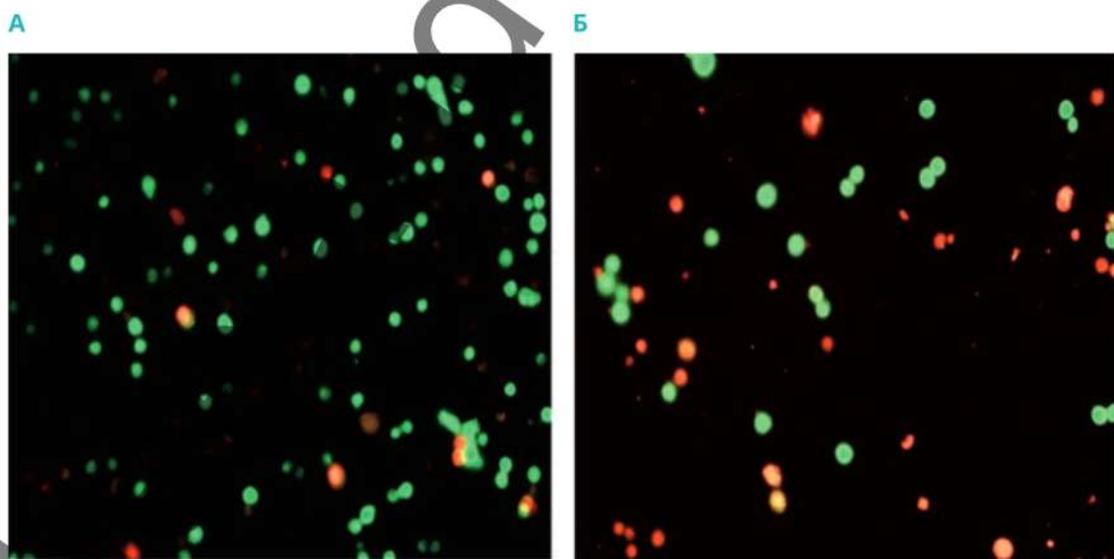


Рис. 6.5. Лимфоциты периферической крови после γ -облучения *in vitro* в дозе 2 Гр: **А** — апоптоз; **Б** — некроз (фотография, пожизненное окрашивание — акридин-оранжевый и пропидиум-йодид). Живые клетки — зеленого, апоптотические клетки — оранжевого, некротические клетки — ярко-красного цветов

Таблица 6.9. Сравнение морфологических характеристик апоптоза и некроза

Процесс	Апоптоз	Некроз
Вовлечение	Одиночные клетки или малые кластеры клеток	Смежные клетки
Изменение морфологии клеток	Сжатие и скручивание	Набухание
Внутриклеточные процессы	<ul style="list-style-type: none"> • Пикноз* • Кариорексис** 	<ul style="list-style-type: none"> • Кариолизис. • Пикноз. • Кариорексис
Мембрана клетки	Интактная	Нарушенная
Цитоплазма	Сохраняется	Расщепляется
Воспаление	Нет	Есть

* Пикноз (от греч. πικνός — плотный) — уплотнение, сморщивание ядра.

** Кариорексис (от греч. κάριον — орех, ядро и ρήσις — разрыв) — распад клеточного ядра на части.

6.3.3. Аутофагия

Аутофагия — процесс деградации клеток, который играет важную роль в клеточном гомеостазе, выживаемости клетки, защите генома. Происходит благодаря деградации органелл цитоплазмы, белков и макромолекул. Принято считать его одним из видов программируемой клеточной гибели. Нарушение процесса аутофагии может приводить к различным патологиям [Ravanan P. et al., 2017].

В животных клетках есть три типа аутофагии: *микроаутофагия*, *макроаутофагия*, *аутофагия при посредничестве шаперонов* (табл. 6.10).

Таблица 6.10. Характеристика типов аутофагии

Тип	Процесс
Микроаутофагия	Впячивание мембраны лизосомы для захвата макромолекул и органелл, которые затем отделяются в виде внутренних пузырьков
Макроаутофагия	<p>Формирование <i>de novo</i> в клетках <i>аутофагосом</i> (двумембранные образования), внутри которых происходит деградация органелл и цитоплазматического материала. При слиянии аутофагосом с лизосомами образуются <i>аутофаголизосомы</i>, в которых и расщепляются подлежащие уничтожению компоненты клетки.</p> <p>Частью процесса макроаутофагии является <i>митофагия</i>. В этом случае происходит селективное уничтожение (деградация) поврежденных митохондрий</p>
Шаперон-опосредованная аутофагия	Этот тип аутофагии не использует мембранные структуры, в нем участвуют цитоплазматические белки-шапероны семейства hsc-70, <i>вспомогательные белки</i> и LAMP-2 (<i>Lysosomal-associated membrane protein 2</i>). Они служат рецепторами на мембране для комплекса шаперона и белка, подлежащего транспорту в лизосому

Стимулами к запуску процессов аутофагии в клетках являются отсутствие факторов роста, нехватка питательных веществ, наличие в цитоплазме поврежденных органелл (например, митохондрий, пероксисом др.) [Sorokina I. V. et al., 2017].

Нарушения в процессе аутофагии могут приводить к воспалительным процессам в том случае, если части мертвых клеток не удаляются. Считается, что нарушения процесса аутофагии играют роль также в развитии миопатий и нейродегенеративных болезней. Так, при болезни Альцгеймера в отростках нейронов пораженных участков мозга наблюдается накопление незрелых аутофагосом, которые не транспортируются к телу клетки и не сливаются с лизосомами. В табл. 6.11 представлены гены аутофагии.

Таблица 6.11. Характеристика генов аутофагии

Локализация на хромосоме	Название гена	Синонимы	Номер гена в ММ	Активность гена
2q35	<i>ATG9A</i> autophagy-related protein 9A	<i>APG9L1</i> , <i>MGD3208</i> , <i>mATG9</i>	612204	Имеет важное значение для аутофагии клеток животных
2q37.1	<i>ATG16L1</i> autophagy-related protein 16 like protein-1	<i>APG16L</i> , <i>ATG16A</i> , <i>ATG16L</i> , <i>BD10</i> , <i>WDR30</i>	610767	Взаимодействует с главным комплексом гистосовместимости
3q13.2	<i>ATG3</i> autophagy-related protein 3	<i>APG3</i> , <i>APG3-LIKE</i> , <i>APG3L</i> , <i>PC3-96</i>	609606	Важен для эффективной деградации внутренней мембраны аутофагосомы
3p25.3	<i>ATG7</i> autophagy-related protein 7	<i>APG7-LIKE</i> , <i>APG7L</i> , <i>GSA7</i>	608760	Участвует в регуляции р53-зависимого клеточного цикла и в клеточной гибели
5q14.1-q14.2	<i>ATG10</i> autophagy-related protein 10	<i>APG10</i> , <i>APG10L</i> , <i>pp12616</i>	610800	Участвует в убиквитин 2 подобных модификациях, необходимых для формирования аутофагосомы
5q22.3	<i>ATG12</i> autophagy-related protein 12	<i>APG12</i> , <i>APG12L</i> , <i>FBR93</i> , <i>HAPG12</i>	609608	Убиквитин-схожий белок для формирования аутофагомных везикул
5q35.3	<i>SQSTM1</i> - sequestosome 1	<i>A170</i> , <i>DMRV</i> , <i>FTDALS3</i> , <i>NADGP</i> , <i>OSIL</i> , <i>PDB3</i> , <i>ZIP3</i> , <i>p60</i> , <i>p62</i> , <i>p62B</i>	601530	Связывается с убиквитинном и регулирует активацию ядерного фактора (<i>factor kappa-B</i> , NF-κB)

Продолжение табл. 6.11

Локализация на хромосоме	Название гена	Синонимы	Номер гена в MIM	Активность гена
6q21	<i>ATG5</i> <i>autophagy- related protein 5</i>	<i>APG5, APG5-LIKE, APG5L, ASP, SCAR25, hAPG5</i>	604261	Кодирует основной белок, включенный в аутофагию
7p22.1	<i>WIPI2</i> WD repeat domain, phosphoinositide interacting 2	<i>ATG18B, Atg21, CGI-50, IDDSSA, WIPI-2</i>	609225	Участвует в ранних стадиях формирования аутофагосомы и контролирует удлинение ее мембраны
7q36.1	<i>ATG9B</i> <i>autophagy- related protein 9B</i>	<i>APG9L2, NOS3AS, SONE</i>	612205	Участвует в регуляции процесса аутофагии путем лизосомальной деградации
8q11.23	<i>RB1CC1</i> <i>RB1 inducible coiled-coil 1</i>	<i>ATG17, CC1, FIP200, PPP1R131</i>	606837	Экспрессируется в ядре и в цитоплазме и играет важную роль в аутофагии, клеточной пролиферации и в апоптозе
11p11.2	<i>ATG13</i> <i>autophagy- related protein 13</i>	<i>KMA0652, PARATARG8</i>	615088	Необходим для образования аутофагосом, двумембранных везикул
11q13.1	<i>ATG2A</i> <i>autophagy related 2</i>	—	616225	Участвует в транспорте липидов и в работе аутофагосом
11q13.4	<i>ATG16L2</i> <i>autophagy- related protein 16 like protein 2</i>	<i>ATG16B, WDR80</i>	618716	Является партнером гена <i>ATG16L1</i> в формировании аутофагосомы
12q13.13	<i>ATG101</i> <i>autophagy- related protein 101</i>	<i>C12orf44</i>	615089	Необходим для формирования аутофагосом и двумембранных везикул
12p13.2	<i>GABARAPL1</i> <i>gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein like protein 1</i>	<i>APG8-LIKE, APG8L, ATG8, ATG8B, ATG8L, GEC1</i>	607420	Участвует в связывании микротрубочек и GABA-рецепторов
12q24.33	<i>ULK1</i> <i>unc-51 like autophagy activating kinase</i>	<i>ATG1, ATG1A, UNC51, Unc51.1, hATG1</i>	603168	Ассоциирован с мембранами аутофагосом, регулирует аутофосфорилицию

Окончание табл. 6.11

Локализация на хромосоме	Название гена	Синонимы	Номер гена в МИМ	Активность гена
14q22.3	ATG14 <i>autophagy-related protein 14</i>	<i>ATG14L, BARKOR, KIAA0831</i>	613515	Компонент белкового комплекса, который регулирует аутофагию
14q32.2	ATG2B <i>autophagy related 2</i>	<i>C14orf103</i>	616226	Участвует в формировании аутофагосом и регуляции размера и распределения липидных капель
16q23.1	GABARAPL2 <i>gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein like protein 2</i>	<i>ATG8, ATG8C, GATE-16, GATE16, GEF-2, GEF2</i>	607452	Участвует в процессе транспорта веществ из аппарата Гольджи
16q24.2	MAP1LC3B <i>microtubule associated protein 1 light chain 3 beta</i>	<i>ATG8F, LC3B, MAP1A/1BLC3-a, MAP1LC3B</i>	609604	Входит в семейство консервативных белков ATG8, и первичной его функцией является участие в процессе аутофагии
17p13.1	GABARAP <i>gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein</i>	<i>ATG8A-a, MIM46, GABARAP</i>	605125	Схож с убиквитином и играет роль во внутриклеточном транспорте GABA-рецепторов и их взаимодействии с цитоскелетом
17q21.31	BECN1 <i>beclin1</i>	<i>ATG6, VPS30, beclin1</i>	604378	Экспрессирует белок-супрессор опухоли и является ключевым инициатором аутофагии
17q24.2	WIPI1 <i>WD repeat domain, phosphoinositide interacting 1</i>	<i>ATG18, ATG18A, WIPI49</i>	609224	Является маркером формирования аутофагосомы в различных типах клеток
20q11.22	MAP1LC3A <i>microtubule associated protein 1 light chain 3 alpha</i>	<i>ATG8E, LC3, LC3A, MAP1ALC3, MAP1BLC3</i>	601242	Относится к семейству белков, ассоциированных с микротрубочками. Участвует в селективной аутофагии, в посттрансляционной модификации

6.3.4. Клеточное старение

Клеточное старение — явление, которое обычно связывают с потерей способности клетки к делению (*предел Хейфлика* — граница количества делений соматических клеток). Под этим термином еще понимают снижение функциональной активности клеток по мере увеличения их возраста.

Клетки человека, делящиеся в клеточной культуре, умирают приблизительно после 50 делений и проявляют признаки старения при приближении к этой границе. Процесс также называется *репликативным старением* [Cheng L. Q. et al., 2017].

Клетки, растущие в культуре, могут делиться только определенное число раз, после чего переходят в стадию старения. Такие клетки характеризуются:

- снижением интенсивности энергообмена;
- замедлением синтеза РНК и белков;
- понижением эффективности репарации ДНК;
- накоплением мутаций;
- разбалансировкой клеточной регуляции;
- активацией β-галактозидазы.

С возрастом в организме происходит накопление старых клеток. Стареющие клетки могут долгое время оставаться жизнеспособными. После остановки деления и торможения клеточного цикла не у всех клеток наступает апоптоз. В основном они уничтожаются клетками иммунной системы [Victorelli S., Passos J. F. et al., 2017].

Показано, что за старение клетки отвечают концевые участки хромосом — теломеры. В большинстве соматических клеток организма (кроме стволовых клеток) после каждого деления происходит укорочение теломер на несколько сотен пар нуклеотидов. В них фермент теломеразы не функционирует [Slijepcevic P., 2016]. Поэтому после множества делений (предел Хейфлика) клетка или подвергается апоптозу, или стареет.

Стареющие клетки могут оказывать влияние как на соседние клетки, так и на весь организм, выделяя определенные сигнальные молекулы. В **табл. 6.12** перечислены основные гены, ответственные за процессы старения.

Таблица 6.12. Характеристика генов старения

Локализация на хромосоме	Название гена	Синонимы	Номер гена в MIM	Активность гена
1q43-q44	<i>Akt3, serine / threonine kinase 3</i>	<i>MPPH, MPPH2, PKB-GAMMA, PKBG, PRKBG, RAC-PK-gamma, RAC-gamma, STK-2</i>	611223	Негативная регуляция клеточного старения

Продолжение табл. 6.12

Локализация на хромосоме	Название гена	Синонимы	Номер гена в МИМ	Активность гена
1q22	<i>Lmna, lamin A</i>	<i>ARTHS, MOZ, MRD32, MYST-3, MYST3, RUNXBP2, ZC2HC6A, ZNF220</i>	150330	Позитивная регуляция возраста клетки
1q41	<i>Slc30a10, solute carrier family 30, member 10</i>	<i>HMDPC, HMNDYT1, ZNT10, ZNT8, ZRC1, ZnT-10</i>	611146	Негативная регуляция клеточного старения
2p16.1	<i>Pnpt1, polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1</i>	<i>COXPD13, DFNB70, OLD35, PNPASE, old-35</i>	610316	Регуляция клеточного старения
2q24.2	<i>Pla2r1, phospholipase A2 receptor 1</i>	<i>CLEC13C, PLA2R, PLA2G1R, PLA2IR, PLA2R</i>	604939	Преждевременное старение, вызванное окислительным стрессом; репликативное старение
3p21.1	<i>Prkcd, protein kinase C, delta</i>	<i>ALPS3, CVID9, MAY1, PKCD, nPKC-delta</i>	176977	Клеточное старение
3p21.1	<i>Nek4, NIMA-related kinase 4</i>	<i>NRK2, STK2, pp12301</i>	601959	Репликативный возраст клетки
3q23	<i>Atr, serine / threonine kinase</i>	<i>FCTCS, FRP1, MEC1, SCKL, SCKL1</i>	601215	Репликативное старение
3q29	<i>Opa1, OPA1, mitochondrial dynamin like GTPase</i>	<i>BERHS, MGM1, MTDPS14, NPG, NTG, largeG</i>	605290	Клеточное старение
5p15.33	<i>Tert, telomerase reverse transcriptase</i>	<i>CMM9, DKCA2, DKCB4, EST2, PFBMFT1, TCS1, TP2, TRT, hEST2, hTRT</i>	187270	Негативная регуляция клеточного и репликативного старения
5q35.1	<i>Npm1, nucleophosmin 1</i>	<i>B23, NPM</i>	164040	Возраст клетки
6p21.1	<i>Srf, serum response factor</i>	<i>MCM1</i>	600589	Клеточное старение
6p21.2	<i>Cdkn1a, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)</i>	<i>CAP20, CDKN1, CIP1, MDA-6, P21, SDI1, WAF1, p21CIP1</i>	116899	Клеточное старение

Продолжение табл. 6.12

Локализация на хромосоме	Название гена	Синонимы	Номер гена в МИМ	Активность гена
6p21.31	<i>Mapk14</i> , mitogen-activated protein kinase 14	CSBP, CSBP1, CSBP2, CSPB1, EXIP, Mxi2, PRKM14, PRKM15, RK, SAPK2A, p38, p38ALPHA	600289	Стресс-индуцированное преждевременное старение
6p22.1	<i>Zkscan3</i> , zinc finger with KRAB and SCAN domains 3	ZF47, ZFP306, ZNF306, ZNF309, ZSCAN13, ZSCAN35, Zfp47, dj874C20.1, dj874C20.1, zfp-47	612791	Негативная регуляция клеточного старения
6p24.3	<i>Eef1e1</i> , eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon 1	AIMP3, P18	609206	Позитивная регуляция клеточного старения
6q25.2	<i>Fbxo5</i> , F-box protein 5	EM11, FBX5, Fbxo31	606013	Негативная регуляция клеточного старения
7p21.1	<i>Twist1</i> , twist family bHLH transcription factor 1	ACS3, BPES2, BPES3, CRS, CRS1, CSO, SCS, SWCOS, TWIST, bHLHa38	601622	Негативная регуляция клеточного старения
7q21.2	<i>Cdk6</i> , cyclin-dependent kinase 6	MCPH12, PLSTIRE	603368	Негативная регуляция клеточного старения
7q22.1	<i>Serpine1</i> , serine (or cysteine) family E, member 1	PAI, PAI-1, PAI1, PLANH1	173360	Клеточное старение
7q31.31	<i>Wnt16</i> , wntless-type MMTV integration site family, member 16	—	606267	Преждевременное старение, вызванное окислительным стрессом; клеточное старение; позитивная регуляция старения клеток
8p11.21	<i>Kat6a</i> , K(lysine) acetyltransferase 6A	ARTHS, MOZ, MRD32, MYST-3, MYST3, RUNXBP2, ZC2HC6A, ZNF220	601408	Клеточное старение
8q24.13	<i>Nsmce2</i> , NSE2/ MMS21 homolog, SMC5-SMC6 complex SUMO ligase	C8orf36, MMS21, NSE2, ZMIZ7	617246	Клеточное старение

Продолжение табл. 6.12

Локализация на хромосоме	Название гена	Синонимы	Номер гена в МИМ	Активность гена
9p21.3	<i>Cdkn2a</i> , cyclin dependent kinase inhibitor 2A	ARF, CDK4I, CDKN2, CMM2, INK4, INK4A, MLM, MTS-1, MTS1, P14, P14ARF, P16, P16-INK4A, P16INK4, P16INK4A, P19, P19ARF, TP16	600160	Клеточное старение, позитивная регуляция клеточного старения, репликативное старение
9q21.12	<i>Smc5</i> , structural maintenance of chromosomes 5	SMC5L1	609386	Клеточное старение
10q21.3	<i>Sirt1</i> , sirtuin 1	SIR2, SIR2L1, SIR2alpha	604479	Негативная и позитивная регуляция клеточного старения; преждевременное старение
10q25.2	<i>Pdcd4</i> , programmed cell death 4	H731	608610	Возраст клетки
11p15.5	<i>Hras</i> , Harvey rat sarcoma virus oncogene	C-BAS/HAS, C-H-RAS, C-HA-RAS1, CTLO, H-RASIDX, HAMS1, RASH1, p21ras, HRAS	190020	Клеточное старение
11q22.3	<i>Atm</i> , serine / threonine kinase	AT1, ATA, ATC, ATD, ATDC, ATE, TEL1, TELO1	607585	Репликативное старение
12q13.12	<i>Wnt1</i> , WNT family, member 1	BMND16, INT1, OI15	164820	Негативная регуляция клеточного возраста
12p13.33	<i>Foxm1</i> , forkhead box M1	FKHL16A, FOXM1B, FOXM1C, HFH-11, HFH11, HNF-3, INS-1, MPHOSPH2, MPP-2, MPP2, PIG29, TRIDENT, FOXM1	602341	Негативная регуляция клеточного возраста
12q23.3	<i>Nuak1</i> , NUAKE family, kinase, 1	ARK5	608130	Регуляция клеточного старения
12q24.12-q24.13	<i>Mapkapk5</i> , MAP kinase-activated protein kinase 5	MAPKAP-K5, MK-5, MK5, PRAK	606723	Стресс-индуцированное преждевременное старение

Продолжение табл. 6.12

Локализация на хромосоме	Название гена	Синонимы	Номер гена в МИМ	Активность гена
12q24.21	<i>Tbx3</i> , <i>T-box transcription factor 3</i>	<i>TBX3-ISO</i> , <i>UMS</i> , <i>XHL</i>	601621	Возраст и старение клетки
14q24.1	<i>Arg2</i> , <i>arginase type II</i>	—	107830	Позитивная регуляция клеточного старения
14q24.3	<i>Vash1</i> , <i>vasohibin 1</i>	<i>KIAA1036</i> , <i>TTCP 1</i>	609011	Регуляция клеточного старения
15q22.31	<i>Map2k1</i> , <i>mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>	<i>CFC3</i> , <i>MAPKK1</i> , <i>MEK1</i> , <i>MKK1</i> , <i>PRKMK1</i>	176872	Клеточное старение
15q24.1	<i>Pml</i> , <i>nuclear body scaffold</i>	<i>MYL</i> , <i>PP8675</i> , <i>RNF71</i> , <i>TRIM19</i>	102578	Клеточное старение
16p11.2	<i>Ypel3</i> , <i>yippee like 3</i>	—	609724	Позитивная регуляция клеточного старения
16p13.13	<i>Rsl1d1</i> , <i>ribosomal L1 domain containing 1</i>	<i>CSIG</i> , <i>L12</i> , <i>PBK1</i> , <i>UTP30</i>	615874	Регуляция клеточного старения
16q22.1	<i>Terf2</i> , <i>telomeric repeat binding factor 2</i>	<i>TRBF2</i> , <i>TRF2</i>	602027	Негативная регуляция клеточного старения
17p13.1	<i>Trp53</i> , <i>tumor protein p53</i>	<i>BCC7</i> , <i>BMF55</i> , <i>LFS1</i> , <i>P53</i> , <i>TRP53</i>	191170	Преждевременное старение, вызванное окислительным стрессом; клеточное старение; позитивная регуляция старения клеток
17q23.2	<i>Tbx2</i> , <i>T-box transcription factor 2</i>	<i>VETD</i>	600747	Возраст и старение клетки
17q23.3	<i>Map3k3</i> , <i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3</i>	<i>MAPKKK3</i> , <i>MEKK3</i>	602539	Негативная регуляция клеточного старения
19p13.13	<i>Calr</i> , <i>calreticulin</i>	<i>CRT</i> , <i>HEL-S-99n</i> , <i>RO</i> , <i>SSA</i> , <i>cC1qR</i>	109091	Клеточное старение
20q11.23	<i>Rbl1</i> , <i>RB transcriptional corepressor like 1</i>	<i>CP107</i> , <i>PRB1</i> , <i>p107</i>	116957	Негативная регуляция клеточного старения

Окончание табл. 6.12

Локализация на хромосоме	Название гена	Синонимы	Номер гена в МИМ	Активность гена
21q22.11	<i>Sod1, superoxide dismutase 1</i>	<i>ALS, ALS1, HEL-S-44, IPOA, SOD, STAHP, hSod1, homodimer</i>	147450	Клеточный возраст
21q22.12	<i>Morc3, family CW-type zinc finger 3</i>	<i>NXP2, ZCW5, ZCWCC3</i>	610078	Возраст клетки
22q11.23	<i>Mif, macrophage migration inhibitory factor</i>	<i>GIF, GLIF, MMIF</i>	153620	Негативная регуляция возраста клетки
22q12.1	<i>Chek2, checkpoint kinase 2</i>	<i>CDS1, CHK2, HuCds1, LFS2, PP1425, RAD53, hCds1</i>	604373	Репликативный возраст клетки

6.4. Мейоз

Мейоз (от др.-греч. μείωσις — уменьшение) — это редукционное деление, в результате которого образуются половые клетки (гаметы) с гаплоидным набором хромосом. Мейоз лежит в основе полового размножения.

Мейоз состоит из двух последовательных делений: *мейоз I* (*редукционное деление*) и *мейоз II* (*эквационное деление*). Редукционное деление клетки характеризуется тем, что происходит уменьшение числа хромосом в образовавшихся дочерних клетках. Полный этап интерфазы с периодами **G1**, **S** и **G2** клеточного цикла происходит только перед первым мейотическим делением. В **S**-фазе клеточного цикла происходит репликация ДНК ($2n4c$). Между первым и вторым мейотическим делением наблюдается очень короткая интерфаза с **G1** и **G2** периодами. **S**-период полностью отсутствует [Ding D. Q. et al., 2010].

6.4.1. Значение мейоза

В процессе эволюции возник и закрепился половой путь размножения организмов, в основе которого лежит процесс мейоза. Важнейшее биологическое значение мейоза состоит в том, что он обеспечивает:

- формирование нового диплоидного организма ($nc + nc = 2n2c$) при оплодотворении из гамет с различным генотипом;

- сохранение постоянного числа хромосом у особей одного вида;
- образование новых последовательностей нуклеотидов генов в процессе *кроссинговера*, что приводит к комбинативной изменчивости;
- независимое/случайное расхождение хромосом, что также лежит в основе комбинативной изменчивости.

6.4.2. Этапы мейоза

Во время мейоза в клетке происходят сложнейшие процессы, в результате которых из одной диплоидной клетки образуются четыре гаплоидные (см. рис. 6.6). Два последовательных деления мейоза (I и II) включают по четыре основных фазы каждый — *профазу I и II*, *метафазу I и II*, *анафазу I и II* и *телофазу I и II* (табл. 6.13). Профаза I — наиболее сложная. Ее подразделяют на пять стадий: *лептотену*, *зиготену*, *пахитену*, *диplotену* и *диакинез*.

Таблица 6.13. Характеристика этапов мейоза

Мейоз I — редуccionное деление	
Профаза I (2n4c)	
<i>Лептотена</i>	<i>Стадия тонких нитей ДНК.</i> Происходят компактизация хроматиновых нитей и их превращение в хромосомы. Длина каждой хроматиновой нити в конце этой стадии на 1–2 порядка длиннее, чем у гиперспирализованного хромосом в метафазе I
<i>Зиготена</i>	<i>Стадия конъюгации (объединения) гомологичных (одинаковых) хромосом (синапсис).</i> Гомологичные хромосомы (уже удвоенные после S-периода интерфазы) сближаются и образуют новый комплекс из четырех хроматид — <i>бивалент</i> , или <i>тетраду</i> . Происходит сборка <i>синаптонемного комплекса</i> , в состав которого входят белки — <i>когезины</i> . Начинается обмен между гомологичными участками хромосом — <i>кроссинговер</i> . Число бивалентов соответствует гаплоидному набору хромосом (1n)
<i>Пахитена</i>	<i>Стадия толстых нитей.</i> Завершается сборка синаптонемного комплекса. Благодаря полной конъюгации гомологов хромосомы утолщаются. Число хромосом гаплоидно (1n), но они состоят из двух объединившихся гомологов, каждый из которых имеет по две сестринские хроматиды. Количество ДНК равно 4c, а число хроматид — 4n [Thiru P. et al., 2014]
<i>Диplotена</i>	<i>Стадия двойных нитей.</i> Разрушаются белковые связи в синаптонемном комплексе, и гомологичные хромосомы отталкиваются друг от друга. Пары сестринских хроматид каждой гомологичной хромосомы остаются соединенными между собой в центромерных районах и по всей длине и видны в световом микроскопе. В бивалентах остаются места перекреста и сцепления хромосом — <i>хиазмы</i> . Только в этих участках сохраняется структура синаптонемного комплекса
<i>Диакинез</i>	<i>Число хиазм уменьшается и перемещается к концам хромосом.</i> Биваленты укорачиваются. Ядрышко разрушается. Хромосомы теряют связи с ядерной оболочкой, которая разрушается по мере формирования нитей веретена деления. Эта стадия является переходной к следующей фазе первого деления мейоза — метафазе I

Окончание табл. 6.13

Мейоз I — редукционное деление
Метафаза I (2n4c)
К центромерам хромосом присоединяются нити веретена деления. Биваленты располагаются по экватору
Анафаза I (2n4c)
Гомологичные хромосомы в биваленте отталкиваются друг от друга в области центромеры. Хромосома от каждого бивалента расходуется к противоположным полюсам. Хиазмы, которые удерживали хромосомы вместе, в анафазе исчезают. Центромеры все еще не разделены и связывают хроматиды каждой хромосомы. Негомологичные хромосомы расходятся независимо друг от друга
Телофаза I (1n2c)
Завершается кариокинез с образованием ядерной мембраны. Начинается цитокинез. Образуются две дочерние клетки
В двух клетках проходит очень короткая интерфаза (интеркинез) с G1 и G2 периодами (без S-периода, где обычно идет синтез ДНК)
Мейоз II — эквационное деление
Профаза II (1n2c)
Аналогична профазе при митозе. Происходят разрушение ядерной мембраны, спирализация хромосом, образование нитей веретена деления
Метафаза II (1n2c)
Нити веретена деления крепятся к кинетохору центромерного участка хромосомы. Хромосомы выстраиваются по экватору
Анафаза II (1n2c)
Центромеры разделяются. Сестринские хроматиды расходятся к противоположным полюсам деления
Телофаза II (1n1c)
Каждая хроматида является хромосомой в зрелой половой клетке (гамете). Завершается кариокинез с образованием ядерной мембраны. Начинается цитокинез. Образуются четыре гаплоидные клетки

Синаптонемный комплекс (от греч. *Συνωπτικός* — соединенный) — длинное белковое образование, морфологически напоминающее трехслойную «ленту» или «лестницу» с двумя боковыми компонентами (см. рис. 6.7). В основу комплекса входят белки — *когезины*. Это семейство *SMC* (*structural maintenance of chromosome*) белков, которые отличаются у разных таксонов.

Сестринские хроматиды каждой гомологичной хромосомы тесно сближены по всей длине. Гомологичные хромосомы в синаптонемном комплексе сближены, хроматиды остаются по разные стороны от трехслойной белковой структуры на расстоянии,

A

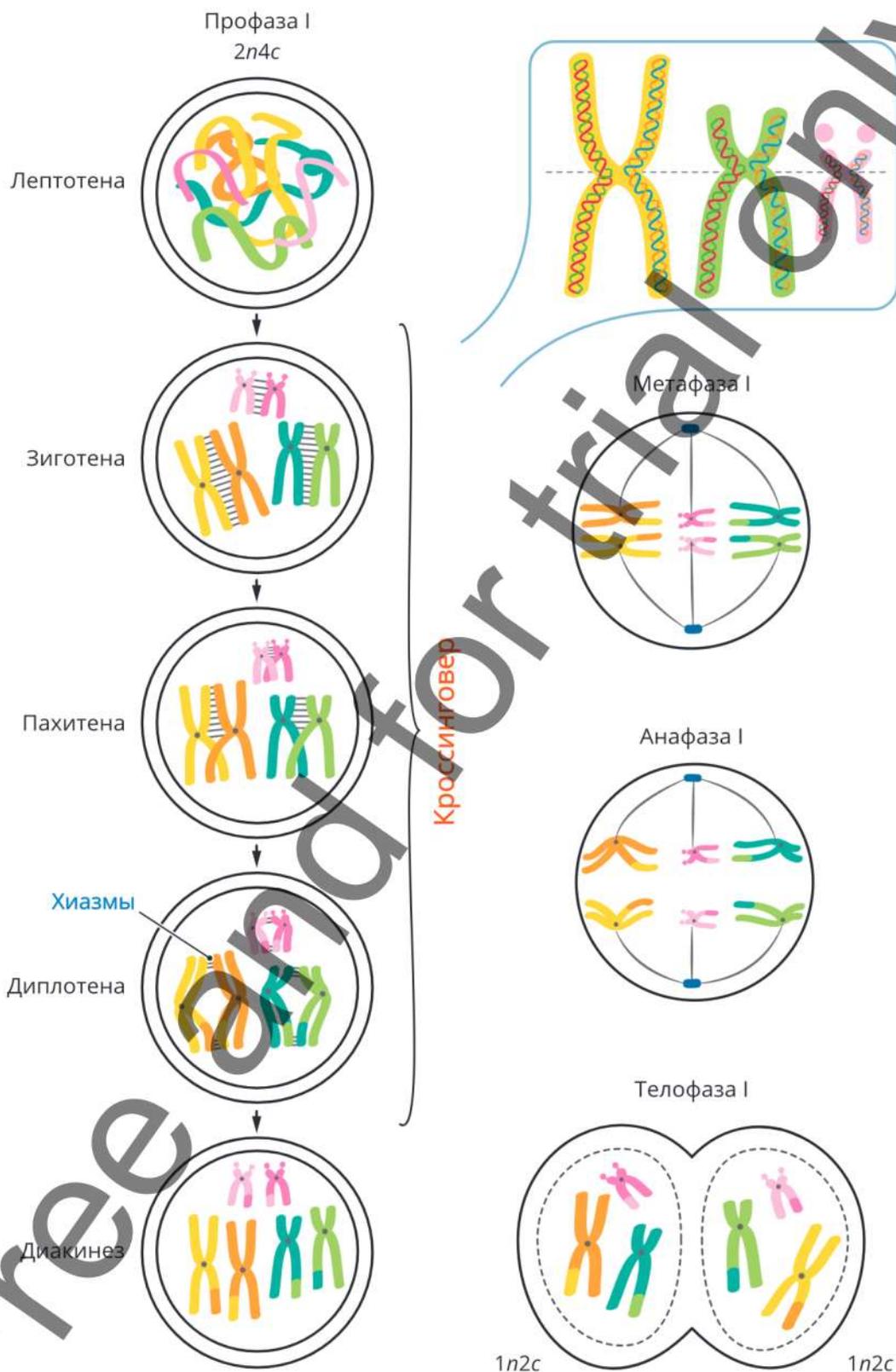
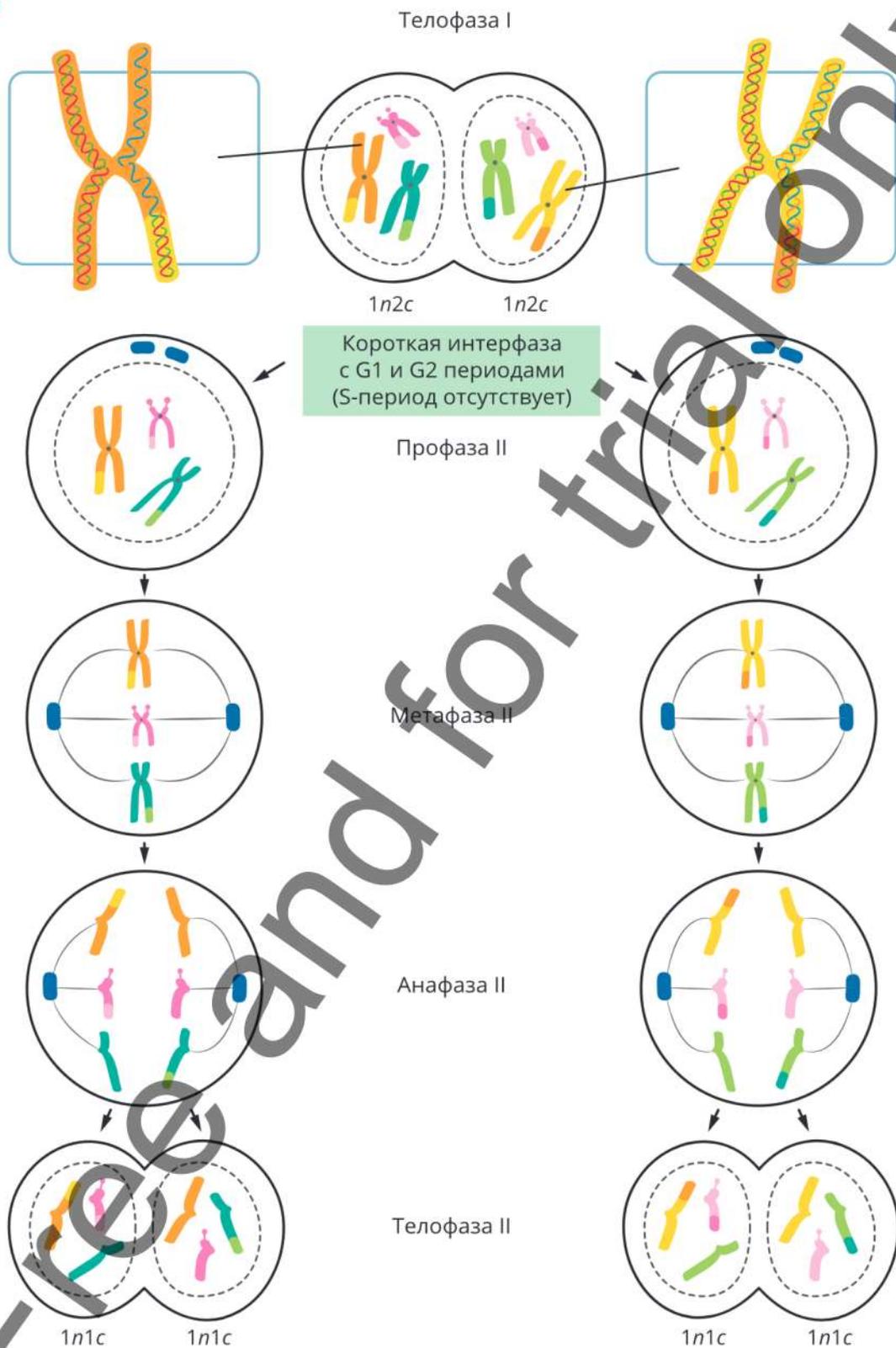


Рис. 6.6. Этапы мейоза:

А — мейоз I; Б — мейоз II

Б



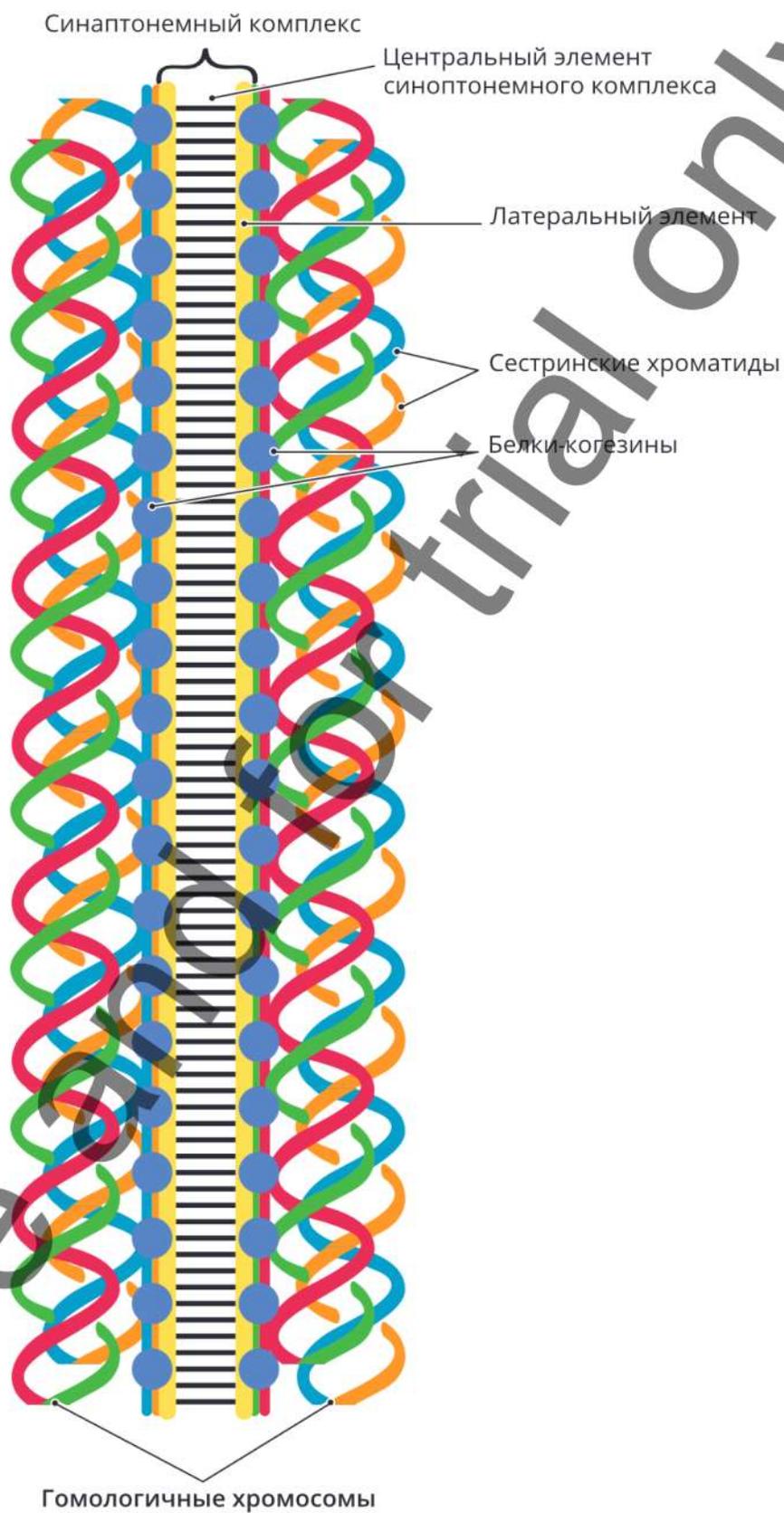


Рис. 6.7. Строение синаптонемного комплекса

превышающем 100 нм. Объединение гомологов чаще всего начинается в теломерах и центромерах. Толщина центрального осевого элемента синаптонемного комплекса составляет 10–40 нм, а бокового элемента — 30–60 нм. Общая ширина этого комплекса — 160–240 нм.

Влияние на сборку синаптонемного комплекса оказывает убиквитинилирование гистона H2A. Каждый боковой элемент связан с петлями двух сестринских хроматид одного гомолога. Большая часть ДНК этих хроматид находится вне синаптонемного комплекса, и лишь менее 5 % геномной ДНК входит в его состав, прочно ассоциируясь с белками. В эту ДНК входят уникальные и умеренно повторяющиеся последовательности нуклеотидов [Gerton J.L. et al., 2005].

Синаптонемный комплекс обеспечивает структурную основу, необходимую для рекомбинационных событий, но сам непосредственно в этих событиях не участвует. Важную роль в этом играют *рекомбинационные узелки* (которые представляют собой очень крупные белковые комплексы диаметром около 90 нм). Рекомбинационные узелки находятся на некотором расстоянии друг от друга между двумя гомологичными хроматидами. Их бывает примерно столько же, сколько происходит перекрестов между хроматидами [Page S.L. et al., 2004].

Функции синаптонемного комплекса:

- организация профазной хромосомы;
- каркас для рекомбинационных процессов (фиксированное расстояние между гомологами);
- расхождение гомологов в метафазе I.

6.4.3. Регуляция мейоза

Как известно, циклинзависимые киназы (CDK) играют центральную роль в регуляции клеточного цикла. При этом белок, чаще называемый **RINGO** (официальное название — *SPDYC. S speedy/RINGO*), который не имеет гомологии аминокислотной последовательности с циклинами, функционирует как *нетипичный активатор CDK*. Гены, синтезирующие белок RINGO, локализованы в теломерных областях разных хромосом (например, во 2, 4, 7, 17-й и др.). Белок **RINGO A** регулирует длину теломер (это имеет решающее значение для всего процесса мейоза).

6.4.4. Патологии мейоза

Причинами патологии мейоза могут быть различные тератогенные факторы эндогенной (нарушение обмена веществ) и экзогенной (воздействие мутагенов) природы. Важную роль играет возраст человека, стресс и др. [Ishiguro K. et al., 2014].

К основным нарушениям в мейозе можно отнести:

- **повреждение хромосом** (приводит к нарушению спирализации и деспирализации хромосом, задержке мейоза на разных фазах и др.);

- **неравный кроссинговер** (хромосомная мутация в виде дупликации или делеции);
- **повреждение митотического аппарата** (веретена деления) приводит к невозможности расхождения отдельных пар гомологичных хромосом в силу прочного сцепления гомологов (анеуплоидии);
- **нарушение цитокинеза** (ранняя цитотомия), как результат — полное нерасхождение хромосом, что способствует возникновению гамет с нередуцированным числом хромосом и последующей полиплоидизацией клеток организма (полиплоидии).

6.5. Гаметогенез

Гаметогенез (греч. γάμος — брак; γένεσις — развитие, происхождение) — процесс образования мужских и женских половых (гаплоидных) клеток, или гамет. Протекает он в половых железах — гонадах (в яичниках у женщин и в семенниках у мужчин). Образование яйцеклеток называется *оогенезом* (*овогенезом*), а образование сперматозоидов — *сперматогенезом*.

6.5.1. Значение гаметогенеза

Гаметогенез имеет важное биологическое значение, он обеспечивает:

- репликацию (удвоение) ДНК;
- комбинирование генов;
- образование гамет с гаплоидным числом ДНК/хромосом ($1n1c$);
- разное функциональное назначение мужских и женских гамет;
- передачу наследственной информации от одного поколения другому.

6.5.2. Стадии гаметогенеза

Гаметогенез — это последовательный процесс, который принято разделять на следующие стадии: *размножение, рост, созревание клеток* (рис. 6.8). В случае сперматогенеза существует стадия формирования, которой нет при оогенезе.

1. *Стадия размножения.* Стволовые предшественники половых клеток делятся митозом. На этой стадии они называются *сперматогониями* и *оогониями* (*овогониями*). Их число значительно возрастает ($2n2c$).
2. *Стадия роста.* Клетки увеличиваются в размерах и превращаются в *сперматоциты I порядка* и *ооциты (овоциты) I порядка*. Эта стадия соответствует интерфазе, предшествующей мейозу, где происходит репликация ДНК ($2n4c$).

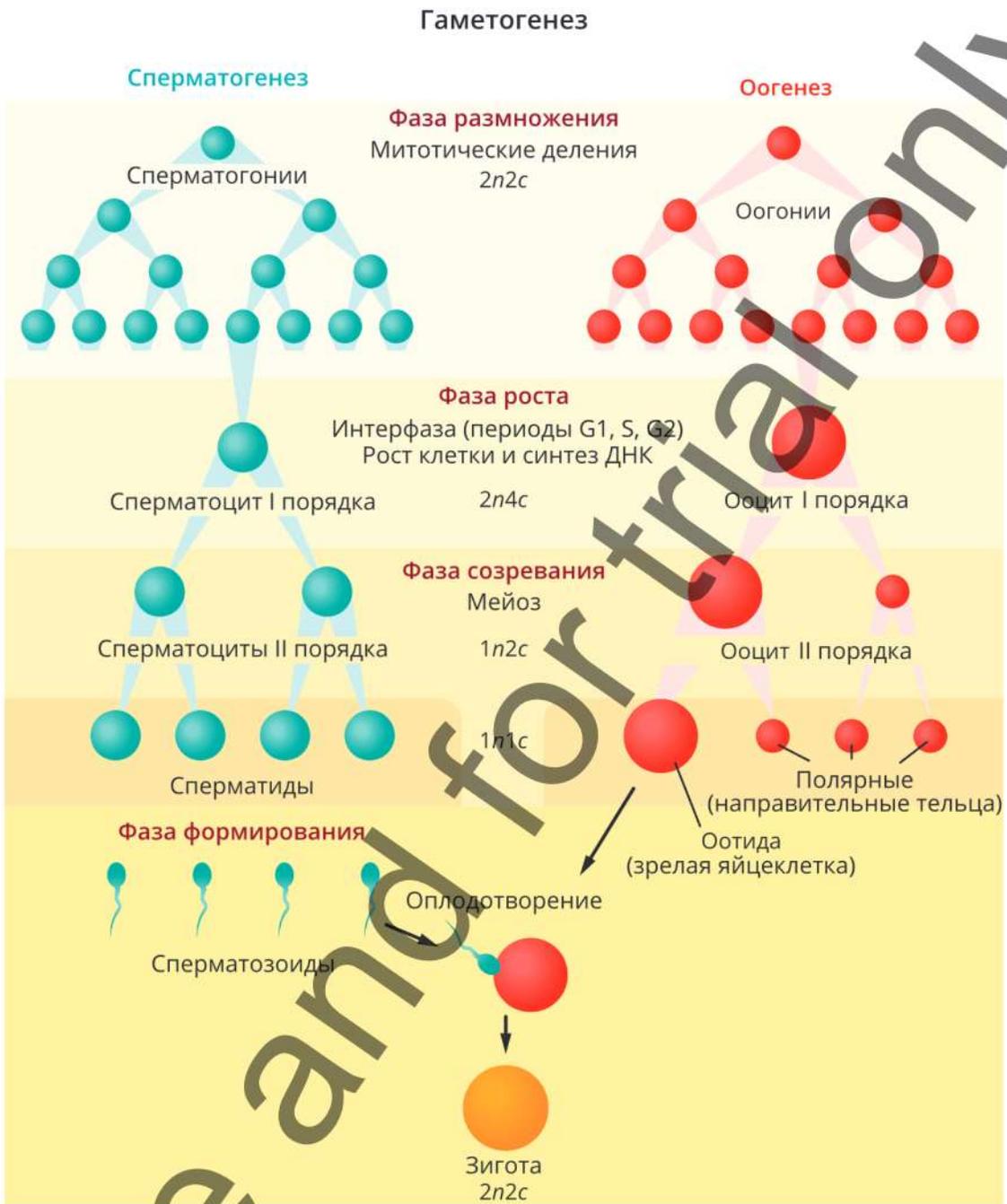


Рис. 6.8. Стадии гаметогенеза

3. *Стадия созревания.* Происходят два последовательных мейотических деления — *редукционное* и *эквационное*. После мейоза I образуются *сперматоциты II порядка* и *ооциты II порядка* ($1n2c$). После мейоза II образуются *сперматиды* и одна *яйцеклетка* с тремя *редукционными тельцами* ($1n1c$).

4. *Стадия формирования* осуществляется только в процессе *сперматогенеза*. Незрелые *сперматиды* превращаются в зрелые *сперматозоиды*, которые имеют

характерные только ему свойственные органоиды и структуры. Сперматозоиды проходят дополнительную четвертую стадию для того, чтобы приобрести своеобразную форму и сформировать аппарат движения.

6.5.3. Регуляция гаметогенеза

Предшественники сперматозоидов и яйцеклеток — *первичные зародышевые клетки* (англ. *primordial germ cells*), возникают на стадии *перигаструляции* во время 2-й недели эмбрионального развития. Сигналы от внезародышевых тканей индуцируют сеть регуляторных генов в компетентных клетках зародышевой линии для спецификации первичных зародышевых клеток [Larose H. et al., 2019]. Например, оогенез регулируется огромным количеством внутри- и внеяичниковых факторов.

Мейотическая яйцеклетка развивается постепенно и последовательно во время *фолликулогенеза*, когда ооцит растет во взаимодействии с его соматическими клетками-компаньонами. При сперматогенезе основным является регуляторный фактор TDF (*testis determining factor*), кодируемый геном *SRY* (*sex-determining Region Y*), локализованным на коротком плече хромосомы Y. В отличие от генов соматических клеток сеть регуляторных генов сперматозоидов и яйцеклеток подвергается двум волнам эпигенетического перепрограммирования. Эти изменения включают деметилирование ДНК и удержание модифицированных гистонов в важных генах развития, передачи сигналов к микроРНК (см. гл. 3, п. 3.13). Такое эпигенетическое состояние является характерным для эмбриональной стволовой клетки.

6.5.4. Различия сперматогенеза и оогенеза

В процессе сперматогенеза и оогенеза помимо сходства основных механизмов на каждой из фаз существует и ряд различий (табл. 6.14). Было определено, что взрослый здоровый мужчина производит в среднем до 30 млн спермиев в день. У женщины образуются в среднем 500–600 зрелых яйцеклеток за всю ее жизнь.

Сперматогенез более подвержен влиянию факторов внешней среды, чем оогенез. Это связано с различием в расположении мужских (семенники) и женских (яичники) половых органов. Семенники находятся вне брюшной полости, а яичники — внутри нее.

Таблица 6.14. Основные различия сперматогенеза и оогенеза

Фаза	Сперматогенез	Оогенез
Размножение	Начинается в период полового созревания (в подростковом возрасте) и продолжается всю жизнь. Размножение идет постоянно	Начинается в эмбриональном периоде (с 3-го по 7-й месяц) и заканчивается в постнатальном периоде (до 3 лет)

Окончание табл. 6.14

Фаза	Сперматогенез	Оогенез
<i>Рост</i>	Фаза короткая. Следует сразу за фазой размножения	Довольно длительная (12–50 лет) фаза. В ооцитах осуществляется накопление запаса питательных веществ. В период малого роста синтезируется РНК. В период большого роста фолликулярные клетки яичника образуют несколько слоев вокруг ооцита I порядка, что способствует переносу питательных веществ в цитоплазму ооцита. Ооциты I порядка у новорожденной девочки останавливаются в фазе мейоз I, завершается созревание ооцита к моменту полового созревания
<i>Созревание</i>	Равномерное деление на четыре сперматоцита	Неравномерное деление ооцитов на ооцит II порядка и три полярных тельца
<i>Формирование</i>	Образуется зрелый сперматозоид	Отсутствует

6.6. Строение половых клеток человека

6.6.1. Мужская половая клетка

В *сперматогенезе* на стадии формирования происходят процессы, которые формируют зрелый *сперматозоид* (от др.-греч. σπέρμα [род. п. σπέρματος], здесь: сперма + ζωή — жизнь + εἶδος — вид, облик).

Среди процессов сперматогенеза основными являются следующие:

- ядро сперматиды уплотняется;
- ДНК сверхспирализируются и становятся функционально инертными;
- из комплекса Гольджи формируется *акросома* у одного из полюсов ядра;
- у другого полюса находятся центриоли, причем одна из них принимает участие в формировании жгутика;
- вокруг жгутика спирально закручивается одна митохондрия;
- головка сперматозоида почти не содержит цитоплазмы.

В организме человека одной из самых маленьких клеток средней длиной 55 мкм является сперматозоид, если не считать длину ее хвоста. Структура сперматозоида (рис. 6.9) приспособлена к активному передвижению по маточной трубе против тока жидкости по направлению к яйцеклетке на первом этапе оплодотворения.

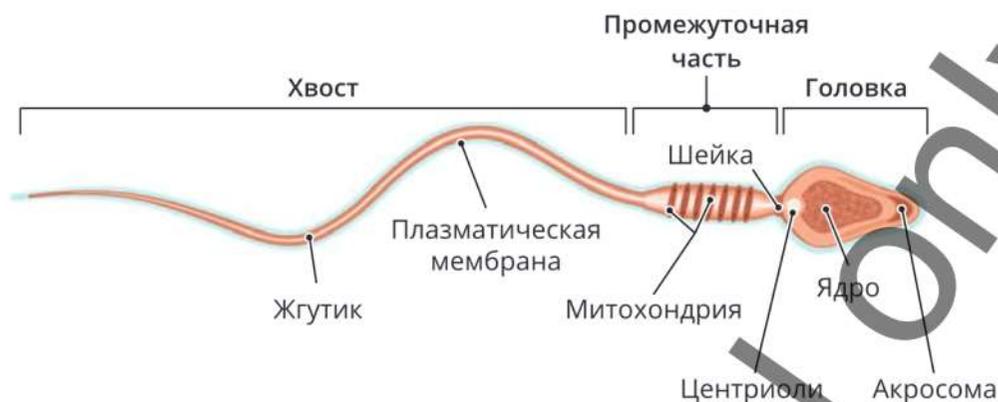


Рис. 6.9. Строение сперматозоида человека

На головке сперматозоида находится *акросома*, являющаяся мембранным пузырьком, несущим протеолитические ферменты. Она формируется из комплекса Гольджи (одномембранного органоида) на стадии формирования сперматогенеза. Акросома находится спереди от ядра, покрывает собой половину ядра и занимает около половины объема головки. Ее размер сопоставим с размером ядра.

Во время оплодотворения на стадии слияния ферменты акросомы участвуют в растворении оболочек яйцеклетки. В акросоме содержится около 15 ферментов, среди которых основными являются *гиалуронидаза* и *трипсиноподобный фермент акрозин*. Они расщепляют *гликозаминогликаны вторичной (блестящей) оболочки* яйцеклетки.

В средней части сперматозоида проходит *цитоскелет жгутика*, который состоит из *микротрубочек*. Они образуются в специальном центре организации — *центросоме*. Жгутик обеспечивает движение хвоста сперматозоида.

Также в средней части, вокруг цитоскелета жгутика, располагается большая митохондрия спиральной формы — *митохондрион*. Он закручивается вокруг цитоскелета жгутика. Главной функцией митохондриона является синтез АТФ, что обеспечивает движение жгутика в процессе оплодотворения.

Хвостовая часть сперматозоида образована только жгутиком, окруженным мембраной. Он тоньше и значительно длиннее остальных участков клетки. Хвост является органом передвижения сперматозоида во время оплодотворения.

Главная функция сперматозоида — это передача гаплоидного генома отца при оплодотворении. Митохондриальное ДНК мужской половой клетки не наследуется.

6.6.2. Женская половая клетка

При оогенезе в организме человека стадии *яйцеклетки* не существует. Под термином «*яйцеклетка*» понимают ооцит I порядка (после стадии роста), ооцит II порядка (после стадии созревания) или только что образовавшуюся зиготу (после оплодотворения). При оогенезе у женщин на стадии второй метафазы образуется блок, который

снимается во время оплодотворения, и фаза созревания заканчивается только после проникновения сперматозоида в яйцеклетку.

Женская половая клетка является самой большой синцитиальной клеткой с диаметром примерно 100–130 мкм, имеет овальную или круглую форму (рис. 6.10).

Женская половая клетка окружена несколькими оболочками, что способствует защите от механических повреждений. У нее, как и у всех клеток, есть *цитолемма* (*оолемма*), или первичная оболочка. У всех млекопитающих она называется *блестящей* (*zona pellucida*). Вторичную оболочку называют *лучистым венцом*. Это слой фолликулярных клеток, отростки которых проникают в блестящую оболочку. Эти клетки богаты гликопротеиновыми частицами. Часть этих молекул секретирует сама клетка, а другую часть она получает из окружающих клеток. Также есть соединительнотканная оболочка, которая присутствует только в яичнике.

Цитоплазма (*ооплазма*) женской половой клетки содержит питательный материал в виде желтка — включений, расположенных в виде желточных гранул. В состав желтка входят фосфолипиды, протеины и углеводы. Структурной единицей желтка является комплекс *липовителлина* (*липопротеида*) и *фосфолитина* (*фосфопротеида*).

В женской половой клетке по сравнению с яйцеклетками других хордовых животных содержится очень мало желтка (*алецитальная клетка*). По расположению

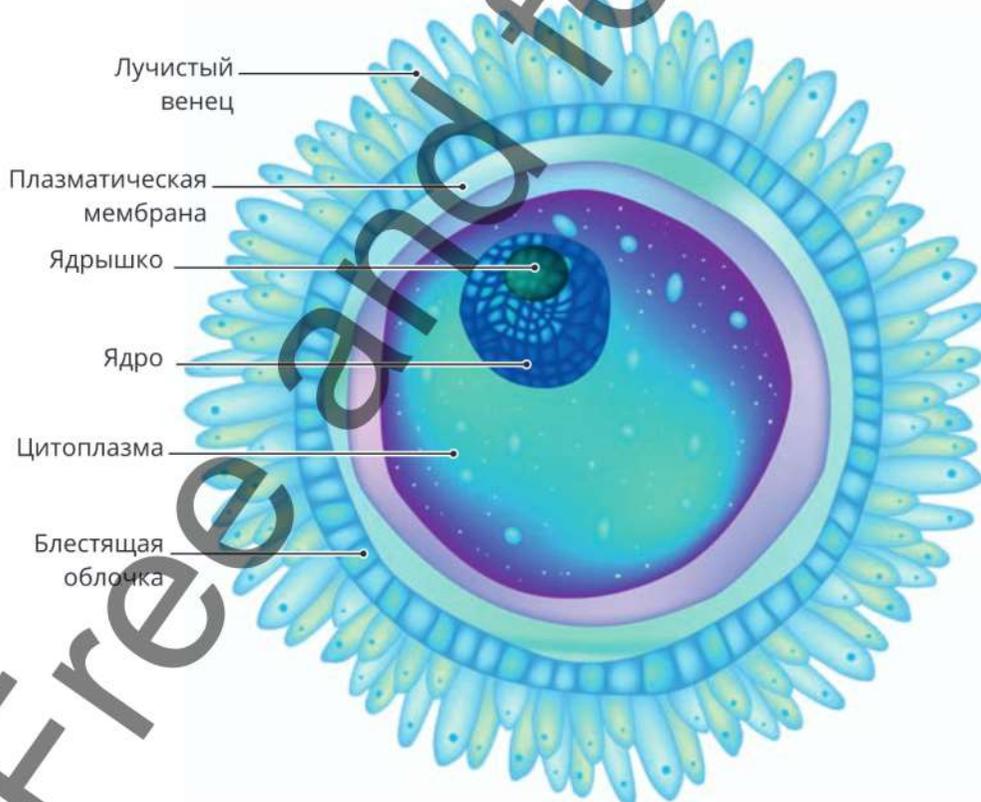


Рис. 6.10. Строение женской половой клетки

желтка это — *изолецитальная клетка*, в которой желточные гранулы располагаются равномерно и поэтому ядро оказывается примерно в центре.

Среди органоидов хорошо развита эндоплазматическая сеть. Комплекс Гольджи расположен на периферии цитоплазмы и участвует в образовании *кортикальных гранул*. Они находятся под плазмалеммой и содержат запасы *гликозаминогликанов*. Есть митохондрии, ДНК которых передается детям.

Основная функция женской половой клетки — участие в оплодотворении. В первую клетку нового организма — *зиготу* — от матери переходит гаплоидное число хромосом ядра и митохондриальная ДНК.

Free and for trial only

Конформационные изменения ДНК в клеточном цикле

7.1. Пространственная организация ДНК

ДНК на стадии интерфазы находится в расплетенном состоянии. Нити ДНК конденсируются, проходя ряд этапов, в результате чего образуется *двухроматидная хромосома*. Основное значение процесса компактизации ДНК — это равномерное распределение генетического материала во время деления по дочерним клеткам. Существует несколько уровней пространственной организации ДНК.

I уровень конденсации — это *вторичная структура ДНК* (рис. 7.1). Диаметр — 2 нм.

II уровень — *нуклеосомный (нуклеосомная нить)* (рис. 7.2). Происходит наматывание нити ДНК на белковые структуры. Диаметр — 11 нм. Степень укорочения по сравнению с I уровнем — 7 раз.

Гистоновые белки H2A, H2B, H3, H4 составляют каркас, на который наматывается фрагмент ДНК протяженностью 146 п. н. Нить ДНК образует 1,65 супервитка. Глобула состоит из восьми молекул гистонов: тетрамера $(H_3-H_4)_2$ и двух димеров H2A–H2B. Диаметр глобулы-диска составляет ≈ 11 нм, а высота — 5,7 нм. Эта

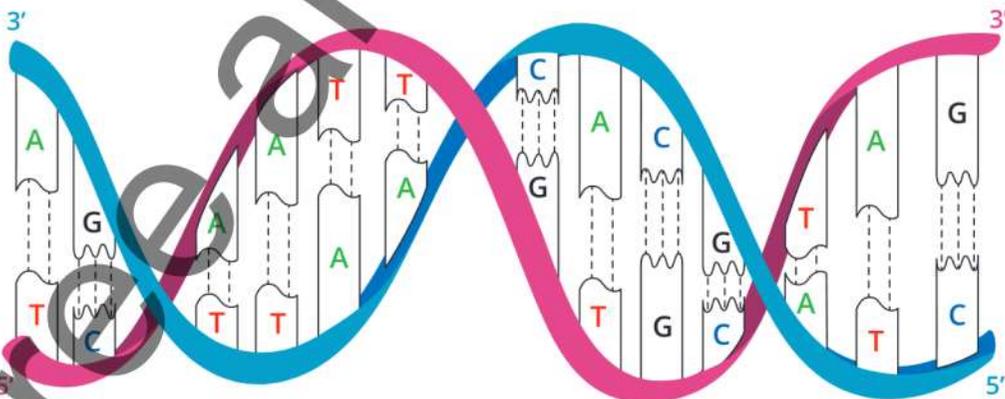


Рис. 7.1. Вторичная структура ДНК

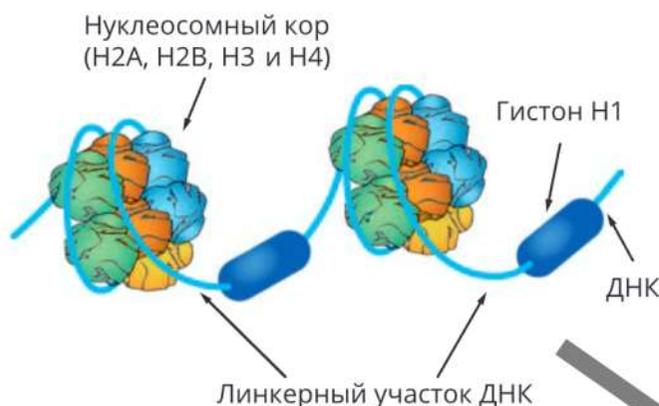


Рис. 7.2. Образование нуклеосомного кора

структура называется *нуклеосомой* или *нуклеосомным кором*. Гистон Н1 существует отдельно от остальных белков. Он связывается с концами молекулы ДНК, входящей и выходящей из минимальной нуклеосомы, и замыкает два полных витка двойной спирали. Функции гистоновых и негистоновых белков имеют определенные отличия (табл. 7.1).

ДНК нуклеосомная делится на две части:

- *коровую ДНК* с постоянной длиной 146 п. н. и относительной устойчивостью к расщеплению нуклеазами;
- *линкерную ДНК* с варьирующей длиной от 8 п. н. до 114 п. н. на одну нуклеосому.

Таблица 7.1. Характеристика гистоновых и негистоновых белков

Белки	Функция	
Гистоновые	H2A, H2B, H3, H4	Составление каркаса, на который наматывается фрагмент ДНК и образуется нуклеосомный кор
	H1	Связывание с концами молекулы ДНК и способствование образованию двух витков двойной спирали
Негистоновые	HP1	Участие в образовании гетерохроматина
	DNMT1, Brahma, CREB	Подавление или активация транскрипции, деметилирование ДНК, участие в образовании гетерохроматина
	HDAC, NcoR, YY1	Подавление или активация транскрипции, сплайсинг РНК, участие в образовании гетерохроматина
	HMGB	Компактизация хроматина, сплайсинг РНК
	ATRX	Реорганизация структуры хроматина

III уровень пространственной организации ДНК — *нуклеомерный, хроматиновая фибрилла, состоящая из упакованных нуклеосом (рис. 7.3)*. Диаметр — 30 нм. Степень укорочения по сравнению с I уровнем — 25–30 раз.

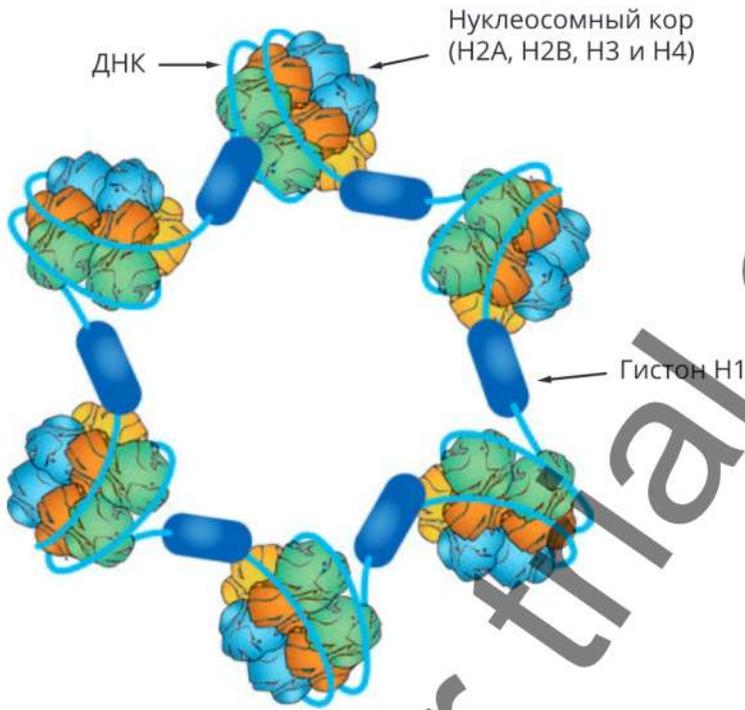


Рис. 7.3. Строение нуклеомера

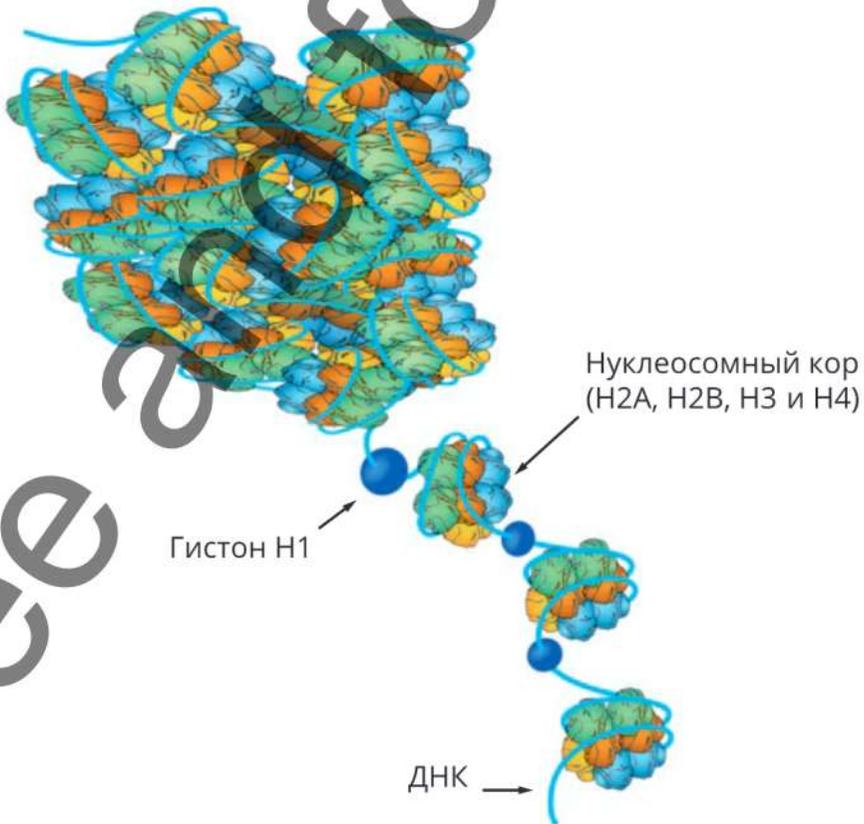


Рис. 7.4. Строение соленида

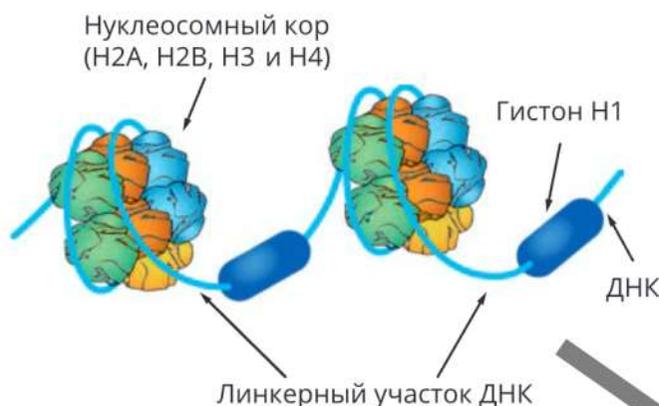


Рис. 7.2. Образование нуклеосомного кора

структура называется *нуклеосомой* или *нуклеосомным кором*. Гистон H1 существует отдельно от остальных белков. Он связывается с концами молекулы ДНК, входящей и выходящей из минимальной нуклеосомы, и замыкает два полных витка двойной спирали. Функции гистоновых и негистоновых белков имеют определенные отличия (табл. 7.1).

ДНК нуклеосомная делится на две части:

- *коровую ДНК* с постоянной длиной 146 п. н. и относительной устойчивостью к расщеплению нуклеазами;
- *линкерную ДНК* с варьирующей длиной от 8 п. н. до 114 п. н. на одну нуклеосому.

Таблица 7.1. Характеристика гистоновых и негистоновых белков

	Белки	Функция
Гистоновые	H2A, H2B, H3, H4	Составление каркаса, на который наматывается фрагмент ДНК и образуется нуклеосомный кор
	H1	Связывание с концами молекулы ДНК и способствование образованию двух витков двойной спирали
Негистоновые	HP1	Участие в образовании гетерохроматина
	DNMT1, Brahma, CREB	Подавление или активация транскрипции, деметилирование ДНК, участие в образовании гетерохроматина
	HDAC, NcoR, YY1	Подавление или активация транскрипции, сплайсинг РНК, участие в образовании гетерохроматина
	HMGB	Компактизация хроматина, сплайсинг РНК
	ATRX	Реорганизация структуры хроматина

III уровень пространственной организации ДНК — *нуклеомерный, хроматиновая фибрилла, состоящая из упакованных нуклеосом (рис. 7.3)*. Диаметр — 30 нм. Степень укорочения по сравнению с I уровнем — 25–30 раз.

7.2. Расположение хромосом в интерфазном ядре

Хромосомы на стадии интерфазы занимают в ядре определенные, не перекрывающиеся участки — «хромосомные территории» (рис. 7.7). Они имеют «губчатую» структуру, в силу чего регуляторные белки могут легко в них проникать [Арифудин Е. Е. и др., 2012; Рубцов Н. Б., 2014; Zinchenko A., 2016].

Основной структурной единицей хромосомных территорий являются *домены* размером 1 млн п. н., представляющие собой розетки, построенные из десяти петель или более. Домены с неактивными генами обладают компактной структурой, которая препятствует доступу крупных макромолекул и белковых комплексов, тогда как домены с активными генами имеют развернутую конфигурацию и легко доступны.

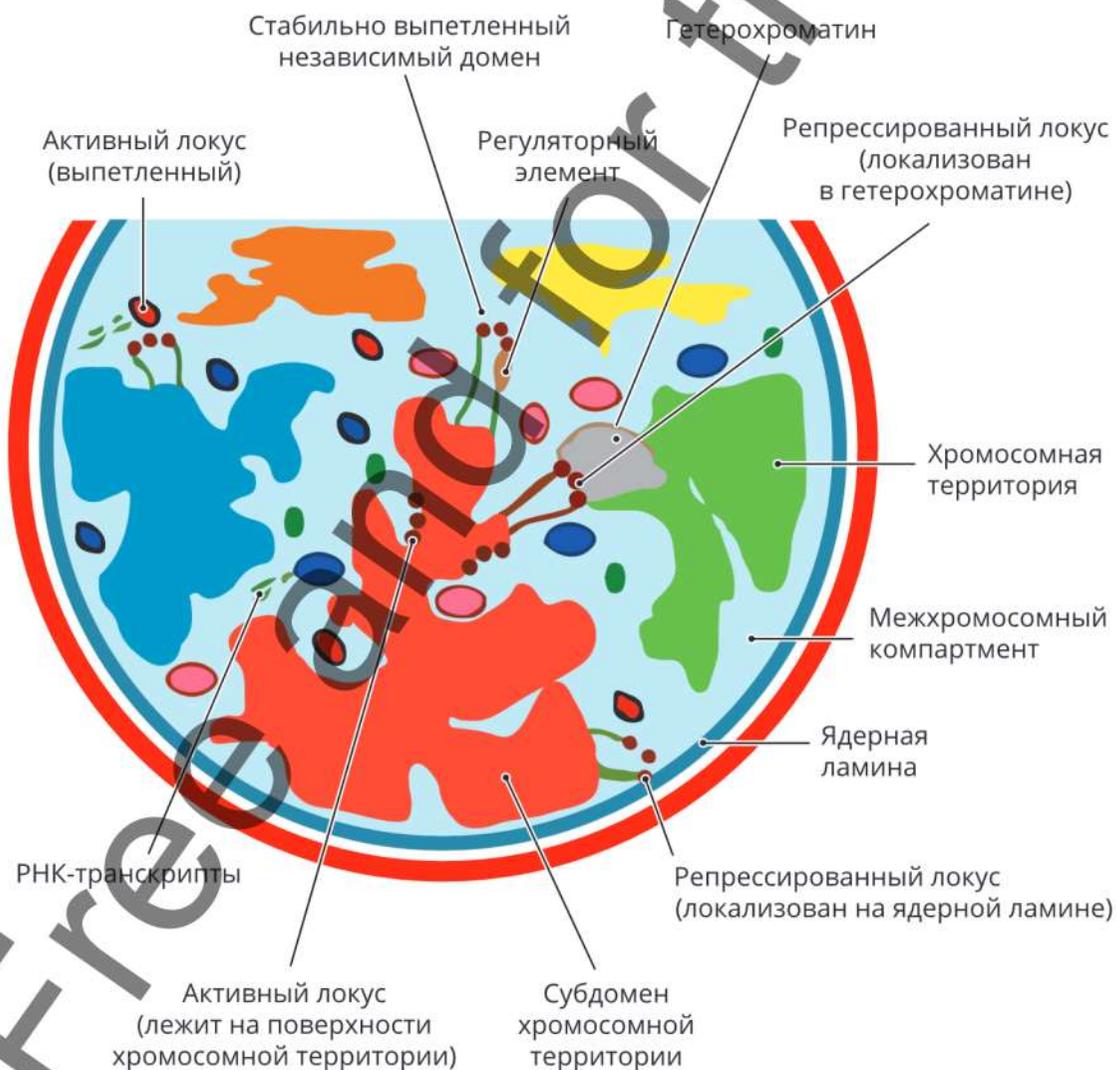


Рис. 7.7. Хромосомные территории

Эффект положения характерен для всех хромосом (рис. 7.8). Отмечено несколько общих особенностей расположения хромосом, при которых:

- для каждой хромосомы характерна определенная радиальная позиция, при обозначении которой принято указывать среднее расстояние между центрами ядра и хромосомной территорией (в процентах радиуса ядра);
- гомологичные (одинаковые) хромосомы располагаются далеко друг от друга, что, как предполагают, может обеспечить поддержание двух копий моноаллельно экспрессируемых генов на расстоянии без их совместной регуляции;
- гетерологичные (неодинаковые) хромосомы находятся довольно близко друг от друга;
- aberrantные хромосомы (например, с транслокациями) в разных слоях ядра занимают промежуточную позицию;
- процессы репарации ДНК проходят более активно в центре ядра;
- хромосомы с большим числом генов обычно располагаются ближе к центру ядра, а бедные генами — ближе к ядерной оболочке.

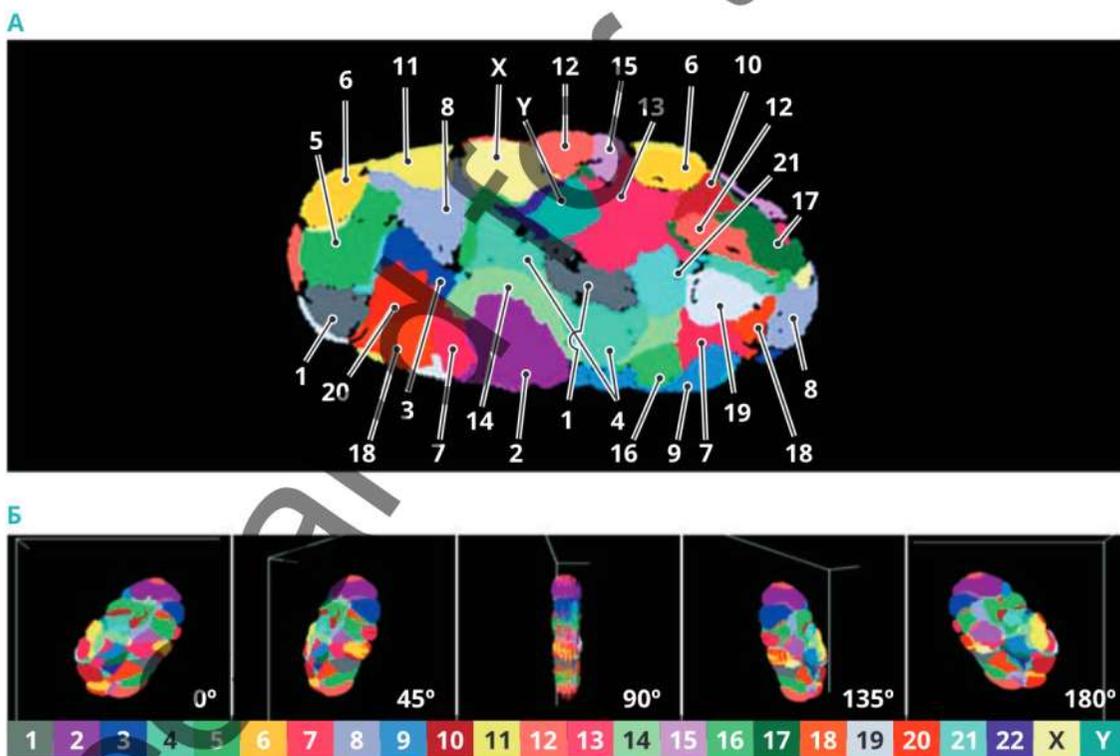


Рис. 7.8. Микрофотография интерфазного ядра под разными углами обзора: 24-цветное 3D FISH и классификация всех хромосом (отмечены цифрами и буквами) в ядре фибробластов человека в G₀-фазе клеточного цикла (цит. по [Bolzer A. et al. 2005])*

* Bolzer A., Kreth G., Solovei I. et al. Three-Dimensional Maps of All Chromosomes in Human Male Fibroblast Nuclei and Prometaphase Rosettes. PLoS Biol 2005; 3(5): e157. [URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030157>]

Между хромосомными территориями существует пространство, которое называют *интерхроматиновым доменом* (*interchromatin domain, ICD*). Эти домены соответствуют кластерам репликаонов. В этом пространстве происходит транспорт разных РНК и регуляторных белков. Там же располагаются особые участки, в которых депонированы факторы сплайсинга и некоторые другие белки.

Интерфазный хроматин показывает непрерывные, локально ограниченные движения. Полученные данные свидетельствуют о движении кодирующих и регуляторных последовательностей между периферией и внутренней частью кластера хроматиновой области в зависимости от их транскрипционной активности. Например, хромосома 19 обычно располагается в центре ядра, т. к. содержит большое количество генов (более 2000), а хромосома 18, содержащая около 1000 генов, расположена на периферии.

Несмотря на основные эволюционные изменения кариотипов у приматов, такое же расположение хромосом наблюдалось и у других видов приматов. Эти наблюдения показывают эволюционно сохраненные неслучайные механизмы расположения хроматина в ядре по меньшей мере в течение 300 млн лет.

7.3. Хромосома

Хромосома (греч. *χρόμα* — цвет + *σώμα* — тело) — это спирализованный хроматин. Длина хромосом варьирует от 0,2 до 5,0 мкм, а диаметр — от 0,2 до 2 мкм.

Набор хромосом соматической клетки, характерный для организма данного вида, называется *кариотипом*. Расположение хромосом по убывающей величине называется *кариограммой*, или *идиограммой* (см. рис. 7.9).

Хромосомы, одинаковые в клетках мужского и женского организмов, называются *аутосомами*. В кариотипе человека 22 пары аутосом. Хромосомы, различные в клетках мужского и женского организмов, называются *половыми хромосомами* (у мужчины это X- и Y-хромосомы, у женщины — две X-хромосомы).

Для хромосом всех организмов существуют определенные общие правила, характеризующие их морфологические особенности (табл. 7.2).

Таблица 7.2. Общая характеристика всех хромосом

Правило	Характеристика
Постоянность числа (n) хромосом	В норме организмы определенных видов имеют постоянное, характерное для вида число хромосом. Например: у человека — 46, у шимпанзе — 48, у макаки — 42, у собаки — 78, у плодовой мушки — 8

Окончание табл. 7.2

Правило	Характеристика
Индивидуальность хромосом	Негомологичные хромосомы отличаются по форме, строению и величине
Гомологичность хромосом	В диплоидном наборе, в норме, каждая хромосома имеет парную хромосому — одинаковую по форме и величине
Непрерывность хромосом	В S-фазу клеточного цикла происходит репликация (синтез) ДНК. В результате образуются две молекулы ДНК. Сверхспирализация удвоенной ДНК во время профазы митоза приводит к образованию хромосомы, состоящей из сестринских хроматид. После деления в дочерние клетки попадает по одной хроматиде, что указывает на то, что хромосомы непрерывны

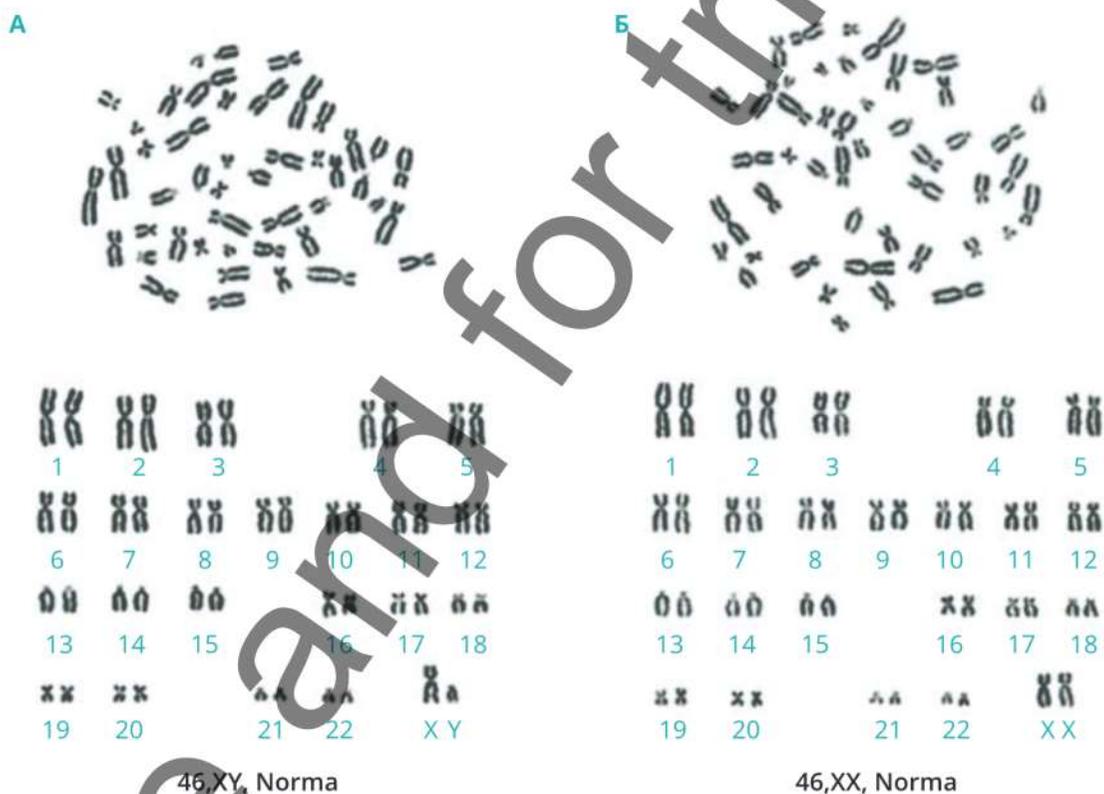


Рис. 7.9. Метафазные пластинки (вверху) и кариогаммы хромосом нормального женского (А) и мужского (Б) кариотипов (фото, монохромно окрашенные хромосомы)

7.3.1. Морфология хромосомы

Хромосома состоит из двух хроматид, объединенных первичной перетяжкой (рис. 7.10). Некоторые хромосомы имеют вторичную перетяжку. Каждая хромосома состоит из двух сестринских хроматид, которые, в свою очередь, состоят из двух

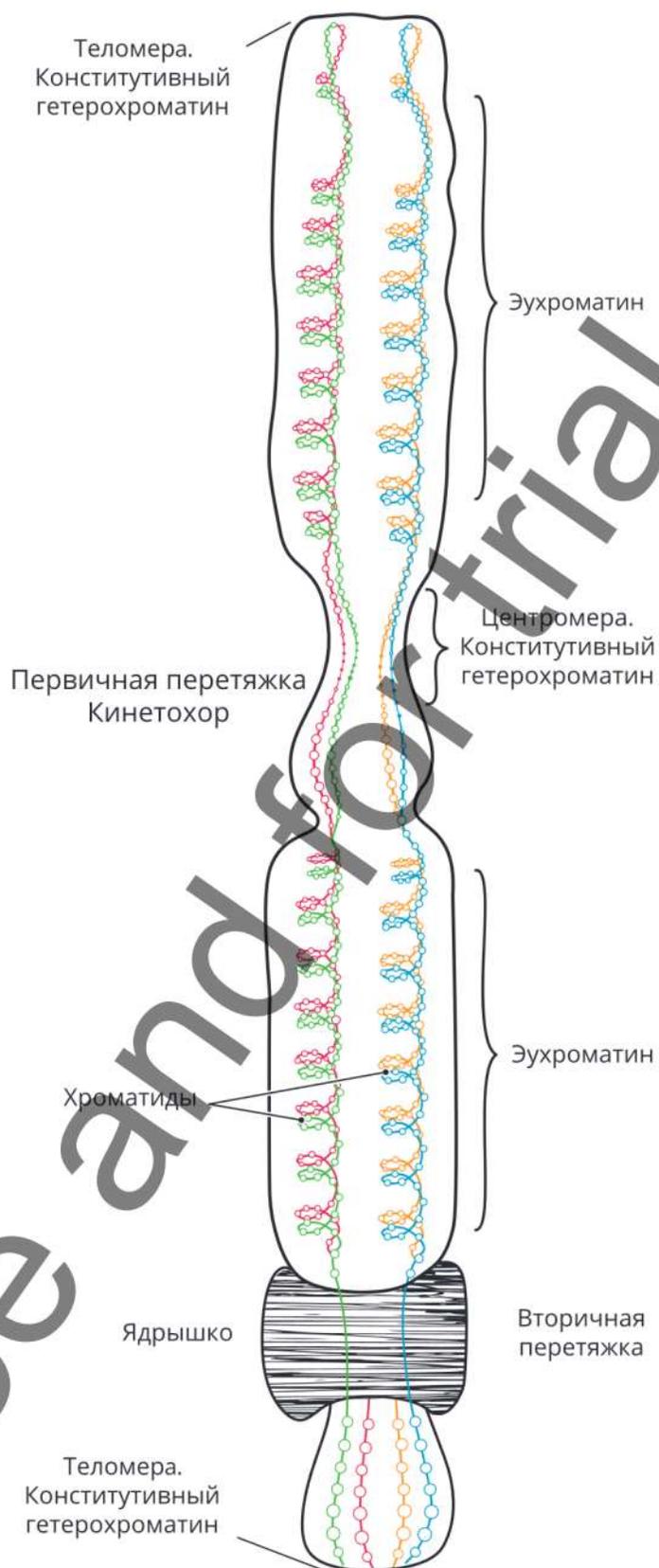


Рис. 7.10. Строение хромосомы



Метацентрическая

Субметацентрическая

Акроцентрическая

Рис. 7.11. Схема морфологических типов хромосом человека

хромонем (от греч. χρώμα — цвет + νῆμα — нить), которые представляют собой дезоксирибонуклеопротеидную цепочку, являющуюся структурной единицей хромосомы. Их число, положение и величина в обеих хроматидах одинаковы и для каждой хромосомы относительно постоянны. Расстояния между хромомерами называются *межхромомерными участками*.

Морфологически по положению центромеры, длине плеч и наличию вторичной перетяжки, или *спутника*, хромосомы делятся (**рис. 7.11**):

- на *метацентрические* (равноплечие);
- *субметацентрические* (неравноплечие);
- *акроцентрические* (центромера лежит у одного из концов хромосомы);
- *телоцентрические* палочковидные хромосомы с центромерой, расположенной на проксимальном конце. В геноме человека телоцентрические хромосомы отсутствуют.

7.3.2. Эухромосомные и гетерохромосомные участки хромосомы

При подготовке клетки к делению в ядре происходят спирализация хроматиновых фибрилл и превращение хроматина в хромосомы. После деления в ядрах дочерних клеток происходит деспирализация хроматиновых фибрилл, и хромосомы снова преобразуются в хроматин.

Хроматин (от греч. χρώματα — цвета, краски) представляет собой вещество, хорошо воспринимающее краситель, откуда и произошло его название. Хроматин состоит из хроматиновых фибрилл толщиной 20–25 нм. Эти фибриллы представляют собой комплекс ДНК с белками — *нуклеопротеид*. Хроматиновые фибриллы могут располагаться в ядре деконденсированно (менее закручено) или конденсированно (сверхспирализованно). На этом основании различают два вида хроматина: *эухроматин* и *гетерохроматин* (**табл. 7.3**).

Таблица 7.3. Морфологическая характеристика эухроматина и гетерохроматина

Признак	Эухроматин	Гетерохроматин	
		факультативный	конститутивный
Структура	Менее спирализованный, содержит также негистоновые белки	Конденсированный. Образуется путем компактизации эухроматина	Конденсированный постоянно. Сохраняется на протяжении всего митотического цикла. Формируется в раннем эмбриогенезе и эпигенетически наследуется во всех клетках организма
Локализация	Плечи хромосом	Плечи хромосом	Прицентромерные и прителомерные районы. Локусы повторенных последовательностей
Состав	Уникальные и малоповторяющиеся последовательности	Неактивная половая хромосома или тельце Барра в интерфазном ядре	Высокоповторенная ДНК — сателлиты. Умеренно повторенная ДНК. Уникальная ДНК. Мобильные генетические элементы
Гены	Много структурных генов	Гены раннего развития (эпигенетическая инактивация в развитии). Часть тканеспецифичных генов (эпигенетическая тканеспецифичная инактивация). Геномный импринтинг (эпигенетическая инактивация аллеля, пришедшего от одного из родителей). Аллельное исключение. Эпигенетическая (наследуемая) инактивация одного из двух аллелей гена. Инактивация X-хромосомы	Обычно генов в гетерохроматине очень мало
Функция	Участие в реализации наследственной информации	Компенсация дозы генов у гомогаметного пола, неспецифичная регуляция активности генов, репрессия генов, которые в других условиях функционируют	Структурная функция, участие в конъюгации, защита ДНК от нуклеаз
Репликация	Проходит активно	Поздняя репликация	Поздняя репликация
Трансляция	Проходит интенсивно	Нетранскрибируемый	Не проходит

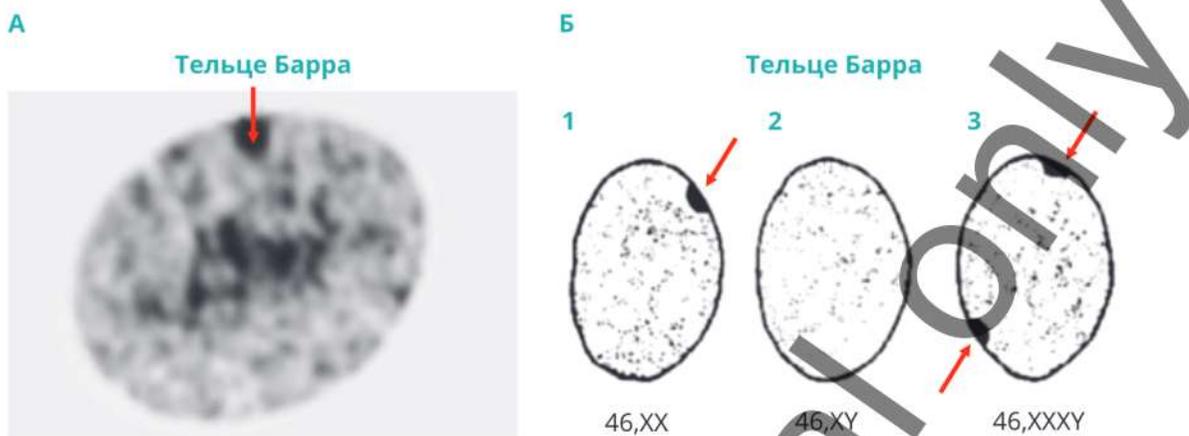


Рис. 7.12. Инактивированная X-хромосома (половой гетерохроматин, тельце Барра): **А** — ядро клетки на стадии интерфазы (фото); **Б** — ядра нормальной женской (1) и мужской (2) клеток и клетки пациента с синдромом Клайнфельтера (3)

Эухроматин (англ. *euchromatin*) — рыхлый, или деконденсированный, хроматин, слабо окрашивается при окраске. В нем (дезоксирибонуклеопротеин) имеются рибонуклеопротеидные гранулы, которые участвуют в завершении созревания РНК и переносе ее в цитоплазму.

Гетерохроматин (англ. *heterochromatin*) — компактный, или конденсированный, хроматин, хорошо окрашивается. Гетерохроматин связан с ядрышком, образуя вокруг него подобие кольца или оболочки.

Одним из примеров полового гетерохроматина является инактивированная X-хромосома в гомогаметных клетках женского организма. Гены на двух гомологичных хромосомах не могут функционировать одновременно. Поэтому одна из X-хромосом сверхспирализуется. Иначе она называется *тельце Барра* в честь ученого, открывшего это явление (рис. 7.12).

Соотношение эухроматина и гетерохроматина в ядре является показателем активности синтетических процессов в данной клетке.

7.3.3. Центромерные участки хромосомы

Центромера (*centromer*), первичная перетяжка, — это гетерохроматиновый участок хромосомы, которая объединяет сестринские хроматиды и принимает активное участие при направлении движения хромосом во время деления клетки (рис. 7.13).

Функция центромеры:

- адгезия (слипание) сестринских хроматид;
- образование кинетохора;
- спаривание гомологичных хромосом;
- вовлечение в контроль генетической экспрессии.

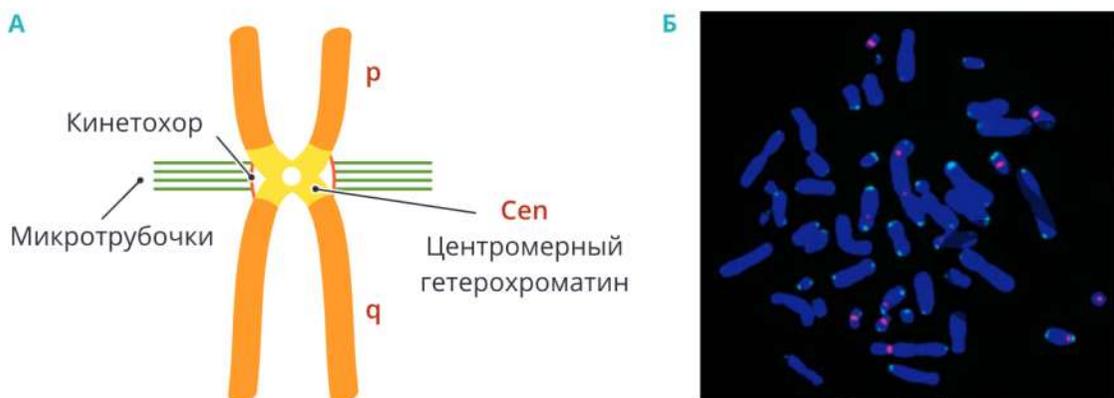


Рис. 7.13. Центромерный участок хромосомы:

А — схема строения; Б — центромерные участки метафазных хромосом (фото, FISH-окрашивание)

Последовательность ДНК в центромерном участке хромосомы богата нуклеотидами с аденином и тиминном. Она состоит из большого количества ДНК-повторов (например, сателлитной ДНК). У человека основная повторяющаяся последовательность называется α -сателлит длиной ~ 171 п. н. (**альфонд**). Не все α -сателлиты становятся центромерой. В этом участке хромосомы присутствуют и другие типы последовательностей сателлитной ДНК.

В пределах ДНК-повторов устанавливается место образования центромеры, называемое **неоцентромера**. Первичная последовательность ДНК в установившейся неоцентромере не имеет значения.

Плотно упакованный гетерохроматиновый участок хроматина центромеры имеет специфический гистон **CENP-A** (*Centromere Protein A*) вместо обычного гистона **H3**. Гистон **CENP-A** участвует в сборке кинетохора на центромере и может играть роль в эпигенетическом наследовании местоположения центромеры.

Белковые структуры (кинетохор) связываются в центромерном участке каждой хроматиды и являются местом прикрепления микротрубочек веретена деления в анафазе и телофазе митоза и мейоза. Кинетохор служит местом действия ключевой для клеточного цикла «контрольной точки», известной как «контрольная точка сборки веретена» (*spindle assembly checkpoint, SAC*), или «митотическая контрольная точка» [Weaver B.A.A. et al., 2003].

Сверхэкспрессия белка **CENP-A** приводит к неправильной локализации нецентромерного хроматина, генерируя неоцентромеры. Это является причиной образования дицентрических хромосом, анеуплоидных клеток, *микроядер*. Важно отметить, что сверхэкспрессия нескольких центромерных белков коррелирует с плохим прогнозом для ряда типов рака.

Аномалии функционирования центромеры ведут к проблемам во взаимном расположении хромосом в делящемся ядре и в результате — к нарушениям процесса *сегрегации* хромосом (правильное распределение хромосом между дочерними клетками). Эти нарушения приводят к такой геномной мутации, как анеуплоидия.

Для нормального наследования генетического материала требуется, чтобы после того, как прошла репликация и репарация ДНК в S-фазе клеточного цикла, хромосомы во время митоза или мейоза надежно расходились. Механизм этого процесса заключается в том, что дочерние хромосомы образуют центромеры в тех же местах, что и материнская хромосома, независимо от характера последовательности, расположенной в центромерном участке. В этом случае важную роль играет эпигенетическое регулирование процесса. Однако остается еще много неясности в этом вопросе. Предполагается, что должен быть какой-то первичный способ определения местоположения центромеры, даже если впоследствии ее местоположение определяется эпигенетическими механизмами.

7.3.4. Теломерные участки хромосомы

Теломера (*telomere*) (от др.-греч. τέλος — конец и μέρος — часть) — концевой участок плеч хромосомы (рис. 7.14). Хромосома имеет две теломеры. У большинства эукариот теломеры представляют собой повторяющиеся последовательности ДНК, распространяющиеся на расстояние от десятков до сотен тысяч пар оснований. Для

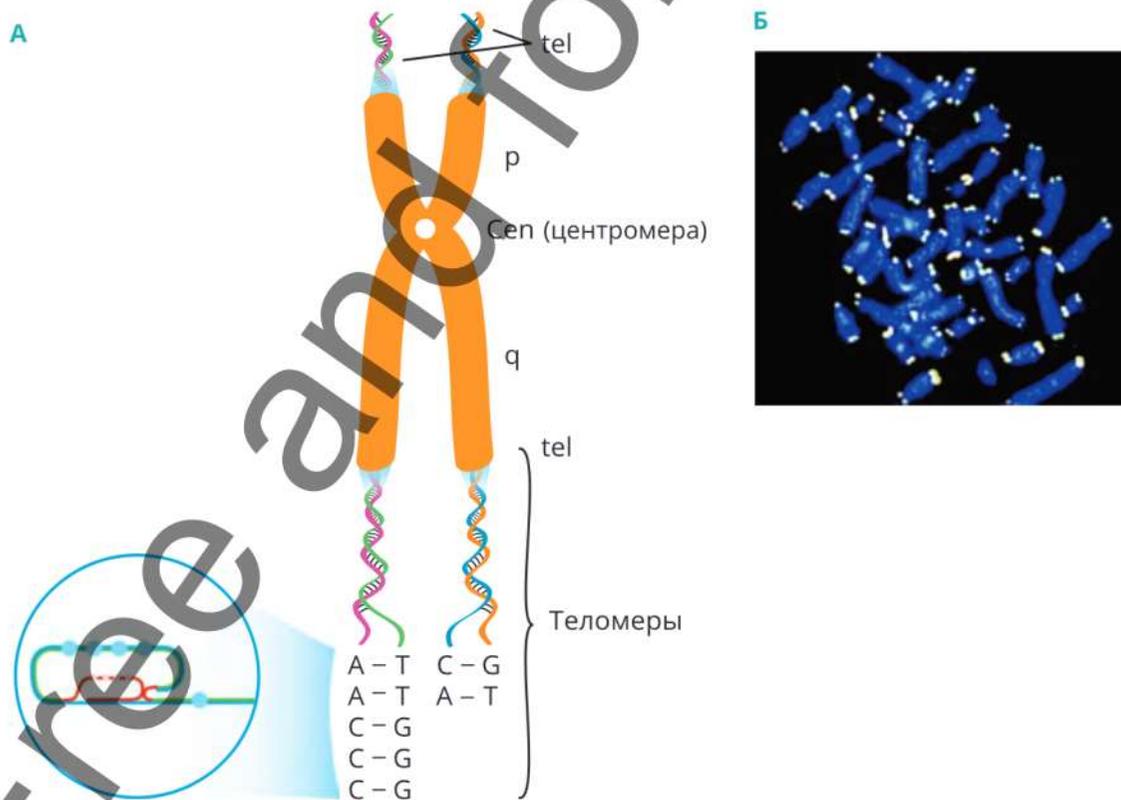


Рис. 7.14. Теломерные участки хромосомы:

А — схема; Б — метафазные хромосомы с помеченными теломерными участками (фото, FISH-окрашивание)

теломерных участков хромосом характерна значительная гетерогенность в разных клетках и тканях даже одного организма. Эти последовательности играют важную роль в защите концов хромосом от деградации.

Длина теломер у разных видов различна. У человека длина теломер доходит до нескольких тысяч пар оснований (т. п. о.) и содержит единственный повтор GGGTTA. Длина ДНК в теломерах хромосом человека варьирует. Например, в клетках зародышевой линии длина составляет 10–15 т. п. о., а в лейкоцитах периферической крови — 5–12 т. п. о.

Функции теломер:

1. Обеспечивают включение самых дистальных концов хромосом в репликацию ДНК, решая тем самым «проблему репликации концов» [Lue N.F., Jiang S., 2004].
2. Сохраняют стабильность хромосом.
3. Защищают концы хромосом от деградации и подавляют слияние с другими хромосомами.
4. Участвуют в перемещении и определяют архитектуру хромосом внутри ядра.
5. Имеют тенденцию образовывать ассоциаты друг с другом. Эти ассоциаты вовлечены в формирование ядерных доменов, которые могут быть важны для регуляции транскрипции, спаривания сестринских хроматид при митозе и для гомологичного синапсиса при мейозе.

Функции теломер регулируются как специальными нуклеотидными последовательностями, так и эпигенетическими механизмами.

Теломеры принципиально отличаются от поврежденных концевых участков хромосом. При возникновении аберрации начинают срабатывать репарационные механизмы, происходит задержка в клеточном цикле.

Для активной пролиферации клеток теломерные последовательности не должны становиться короче определенного порогового размера. На сегодняшний день известно, что при запуске мутагенных и канцерогенных механизмов внутри клетки наблюдается резкое повышение активности теломераз. Такая активность характерна для опухолевых клеток и является маркером их злокачественного перерождения. Поэтому в качестве одного из подходов к терапии опухолей рассматривают подавление активности теломераз, функционирование которых, как полагают, необходимо для иммортализации клеток и роста опухолей.

Во время репликации ДНК-полимераза не может синтезировать линейную хромосому полностью. Требуется иной механизм восстановления концов хромосомы. Теломерные участки восстанавливаются ферментом теломеразой, которая является обратной транскриптазой с внутренней РНК-матрицей. Теломераза добавляет особые повторяющиеся последовательности ДНК (TTAGGG у позвоночных) к 3'-концу цепи ДНК на участках теломер на концах хромосом в эукариотических клетках. Теломеразная активность наблюдается в активно делящихся клетках (см. рис. 7.15).

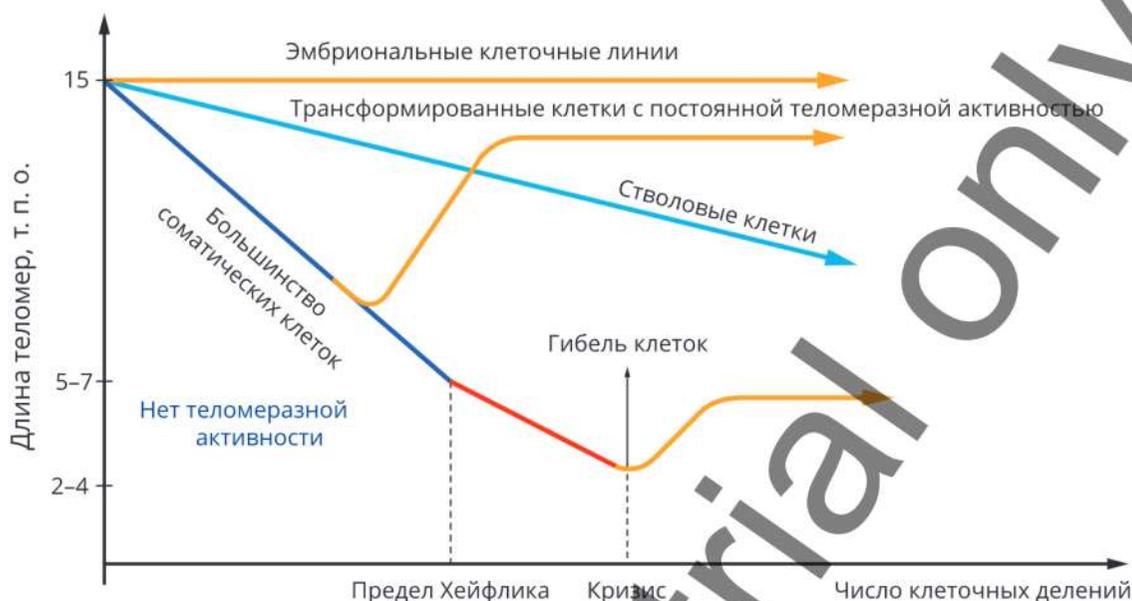


Рис. 7.15. Активность фермента теломеразы при достраивании теломер различных типов клеток

Механизм достраивания концевых участков хромосом проходит с участием белков *шелтеринов* (анг. *shelterin*) (TRF1, TRF2, TIN2, Rap1, TPP1, POT1). Шелтерины формируют защитный комплекс на конце теломеры, участвуют в образовании Т-петли и контролируют синтез теломерной ДНК при участии теломеразы.

Шелтерины обеспечивают следующие процессы:

1. Белки TRF1, TRF2, POT1 напрямую узнают повторы TTAGGG.
2. TRF1, TRF2, POT1 соединяются с TIN2, Rap1, TPP1 и формируют комплекс, отличающий теломеры от сайтов повреждения ДНК.
3. Далее белки TRF1 и TRF2 формируют *гомодимеры*, а POT1 связывает одноцепочечный сайт 5'-(TTAGGGTTAG)-3'.

7.3.5. Спутничные участки хромосомы

Спутник (satellite) — это участок хромосомы, сферическое тельце с диаметром, равным диаметру хромосомы или меньше, которое связано с хромосомой тонкой нитью (рис. 7.16). Вторичная перетяжка, соединяющая спутник с телом хромосомы, способна участвовать в процессе формирования и сборке ядрышек и поэтому называется еще *ядрышковым организатором*. Спутник вместе со вторичной перетяжкой составляют *спутничный район*. У одних хромосом вторичные перетяжки могут быть на длинном плече, а у других — на коротком.

Район спутничной перетяжки остается деспирализованным на протяжении всего клеточного цикла. Здесь расположены гены, ответственные за синтез рРНК, поступающей в ядрышко.



Рис. 7.16. Акроцентрические хромосомы (стрелками указаны спутничные участки): **А** — хромосома на стадии метафазы: **p** и **q** — короткое и длинное плечи хромосомы; **Б** — фото дифференциально окрашенных хромосом; стрелки — указаны спутничные участки хромосом (цит. по [Ketan K. Vaghasia et al., 2017])

Закономерности наследования и взаимодействия генов

Наследственность (*heredity*) — это присущая всем живым организмам способность передавать информацию о признаках и их развитии, зашифрованную с помощью генетического кода в ДНК, от родителей к детям. Наследственность бывает *ядерная* (гены локализованы в ядерной ДНК) и *цитоплазматическая* (гены локализованы в митохондриальной ДНК).

Закономерности наследования генов были открыты с применением *гибридологического метода*, предложенного *Грегором Менделем*. При этом методе используется скрещивание организмов и последующий анализ признаков у потомства. Скрещивание проводится в ряду поколений, что позволяет выяснить тип наследования признака и генетическую структуру организма. В основе гибридологического анализа лежит способность к *рекомбинации* при гаметогенезе.

Гибридологический метод **не может использоваться при изучении генетики человека**, так как:

- невозможен целенаправленный выбор родителей;
- недостаточное число детей в семье;
- ограничен период наблюдения (первое-второе поколение);
- большое наследственное разнообразие.

Для записи результатов скрещиваний в генетике используются специальная символика, предложенная *Г. Менделем*:

P — родители;

F — потомство, (**F₁** — гибриды первого поколения, **F₂** — гибриды второго поколения);

G — гаметы;

× — значок скрещивания;

♂ — мужская особь;

♀ — женская особь.

A, a, B, b, C, c и др. — буквами латинского алфавита обозначаются отдельно взятые наследственные признаки.

Благодаря гибридологическому методу были открыты законы наследственности (табл. 8.1), что легло в основу общей генетики.

Таблица 8.1. Законы наследования генов

Название закона	Наследование генов и признаков
Закон/правило единообразия потомков первого поколения (I закон Менделя)	Гены с фенотипическим проявлением доминантных признаков
Закон расщепления (II закон Менделя)	Аллельные гены аутосом, <i>Альтернативные</i> признаки
Закон независимого наследования генов (III закон Менделя)	Неаллельные гены аутосом, расположенных в негомологичных хромосомах. <i>Неальтернативные</i> признаки
Закон сцепленного наследования генов (закон Моргана)	Неаллельные гены аутосом, расположенных в одной хромосоме
	Гены, сцепленные с X-хромосомой
	Гены, сцепленные с Y-хромосомой

Генотип (от др.-греч. γένος — род + τύπος — отпечаток) — совокупность всех генов организма, локализованных в хромосомах.

Фенотип (от греч. φαίνω, лат. *phainō* — являю, обнаруживаю + τύπος, typos — образец) — совокупность всех признаков организма, которые проявляются при взаимодействии генотипа и средовых факторов.

Аллели (от греч. ἀλλήλων — друг друга, взаимно) — варианты одного и того же гена, различающиеся нуклеотидными последовательностями.

Гомозигота (др.-греч. ὁμοῖος — подобный, похожий + ζυγωτός — спаренный, удвоенный) — генотип организма с одинаковыми вариантами аллельной пары в определенном локусе гомологичных хромосом.

Гетерозигота (греч. ἄλλο — другой, разный + ζυγωτό — соединенный вместе) — генотип организма с разными вариантами аллельной пары в определенном локусе гомологичных хромосом.

Гемизигота (от греч. ἁπλ — полу- + ζυγωτό — соединенный вместе) — генотип гетерогаметного (мужского) организма с гаплоидным набором генов в гетерологических хромосомах. Генотип мужского организма гемизиготен по генам половых хромосом.

Гомологичные (др.-греч. ὁμοῖος — подобный, похожий + νόμος — слово, закон) хромосомы — хромосомы одной пары, в норме — приблизительно равной длины, с одинаковым набором генов и положением центromеры. В каждой паре хромосом во время оплодотворения одна получена от матери, другая — от отца.

8.1. Закон расщепления генов

Закон расщепления — это наследование аллельных генов аутосом и альтернативных признаков. Этот закон был открыт с помощью *моногибридного скрещивания* (скрещивание, в котором родительские формы различаются по одной паре альтернативных признаков, контролируемых аллелями одного гена).

Аллельные гены — это варианты одного гена, которые контролируют развитие альтернативных признаков. В диплоидном организме аллельные гены расположены в идентичных локусах гомологичных хромосом (рис. 8.1). Аллельные гены возникают в результате генных мутаций, поэтому вариантов одного гена (аллелей) может быть несколько (два, три, четыре и более).

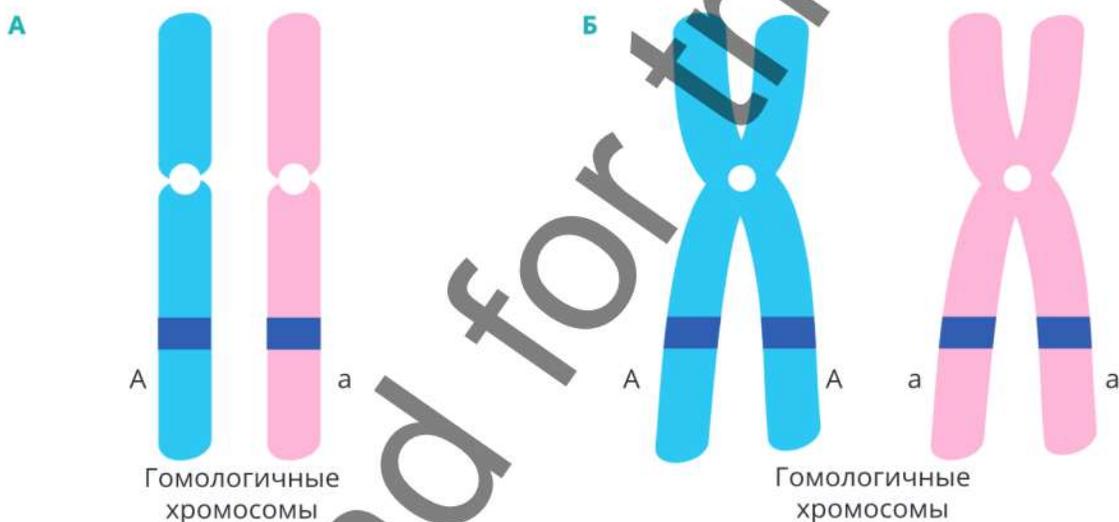


Рис. 8.1. Схема расположения аллельных генов на интерфазных (А) и метафазных (Б) хромосомах

В диаллельной системе различают два варианта аллельных генов — *доминантный* и *рецессивный*, которые соответствуют двум вариантам одного признака. Доминантный ген подавляет проявление рецессивного гена. Действие доминантного гена проявляется как в гомозиготном, так и в гетерозиготном состоянии, рецессивного — только в гомозиготном состоянии. При *полном доминировании* наблюдаются следующие закономерности:

- расщепление по генотипу: **1 : 2 : 1**;
- расщепление по фенотипу: **3 : 1**.

Цитологическими и генетическими основами закона расщепления являются:

- расхождение гомологичных хромосом к полюсам во время редукционного деления мейоза I (рис. 8.2);
- случайное слияние гамет при оплодотворении.

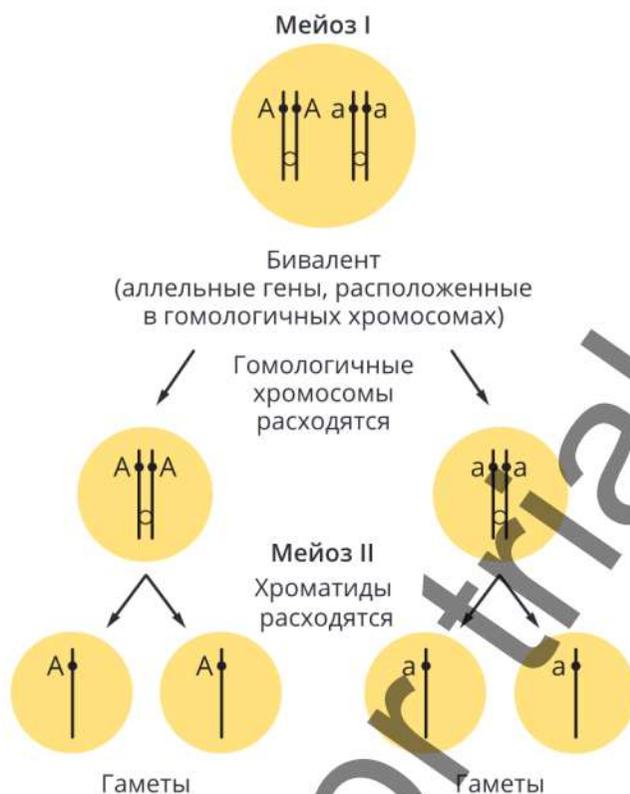


Рис. 8.2. Схема цитологических и генетических основ закона расщепления

Пример. Наследование цвета глаз детьми, у родителей которых карие и голубые глаза (родители-гомозиготы)

P: AA × aa
Кареглазая Голубоглазый

G_p: (A) (a)

F₁: Aa
Кареглазые

Единообразие потомков первого поколения

F₁: Aa × Aa
Кареглазая Кареглазый

G_{F₁}: (A) (a) (A) (a)

F₂: 1/4 AA : 1/4 Aa : 1/4 Aa : 1/4 aa
Кареглазые Кареглазые Кареглазые Голубоглазый

Расщепление по генотипу: **1 : 2 : 1.**

Расщепление по фенотипу: **3 : 1.**

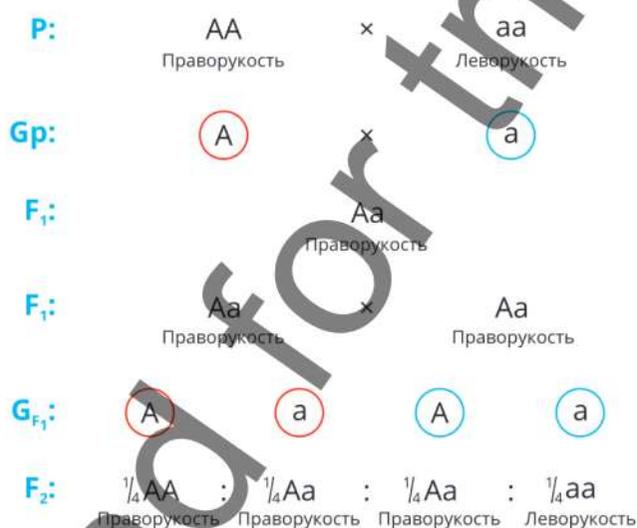
Сокращения: **A** — карие глаза (доминантный признак); **a** — голубые глаза (рецессивный признак),
P — родители; **G_p** — гаметы родителей; **G_{F₁}** — гаметы первого поколения **F₁**, **F₂** —
потомки второго поколения.

8.2. Взаимодействие аллельных генов

8.2.1. Полное доминирование

Фенотипическое проявление признаков одного доминантного аллеля не зависит от рецессивного аллеля, поэтому фенотипы у потомства поколения F_1 (гетерозиготы Aa) и одного из родителей (доминантной гомозиготы AA) совпадают — правило доминирования: $A > a$. В поколении F_2 все особи, в генотипе которых есть доминантный аллель, будут иметь доминантный фенотип.

Пример. Наследование праворукости и леворукости у потомков поколения F_1 и F_2



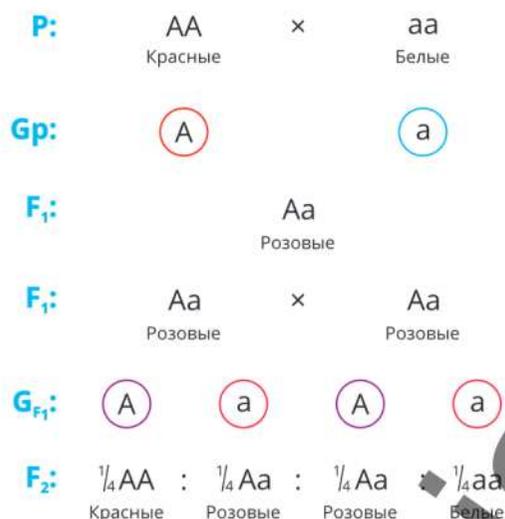
Расщепление по генотипу: **1 : 2 : 1**

Расщепление по фенотипу: **3 : 1**

8.2.2. Неполное доминирование

Признак у гибрида F_1 проявляется неполностью, формируется несхожий с обоими родителями промежуточный фенотип. Проявление признака зависит от дозы одного и другого аллеля в гомологичных хромосомах.

Пример. При скрещивании земляники с красными и белыми плодами в поколении F_1 (две гомозиготы) проявляется промежуточный признак, а при скрещивании двух гетерозигот в поколении F_2 наблюдаются ягоды красного (AA), розового (Aa) и белого (aa) цветов:



Расщепление по фенотипу поколения F₂ будет совпадать с расщеплением по генотипу: 1 : 2 : 1.

8.2.3. Кодоминирование

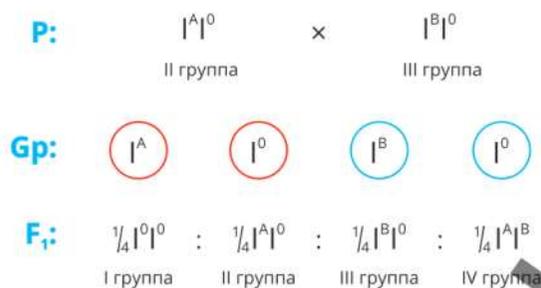
При кодоминировании доминантный и рецессивный аллели функционируют независимо друг от друга (A + a), поэтому у гибрида F₁ одновременно проявляются оба признака, характерные для родительских форм. В этом случае расщепление в F₂ по фенотипу будет совпадать с расщеплением по генотипу: 1/4 AA : 1/2 Aa : 1/4 aa (1 : 2 : 1). Примером кодоминирования является IV группа крови по системе АВ0 (табл. 8.2), которая чаще всего определяется в клинической практике. Ген, кодирующий белки групп крови системы АВ0, располагается на длинном плече хромосомы 9 (9q34.2).

Таблица 8.2. Генотипы и фенотипы групп крови по системе АВ0*

Группа крови (фенотип)	Возможный генотип	Формирование групп крови	
		Антиген эритроцитов	Антитела плазмы
I	II ⁰	Нет	α- и β-агглютинины
II	II ^A ; II ⁰	A-агглютиноген	β-агглютинин
III	II ^B ; II ⁰	B-агглютиноген	α-агглютинин
IV	II ^{AB}	A- и B-агглютиногены	Нет

* По данным Международного общества переливания крови (International Society of Blood Transfusion, ISBT), у человека обнаружено еще 35 систем групп крови, при этом гены, кодирующие белки, локализируются на разных хромосомах.

Пример. Наследование IV группы крови в первом и втором поколениях:



Расщепление по генотипу: **1 : 1 : 1 : 1**

Расщепление по фенотипу: **1 : 1 : 1 : 1**

8.3. Закон независимого наследования генов

Закон независимого наследования генов — это наследование *неаллельных генов*, расположенных в негомологичных аутосомах. В этом случае происходит передача и *неальтернативных признаков* (рис. 8.3). Этот закон был открыт с использованием *дигибридного* скрещивания (скрещивание, в котором родительские формы различаются по двум парам альтернативных признаков, контролируемых аллелями двух разных генов). Этот закон приемлем также при три- и полигибридном скрещивании.

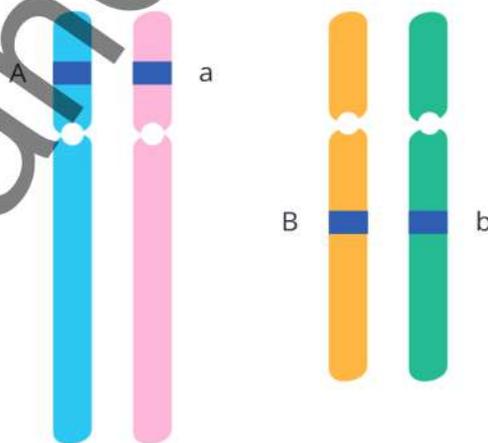
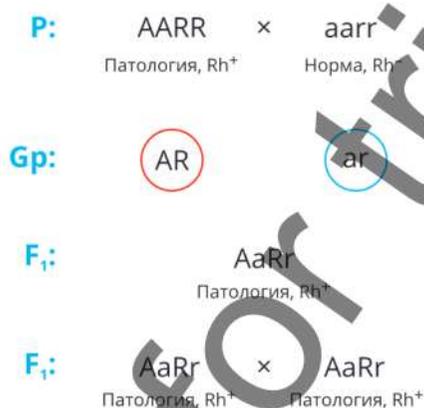


Рис. 8.3. Схема расположения неаллельных генов на интерфазных хромосомах

При скрещивании двух *дигомозиготных* организмов, различающихся по двум парам аллелей (A–a, B–b), в первом поколении F₁ получается *дигетерозигота*.

Фенотипически проявляются только два доминантных признака (тип взаимодействия аллелей в каждой паре — полное доминирование: $A > a$, $B > b$). Далее при скрещивании двух дигетерозигот в F_2 получается 16 особей.

Пример. Наследование резус-фактора и синдрома Марфана — моногенного заболевания с аутосомно-доминантным типом наследования (см. гл. 15). Определение положительного и отрицательного резус-фактора (Rh^+ и Rh^-) относят к наличию или отсутствию антигена Rho(D), который кодируется геном *RHD* (*Rh blood group, D antigen, Rh polypeptide 1*), локализованном на хромосоме 1 (1p36.11).



Сокращения: **A** — патология (доминантный признак); **a** — норма (рецессивный признак); **R** — Rh^+ (доминантный признак); **r** — Rh^- (рецессивный признак).

Представим результаты скрещивания в виде таблицы — решетки Пенета:

G_2	(AR)	(Ar)	(aR)	(ar)
(AR)	$AARR$ Патология, Rh^+	$AARr$ Патология, Rh^+	$AaRR$ Патология, Rh^+	$AaRr$ Патология, Rh^+
(Ar)	$AARr$ Патология, Rh^+	$AArr$ Патология, Rh^-	$AaRr$ Патология, Rh^+	$Aarr$ Патология, Rh^-
(aR)	$AaRR$ Патология, Rh^+	$AaRr$ Патология, Rh^+	$aaRR$ Норма, Rh^+	$aaRr$ Норма, Rh^+
(ar)	$AaRr$ Патология, Rh^+	$Aarr$ Патология, Rh^-	$aaRr$ Норма, Rh^+	$aarr$ Норма, Rh^-

Расщепление по генотипу: **1 : 2 : 1 : 2 : 4 : 2 : 1 : 2 : 1** (или **1 : 2 : 1**)²

Расщепление по фенотипу: **9 : 3 : 3 : 1** (или **3 : 1**)²

Цитологическими и генетическими основами закона независимого наследования генов являются:

- расхождение гомологичных хромосом к полюсам во время редукционного деления мейоза (мейоз I) (рис. 8.4);
- независимый характер распределения негомологичных хромосом в разных гаметах;
- случайное слияние гамет при оплодотворении.

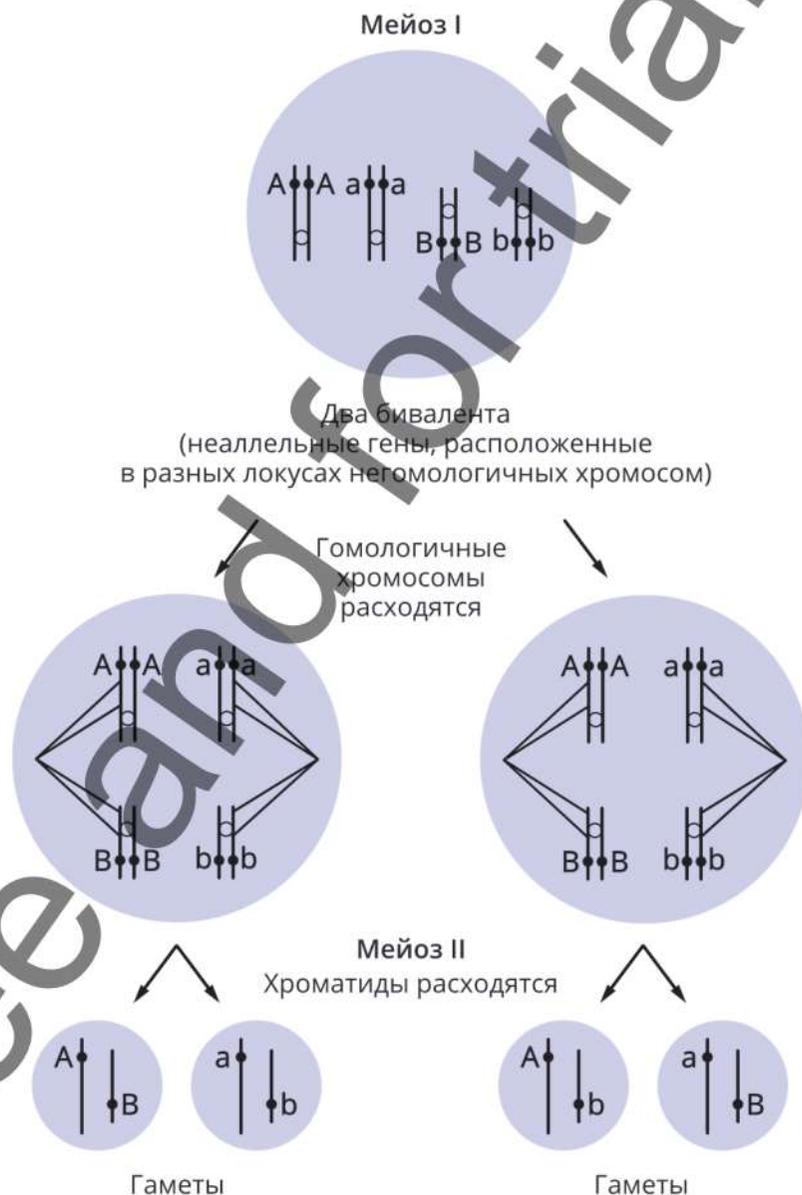


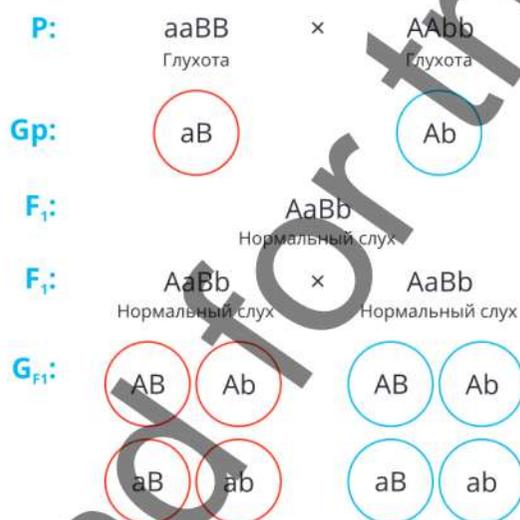
Рис. 8.4. Схема цитологических и генетических основ закона независимого наследования генов

8.4. Взаимодействие неаллельных генов

8.4.1. Комплементарность

При комплементарном взаимодействии неаллельных генов доминантные гены, дополняя действие друг друга, определяют появление нового признака. У организмов с генотипом **aabb** признак отсутствует. Так, гены врожденной нейросенсорной тугоухости (глухота) могут наследоваться по аутосомно-доминантному или рецессивному типу. Гены располагаются на негомологичных хромосомах. В семье, где оба родителя страдают этой наследственной патологией, может родиться ребенок с нормальным слухом.

Пример. Наследование генов тугоухости:



В F₂ может наблюдаться расщепление:

- по генотипу: 1 : 2 : 1 : 2 : 4 : 2 : 1 : 2 : 1;
- по фенотипу: 9 : 3 : 3 : 1; 9 : 3 : 4; 9 : 7.

8.4.2. Эпистаз

При эпистатическом взаимодействии неаллельных генов действие одного гена подавляется другим, ему не аллеломорфным. Ген-подавитель в этом случае называется *эпистатическим геном*, *геном-ингибитором* или *геном-супрессором*. Ген, проявление которого подавляется эпистатическим, называется гипостатическим геном.

Пример. Рецессивный эпистаз нетипичного фенотипического проявления групп крови у потомков — так называемый *бомбейский феномен*.

А. Фенотипическое проявление I группы крови у ребенка, родители которого имеют II и III группы крови:

Р: $I^A I^H h$ × $I^B I^H h$
II группа III группа

G	$I^B H$	$I^B h$
$I^A H$	$I^A I^B H h$ (IV группа)	$I^A I^B H h$ (IV группа)
$I^A h$	$I^A I^B H h$ (IV группа)	$I^A I^B h h$ (I группа)

Б. Фенотипическое проявление I группы крови у детей, родители которых имеют IV группу крови:

Р: $I^A I^B H h$ × $I^A I^B H h$
IV группа IV группа

G	$I^A H$	$I^A h$	$I^B H$	$I^B h$
$I^A H$	$I^A I^A H H$ (II группа)	$I^A I^A H h$ (II группа)	$I^A I^B H H$ (IV группа)	$I^A I^B H h$ (IV группа)
$I^A h$	$I^A I^A H h$ (II группа)	$I^A I^A h h$ (I группа)	$I^A I^B H h$ (IV группа)	$I^A I^B h h$ (I группа)
$I^B H$	$I^A I^B H H$ (IV группа)	$I^A I^B H h$ (IV группа)	$I^B I^B H H$ (III группа)	$I^B I^B H h$ (III группа)
$I^B h$	$I^A I^B H h$ (IV группа)	$I^A I^B h h$ (I группа)	$I^B I^B H h$ (III группа)	$I^B I^B h h$ (I группа)

Сокращения: **H** — ген (*fucosyltransferase 1, FUT1; H blood group*), который локализуется на 19q13.33 и кодирует антиген H на поверхности эритроцитов; **h** — рецессивный ген, не образующий антиген H.

8.4.3. Полимерия

При полимерии развитие того или иного признака обусловлено взаимодействием двух или более доминантных неаллельных генов, сходно воздействующих на развитие этого признака. Такие гены называются *полимерными*, или *множественными*.

Полимерные гены однозначно влияют на один и тот же признак: цвет кожи, рост, жирность материнского молока у человека и др. (рис. 8.5). Их принято обозначать одной латинской буквой с указанием индекса для разных членов: A_1, A_2, A_3, A_4 и т. д.

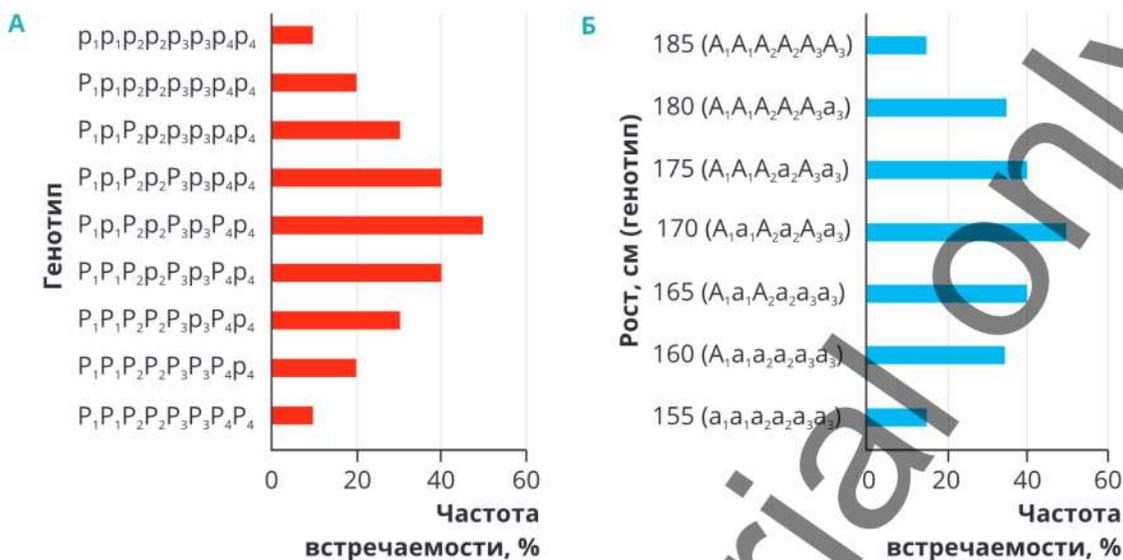


Рис. 8.5. Проявление полимерного взаимодействия неаллельных генов:

А — зависимость уровня содержания меланина в клетках кожи человека от генотипа;

Б — распределение среднего роста и генотипов у мужчин в европейской популяции

8.5. Закон сцепленного наследования генов

Закон сцепленного наследования генов — это наследование *неаллельных генов, расположенных в одной хромосоме*. Они образуют *группу сцепления* и наследуются вместе (см. **рис. 8.6**). Количество групп сцепления равно числу пар хромосом, т. к. каждая пара гомологичных хромосом содержит гены, контролирующие одни и те же признаки. У человека 23 группы сцепления (22 соответствуют 22 аутосомам и 2 — X- и Y-хромосомам). У шимпанзе обыкновенной (*Pan troglodytes*) 24 группы сцепления, у плодовой мушки дрозофилы (*Drosophila melanogaster*) — 4.

Было выяснено, что причиной появления хромосом с новыми комбинациями родительских генов является *кроссинговер*. Он происходит в профазе мейоза I на стадии зиготены, пахитены, диплотены и представляет собой обмен соответствующими участками между гомологичными хромосомами. Образование перекрестов между хроматидами осуществляется произвольно, на любых соответствующих участках.

Кроссинговер препятствует полному (абсолютному) сцеплению генов. Гаметы, которые образуются в результате кроссинговера, и особи, которые развиваются при участии таких гамет, называются *кроссоверными*, или *рекомбинантными*. Кроссинговер между конкретными сцепленными генами происходит с определенной вероятностью (частотой).

Частоту кроссинговера (англ. *recombination frequency (rf)* — частота рекомбинации) рассчитывают по формуле:

$$rf = \frac{\text{Сумма кроссоверных гамет}}{\text{Общее число особей (гамет)}} \cdot 100\%$$

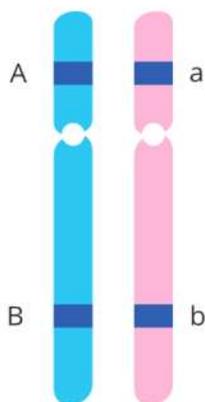


Рис. 8.6. Неаллельные гены, расположенные в одной хромосоме

Частота кроссинговера пропорциональна расстоянию между генами, расположенными в одной хромосоме. Чем больше расстояние между сцепленными генами, тем чаще между ними происходит кроссинговер. Частота кроссинговера позволяет судить о расстоянии между генами. Генетическое расстояние, на котором кроссинговер происходит с вероятностью в 1 %, называется *сантиморганидой* (сМ). Эти открытия позволили создать первые генетические карты хромосом (см. гл. 12).

В случае, когда между генами гомологичных хромосом происходит кроссинговер, говорят о *неполном сцеплении*. При этом образуются четыре гаметы: две кроссоверные и две некрссоверные. Частота кроссоверных гамет или особей меньше, чем некрссоверных. Если же кроссинговер отсутствует, то это считается полным сцеплением. При нем образуются две гаметы, а гены наследуются сцепленно.

Предположим, что неаллельные гены **A** и **B** расположены на одной хромосоме и отвечают за разные признаки. Расстояние между ними равно 20 сМ. Тогда у организма с генотипом **AB//ab** будут четыре гаметы: **AB**, **Ab**, **aB**, **ab**. Из них гаметы **AB** и **ab** являются некрссоверными и составляют 80 % (**AB** — 40 %, **ab** — 40 %), а гаметы **Ab** и **aB** — кроссоверными и составляют 20 % (**Ab** — 10 %, **aB** — 10 %).

Пример. Наследование двух неаллельных генов, локализованных на одной хромосоме, на расстоянии 3 сМ.

P: ER // ER × er // er
Эллиптоцитоз, Rh⁺ Норма, Rh⁻

G: ER er

F₁: ER // er
Эллиптоцитоз, Rh⁺

А. Полное сцепление:

P: ER // er × er // er
Эллиптоцитоз, Rh⁺ Норма, Rh⁻

G: ER er

F₁: 1/2 ER // er 1/2 er // er
Эллиптоцитоз, Rh⁺ Норма, Rh⁻
50 % 50 %

Б. Неполное сцепление:

P: ER // er × er // er
Эллиптоцитоз, Rh⁺ Норма, Rh⁻

G: ER rE er

F₁: ER // er er // er Er // er eR // er
Эллиптоцитоз, Rh⁺ Норма, Rh⁻ Эллиптоцитоз, Rh⁺ Норма, Rh⁻
48,5 % 48,5 % 1,5 % 1,5 %
Некрссоверное потомство Кроссоверное потомство

Сокращения: **E** — патология [наследственный эллиптоцитоз (овалоцитоз) — редкое аутосомно-доминантное заболевание, при котором эритроциты имеют овальную или эллиптическую форму]; **e** — норма; **R** — положительный резус-фактор (Rh+); **r** — отрицательный резус-фактор (Rh-).

Основные положения хромосомной теории наследственности:

- Гены в хромосомах расположены последовательно и линейно.
- Размещение генов в хромосоме строго упорядочено. Аллельные гены находятся в идентичных локусах гомологичных хромосом.
- Гены, расположенные в одной хромосоме, образуют группу сцепления и наследуются вместе. Количество групп сцепления равно гаплоидному числу хромосом.
- Сцепление генов может нарушаться в профазе I мейоза в результате кроссинговера между гомологичными хромосомами.
- Частота кроссинговера пропорциональна расстоянию между генами: чем больше расстояние, тем выше частота кроссинговера, и наоборот.

Цитологическими и генетическими основами закона сцепленного наследования генов являются:

- расхождение гомологичных хромосом и хроматид к полюсам во время мейоза;
- кроссинговер;
- случайное слияние гамет при оплодотворении.

8.6. Наследование генов, сцепленное с полом

При наследовании генов, локализованных в половых хромосомах, следует учитывать, что эти гены расположены на негомологичных хромосомах. Женская половая хромосома (**X**) относится к крупным метацентрическим хромосомам: в ее состав входят более тысячи генов (из них 874 гена кодируют белки). Мужская половая хромосома (**Y**) является малой акроцентрической хромосомой, в состав которой входят 200 генов. Поэтому доза генов в этих хромосомах различна. В геноме женского (*гомогаметного*) пола существуют две гомологичные половые хромосомы (**XX**). В геноме мужского (*гетерогаметного*) пола половые хромосомы негомологичные: присутствуют одна X-хромосома и одна Y-хромосома. Хромосомы X и Y иначе называют *гетерохромосомами*.

В женских гаметах находятся 22 аутосомы и X-хромосома, в мужских гаметах — 22 аутосомы и либо одна Y-, либо одна X-хромосома. Пол ребенка формируется отцом. Во время оплодотворения при слиянии мужской гаметы с X-хромосомой и женской гаметы с X-хромосомой формируется женский пол (46,XX), а при слиянии мужской гаметы с Y-хромосомой и женской гаметы с X-хромосомой — мужской пол (46,XY).

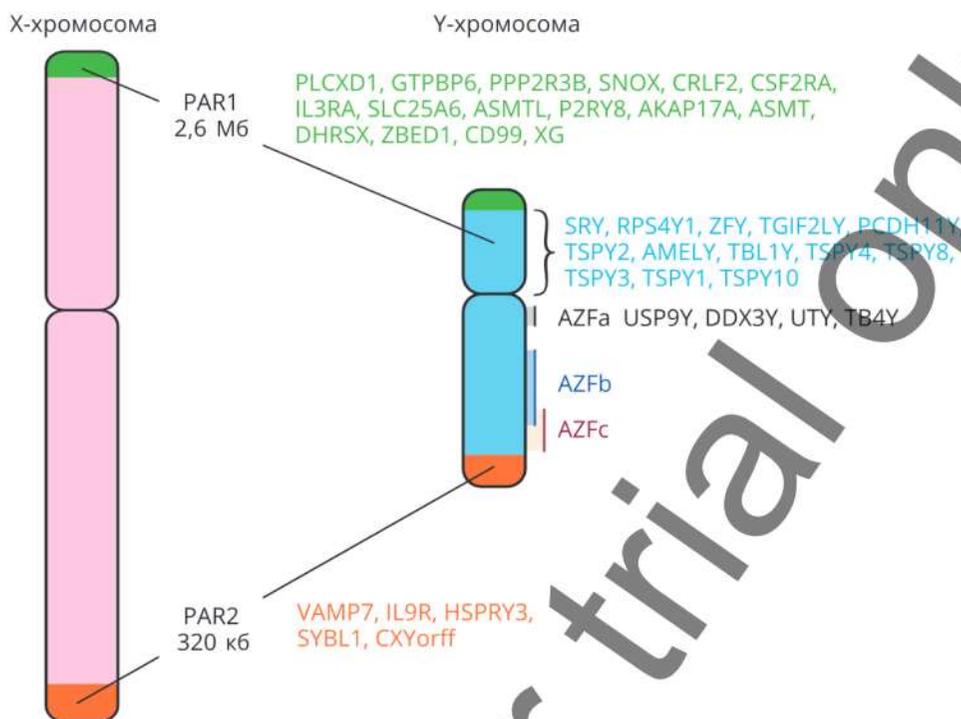


Рис. 8.7. Негомологичные и псевдоаутосомные участки половых хромосом (перечень генов)

Наследование генов, расположенных в негомологичных локусах гетерохромосом, называют *сцепленным с полом наследованием* (рис. 8.7). Необходимо учитывать, что в этих хромосомах существуют также и гомологичные районы — *псевдоаутосомные* [Colaco S., Modi D., 2018; Ross M. T. et al., 2005]. В этом случае наследование генов, локализованных в псевдоаутосомных участках, происходит так же, как при наследовании генов аутосом. Терминальные участки короткого плеча (p) X- и Y-хромосом включают псевдоаутосомную область PAR1 (*pseudoautosomal region 1*) размером 2,7 Мб. Генные локусы в этом регионе присутствуют в двух экземплярах и у мужчин, и у женщин. Во время мейоза между гомологичными псевдоаутосомными участками X- и Y-хромосом проходит процесс рекомбинации. Остальные области этих хромосом рекомбинации не подвергаются. На кончике длинного плеча X и Y есть вторая псевдоаутосомная область PAR2 (*pseudoautosomal region 2*) размером 330 кб. Область за пределами PAR называется мужской специфической областью на Y (*Male Specific Region Y, MSY*).

Гены, локализованные в Y^G-хромосоме, наследуются только по мужской линии. Такой тип наследования называется *голандрическим*. Признак или заболевание передается от отца и наблюдается у всех детей мужского пола в 100 % случаев.

Гены, локализованные в X-хромосоме, наследуются:

- мальчиками от матери;
- девочками от матери и от отца.

Рассмотрим разные варианты наследования данной патологии.

Пример. Наследование миопатии Дюшенна — X-сцепленного рецессивного заболевания.

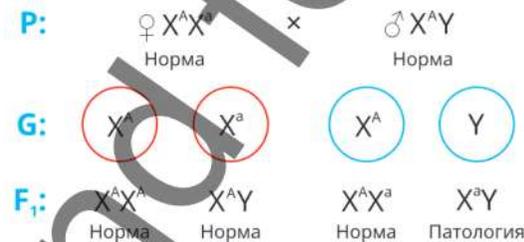
Вариант 1:



Сокращения: X^a — патология; X^A — здоров.

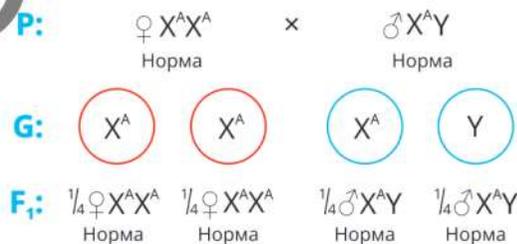
Частота рождения больных детей — 50 %. Из них больных девочек — 25 % и больных мальчиков — 25 %.

Вариант 2:



Частота рождения больных детей — 25 %. Из них 25 % больных мальчиков.

Вариант 3:



Все дети здоровы.

Вариант 4:



Частота рождения больных детей — 50 %. Из них больны только мальчики (50 %).

Медицинская генетика

Глава 9. Медико-генетическое консультирование	248
Глава 10. Генетико-эпидемиологические методы	252
Глава 11. Методы лабораторной генетики	267

Медико-генетическое консультирование

Медико-генетическое консультирование — вид специализированной медицинской помощи, целями которой служат выявление и профилактика наследственных болезней и известной патологии наследственного характера [Асанов А. Ю. и др., 2012; Бочков Н. П. и др., 2013; Гинтер Е. К., 2003; Шнайдер Н. А. и др., 2013].

На сегодняшний день медико-генетическое консультирование — это неотъемлемая часть практически любой области медицины. Развитие молекулярной биологии в конце XX — начале XXI в. позволило расширить познания о классификации как наследственных, так и других заболеваний. В ряде нозологий появились не только клиническая и патоморфологическая, генетическая, но и молекулярно-генетическая классификация болезней. Применение в лабораторной диагностике полногеномного и полноэкзомного секвенирования нового поколения (*Next-Generation Sequencing, NGS*) позволило выявить генетическую причину ряда заболеваний, которые раньше не считались наследственными.

Для того чтобы врач — медицинский генетик смог провести квалифицированную консультацию, дать заключение с рекомендациями, необходимо проанализировать результаты различных клинических исследований и использовать все методы медицинской генетики (табл. 9.1). Также важны результаты, полученные другими биологическими методами диагностики: *биохимические, цито-, гисто- и иммунологические, иммуногенетические* и др.

Таблица 9.1. Методы диагностики медицинской генетики для определения наследственного характера патологии

Генетико-эпидемиологический метод	Вид изучения / вычисления
Клинико-генеалогический	<ul style="list-style-type: none"> • Семейный анамнез. • Составление родословной. • Тип наследования патологии
Близнецовый	<ul style="list-style-type: none"> • Конкордантность и дискордантность. • Коэффициент наследственности. • Выявление влияния факторов среды

Окончание табл. 9.1

Генетико-эпидемиологический метод	Вид изучения / вычисления
Популяционно-статистический	<ul style="list-style-type: none"> • Частота встречаемости заболевания. • Генетическая структура популяции. • Характер изменения генов под влиянием окружающей среды. • Факторы популяционной динамики
Метод лабораторной генетики	Цель выявления
Цитогенетический	<ul style="list-style-type: none"> • Геномная, хромосомная мутация.
Молекулярно-цитогенетический	<ul style="list-style-type: none"> • Геномная, хромосомная, генная мутация
Молекулярно-генетический	<ul style="list-style-type: none"> • Генная мутация. • Нарушение экспрессии генов. • Изменение уровня метилирования ДНК

При первичном осмотре специалист использует также методы *дерматоглифики*, такие как *пальмоскопия* (изучение кожного рисунка на ладонях) и *плантоскопия* (изучение кожного рисунка на подошвах). По расположению гребней и борозд на коже можно предположить такие патологии, как синдромы Дауна, Клайнфельтера, Шершевского—Тернера и даже мультифакторные заболевания — диабет, рак и др.

Задачами медико-генетического консультирования являются:

- установление точного диагноза врожденного или наследственного заболевания;
- определение типа наследования заболевания в данной семье;
- расчет величины риска повторения заболевания в семье;
- объяснение содержания медико-генетического прогноза тем людям, которые обратились за консультацией;
- диспансерное наблюдение и выявление группы повышенного риска среди родственников индивида с наследственной болезнью;
- пропаганда медико-генетических знаний среди врачей и населения.

Показаниями для медико-генетического консультирования служат:

- установленная или подозреваемая наследственная болезнь в семье;
- близкородственные браки (см. табл. 9.2);
- возраст матери старше 35 лет;
- национальность;
- воздействие неблагоприятных факторов внешней среды до и в ранние сроки беременности (инфекционные заболевания, массивная лекарственная терапия, лучевая диагностика, профессиональная деятельность родителей; проживание на загрязненных радионуклидами территориях);
- рождение ребенка с врожденными пороками развития;
- задержка физического развития или умственная отсталость у ребенка;

- повторные спонтанные аборт, выкидыши, мертворождения;
- неблагоприятный ход беременности.

Таблица 9.2. Степень родства и доля общих генов у родственников

Степень родства	Родственные отношения	Доля общих генов (%)
I	Родители — дети	$\frac{1}{2}$ (50,00)
	Братья и сестры	
II	Дедушки, бабушки — внуки	$\frac{1}{4}$ (25,00)
	Дяди, тети — племянники	
III	Двоюродные братья и сестры	$\frac{1}{8}$ (12,50)
V	Троюродные братья и сестры	$\frac{1}{32}$ (3,12)

Медико-генетическое консультирование прогноза потомства разделяют на проспективное и ретроспективное.

Проспективное консультирование — это наиболее эффективный вид профилактики наследственных болезней, когда риск рождения больного ребенка определяется еще до наступления беременности или на ранних ее этапах. Супруги, направленные на консультацию, не имеют больного ребенка.

Ретроспективное консультирование — это консультирование относительно здоровья будущих детей после рождения в семье больного ребенка.

Медико-генетическое консультирование состоит из нескольких этапов (табл. 9.3).

Таблица 9.3. Основные этапы медико-генетического консультирования

Этап	Характеристика
I	<ul style="list-style-type: none"> • Подробный опрос пробанда/пациента. • Изучения анамнеза болезни. • Составление родословной. • Фенотипический и синдромологический анализы
	Уточнение диагноза с помощью методов генетической, лабораторной, лучевой диагностики и др.
	Проведение обследования членов семьи
II	Оценка генетического риска
III	Оформление официального заключения с учетом степени риска для потомства и других родственников
IV	Рекомендации медицинского генетика и психолога

Генетический риск — это вероятность (в процентах) проявления определенной наследственной патологии у пациента, обратившегося за консультацией, членов семьи и его потомков. Генетический риск определяется путем расчетов, основанных на генетических закономерностях, или с помощью эмпирических данных.

Для того чтобы достоверно рассчитать генетический риск, необходимо учитывать:

- клиническую и генетическую точность диагноза;
- полноту генеалогических данных (родословная должна включать информацию не менее чем о трех поколениях);
- выявление кровного родства между консультирующимися супругами (см. табл. 9.2), что очень важно;
- состояние здоровья монозиготных близнецов, если такие есть в родословной;
- обследование как больных, так и здоровых членов семьи;
- сведения о беременностях с патологией, выкидышах, мертворождениях.

После вычисления степени генетического риска заболевания врачом-генетиком даются рекомендации для выбора тактики медицинского сопровождения лица или лиц, обратившихся в консультацию (табл. 9.4).

Таблица 9.4. Рекомендации при уже известной частоте генетического риска проявления патологии

Генетический риск		Рекомендации
Уровень	%	
Низкий	1–5	Не является противопоказанием к деторождению в семье
Средний	6–20	<ul style="list-style-type: none"> • Требуется дополнительное обследование, такое как <i>пренатальная диагностика</i>. • Прерывание и планирование дальнейших беременностей зависит от тяжести медицинских и социальных последствий конкретного наследственного заболевания
Высокий	≥ 20	<ul style="list-style-type: none"> • Проведение <i>пренатальной диагностики</i> (желательно). • Использование методов вспомогательных репродуктивных технологий. • Дальнейшее деторождение в данной семье не рекомендуется

В дополнение к генетическому консультированию в рамках пренатальной диагностики может быть предложено психосоциальное консультирование.

Генетико-эпидемиологические методы

10.1. Клинико-генеалогический метод

Генеалогический метод — это метод изучения родословных и анализ наследования признака или заболевания в семье/роду. Человечество изучает родословные с древних времен. Активное применение анализа наследственной патологии в XVIII–XIX вв. можно считать предпосылкой к формированию клинико-генеалогического метода. В дальнейшем шло только усовершенствование метода, поиск методов статистического анализа данных.

Генеалогический метод применяется в клинической практике:

- при установлении наследственного характера признака;
- определении типа наследования признака или заболевания;
- для оценки пенетрантности гена;
- при анализе сцепления генов и картировании хромосом;
- изучении интенсивности мутационного процесса;
- расшифровке механизмов взаимодействия генов.

Метод предполагает тщательное клиническое обследование максимального количества членов родословной и включает несколько этапов: *сбор сведений о семье, составление родословной и генеалогический анализ* [Бочков Н.П. и др., 2013; Шнайдер Н.А. и др., 2013].

1. Сбор семейного анамнеза проводят по определенной схеме.

1. Проводят опрос *пробанда*. Пробанд — это обратившееся к врачу лицо, родословную которого необходимо составить. Им может быть больной или здоровый человек. Выясняют возраст, национальность, вредные привычки, профессиональную деятельность пробанда.
2. Собирают сведения о *родственниках первого порядка*. К ним относятся родители, дети, родные братья и сестры (сibsы) пробанда.
3. Если возможно, то узнают данные о *родственниках второго порядка* как со стороны матери, так и со стороны отца. К ним относятся бабушки, дедушки, тети и дяди, племянники и племянницы, двоюродные братья и сестры, внуки и внучки.

4. Изучают, что очень важно, акушерский анамнез женщин — как протекала и на каком фоне наступила беременность, подробности о спонтанных абортах, мертворождениях, наличии бесплодных браков и ранней детской смертности.
 5. Обязательно учитывают наличие и характер профессиональной деятельности пробанда и его родителей, наличие контакта с вредными условиями (мутагенными факторами) на работе.
 6. Выясняют, проживает ли семья на территориях, загрязненных радионуклидами или другими мутагенами среды, учитывают климатические особенности постоянного места проживания.
 7. Включают информацию о вредных привычках (курение, употребление алкоголя, наркотиков), приеме лекарственных препаратов в семье.
- II. Далее составляют **графическую схему родословной** с использованием символов — *генеалогическое древо* (рис. 10.1).

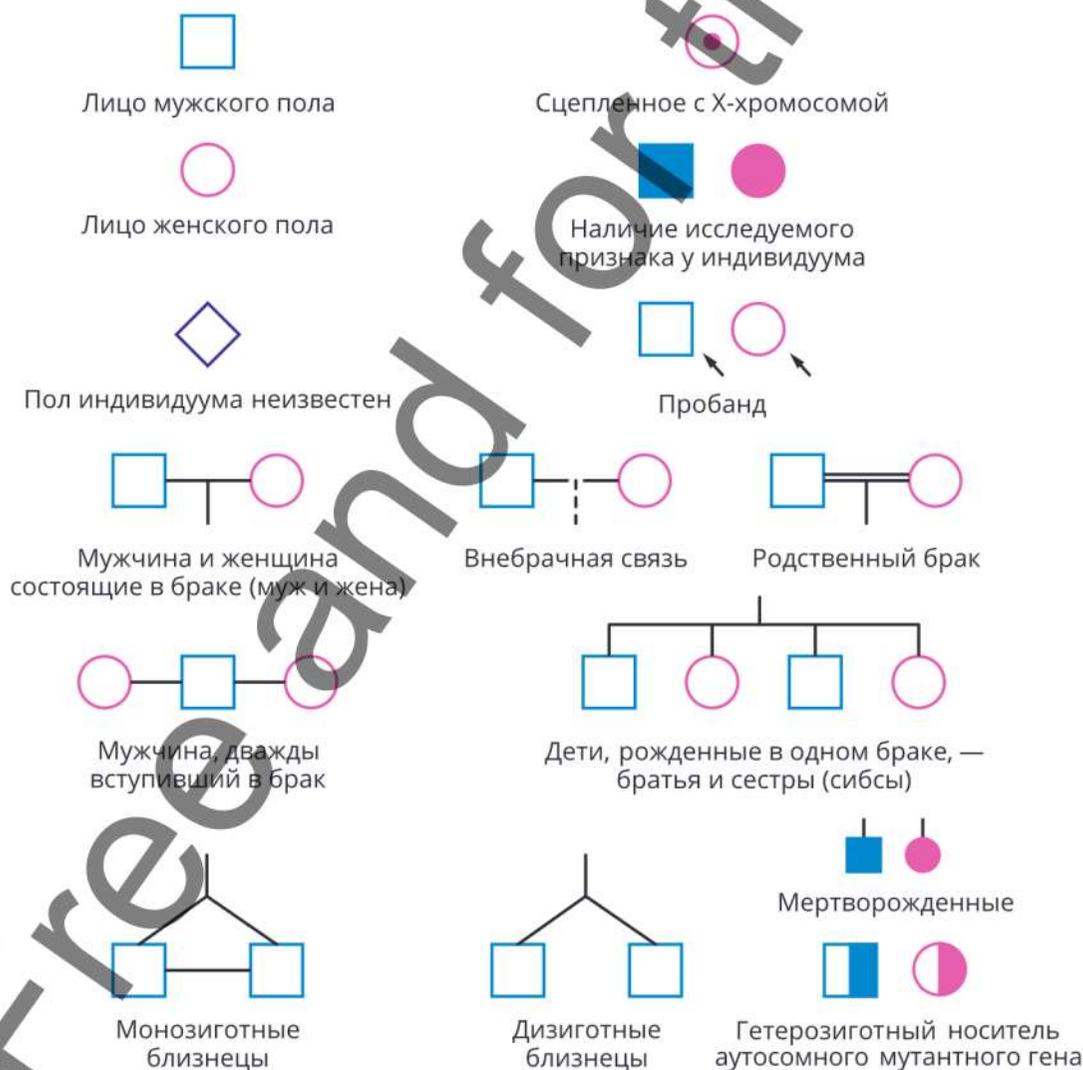


Рис. 10.1. Основные символы, используемые при составлении родословной

При этом соблюдают ряд правил:

- поколения обозначаются римскими цифрами (I, II, III и т. д.) по вертикали, начиная со старшего;
 - члены поколения нумеруются арабскими цифрами (1, 2, 3 и т. д.) по горизонтали, слева направо;
 - каждый член родословной имеет свой шифр, например I6, II3, III5;
 - члены семьи, обследованные лично, в родословной обозначаются восклицательным знаком (!);
 - каждый член родословной должен располагаться в своем поколении;
 - схематическое изображение родословной начинается с пробанда, который помечается стрелкой;
 - в браке мужчина изображается слева, женщина справа;
 - дети общих родителей (сibsы) размещаются на одном горизонтальном уровне;
 - сibsы (братья, сестры пробанда) размещаются в родословной в порядке рождения слева направо, начиная со старшего ребенка.
- III. Затем проводят **генеалогический анализ**, который позволяет установить следующие генетические закономерности:
- является ли данный признак/заболевание наследственным;
 - тип наследования признака/заболевания;
 - генотип членов семьи.

Передача признака/заболевания может быть связана: с моногенным или полигенным, хромосомным, мультифакториальным и другим заболеванием.

Наследование моногенных заболеваний (*менделирующие признаки*) происходит по определенным закономерностям, установленным Г. Менделем. Мутантный ген может находиться на одной из аутосом (*аутосомный тип наследования*), на одной из половых хромосом X или Y (*сцепленное с полом наследование*), в митохондриальной ДНК (*митохондриальный тип наследования*) (рис. 10.2).



Рис. 10.2. Типы моногенного наследования

Кроме типа наследования при оценке риска моногенного заболевания учитываются *экспрессивность гена* (степень выраженности фенотипа/признака) и *пенетрантность гена* (частота фенотипического проявления гена). Также используют термины «инбридинг» — близкородственное скрещивание и «инцест» — получение потомства от родителей, состоящих друг с другом в кровном родстве. Подробная характеристика аутосомного типа наследования (доминантного и рецессивного) и сцепленного с полом наследования представлена в табл. 10.1 и 10.2.

Родословные с аутосомным типом наследования (доминантным и рецессивным) проиллюстрированы на рис. 10.3. Разные типы моногенного наследования удобно описывать в виде схем родословных (см. рис. 10.4 и 10.5).

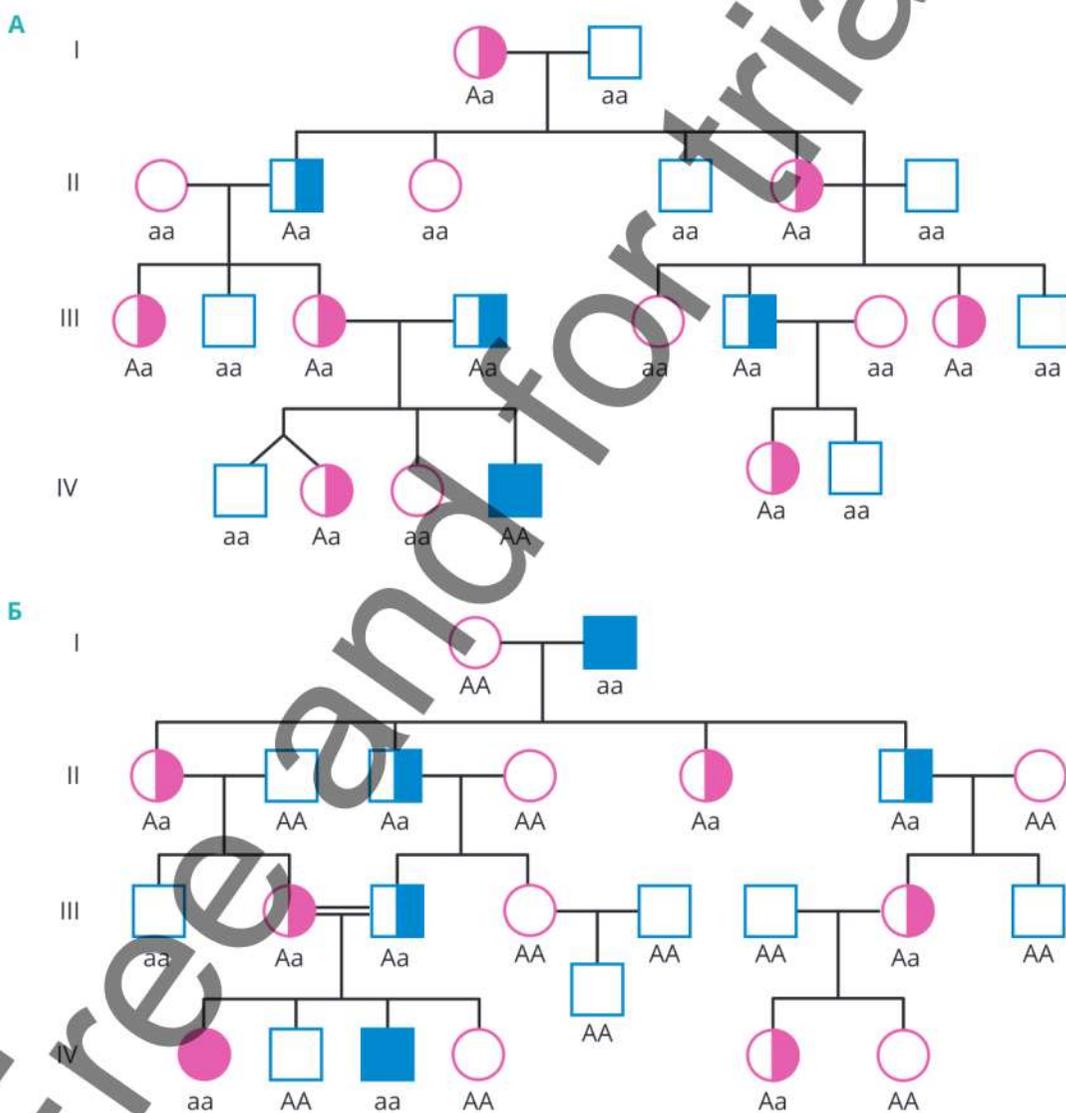


Рис. 10.3. Родословные с аутосомным типом наследования (I–IV поколения):

А — аутосомно-доминантный тип наследования; Б — аутосомно-рецессивный тип наследования.

Таблица 10.1. Характеристика моногенного аутосомного типа наследования

Наследование по аутосомам, $n = 22$					
Тип наследования	Заблеваемость в зависимости от пола (σ , ρ)	Проявление заболевания в поколениях	Родственные браки	Заблеваемость родителей (генотип)	Вероятность рождения больного ребенка (генотип)
Доминантное		В каждом поколении (<i>наследование по вертикали</i>)	—	Один (AA, Aa) или оба (Aa x Aa) из родителей больные	<ul style="list-style-type: none"> Составляет 50 % (AA, Aa) (при условии полной <i>пенетрантности</i> гена). В случае гетерозиготности обоих родителей (Aa x Aa) больные дети могут родиться с вероятностью 75 % (AA, Aa)
Рецессивное	σ и ρ — болен с равной вероятностью	Не в каждом поколении (<i>наследование по горизонтали</i>)	Возрастает вероятность рождения больных детей	Родители — гетерозиготные носители мутантного гена (Aa), фенотипически здоровы	<ul style="list-style-type: none"> ρAa x σaa — у таких родителей все дети (100 %) будут больными (aa). ρAa x σAa — 50 % детей будут больными (генотип aa) и 50 % — фенотипически здоровыми (генотип Aa), но будут являться гетерозиготными носителями дефектного гена. ρAa x ρAa — 25 % — детей будут больными (генотип aa), 75 % — фенотипически здоровыми (генотипы AA и Aa), но 50 % из них будут носителями мутантного гена (генотип Aa)

Таблица 10.2. Характеристика моногенного, сцепленного с полом, наследования

Наследование по половым хромосомам, $n = 2$						
Носительство	Заболелаемость в зависимости от пола (♂, ♀)	Проявление заболевания в поколениях	Родственные браки	Заболелаемость родителей (генотип)	Вероятность рождения больного ребенка (генотип)	
X-сцепленное доминантное						
Женщины (X ^a X ^a)	♂ и ♀ — болеют с равной вероятностью	В каждом поколении (наследование по вертикали)	—	Мать больна (X ^a X ^a , X ^a X ^a)	Вероятность рождения больного ребенка составляет 50 % независимо от пола	
Мужчины (X ^a Y)	Болеют ♀			Отец болен (X ^a Y)	Мужчины гемизиготны (имеют только одну хромосому X), передают ее только дочерям и никогда сыновьям. Все дочери будут больными, а все сыновья — здоровыми	
X-сцепленное рецессивное						
Женщины (X ^a X ^a)	Болеют ♂	Не в каждом поколении (наследование по горизонтали)	Возрастает вероятность рождения больных детей	Мать фенотипически здорова (X ^a X ^a)	Гетерозиготная женщина (X ^a X ^a) передает мутантный рецессивный ген (X ^a): <ul style="list-style-type: none"> • всем своим сыновьям — будут больны все (X^aY); • половине своих дочерей: фенотипически здоровые дочери будут носительницами рецессивного гена (X^aX^a) 	
Мужчины (X ^a Y)	Болеют ♀			Отец болен (X ^a Y)	Мужчины гемизиготны (имеют только одну хромосому X), передают ее только дочерям и никогда сыновьям. Все дочери будут больными, а сыновья — здоровыми	
Y-сцепленное (небольшое число генов, расположенных в непарном участке Y-хромосомы)						
Мужчины (XY ^a)	Болеют ♂	В каждом поколении	—	Отец болен (XY ^a)	Встречается только у лиц мужского пола и передается от отца к сыну	

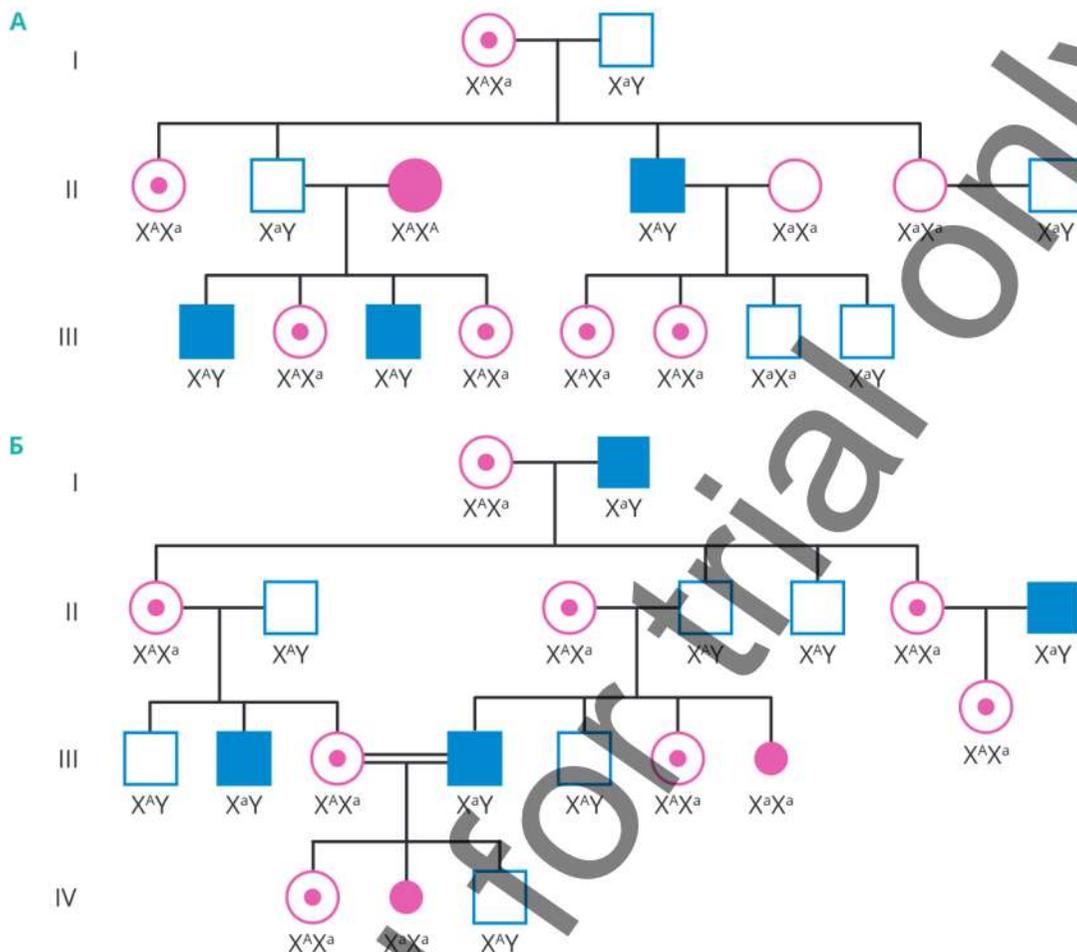


Рис. 10.4. Родословные с X-сцепленным типом наследования (I–III поколения):

А — X-сцепленный доминантный тип наследования; **Б** — X-сцепленный рецессивный тип наследования

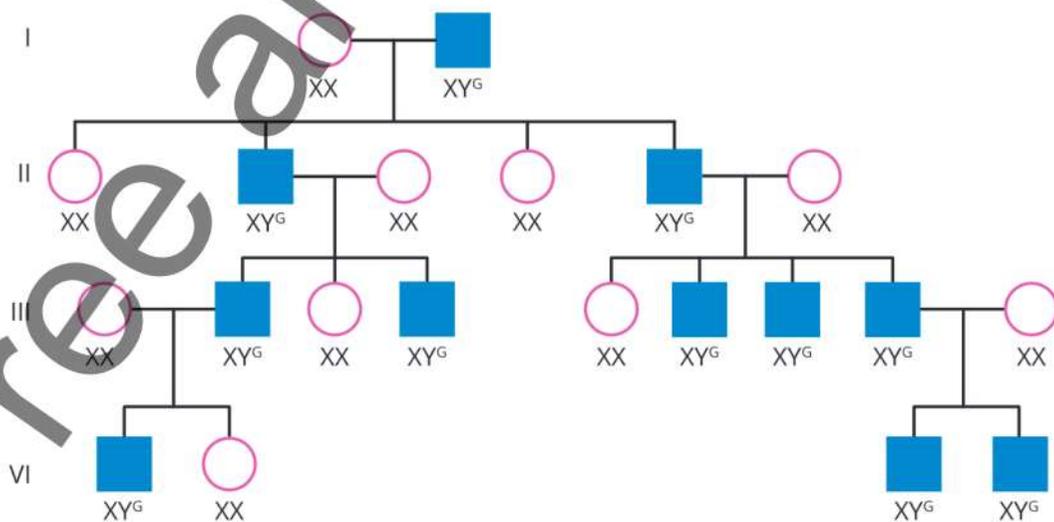


Рис. 10.5. Родословная с Y-сцепленным типом наследования (I–IV поколения)

Митохондриальный тип наследования характеризуется тем, что передача признака или заболевания осуществляется по материнской линии. Наследуется митохондриальная ДНК (мтДНК) яйцеклетки. Мутации в мтДНК сопровождаются патологией практически у всех потомков пораженной матери.

Митохондриальный тип наследования характеризуется тем, что:

- гены, содержащиеся в митохондриальной хромосоме, наследуются только по женской линии;
- болеют как мальчики, так и девочки;
- больные отцы не передают признак своим детям.

10.2. Близнецовый метод

Классический *близнецовый метод* основан на изучении роли наследственности и роли влияния различных факторов на формирование индивидуальных особенностей организма или на развитие мультифакториальных заболеваний у близнецов.

С помощью близнецового метода можно изучать:

- 1) роль наследственности в формировании физиологических и психологических особенностей организма;
- 2) оценить эффективность действия на организм некоторых внешних и внутренних факторов (лекарственных препаратов, обучения, воспитания);
- 3) коэффициенты наследуемости разных признаков;
- 4) гетерогенность популяции по изучаемым генам;
- 5) конкретные факторы, усиливающие или ослабляющие влияние внешней среды;
- 6) роль среды в определении изменчивости признаков;
- 7) корреляцию признаков и функций организма;
- 8) пенетрантность аллели.

Близнецы бывают *монозиготными* (однойяйцевые) и *дизиготными* (двухяйцевые) [Акушерство. Клинические лекции, 2007].

Монозиготные близнецы развиваются из одной зиготы (см. рис. 10.6). Их формирование является следствием патологии дробления. Во время раннего эмбриогенеза, на стадии дробления, внутри бластоцисты образуется не одна клеточная масса, а две. Эти два клона клеток и являются началом развития двух генетически идентичных организмов. Они всегда бывают одного пола и фенотипически очень похожи.

Для идентификации монозиготности применяют:

- методы ДНК-диагностики;
- полисимптомный метод сравнения близнецов по многим признакам;
- методы, основанные на иммунологической идентичности близнецов по эритроцитарным антигенам (ABO, MN, резусу), по сывороточным белкам, γ -глобулину);
- трансплантационный тест с применением перекрестной пересадки.

А

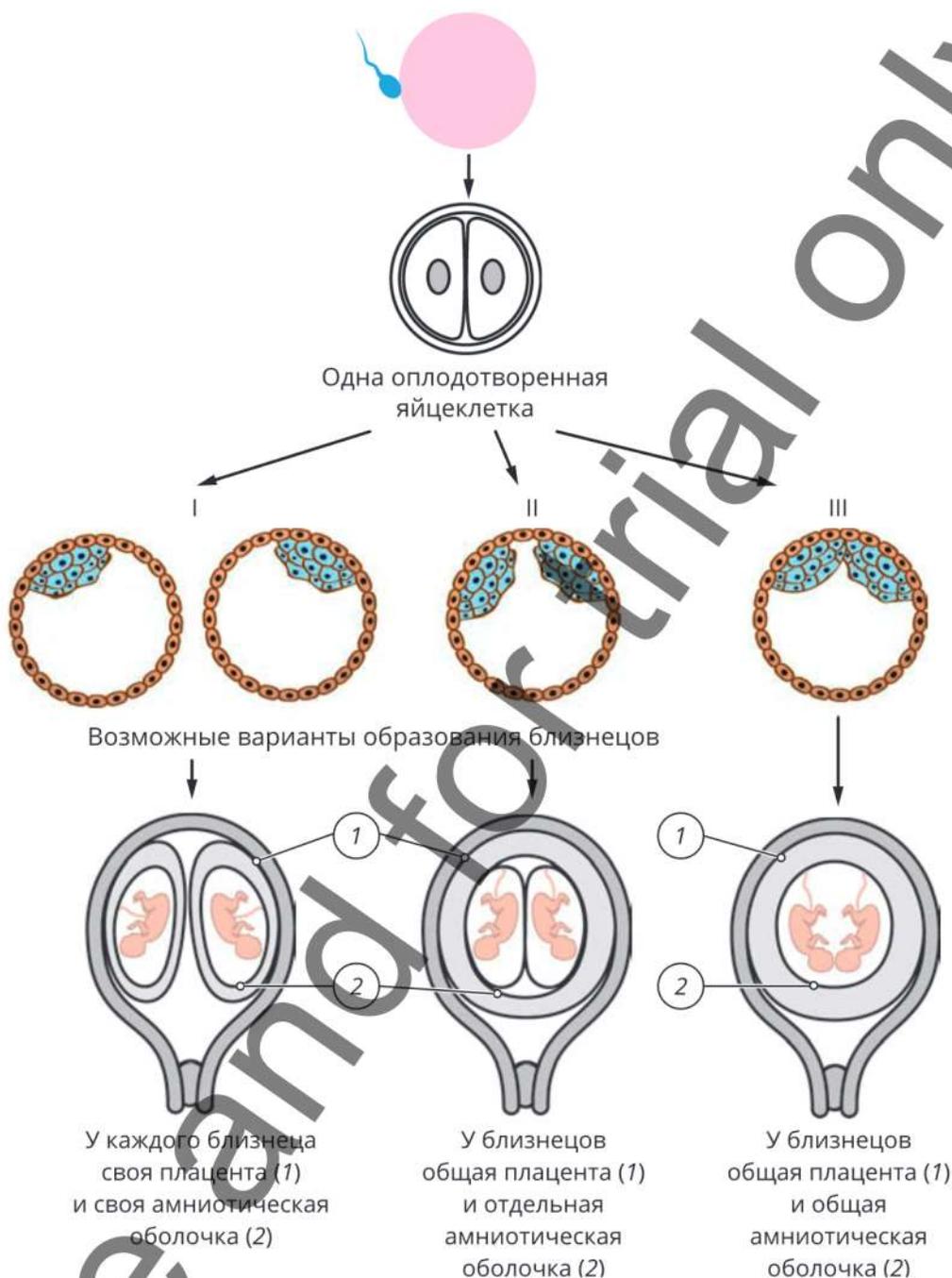
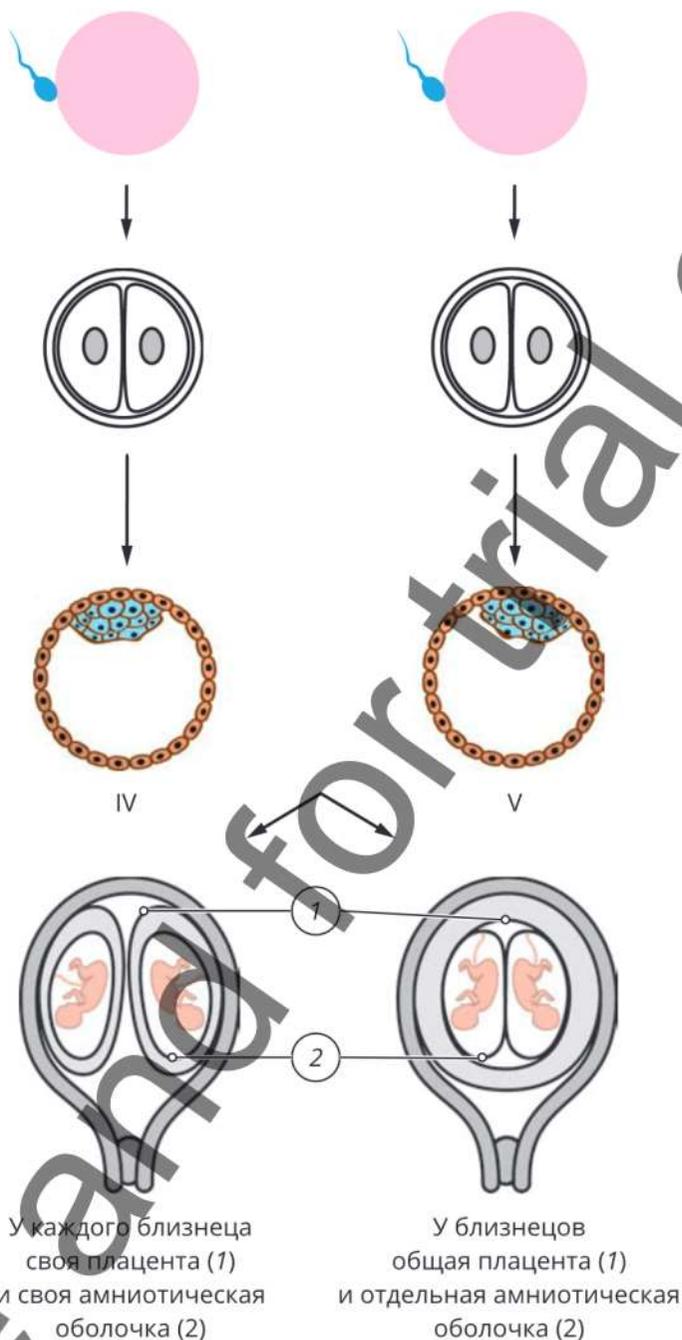


Рис. 10.6. Процесс формирования близнецов:

А — монозиготные близнецы (I, II, III); Б — dizиготные близнецы (IV, V)

Дизиготные близнецы развиваются из двух зигот вследствие одновременно овулировавших и оплодотворенных разными сперматозоидами яйцеклеток. Поэтому они имеют различные генотипы. Эти дети могут быть как одного пола, так и разного пола. Их внутриутробное развитие (эмбриональный период онтогенеза) происходит в одинаковых условиях.

Б



Для выявления фактора наследственности и влияния среды в формировании признака или заболевания определяют степень сходства — *конкордантность* и степень различия — *дискордантность* у монозиготных близнецов. По всем признакам и характеристикам конкордантность у них выше, чем у дизиготных близнецов. Так как дизиготные близнецы, как и монозиготные, развиваются приблизительно в одинаковых

условиях, но имеют лишь половину общих по происхождению генов, их используют как контроль. На рис. 10.7 представлены графики с данными конкордантности у дизиготных и монозиготных близнецов по фенотипическим признакам и заболеваниям.

Количественную оценку относительной роли наследственности и среды можно сделать на основе расчета *коэффициента наследственности (Н)* и *коэффициента влияния среды (Е)* с помощью формулы К. Хольцингера:

$$H = \frac{KMБ - KDБ}{100 - KDБ}; E = 1 - H,$$

где **КМБ** — конкордантность признака для монозиготных близнецов, %; **КДБ** — конкордантность признака для дизиготных близнецов, %.

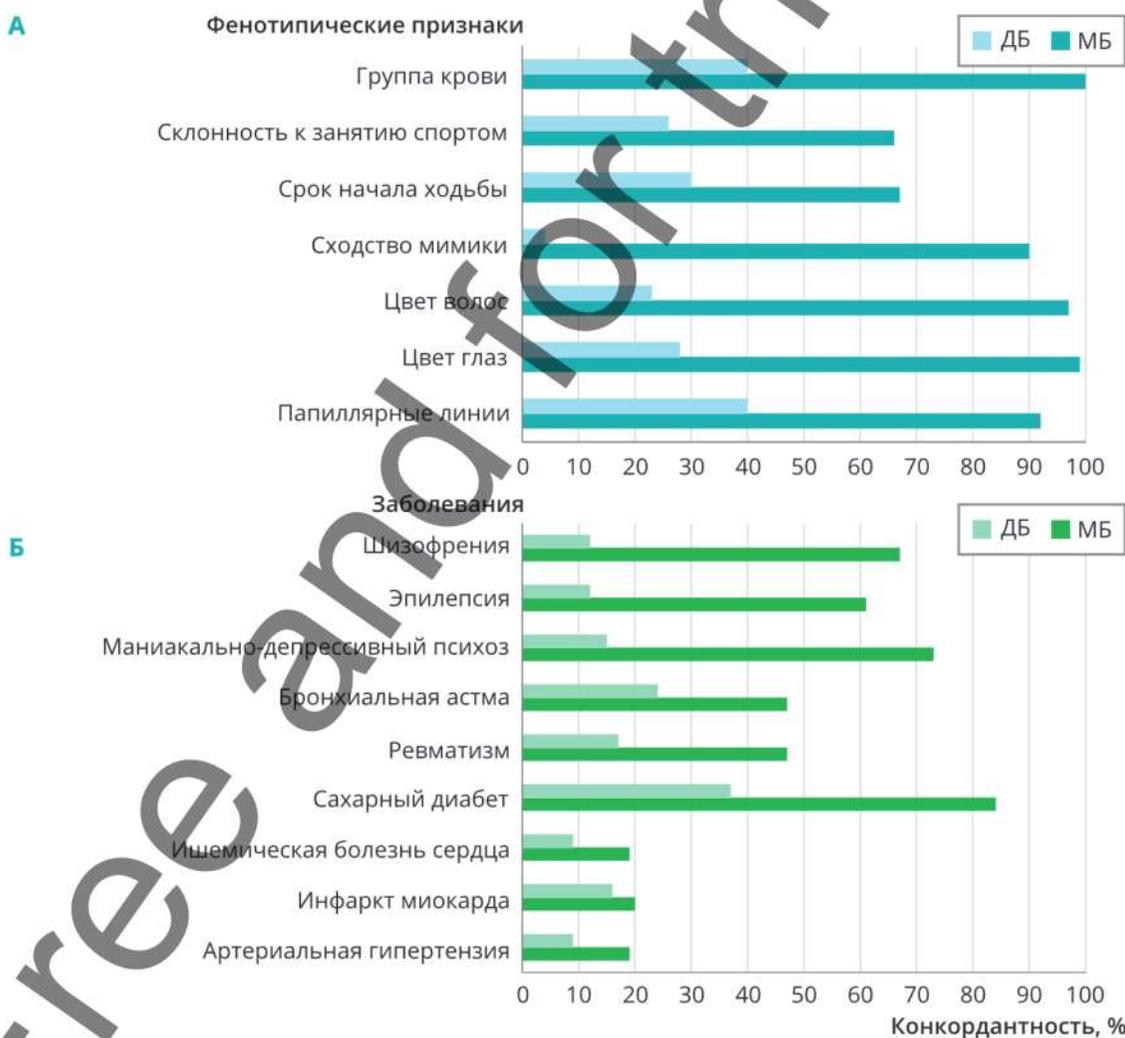


Рис. 10.7. Примеры конкордантности у монозиготных и дизиготных близнецов по фенотипическим признакам (А) и заболеваниям (Б)

ДБ — дизиготные близнецы; МБ — монозиготные близнецы.

Если $H = 1$, т. е. 100 %, то можно считать, что экспрессия признака определяется только генотипом индивидуума. Если $H = 75$, то 75 % в формировании признака отводится наследственности, а 25 % — факторам среды (E).

Значение коэффициента наследственности при генетической предрасположенности признака или заболевания варьирует от 30 до 100 % (табл. 10.3).

Таблица 10.3. Значения коэффициента наследственности при генетической предрасположенности признака или заболевания

Коэффициент наследственности, абс. число (%)	Причина развития заболевания
0	Только под влиянием факторов внешней среды
0,3–0,7 (30–70 %)	Влияние факторов внешней среды при наличии генетической предрасположенности
0,7–1,0 (70–100 %)	В основном наследственные факторы

На основании близнецового метода была установлена генетическая предрасположенность к различным наследственным болезням. Данный метод нашел применение при проведении исследований в области фармакогеномики; представляет собой гибкую модель для системно-биологических исследований реакции лекарственного средства на организм человека [Castillo-Fernandez J.E. et al., 2014; Fraga M.F. et al., 2005; Garfield E., 1984; Sahu M., Prasuna J.G., 2016].

Трудности применения близнецового метода связаны:

- с низкой рождаемостью близнецов в популяциях (1 : 85 — 1 : 88);
- идентификацией монозиготности близнецов, что важно для достоверности выводов.

10.3. Популяционно-генетический (статистический) метод

Для определения частоты встречаемости заболевания, его генетической структуры, характера изменения генов под влиянием окружающей среды и факторов популяционной динамики применяют *популяционно-генетические (статистические) методы* как в генетике, так и в медицине. Эта область генетики называется *популяционной генетикой*. В медицине данные популяционной генетики используются

при эпидемиологических исследованиях, когда изучаются закономерности возникновения и распространения заболеваний различной этиологии [Алтухов Ю. П., 2003].

С помощью популяционно-генетических (статистических) методов можно:

- вычислить частоту наследственного заболевания в популяции;
- определить частоты генов, степень гомозиготности и полиморфизма;
- установить, как меняются частоты генов под действием отбора;
- выявить влияние факторов популяционной динамики на частоты тех или иных фенотипов и генотипов;
- проанализировать влияние факторов окружающей среды на экспрессию генов;
- определить степень межпопуляционного генетического разнообразия и вычислить расстояние между популяциями.

По определению *Н. В. Тимофеева-Ресовского* [Тимофеев-Ресовский Н. В., 1973] **популяция** — это группа особей определенного вида, которая:

- 1) в течение достаточно длительного времени (большого числа поколений) населяет конкретный ареал;
- 2) в той или иной степени случайно скрещивается в его пределах;
- 3) не имеет внутри себя заметных изоляционных барьеров;
- 4) отделена от соседних групп этого вида той или иной степенью давления тех или иных форм изоляции.

Понятно, что популяция человека как вида (подвид «человек разумный разумный» — *Homo sapiens sapiens*) среди животного мира имеет много особенностей. Поэтому генетическое изучение популяций человека предполагает знание их:

- демографических характеристик (размер популяций, рождаемость, смертность, возрастная структура, национальный состав);
- географических и климатических условий жизни;
- религиозных убеждений;
- этнических характеристик населения;
- естественно-исторических и социально-исторических данных и др.

Популяции человека подразделяют на *панмиксные* (случайные браки) и *инбредные* (высокая частота кровнородственных браков).

В популяции человека формирование субпопуляций связано с такими формами изоляции, которые свойственны только человеку:

- расовой;
- социальной (специальное положение, экономические, этнические, языковые, административные особенности);
- религиозно-конфессиональной;
- идеологической.

Предполагается, что для изучения достоверных результатов этим методом популяция должна быть достаточно многочисленной. Для генетических исследований оптимальным является размер популяции численностью от 0,5 до 5,0 млн человек.

Для сбора материала используют *обзорный метод* и его различные модификации. Обзорным методом можно исследовать:

- всю наследственную патологию;
- отдельную группу заболеваний;
- только одно заболевание по выборке всего населения данной территории.

Благодаря популяционно-генетическому и другим методам медицинской генетики показано, что наследственные заболевания распределены по различным регионам земного шара, среди разных рас и народностей неравномерно [Baird P.A. et al., 1988; de la Chapelle C.A., 1993; Malécot G., 1973; Гинтер Е.К., Зинченко П., 2006; Castillo-Fernandez J. E. et al., 2014]. Информация о частоте встречаемости наследственных болезней, количестве гетерозиготных носителей в регионе имеет большое значение, т. к. способствует организации профилактических мероприятий.

При статистической обработке полученных данных основой для определения генетической структуры популяции является закон *генетического равновесия Харди—Вайнберга*, который описывает условия генетической стабильности популяции. Популяцию, генофонд которой не меняется в ряду поколений, называют *менделевской популяцией*. В природе эти популяции не встречаются, но их выделение имеет чисто теоретическое значение.

Закон отражает закономерность, в соответствии с которой в популяции *первоначальные частоты аллелей сохраняются из поколения в поколение* при соблюдении следующих условий:

- бесконечно большое число;
- свободное скрещивание особей;
- отсутствие мутаций;
- отсутствие избирательной миграции организмов с различными генотипами;
- без давления естественного отбора.

Для расчета частот генотипов, фенотипов и аллелей в диаллельной системе применяется формула:

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

или

$$p^2(AA) + 2pq(Aa) + q^2(aa) = 1,$$

где *A* — нормальный аллель; *a* — мутантный аллель; *aa* — генотип больного; *AA* и *Aa* — генотипы здоровых людей; *pA* — частота доминантного аллеля; *qa* — частота рецессивного аллеля; *p²* — частота доминантных гомозигот *AA*; *2pq* — частота гетерозигот *Aa*; *q²* — частота рецессивных гомозигот *aa*. *pA + qa = 1* — сумма частот доминантного и рецессивного аллелей (*pA + qa*), равная 1, или 100 %.

Пример. Рассмотрим генетическую структуру некоей популяции по муковисцидозу на примере моногенного заболевания с аутосомно-рецессивным типом наследования.

Муковисцидоз — системное наследственное моногенное заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования. Причиной этой болезни является мутация в ге-

не трансмембранного регулятора муковисцидоза *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*; локализация: 7q31.2, MIM 602421). Характеризуется поражением желез внешней секреции, тяжелыми нарушениями функций органов дыхания.

Частота встречаемости муковисцидоза среди белого населения планеты колеблется в различных популяциях от 600 до 12 000 на одного новорожденного.

Если предположить, что частота встречаемости муковисцидоза в среднем составляет 1 : 10 000 новорожденных, то с применением приведенной выше формулы получим следующие значения частот встречаемости:

- гомозигот: $q^2(aa) = 1 : 10000 = 0,0001$ (или 0,01 %);
- рецессивного аллеля: $qa = \sqrt{0,0001} = 0,01$;
- доминантного аллеля: $pA = 1 - qa = 1 - 0,01 = 0,99$;
- здоровых людей: $p^2(AA) = 0,992 = 0,98$ (или 98 %);
- гетерозигот: $2pqAa = 2 \cdot 0,99 \cdot 0,01 = 0,0198$ (или 1,98 %).

Таким образом:

- частота лиц с муковисцидозом (aa) равна 0,0001 (0,01 %);
- частота здоровых лиц, но гетерозигот (Aa), равна 0,00198 (1,98 %);
- частота здоровых лиц (AA) равна 0,98 (98 %).

Из закона Харди—Вайнберга следует:

- редкие аллели присутствуют в популяции главным образом в гетерозиготном состоянии;
- в гетерозиготном состоянии содержится примерно в 100 раз больше рецессивных аллелей, чем в гомозиготном состоянии;
- чем ниже частота рецессивного аллеля, тем большая доля этого аллеля присутствует в популяции в гетерозиготном состоянии.

Трудности применения популяционно-генетического метода связаны с тем, что:

- для получения достоверных результатов выборка должна быть многочисленной;
- критерии (критерий) отбора должны быть точными;
- сложно собрать исчерпывающие данные в силу различных причин и др.

Методы лабораторной генетики

11.1. Цитогенетические методы

Цитогенетический метод впервые позволил визуализировать ДНК на уровне хромосом. Это был прорыв и в биологии, и в медицине, и в смежных областях естественных наук. Фактически этот метод является одним из первых молекулярных методов изучения нуклеиновых кислот.

Цитогенетический метод применяют при изучении организации и функционирования ДНК на разных стадиях клеточного цикла, способов наследования в ряду клеточных поколений вследствие деления клетки (митозом или мейозом).

Цитогенетика использует методы генетики и цитологии и тесно связана с разделами таких наук, как молекулярная генетика, цитохимия, кариология, гистология и др.

Разработка классического цитогенетического метода стала основой для создания физических карт хромосом человека. Они имеют высокое разрешение и успешно применяются в настоящее время в практической медицине и биологии. Достижения в молекулярной биологии позволили внедрить в клиническую практику новые методы и технологии молекулярной цитогенетики. Эти методы, наряду с методами молекулярной генетики, помогают при создании верификации патологического генома человека.

Применение классического цитогенетического метода в клинической практике позволило изучать нормальную морфологию хромосом и кариотипа, определять генетический пол организма, диагностировать наследственные болезни человека, анализировать процессы мутагенеза (воздействие различных типов мутагенов) на уровне хромосом [Cytogenetic dosimetry..., 2011]. Молекулярно-цитогенетический метод позволил осуществлять анализ структуры ДНК в более высоком разрешении и изучать геном клетки на стадии интерфазы [Molecular cytogenetics..., 2002; The principles of clinical cytogenetics, 2013].

11.1.1. Классический цитогенетический метод

Как отмечалось ранее, с помощью цитогенетического метода изучают организацию и функционирование ДНК на разных стадиях клеточного цикла, способы

наследования в ряду клеточных поколений вследствие деления клетки (митозом или мейозом).

На сегодняшний день цитогенетику принято разделять на классическую и молекулярную, хотя и классическим методом изучают молекулу — ДНК. Когда мы говорим о метафазных хромосомах, точнее было бы говорить об одном методе и различных способах окраски и анализа хромосом. Все зависит от задач, поставленных перед исследователем. Безусловно, в этих методах существуют различия, что будет подробно рассмотрено далее в главе 11.

Подчеркнем, что, несмотря на постоянную модификацию, все разновидности цитогенетического метода до сих пор активно используются в биологии, теоретической и практической медицине.

Развитие технологий в молекулярной генетике (например, полимеразная цепная реакция) способствовало тому, что анализы стали осуществляться быстрее, качественнее, дешевле. Однако эти методы во многих случаях не могут заменить цитогенетический анализ.

11.1.1.1. Этапы цитогенетического метода

Биоматериал

Первый шаг при цитогенетическом анализе — это правильно отобрать биоматериал и в стерильных условиях поместить в соответствующий раствор. Эти правила могут казаться обыденными, но зачастую критически важный анализ хромосом не может быть выполнен, потому что образец загрязнен, помещен в фиксирующий раствор (например, формалин) или обезвожен и др. [The principles of clinical cytogenetics, 2013].

Хромосомный анализ может проводиться на клетках, полученных из многих источников, включая лимфоциты периферической крови, эмбриональную кровь, ооциты и сперматозоиды, бластомеры эмбрионов, хорионические ворсинки, амниотические жидкости, кожу, костный мозг, ткани плода (например, легкие, печень), солидные опухоли и др. (табл. 11.1).

Таблица 11.1. Ткани и клетки, используемые при классическом цитогенетическом анализе

Источник ткани	Тип клетки	Применение/изучение
Периферическая кровь	T-лимфоцит	Рутинный анализ
Хорионические ворсинки	Трофобласт	Перинатальный диагноз первого триместра
Амниотическая жидкость	Амниоцит	Пренатальная диагностика во втором триместре
Пуповинная кровь	T-лимфоцит	Диагностика эмбриона во втором триместре
Фетальные ткани	Фибробласт	Подтверждение диагноза
Костный мозг	Белая кровяная клетка	Лейкемия

Окончание табл. 11.1

Источник ткани	Тип клетки	Применение/изучение
Фетальный яичник	Яйцеклетка	Мейоз
Сперматозоиды	Сперматозоид	Мейоз
Солидные опухоли и асцит	Опухолевая ткань	Диагностика, лечение и прогноз
Ооциты	Полярное тело	Преимплантационная диагностика
Эмбрион	Бластомер	

Периферическая кровь

Чаще всего используют периферическую венозную кровь. Для предотвращения свертываемости крови в пробирку добавляют антикоагулянт (*гепарин*). Также можно проводить забор крови из пуповины новорожденного, из других периферических сосудов.

В зависимости от задач исследования применяются три метода культивирования клеток крови: *макро-, микро- и полумикрометод*, отличающийся в основном количеством взятой крови для культивирования.

Известно, что ядросодержащие зрелые клетки крови многочисленны. Это лейкоциты, стволовые клетки (морфологически похожи на лимфоциты). Лейкоциты бывают зернистые (гранулоциты — нейтрофилы, базофилы, эозинофилы) и незернистые (агранулоциты — моноциты, лимфоциты) (рис. 11.1).

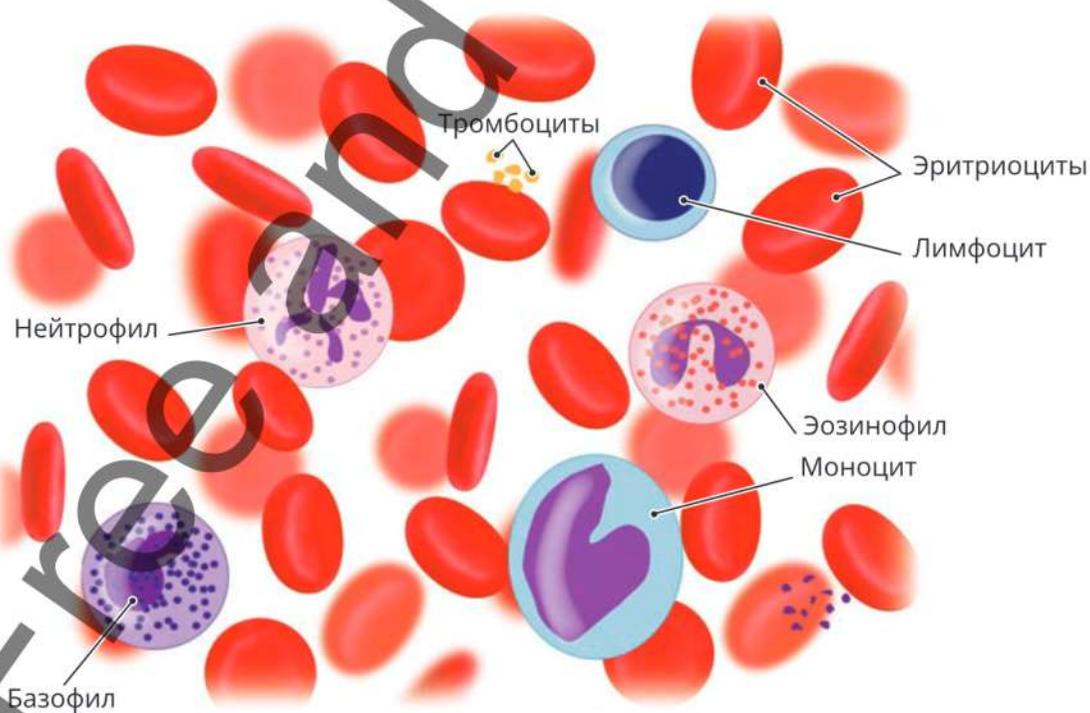


Рис. 11.1. Морфология клеток крови

Лимфоциты имеют округлое или бобовидное ядро и небольшой объем цитоплазмы. В цитоплазме органеллы развиты плохо. По строению лимфоциты делятся на малые, средние и большие. На лимфоцитах есть рецепторы для антигенов, медиаторов иммунитета, гормонов и ряда биологически активных веществ.

Основными **свойствами лимфоцитов** являются:

- выход из крови в ткани, миграция в тканях;
- направленная миграция в очаги воспаления и иммунных конфликтов;
- пролиферация и дифференцировка под влиянием различных стимулов;
- цитотоксичность (за исключением В-лимфоцитов).

По функции различают **Т- и В-лимфоциты**, естественные киллеры; в свою очередь, Т-лимфоциты делятся на Т-киллеры, Т-хелперы, Т-супрессоры, Т-клетки памяти (табл. 11.2).

Таблица 11.2. Функциональные свойства лимфоцитов

Тип		Функция
Т-лимфоцит		Синтезирует активные вещества, включая интерферон
Подтип	Т-хелпер	Способствует пролиферации и дифференцировке В- и Т-лимфоцитов
	Т-киллер	Обладает цитотоксичностью (убивает чужеродные и раковые клетки, вирусы, простейшие)
	Т-супрессор	Подавляет пролиферацию и дифференцировку Т-киллеров, Т-клеток памяти, Т-хелперов
	Т-, В-клетки памяти	Хранят информацию о попадающих в организм антигенах
В-лимфоцит		Превращается в плазматическую клетку, которая вырабатывает антитела
Естественный киллер		Обладает цитотоксичностью по отношению к чужеродным, раковым и другим клеткам

При классическом цитогенетическом методе анализируют хромосомы ДНК Т-лимфоцитов периферической крови человека.

К основным достоинствам культуры лимфоцитов периферической крови относятся:

- Относительная доступность биоматериала.
- Высокая концентрация клеточной популяции. В 1 мл крови содержится $(1-3) \times 10^6$ малых лимфоцитов, способных к трансформации при культивировании.
- Большинство лимфоцитов в ней находятся в покоем состоянии (стадия G_0) клеточного цикла. Показано, что лишь 0,06–0,3 % свежееотобранных лимфоцитов периферической крови осуществляют синтез ДНК.
- Продолжительный первый митотический цикл (в среднем 48 ч). Знание параметров отдельных фаз клеточного цикла дает возможность изучать ДНК на разных фазах клеточного цикла.
- Практически стандартная во всех лабораториях мира техника культивирования лимфоцитов периферической крови и приготовления препаратов хромосом дает возможность адекватно сопоставлять и проверять достоверность полученных результатов.

Костный мозг

Костный мозг состоит из стволовых клеток. Они характеризуются низкой степенью дифференцировки, могут неограниченное время делиться и превращаться в разные типы клеток и способны выходить из костного мозга в кровь, а затем — в органы и ткани. В органах и тканях стволовые клетки могут или оставаться стволовыми, или подвергаться дальнейшей дифференцировке (превращаясь, например, в эпителиальные, соединительнотканые, клетки крови и др.).

Стволовые клетки обеспечивают рост, физиологическое обновление и репаративную регенерацию органов и тканей.

В гематологии и онкогематологии активно используются клетки спинномозговой жидкости.

При постановке гематологического диагноза для получения наилучших результатов рекомендовано брать 2–5 мл костного мозга или 5–10 мл крови в пробирку с гепарином. На практике у взрослых больных объем получаемого костного мозга составляет 1,5–3 мл, у детей объем получаемых костного мозга и крови значительно меньше.

Другие ткани

Приготовление препаратов из различных тканей: ворсины хориона, плаценты, частей органов эмбриона. Для анализа могут быть использованы, например, фибробласты того или иного органа. Ткани плода следует помещать в стерильные сбалансированные солевые растворы для предотвращения обезвоживания.

Культивирование ткани

Культивирование ткани осуществляют в стерильных условиях. Для этого работу проводят в ламинарном боксе, где рабочая поверхность защищена от пыли и микробного заражения постоянным стабильным потоком фильтрованного воздуха, проходящего над ней (см. рис. 11.2). Также для стерилизации воздуха в перерывах между работами используют ультрафиолетовый свет.

Главной проблемой при культивировании тканей остается заражение микроорганизмами (бактерии, микоплазма, дрожжи и споры грибов попадают в культуру через оператора, из воздуха, с рабочей поверхности, из растворов и многих других источников).

Подготовка препарата зависит от типа ткани.

Рассмотрим культивирование лимфоцитов периферической крови. В пробирку с питательной (культуральной) средой добавляют 1–2 мл крови. Выбор питательной среды зависит от цели анализа.

Пример состава питательной среды для культивирования лимфоцитов периферической крови:

- Среда RPMI-1640 (6,0–6,5 мл).
- Сыворотка телячья эмбриональная (1–2 мл).
- Фитогемагглютинин (0,02 мл).
- Антибиотик (40 у/мл).

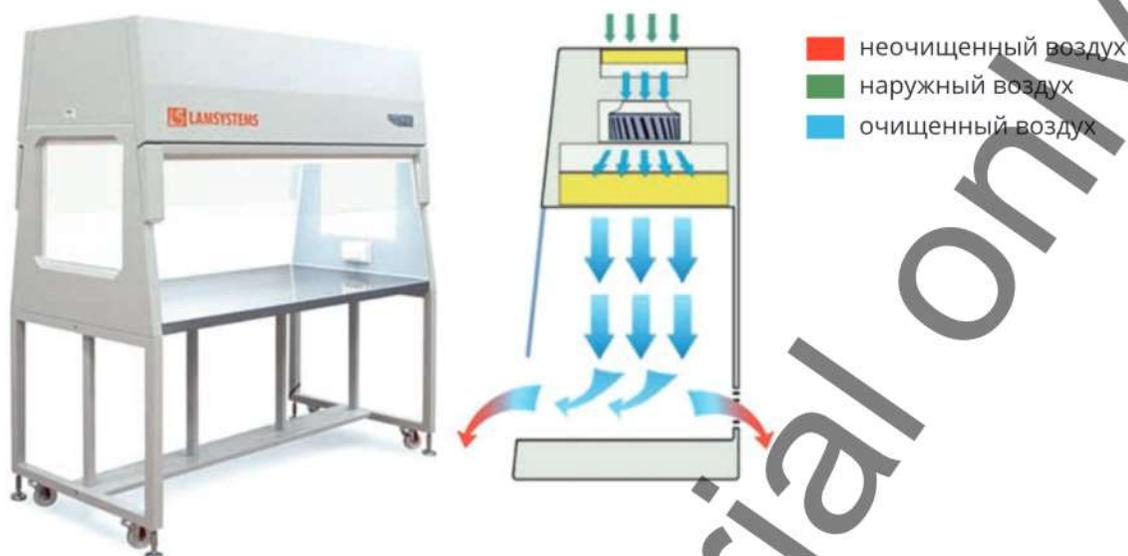


Рис. 11.2. Ламинарный бокс БАВнп-01-«Ламинар-С» 1,8 LORICA (412.180) (фото) и схема фильтрации воздуха*

Виды питательных сред**

Среда RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) была разработана в 1966 г. Джорджем Э. Муром (George E. Moore) и его коллегами для культивирования лейкоцитов. В настоящее время используется для широкого спектра клеточных культур.

Среда DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) — модификация среды BME (Basal Medium Eagle), содержит в четыре раза больше аминокислот и витаминов, а также различные добавки, улучшающие рост клеток. Среда DMEM выпускаются с высоким и пониженным содержанием глюкозы, пируватом натрия и без него, добавками для культивирования клеток различных типов, в том числе нетрансформированных клеток и гибридов.

Среда MEM (Minimum Essential Medium, среда Игла) разработана Гарри Иглом (Harry Eagle). Среда содержит 13 аминокислот, 6 водорастворимых витаминов, холин и инозит, выполняющие роль углеводородного субстрата. Есть модификации среды MEM с солями Эрла (Earle) и Хэнкса (Hanks), а также α -модификация среды MEM с содержанием 21 аминокислоты и солей Эрла.

Среда DMEM/F12 — среда Игла в модификации Р. Дульбекко с добавлением питательных веществ (F-12) в соотношении 1 : 1.

Для культивирования клеток крови чаще всего используется среда RPMI-1640 (табл. 11.3).

* Сайт российской компании «Ламинарные системы», поставщика оборудования, расходных материалов и химических реактивов российских и зарубежных производителей <http://www.lamsys.ru/boks.php>

** <https://www.dia-m.ru/catalog/reactive/kulturalnye-sredy-syvorotki-zameniteli-dobavki/sredy-kulturalnye/>

Таблица 11.3. Состав культурной среды RPMI-1640*

Аминокислоты, г/л	Витамины, г/л	Неорганические соли, г/л	Другие вещества, г/л
L-Аланин — нет** L-Аргинин х HCl — 0,2 L-Аспарагин — 0,05 L-Аспарагиновая кислота — 0,02 L-Цистин х 2 HCl — 0,0652 L-Глутаминовая кислота — 0,02 L-Глутамин — 0,3 Глицин — 0,01 L-Гистидин х HCl х H ₂ O — 0,015 Гидрокси-L-Пролин — 0,02 L-Изолейцин — 0,05 L-Лейцин — 0,05 L-Лизин х HCl — 0,04 L-Метионин — 0,015 L-Фенилаланин — 0,015 L-Пролин — 0,02 L-Серин — 0,03 L-Треонин — 0,02 L-Триптофан — 0,005 L-Тирозин х 2 Na х 2 H ₂ O — нет** L-Тирозин — 0,02184 L-Валин — 0,02	D-Биотин — 0,0002 Хлорид холина — 0,003 Фолиевая кислота — 0,001 Мио-инозитол — 0,035 Никотинамид — 0,001 p-Аминобензойная кислота — 0,001 D-пантотеновая кислота х ½ Ca — 0,00025 Пиридоксин х HCl — 0,001 Рибофлавин — 0,0002 Тиамин х HCl — 0,001 Витамин B ₁₂ — 0,000005	Нитрат кальция 4-водный — 0,1 Сульфат магния — 0,04884 Хлорид калия — 0,4 Гидрокарбонат натрия — 2,0 Хлорид натрия — 6,0 Гидрофосфат натрия — 0,8	Эндотоксины — ≤1 EU***/мл D-глюкоза — 2,0 Глутатион — 0,001 г Феноловый красный х Na — 0,0053

* Производитель — Sigma-Aldrich, США (Merck, Германия), pH — 7,0–7,6, осмоляльность — 264–292 мОсмоль/кг.

** Добавить при непосредственном исследовании.

*** Единица эндотоксина.

Виды сывороток*

Телячьи сыворотки эмбриональные — жизненно важный компонент базальных культуральных сред, поскольку являются естественным источником таких биологически активных молекул, как факторы роста и адгезии клеток, гормоны, липиды, минералы, которые необходимы для роста культуры клеток. Кроме того, сыворотки влияют на проницаемость клеточной мембраны и могут выступать в качестве среды-носителя для липидов, ферментов, микронутриентов.

Сыворотки животного происхождения прочие (крупного рогатого скота, козы, лошадиные и т. д.). Получены от взрослых животных-доноров, имеют сертификаты о содержании микроэлементов, уровне эндотоксинов и отсутствии микоплазм. Сыворотки крови взрослых животных могут использоваться как бюджетная замена эмбриональных сывороток, а также в качестве блокирующего агента при проведении иммуноферментного анализа, иммуногистохимического окрашивания гистологических препаратов и иммуноблоттинге.

Для увеличения митотической активности клеток добавляют фитогемагглютинин (ФГА).

ФГА (*phytohemagglutinin, phytohaemagglutinin* от лат. *phyo(n)* — растение, *haima* — кровь, *agglutinatio* — склеивание и *-in(e)* — суффикс, обозначающий «подобный») — лектин фасоли обыкновенной (лат. *Phaseolus vulgaris*). Лектины (от лат. *legere* — собирать) — белки и гликопротеины, обладающие способностью высокоспецифично связывать остатки углеводов на поверхности клеток, в частности, вызывая их агглютинацию. ФГА индуцирует переход клеток из стадии G2 в митоз. Впервые ФГА был выделен П. Новеллом в 1960 г.

Для определения порядкового номера митоза при окрашивании хромосом используют методику дифференциальной окраски сестринских хроматид. Для этого дополнительно в культуральную среду добавляют 5-бромдезоксисуридин (5-БДУ) в определенной концентрации (10 г/мл). Иначе такое окрашивание называют окрашиванием по Гимзе (*fluorescence plus Giemsa, FPG*).

Бромдезоксисуридин (*Bromodeoxyuridine, BrdU*) — синтетический нуклеозид, аналог тимидина, используемый для дифференциальной окраски сестринских хроматид, выявления пролиферирующих клеток в живых тканях, изучения репликации ДНК ($C_9H_{11}BrN_2O_5$). БДУ способен заменять тимидин в процессе репликации ДНК, встраиваясь в новую ДНК.

Инкубация

Инкубация (от лат. *incubare* — высидывать, выдерживать в чем-то) — это культивирование клеток при определенной температуре и времени для проведения биохимической реакции.

Пробирку с культуральной смесью хранят 48 ч при 37 °С в термостате. В этом случае регистрируют клетки первого деления (1-го митоза). При культивировании клеток крови в течение 72 ч регистрируют метафазные пластины как 1-го, так и 2-го митозов;

* <https://www.dia-m.ru/catalog/reactive/kulturalnye-sredy-syvorotki-zameniteli-dobavki/syvorotki-embriionalnye-zameniteli-syvorotok>

в течение 96 ч — метафазные пластины второго и третьего митозов (т. е. клетки прошли клеточный цикл 2 или 3 раза). В табл. 11.4 представлены примеры различной по времени инкубации отдельных типов клеток.

Таблица 11.4. Условия инкубации разных типов тканей

Типы тканей и клеток	Период инкубации
Слой цитотрофобласта с активно делящимися клетками хорионических ворсинок	Позволяет проводить прямой и немедленный анализ хромосом
Клетки хориона и амниотической жидкости	От 6 до 14 дней
Клетки костного мозга	Прямой анализ или кратковременная культура тканей (от 24 до 48 ч)
Фибробласты кожи и тканей плода	От 8 до 15 дней

Добавление колхицина

За 2–3 ч до окончания культивирования добавляют колхицин или колцемид для остановки клеточного цикла на стадии метафазы, т. к. данные вещества могут разрушать нити веретена деления. На этой стадии клеточного цикла ДНК сверхспирализована.

Колхицин (*colchicine*, от лат. родового названия *Colchi (cum)* — безвременник и *-in(e)* — суффикс, обозначающий «подобный») — алкалоид ($C_{22}H_{25}O_6$), сильный нервно-паралитический яд. Способствует разрушению нитей веретена деления. Содержится в безвременнике и некоторых других растениях семейства лилейных. Выделен впервые в 1820 г. П. Пельтье и Ж. Каванту из клубней луковиц безвременника осеннего (*Colchicum autumnale*).

Гипотонизация

Гипотонизация необходима для разрушения мембран клеток. После окончания культивирования смесь центрифугируют (рис. 11.3). Отбирают надосадочную жидкость. Далее добавляют гипотонический раствор (0,075 KCl) и ставят в термостат при 37 °C на 15–20 мин.

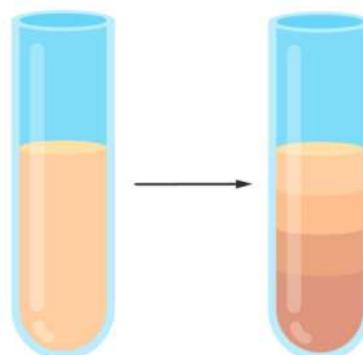


Рис. 11.3. Фото центрифуги и схема осаждения клеток крови (справа)

Фиксация клеток

После гипотонизации смесь центрифугируют, удаляют надосадочную жидкость и проводят трехкратную фиксацию клеток смесью абсолютного этанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3 : 1.

Раскапывание суспензии

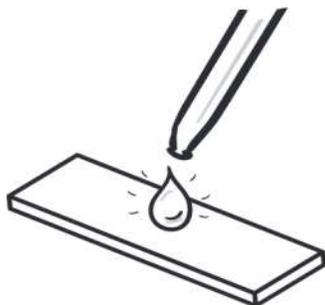


Рис. 11.4. Схема раскапывания суспензии

Клеточную суспензию раскапывают на предварительно вымытые влажные стекла (рис. 11.4), которые хранили в холоде в дистиллированной воде и высушивали при комнатной температуре.

Окрашивание метафазной пластинки

Монохромно окрашенные хромосомы (рутинная окраска) (рис. 11.5, А). Предметные стекла помещают в емкость с раствором красителя на 10–20 мин. Можно использовать различные модификации окрашивания. Красители: азур-эозин (окраска по Романовскому—Гимзе; по Фельгену), карболовый фуксин, лактацетоорсеин.

Дифференциально окрашенные хромосомы (рис. 11.5, Б, В). Модификаций такого типа окрашивания множество. Например, при G-бэндинге изначально препараты обрабатывают в растворе трипсина на 10–15 с при комнатной температуре, далее промывают в этиловом спирте и только после этого окрашивают азур-эозином (окраска по Романовскому—Гимзе).



Рис. 11.5. Окрашенные хромосомы на метафазных пластинках (фото):

- А — рутинное монохромное окрашивание; Б — дифференциальное окрашивание (G-бэндинг);
- В — дифференциальное окрашивание сестринских хроматид.

11.1.1.2. Анализ метафаз

Анализ метафаз и выявление аббераций хромосом проводят методом *микроскопирования*.

Микроскоп

Микроскопы — это приборы, предназначенные для получения увеличенных изображений мелких объектов, а также их фотографий (микрофотография) [Amos B., 2000; Diaspro A., 2001; Hawkes P. W., Spence J. C.H., 2006; Masters B. R., 2006; Pawley J. B., 2006].

Микроскоп служит для решения следующих задач:

- увеличения изображения препарата;
- разделения деталей на изображении;
- визуализации деталей для восприятия человеческим глазом или камерой.

Конструкция микроскопа непосредственно зависит от его назначения. Микроскопы бывают: оптические, электронные, рентгеновские.

Рассмотрим строение оптического микроскопа, разновидности которого используются в цитогенетике (рис. 11.6), и характеристики его частей (см. табл. 11.5).



Рис. 11.6. Основные элементы оптического микроскопа (Carl Zeiss, Германия)

Таблица 11.5. Основные части микроскопа и характеристики его элементов

Элемент	Характеристика элементов
Оптическая часть микроскопа	
Окуляр	Та часть оптической системы, которая непосредственно связана с глазами наблюдателя. В общем виде окуляры состоят из двух групп линз: глазной (ближайшей к глазу наблюдателя) и полевой (ближайшей к плоскости, в которой объектив строит изображение рассматриваемого объекта)
Объектив	Это оптические системы, предназначенные для построения микроскопического изображения в плоскости изображения с соответствующим увеличением, разрешением, точностью воспроизведения по форме и цвету объекта исследования. Они имеют сложную оптико-механическую конструкцию, которая включает несколько одиночных линз и компонентов, склеенных из двух-трех линз. Количество линз обусловлено кругом решаемых объективом задач. Чем выше качество изображения, даваемое объективом, тем сложнее его оптическая схема. Объективы делятся на «сухие» и «иммерсионные», ахроматические и апохроматические
Осветитель	Очень часто используется обыкновенное зеркало, позволяющее направлять на исследуемый образец дневной свет. В настоящее время часто применяют специальные галогенные лампы, имеющие спектр, близкий к естественному белому свету и не вызывающие грубых искажений цвета
Диафрагма	Сдвигая или раздвигая лепестки, можно плавно регулировать силу светового потока, поступающего на исследуемый образец
Коллектор	С помощью коллектора, расположенного вблизи светового источника, создается световой поток, который заполняет апертуру конденсора
Конденсор	Данный элемент, представляющий собой собирающую линзу, формирует световой конус, направленный на объект. Интенсивность освещения при этом регулируется диафрагмой. Чаще всего в микроскопах используется стандартный двухлинзовый конденсор Аббе
Механическая часть микроскопа	
Тубус	Тубус представляет собой трубку, в которую заключаются окуляр. Тубус должен быть достаточно прочным, не должен деформироваться, что ухудшит оптические свойства, поэтому для его изготовления часто используют алюминий, нержавеющую сталь либо специальные сплавы (тубус из пластмассы встречается только в бюджетных моделях). Для ликвидации бликов тубус внутри, как правило, покрыт черной светопоглощающей краской
Револьверная головка для быстрой смены объективов	Как правило, в недорогих моделях, имеющих всего один объектив, этот элемент отсутствует. Наличие револьверной головки позволяет оперативно регулировать увеличение, меняя объективы простым ее поворотом
Основание	Обычно выполняется достаточно массивным, из металлического литья, для обеспечения устойчивости микроскопа во время работы. На данном основании крепятся тубусодержатель, тубус, держатель конденсора, ручки фокусировки, револьверное устройство и насадка с окулярами

Окончание табл. 11.5

Элемент	Характеристика элементов
Механическая часть микроскопа	
Предметный столик	На нем размещают исследуемые образцы. Это либо тонкие срезы на предметных стеклах для микроскопов, работающих в проходящем свете, либо объемные объекты для микроскопов с освещением в отраженном свете
Крепления	Служат для фиксации предметных стекол на предметном столике
Винт грубой настройки фокусировки	Позволяет, изменяя расстояние от объектива до исследуемого образца, добиваться наиболее четкого изображения
Винт точной фокусировки	То же самое, только с меньшим шагом и меньшим ходом резьбы для максимально точной регулировки

В оптическом микроскопе может быть использован один из двух основных способов освещения: в проходящем и отраженном свете. В первом случае световой поток проходит через объект, в результате чего формируется изображение, во втором — свет отражается от поверхности объекта.

Что касается оптической системы в целом, то в зависимости от ее строения принято выделять *микроскопы прямые* (объективы, насадка, окуляры располагаются над объектом), *инвертированные* (вся оптическая система располагается под объектом) и *стереоскопические* (бинокулярные), состоящие из двух микроскопов, расположенных под углом друг к другу, и формирующие объемное изображение.

Кариотипирование

При микроскопировании наблюдают хромосомы с хорошим разбросом метафазных пластинок (см. рис. 11.7). Поиск метафаз проводят под малым увеличением (увеличение окуляра и увеличение объектива — 10×10), анализ — под большим увеличением (100×10) с использованием иммерсионной жидкости (кедрового или синтетического иммерсионного масла) в соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) 1973 г., Международного агентства по атомной энергии (МАГАТЭ) 1986 г. и Института медицинской генетики Академии медицинских наук (АМН) СССР 1974 г.

При анализе метафазных пластинок с 44–46 хромосомами учитывают все видимые в микроскоп aberrации хромосом. Такой анализ позволяет составить кариотип.

Кариотип — это хромосомный набор человека (число, размеры, форма) или генетический паспорт, который не меняется в течение всей жизни. В норме у человека 46 хромосом (23 пары), из них — 22 пары аутосом и 1 пара половых хромосом. Запись нормального женского кариотипа — 46,XX,N; нормального мужского — 46,XY,N. Далее составляют кариограмму.

Кариограммой является изображение всех хромосом диплоидного набора клетки, которые распределены по группам и расположены друг за другом в порядке уменьшения размеров с учетом индивидуальных особенностей каждой хромосомы (см. рис. 11.8).

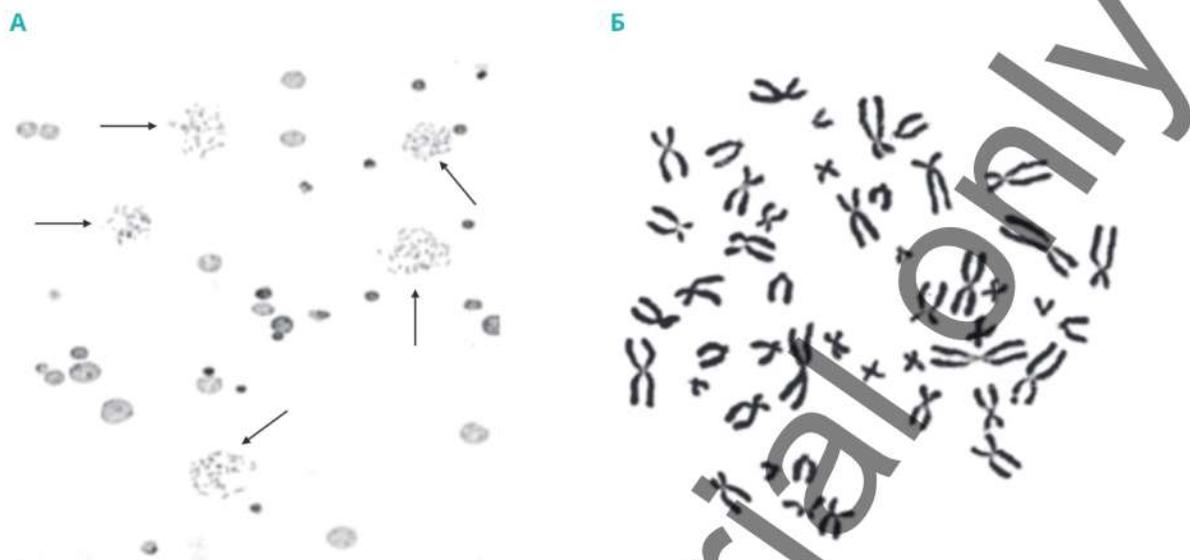


Рис. 11.7. Фото монохромно окрашенных хромосом: метафазные пластинки (показаны стрелками) при малом (А) и большом увеличении (Б)

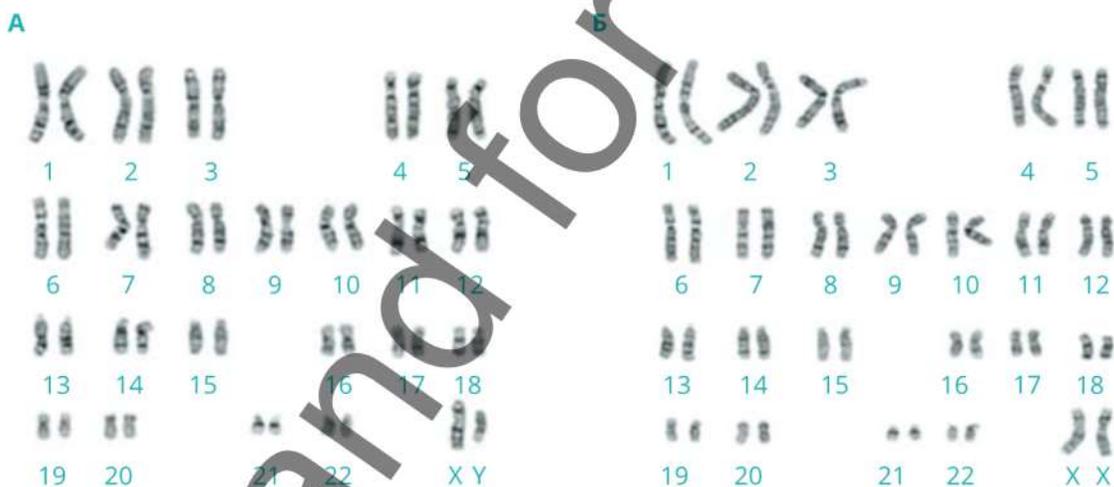


Рис. 11.8. Кариограммы хромосом нормального женского (А) и мужского (Б) кариотипа; дифференциальное окрашивание, G-бэндинг

11.1.2. Основная номенклатура, используемая в цитогенетике

11.1.2.1. Символы и сокращения

A, C, D, E, F, G — морфологические группы хромосом

1–22 — номера аутосом

X, Y — половые хромосомы

(,) — разделяет модальное число хромосом, половые хромосомы и хромосомные аномалии

(-) — потеря хромосомы

- (•) — структурированные структурно измененные хромосомы и точки останова
- (+) — усиление хромосомы
- (;) — отделяют перестроенные хромосомы и точки останова, содержащие более одной хромосомы
- (:) — разрыв без соединения
- (::) — разрыв и соединение
- (/) — отделяет клеточные линии или клоны
- (//) — отделяет линии реципиента и донорских клеток в трансплантации костного мозга
- cen** (*centromere*) — центромера
- del** (*deletion*) — выпадение
- der** (*derivative*) — хромосомы (используется, когда присутствует только одна хромосома из транслокации или когда одна хромосома имеет две или более структурные аномалии)
- dic** (*dicentric*) — дицентрик
- dn** (*de novo*) — хромосомная аномалия, не унаследованная от родителей
- dup** (*duplication*) — дублирование части хромосомы
- fra** — хрупкий, фрагильный сайт (обычно используется с синдромом Fragile-X)
- h** — гетерохроматическая область хромосомы
- h+** — увеличение за счет амплификации гетерохроматинового участка хромосомы
- i** (*isochromosome*) — изохромосома: оба плеча хромосомы одинаковы
- ins** (*insertion*) — вставка части хромосомы
- inv** (*inversion*) — поворот на 180°
- ish** — предшествующие кариотипы являются результатом FISH-анализа
- mar** — маркерная хромосома (неидентифицируемая часть хромосомы)
- mat** — перестройка хромосомы по материнской линии
- p** — короткое плечо хромосомы
- pat** — перестройка хромосомы по отцовской линии
- pter** — теломера короткого плеча
- psu dic** — только одна центромера активна (псевдодицентрическая хромосома)
- q** — длинное плечо хромосомы
- qter** — теломера длинного плеча
- r** (*ring*) — кольцевая хромосома
- recp** (*reciprocal translocation*) — реципрокная транслокация
- rec** — рекомбинантная хромосома
- rob** (**Rb**) — Робертсоновская транслокация
- t** (**tr**) — транслокация
- tan** — тандемная транслокация
- ter** — концевой участок хромосомы (например, 2qter-конец длинного плеча хромосомы 2)
- tri** — трисомия
- trp** — умножение части хромосомы

Порядок записи результатов кариотипирования. Модальное число хромосом, половые хромосомы, аббревиатура (первая хромосома; вторая хромосома) (номер локуса на коротком плече хромосомы; номер локуса на длинном плече хромосомы).

Пример. 46,XX,t(1;2)(p32;q22)

Запись означает: 46 хромосом, женщина (XX половых хромосом) со сбалансированной транслокацией между хромосомами 1 и 2, с точками прерывания в коротком плече хромосомы 1 в полосе 1p32 и длинном плече хромосомы 2 в полосе 2q22.

11.1.2.2. Определения

Модальное число — общее количество хромосом в каждой клетке данной клеточной линии.

Половые хромосомы — дополнение хромосом X и Y.

Номер локуса/бэнда — численное описание местоположения на плече хромосомы от центромеры до конца хромосомы.

Эта запись кариотипа является стандартом, определяемым Международной системой цитогенетической номенклатуры хромосом человека (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, ISCN). Она имеет решающее значение для точного и последовательного описания геномных изменений, выявленных с помощью кариотипирования, флуоресцентной гибридизации *in situ* и микрочипов. Международная система цитогеномной номенклатуры хромосом человека (ISCN) является центральным справочным материалом для описания результатов кариотипирования, FISH и микрочипов и предоставляет правила для описания цитогенетических и молекулярно-цитогенетических результатов в лабораторных отчетах. Эта номенклатура пересматривается и уточняется каждые несколько лет. Так, в выпуске 2017 г. были представлены рекомендации для цитогенетического тестирования, примененного к образцам опухоли [Stevens-Kroef M.J.P.L. et al., 2017].

11.1.3. Ограничение классического цитогенетического метода

Классическая цитогенетика при изучении кариотипа всегда была ограничена бэндовым уровнем разрешения. Анализ хромосом детектирует и правильно идентифицирует лишь около трети хромосомных перестроек. Еще около трети перестроек идентифицируются этими методами неверно, а треть остается совсем незамеченной. Классические методы цитогенетического анализа в среднем позволяют выявлять лишь около 15 % хромосомных перестроек.

11.1.4. Классификация хромосом человека

Для изучения метафазных хромосом и по сей день используют различные способы окрашивания. На способе их окрашивания базируются две классификации хромосом: *Денверская* и *Парижская*. Их разработка стала начальным этапом создания **физических карт хромосом человека**.

11.1.4.1. Денверская классификация хромосом

Монохромно окрашенные хромосомы (рутинная окраска). Такой тип окрашивания лег в основу Денверской классификации хромосом, принятой цитогенетиками на конференции в городе Денвер (США) в 1960 г. (см. табл. 11.8). Хромосомы распределяются по их размеру. Участки метафазной хромосомы обозначили следующим образом: **p** — короткое плечо, **q** — длинное плечо, **cen** — центромера, **tel** — теломера.

Денверская классификация хромосом позволила:

- визуализировать монохромно окрашенные хромосомы;
- распределять хромосомы по размеру;
- выявлять аутосомы и половые хромосомы;
- устанавливать морфологические характеристики различных типов хромосом.

Морфологические типы хромосом

В зависимости от места расположения центромеры (первичная перетяжка, делящая хромосому на два плеча) различают четыре типа хромосом (рис. 11.9):

- **Метацентрические** — у которых длины p- и q-плеч практически одинаковы. К ним относят хромосомы № **1** и **3** (крупные метацентрики), **16** (маленькая метацентрическая), **19** и **20** (самые маленькие метацентрики).

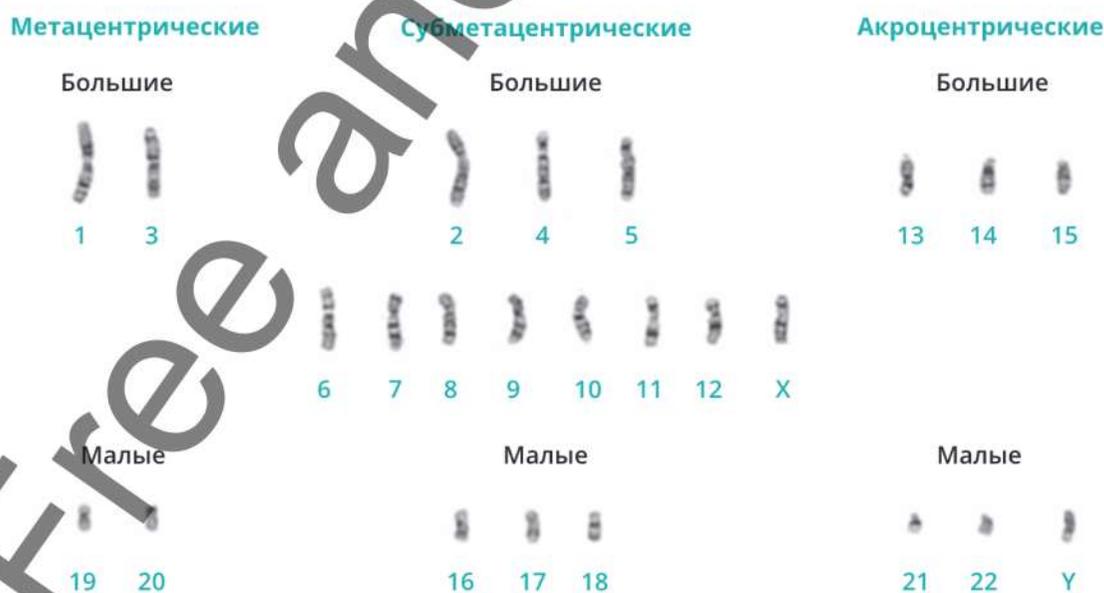


Рис. 11.9. Типы метафазных хромосом человека (фото)

Таблица 11.6. Денверская классификация хромосом человека

Группа хромосом	Изображение
A	 1
	 2
	 3
B	 4 5
C	 6 7 8 9 10 11 12 X X
D	 13 14 15
E	 16
	 17
	 18
F	 19 20
G	 21 22 Y

Размеры хромосомы и положение центромеры	Центриольный индекс, %	Примечание
Самая большая метацентрическая	48–49	На длинном плече может быть вторичная перетяжка
Самая большая субметацентрическая	38–40	—
Большая метацентрическая	45–46	На 20 % короче первой хромосомы
Большая субметацентрическая	24–30	—
Средние субметацентрические	27–35	На 9-й хромосоме часто встречается вторичная перетяжка
Средние акроцентрические	≈15	На всех хромосомах — вторичные перетяжки
Маленькая метацентрическая	40	В 10 % случаев встречается вторичная перетяжка
Маленькая субметацентрическая	34	—
Маленькая субметацентрическая	26	—
Самые маленькие метацентрические	36–46	—
Самые маленькие акроцентрические	13–33	На 21-й и 22-й хромосомах — вторичные перетяжки

- **Субметацентрические** — длина p -плеча короче длины q -плеча. Это хромосомы № 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, X (крупные субметацентрики) и 17, 18 (маленькие субметацентрики).
- **Акроцентрические** — длина p -плеча значительно короче длины q -плеча. К ним относят хромосомы № 16, 17, 18 (крупные акроцентрики со вторичными перетяжками); 21, 22 (маленькие акроцентрики со вторичными перетяжками) и Y-хромосома.
- **Телоцентрические** — p -плечо практически незаметно, а центромера — на самом краю.

В геноме человека телоцентрические хромосомы отсутствуют.

Аберрации хромосом, выявляемые при кариотипировании монохромно окрашенных хромосом

При анализе метафазных пластинок монохромно окрашенных хромосом выявляют геномные и хромосомные мутации.

Среди хромосомных мутаций можно определить следующие типы мутаций/аберраций (рис. 11.10):

- одиночные фрагменты (*sfr*) (рис. 11.11);
- парные фрагменты (*dfr*);
- дицентрики (*dic*), трицентрики (*tric*);
- центрические и ацентрические кольца (*ring*);
- делеции (*del*);
- центромерные разрывы (*cbr*);
- маркерные хромосомы (*mar*) и др.

Такой микроскопический анализ хромосом незаменим, особенно при выявлении дицентрических хромосом, центрических и ацентрических колец.

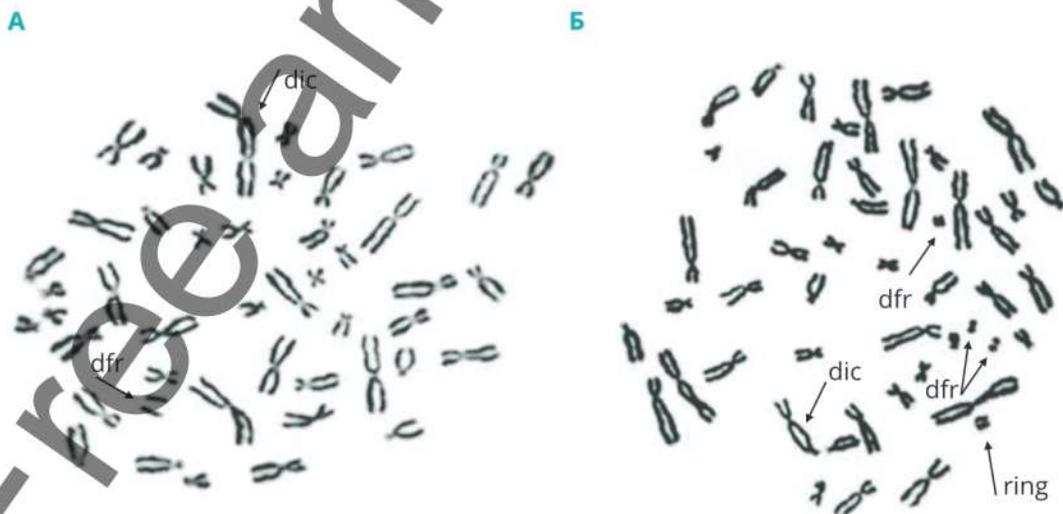


Рис. 11.10. Дицентрики (*dic*), кольца (*ring*) и парные (*dfr*) фрагменты (фото монохромно окрашенных хромосом)

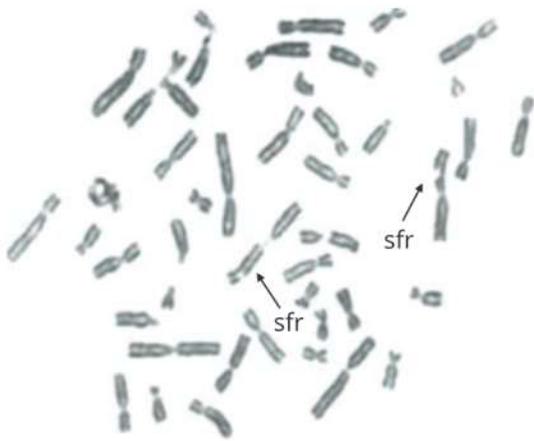


Рис. 11.11. Одиночные фрагменты (*sfr*) в *p*- и *q*-плечах хромосомы 1 (фото монохромно окрашенных хромосом)

11.1.4.2. Парижская классификация хромосом

Дифференциальный тип окрашивания метафазных хромосом стал основой Парижской классификации, принятой сообществом цитогенетиков в 1971 г. на конференции во Франции (Paris Conference, 1971: Standardization in human cytogenetics. Cytogenetics. 1972; 11(5): 317–62) (рис. 11.12).

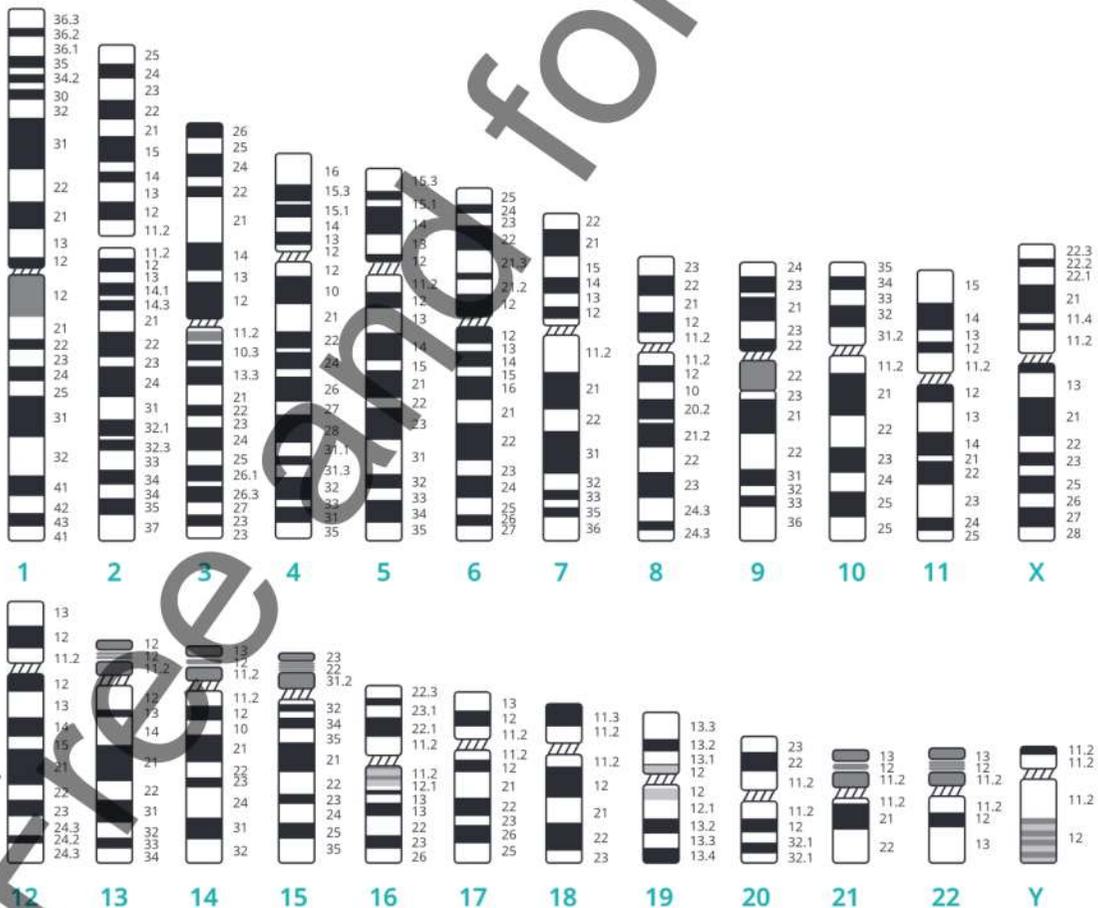


Рис. 11.12. Парижская классификация хромосом (номенклатура ISCN-1995)

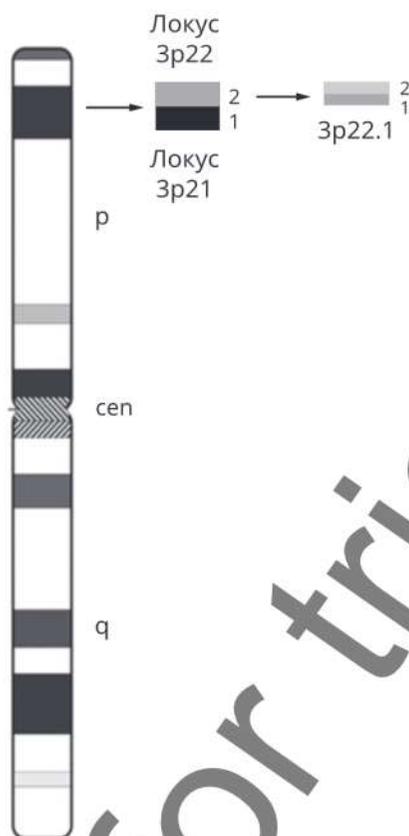


Рис. 11.13. Схема расположения участков хромосомы: p- и q-плечи и центромера (cen)

Хромосомные плечи **p** и **q** подразделяются на районы (*regions*), границами которых служат регулярно наблюдаемые четкие морфологические маркеры (*landmarks*), а районы, в свою очередь, делятся на сегменты (*bands*), участки хромосом четко отличаются от соседних по интенсивности окраски (рис. 11.13).

Районы и сегменты нумеруются арабскими цифрами от центромеры к теломере, отдельно для каждого плеча.

На сегодняшний день эта классификация хромосом активно используется в практической медицине. Последнее издание вышло в свет в 2016 году [ISCN-2016].

Парижская классификация хромосом позволила:

- визуализировать дифференциально окрашенные хромосомы;
- идентифицировать все хромосомы человека;
- определить длины длинного и короткого плеч хромосомы;
- открыть эухроматиновые и гетерохроматиновые участки хромосом;
- определить центромерный индекс.

Способы дифференциальной окраски хромосом

Дифференциальная окраска — это линейная непрерывная совокупность сегментов. Известны различные модификации этого метода окрашивания (**Q, G, R, C** — окраски) (табл. 11.7, рис. 11.14, 11.15).

Таблица 11.7. Типы и характеристика различных способов дифференциального окрашивания хромосом

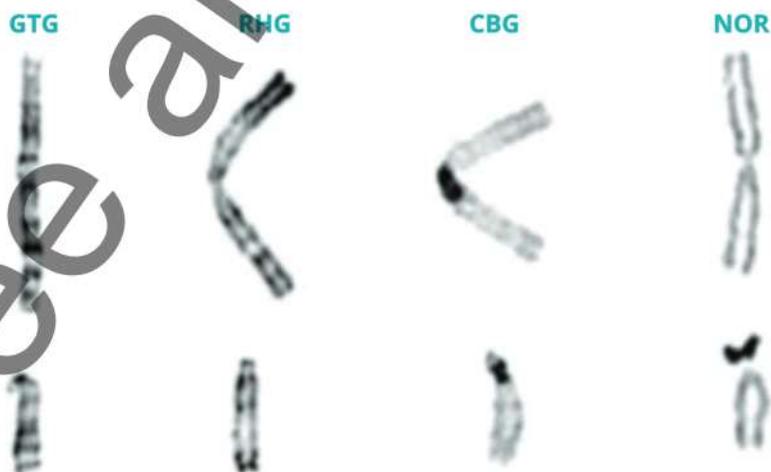
Типы	Характеристика
G-окрашивание (GTG: G-banding Trypsin Giemsa)	Наиболее распространенный метод дифференциального окрашивания
R-окрашивание (RHG: R-bands Heating Giemsa)	Рисунок окраски противоположен рисунку G-окрашивания
C-окрашивание (CBG: C-bands Barium hydroxide Giemsa)	Метод избирательного окрашивания прицентромерного гетерохроматина
NOR-окрашивание (Nucleolar organizers)	Метод избирательного окрашивания активных ядрышкообразующих районов акроцентрических хромосом (13, 14, 15, 21, 22)
Окрашивание с использованием Hoechst 33258, контрастирование актиномицином D	Скрининговый метод окрашивания. Морфология хромосом соответствует G-окрашиванию

G- и **R-** окрашенные участки хромосомы имеют различные нуклеотидные последовательности и, следовательно, специфические свойства и функции (см. рис. 11.16).

В клинических лабораториях наиболее часто используют G-окраску (G-banding) (см. рис. 11.17).

Для характеристики положения центромеры на хромосоме используют величину **центромерный индекс (I^c)** (см. табл. 11.8) — отношение длины короткого плеча (*p*) к общей длине (*p* + *q*) хромосомы, его определяют по формуле:

$$I^c = \frac{p}{p + q} \cdot 100 \%$$

**Рис. 11.14.** Фото большой метацентрической и акроцентрической хромосом с типами дифференциального окрашивания: GTG, RHG, CBG и NOR

А



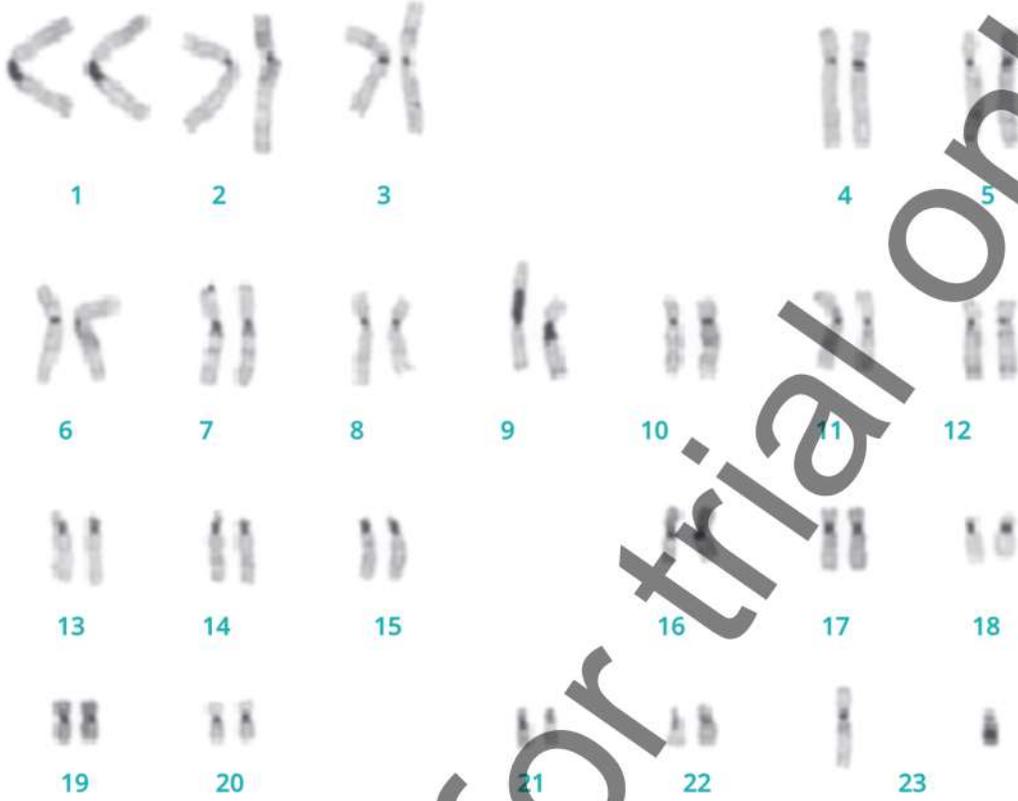
Б



Рис. 11.15. Кариогаммы дифференциально окрашенных хромосом (фото):

А — G-окрашивание; Б — R-окрашивание; В — C-окрашивание; Г — N-окрашивание

В



Г



Free and for trial only

G-сегменты:

- АТ-богатые.
- Гены, определяющие тканеспецифичную дифференцировку.
- Реплика в позднюю S-фазу.
- LINE+

GTG

G

G

RHG

R

R

R-сегменты:

- GC-богатые.
- Гены «домашнего хозяйства».
- Реплика в ранней S-фазе.
- SINE+, Alu+

Рис. 11.16. Молекулярная природа G- и R-сегментов (GTG и RHG — G- и R-окрашивание)

А

Б

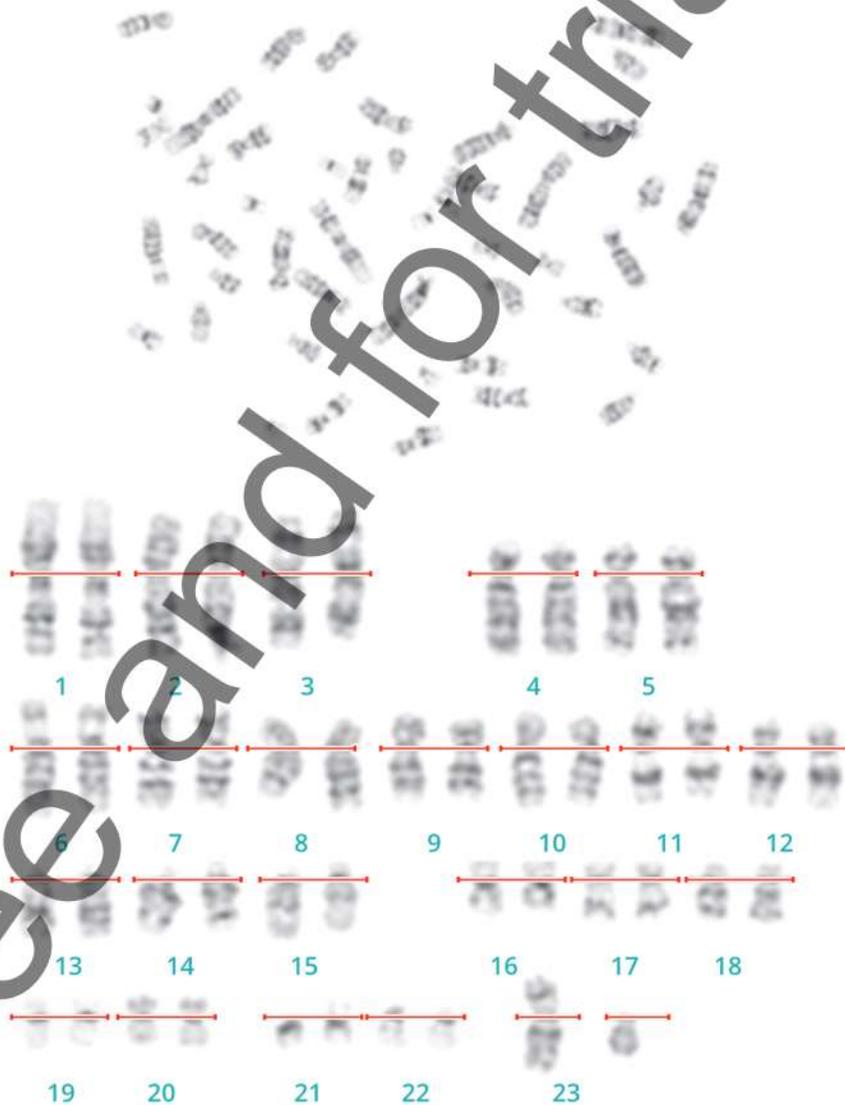


Рис. 11.17. Фото метафазной пластинки (А) и кариограмма хромосом (46,XY,N) (Б) с дифференциальным окрашиванием (G-бэндинг)

Таблица 11.8. Относительная длина хромосом (в процентах от общего количества аутосом)* и центромерный индекс

Хромосома	Относительная длина (короткое плечо: длинное плечо)	Центромерный индекс
1	9,11 (4,43 : 4,68)	48,6
2	8,61 (3,35 : 5,26)	38,9
3	6,97 (3,30 : 3,67)	47,3
4	6,49 (1,80 : 4,69)	27,8
5	6,21 (1,66 : 4,55)	26,8
6	6,07 (2,30 : 3,77)	37,9
7	5,43 (2,01 : 3,42)	37,0
X	5,16 (1,94 : 3,22)	37,5
8	4,94 (1,62 : 3,32)	32,8
9	4,78 (1,56 : 3,22)	32,7
10	4,80 (1,55 : 3,25)	32,3
11	4,82 (1,95 : 2,87)	40,5
12	4,50 (1,23 : 3,27)	27,4
13	3,87 (0,64 : 3,23)	16,6
14	3,74 (0,69 : 3,05)	18,4
15	3,30 (0,58 : 2,72)	17,6
16	3,14 (1,33 : 1,81)	42,5
17	2,97 (0,94 : 2,03)	31,9
18	2,78 (0,74 : 2,04)	26,6
19	2,46 (1,10 : 1,36)	44,9
20	2,25 (1,03 : 1,22)	45,6
21	1,70 (0,49 : 1,21)	28,6
22	1,80 (0,51 : 1,29)	28,2
Y	2,21 (0,51 : 1,70)	23,1

Аберрации хромосом, выявляемые при кариотипировании дифференциально окрашенных хромосом

При анализе метафазных пластинок с дифференциально окрашенными хромосомами определяют *геномные* и *хромосомные мутации*.

При кариотипировании дифференциально окрашенных хромосом (см. [рис. 11.18](#)) выявляются следующие типы хромосомных мутаций/аббераций:

* Процент каждой хромосомы в общей сложности 22 пар аутосом.

Таблица 11.9. Делеции хромосом, выявленные при различных патологиях

Аномальная хромосома в каждой паре (справа)		
 del(5)(q22q35)	 del(5)(q13q33)	
 del(6)(q21q25)	 del(6)(q15q21)	
 del(7)(q11.2)	 del(7)(q11.2q36)	 del(7)(q22q34)
 del(7)(q21q31)	 del(7)(q22)	 del(7)(q22)
 del(9)(p13)	 del(9)(p22)	 del(9)(p21)
 del(9)(q13q22)	 del(9)(q13q34)	

(дифференциальное окрашивание, G-бэндинг)*

Основной участок мутации или диапазон повреждения	Патология (код по МКБ-10)
del(5)(q12-q35)	Острый миелоидный лейкоз (C92.0) Миелодиспластические синдромы (D46)
del(6)(q13-q27)	Острый лимфобластный лейкоз (C91.0) Хронический лимфоцитарный В-клеточный лейкоз (C91.1)
del(7)(q11.2-q36)	Острый миелоидный лейкоз (C92.0) Миелодиспластические синдромы (D46)
del(7)(q21q31), del(7)(q22)	Нет данных
del(9)(p13) del(9)(p21-p22)	Острый лимфобластный лейкоз (C91.0) Меланома (C43) — злокачественная опухоль, развивающаяся из меланоцитов (пигментных клеток, продуцирующих меланины)
del(9)(q21-q22)	Острый миелоидный лейкоз (C92.0)

Аномальная хромосома в каждой паре (справа)

		
del(11)(p13)		
		
del(11)(q23)	del(11)(q23)	del(11)(q13q23)
		
del(12)(p12)	del(12)(p12)	
		
del(13)(q12q14)	del(13)(q12q21.2)	del(13)(q12q22)
		
del(14)(q22q31)	del(14)(q22q31)	
		
del(20)(q11.2q13.1)	del(20)(q11.2)	del(20)(q11.2)
		
del(22)(q11.2)	del(22)(q11.2)	del(22)(q13)

Окончание табл. 11.9

Основной участок мутации или диапазон повреждения	Патология (код по МКБ-10)
del(11)(p13)	Нефробластома (опухоль Вильмса) (C64) — высокозлокачественная эмбриональная опухоль, происходящая из развивающихся тканей почек
del(11q)	Миелодиспластические синдромы (D46) Диффузная крупно-В-клеточная лимфома (C83.3)
del(12)(p12)	Острый лимфобластный лейкоз (C91.0) Острый миелоидный лейкоз (C92.0) Миелодиспластические синдромы (D46)
del(13)(q12-q34)	Миелодиспластические синдромы (D46)
del(14)(q22q31)	Нет данных
del(20)(q11.2q13.1), del(20)(q11.2)	Неходжинская лимфома (C85) Острый миелоидный лейкоз (C92.0) Миелодиспластические синдромы (D46),
del(22)	Менингиома (арахноидэндотелиома) (C70, D32) — опухоль, растущая из клеток паутинной мозговой оболочки, а именно: арахноидального эндотелия — ткани, окружающей мозг

Таблица 11.10. Инверсии и изохромосомы, выявленные при различных патологиях

Аномальная хромосома в каждой паре (справа)	Основной участок мутации или диапазон повреждения
 <p>i(6)(p10)</p>	 <p>i(6)(p10)</p>
 <p>i(12)(p10)</p>	 <p>i(12)(p10)</p>
 <p>i(17)(q10)</p>	 <p>i(17)(q10)</p>
 <p>inv(3)(q21q26.2)</p>	 <p>inv(3)(q21q26.2)</p>
 <p>inv(16)(p13.1q22)</p>	 <p>inv(16)(p13.1q22)</p>
 <p>idic(X)(q13)</p>	 <p>idic(X)(q13)</p>

(дифференциальное окрашивание, G-бэндинг)***Патология**

Ретинобластома (C69.2) — злокачественная опухоль глаза, развивающаяся преимущественно в детском возрасте из тканей эмбрионального происхождения

Рак яичка (C62) — злокачественная опухоль, развивающаяся из тканей яичек (мужских половых желез, расположенных в мошонке)

Острый лимфобластный лейкоз (C91.0)

Острый миелоидный лейкоз (C92.0)

Хронический миелоидный лейкоз (C92.1)

Примитивная нейроэктодермальная опухоль (C71)

Острый миелоидный лейкоз (C92.0)

Миелодиспластические синдромы (D46)

Острый миелоидный лейкоз (C92.0)

Острый миелоидный лейкоз (C92.0)

Миелодиспластические синдромы (D46)

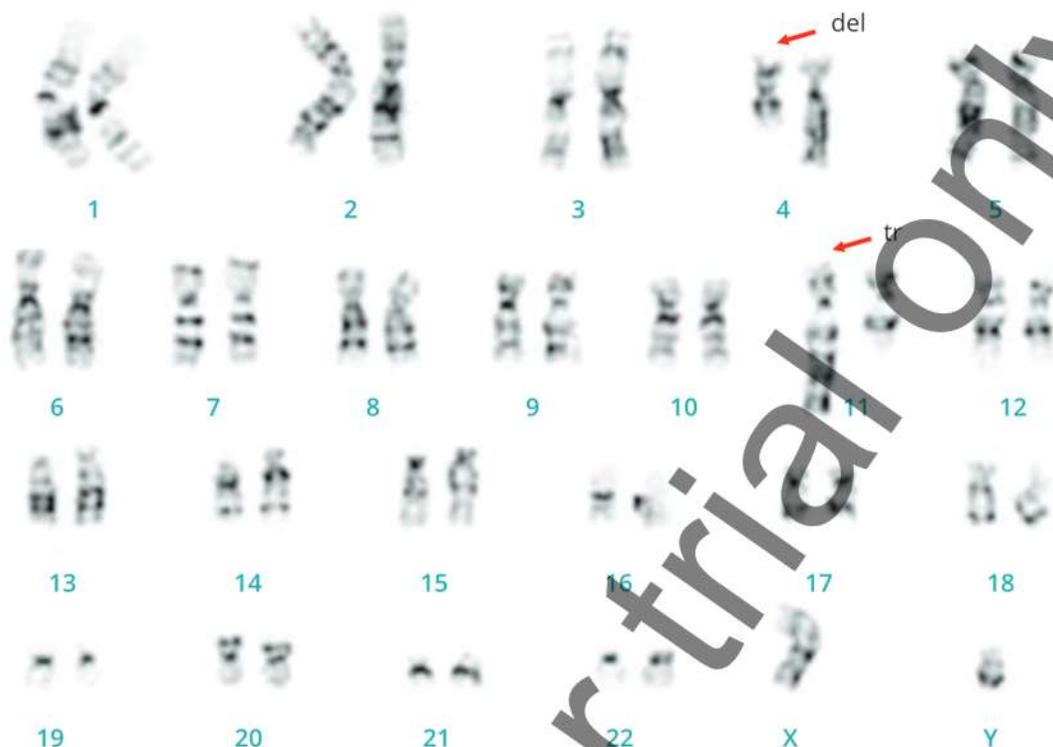


Рис. 11.18. Кариограмма с транслокацией (*tr*) и делецией (*del*) в хромосомах 11 и 4 соответственно (46,XY,*tr*(4;11);*del* 4) (фото, дифференциальное окрашивание G-бэндинг)

- реципрокные и нероципрокные транслокации (*tr*);
- делеции (*del*) (см. табл. 11.9);
- маркерные хромосомы (*mar*);
- центромерные разрывы (*abr*);
- пери- и парацентрические инверсии (*inv*) (см. табл. 11.10).

11.1.5. Молекулярно-цитогенетические методы

С развитием молекулярных технологий стало возможным исследовать ДНК/хромосому в микроскопе с большим разрешением [Molecular cytogenetics..., 2002].

Визуализация в составе хромосомы конкретных последовательностей ДНК позволила изучать:

- трехмерную и прижизненную организацию хромосомы;
- архитектонику интерфазного ядра;
- пространственное взаимодействие хромосомных районов.

Молекулярная цитогенетика обеспечила революционный прорыв в генетике, дав возможность:

- осуществлять анализ структуры ДНК хромосом в диапазоне 10–100 кб;
- проводить диагностику неделящихся интерфазных клеток.

Существует **несколько модификаций методов молекулярной цитогенетики**.

Среди них основными являются:

- *флуоресцентная гибридизация in situ* (fluorescence in situ hybridization, FISH);
- *сравнительная геномная гибридизация* (comparative genomic hybridization, CGH);
- *мечение хромосом с помощью полимеразной реакции с использованием специфических праймеров (олигонуклеотидов) in situ* (primed in situ labeling, PRINS);
- *флуоресцентная гибридизация пептидно-нуклеиновых соединений* (peptide nucleic acid labeling, PNA)

В практической медицине чаще всего применяют FISH- и CGH-метод.

11.1.5.1. Флуоресцентная гибридизация *in situ*

FISH-метод — это цитогенетический метод, который применяют для детекции и определения положения специфической последовательности ДНК на метафазных хромосомах или в интерфазных ядрах *in situ* [Baheti B. et al., 2017; Cui C. et al., 2016; *Multicolor FISH in Human Cytogenetics*, 2006; O'Connor C., 2008; Urbankova H. et al., 2014].

Этапы FISH-метода

1. **Забор биоматериала** (активно пролиферирующая ткань — лимфоциты периферической крови, фибробласты, клетки буккального эпителия, амниотическая жидкость, ворсины хориона или плаценты) **и его культивирование**. При изучении метафазных хромосом их проводят так же, как и при классическом цитогенетическом методе. Далее раскапывают суспензию на предметные стекла. Гибридизация *in situ* молекулярной ДНК-пробы на хромосому-мишень проводится на определенном ограниченном участке предметного стекла. Данный участок цитогенетического препарата должен содержать достаточное количество клеточного материала и обязательное число метафазных пластинок. Поэтому суспензия клеток для раскапывания должна иметь несколько большую концентрацию клеточного материала в сравнении с концентрацией, используемой при приготовлении препаратов для окраски GTG-методом. При выполнении FISH на препаратах, получаемых непрямым методом раскапывания суспензии (амниотическая жидкость, ворсины хориона), необходимо выбрать зону с максимальным количеством метафаз. Препарат для FISH должен быть приготовлен за трое суток до выполнения гибридизации и храниться при комнатной температуре. При изучении *интерфазной ДНК любых видов тканей* используют гистологический срез, зафиксированный на предметном стекле. Подготовка гистологического препарата осуществляется по стандартной схеме: вырезка, маркировка, проводка, заливка, микротомия, помещение среза на предметное стекло и депарафинизация (очищение от парафина). При подготовке цитологического препарата используются специальные осаждающие растворы и центрифугирование, что позволяет получить концентрированную суспензию клеток.
2. **Предварительная ферментативная обработка препаратов** (для всех клеточных культур, кроме амниотической жидкости).

3. **Денатурация ДНК на предметных стеклах.** Наносят суспензию с ДНК-зондом на уже готовый препарат (с метафазными или интерфазными ядрами). ДНК-зонд (*DNA-probe*) — это нуклеотидная последовательность определенного размера, которая комплементарна определенному участку исследуемой ДНК цитогенетического препарата). Далее препарат нагревают. Молекула ДНК, существующая в форме двойной полинуклеотидной цепи, подвергается процессу тепловой денатурации (рис. 11.19). Для того чтобы несколько снизить температуру процесса (приблизительно с 95 до 70 °С), денатурацию проводят в растворе формамида, ослабляющего водородные связи между комплементарными азотистыми основаниями.
4. **Реакция гибридизации.** Одиночные полинуклеотидные цепи ДНК вступают затем в реакцию гибридизации с предварительно денатурированным в тех же условиях ДНК-зондом — центральным и определяющим звеном при проведении *in situ* гибридизации. Хромосомная аномалия может быть выявлена только в том случае, если в распоряжении исследователя имеется соответствующий задаче ДНК-зонд.
5. **Инкубация.** Ее проводят в гибридизационном буфере при 37 °С и инкубируют во влажной камере в течение нескольких часов (продолжительность инкубации указана в каждом конкретном протоколе). В настоящее время для денатурации и гибридизации используют высокоточные приборы — автоматические гибридазеры.

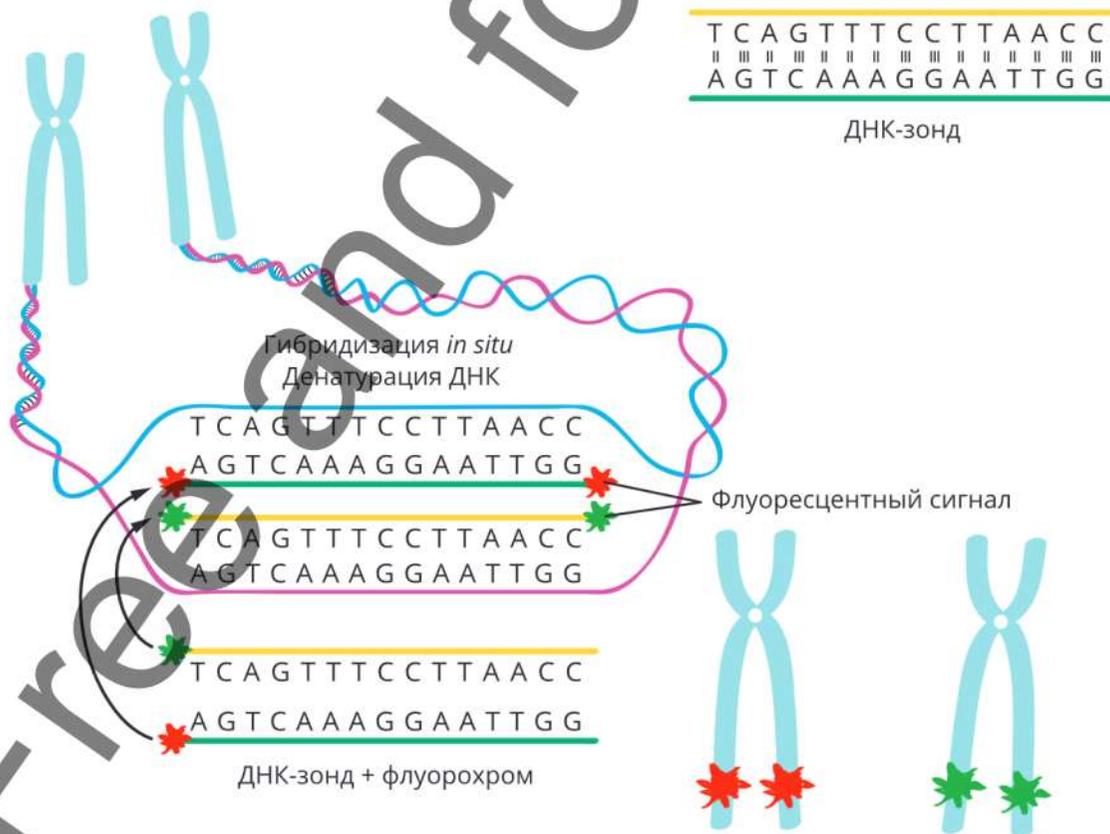


Рис. 11.19. Основные этапы флуоресцентной гибридизации *in situ*

- 6. Промывание препаратов.** Полученные препараты многократно отмывают для удаления не связавшегося избытка зонда и предотвращения возможного неспецифического связывания его с другими участками ДНК.
- 7. Окрашивание препаратов.** Контрастное по цвету окрашивание клеточных ядер с помощью ДНК-специфичного флуоресцентного красителя.

В основном это стандартные процедуры, которые описаны во многих методических пособиях, а при использовании коммерческих зондов — в протоколах фирм-производителей.

Главный принцип при подборе флуорохромов — принцип цветового контраста. Для мечения зондов чаще всего используют флуорохромы FITC, Texas Red, PI, DAPI, Cy5, Cy5.5 (табл. 11.11).

Таблица 11.11. Характеристика флуорохромов, применяемых в молекулярной цитогенетике для прижизненного окрашивания препаратов

Название красителя (англ./рус. яз.)	Длина волны поглощения/излучения, нм	Видимый цвет
DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole / 4', 6-диамидино-2-фенилиндол)	345/455	Голубой
Ethidium bromide / бромистый этидий	493/620	Красный
FAM (Fluorescein amidites / флуоресцеиновые амидиты)	495/516	Темно-зеленый
FITC (Fluorescein isothiocyanate / изотиоцианат флуоресцеина)	495/518	Светло-зеленый
HEX (Hexadecimal)	535/556	
PI (Propidium iodide / пропидиум йодид)	536/617	Красный
TRITC (Tetramethylrhodamine-5-(and 6)-isothiocyanate / тетраметилродамин-5-(и 6)-изотиоцианат)	547/572	Желтый
Rox (carboxy-X-rhodamine / карбокси-X-родамин)	575/602	
Texas Red / тexasский красный	615/615	
Cy5 (Cyanine 5 / цианин 5)	650/670	Красный
Cy5.5 (Cyanine 5.5 / цианин 5.5)	675/694	

FISH-метод может применяться для различных целей с использованием зондов различных типов (см. рис. 11.20).

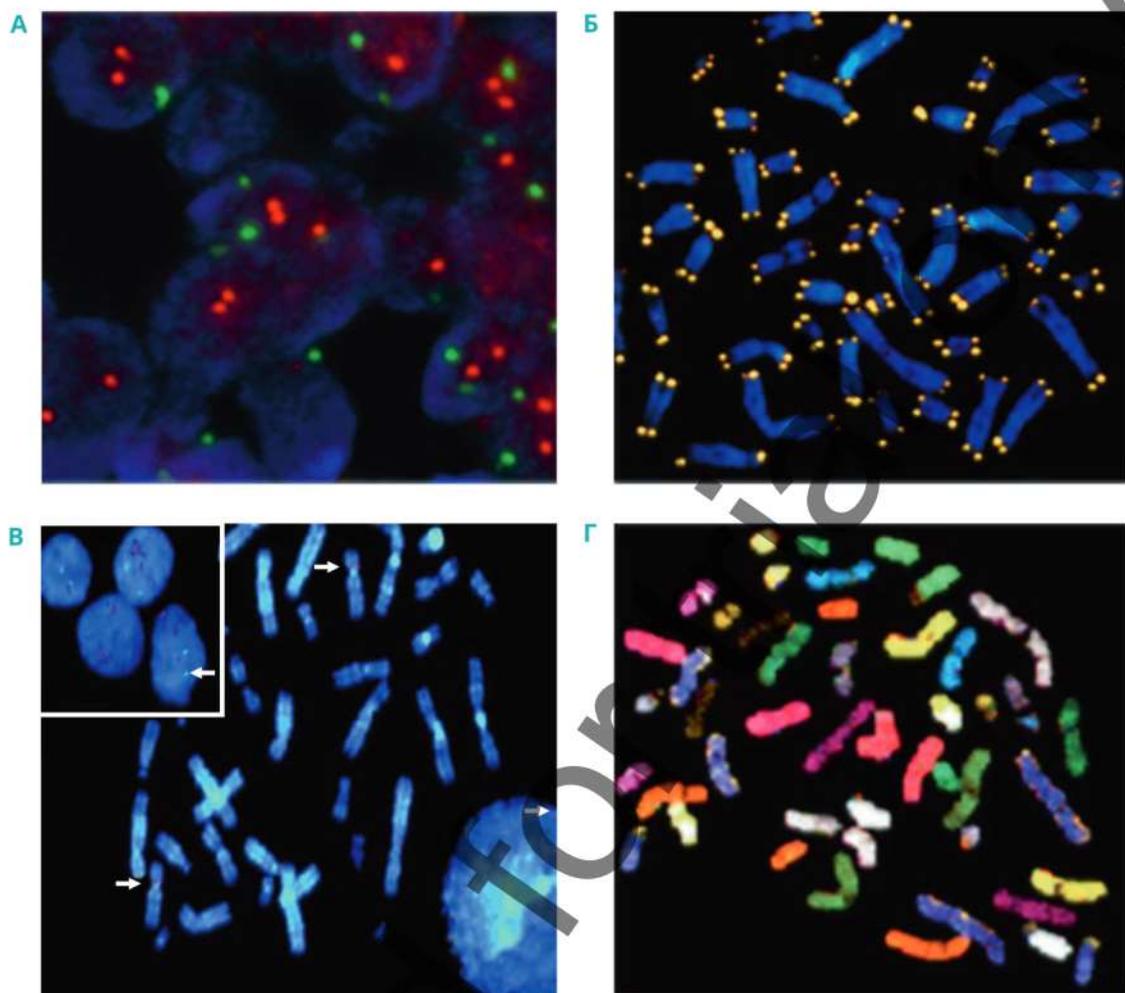


Рис. 11.20. Метафазная и интерфазная ДНК, меченные различными зондами (фото; FISH-окрашивание).

А, Б — локус-специфичными; В — центромерными; Г — зондами на всю хромосому

Локус-специфичные зонды связываются с определенными участками хромосом. Их используют для идентификации имеющейся короткой последовательности, выделенной ДНК, которая используется для приготовления меченого зонда и его последующей гибридизации с набором хромосом. В клинической практике локус-специфичные зонды используются наиболее часто. Особенно для детекции точковых мутаций в интерфазных и метафазных ядрах.

Альфонидные, или центромерные, зонды-повторы представляют собой повторяющиеся последовательности центромерных областей хромосом. С их помощью каждая хромосома может быть окрашена в различный цвет, что позволяет быстро определить число хромосом и отклонения от нормального их числа. Используются редко.

Зонды на всю хромосому являются набором небольших зондов, комплементарных к отдельным участкам хромосомы, но в целом покрывающих всю ее длину.

Используя библиотеку таких зондов, можно «раскрасить» всю хромосому и получить дифференциальный спектральный кариотип индивида. Данный тип анализа применяется для анализа хромосомных aberrаций, например, реципрокных и нерципрокных транслокаций, инверсий, делеций. В практической медицине используются окрашивание и детекция только нескольких хромосом. Это связано с высокой стоимостью химических реактивов.

Анализ препаратов и интерпретация результатов

Анализ препаратов проводят с помощью флуоресцентного микроскопа, где под воздействием возбуждающего света определенного спектра молекулы флуорохромов начинают испускать кванты света, при этом длина его волны зависит от свойств используемого флуорохрома (см. табл. 11.11).

Для анализа флуоресцентных сигналов используют флуоресцентный микроскоп с набором фильтров, соответствующих спектральным характеристикам флуорохромов. Выпускаемые фильтры могут быть одинарными, двойными или тройными.

Для анализа сигналов на **метафазных хромосомах** необходимо просмотреть не менее 20–25 метафаз при отсутствии мозаицизма, а для уточнения мозаичного статуса кариотипа — 100 метафаз и более. В исследование включаются метафазы, в которых на обеих анализируемых гомологичных хромосомах идентифицируются контрольные флуоресцентные сигналы, входящие в состав ДНК-пробы.

Анализ сигналов на **интерфазных хромосомах** заключается в просмотре не менее 50 интерфазных клеток. Для уточнения мозаичного статуса кариотипа просматривают 500 интерфаз и более.

Цитогенетический анализ завершается протоколированием результатов, внесением фотографий в компьютерную базу данных [Колотий А.Д., Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б. и др., 2016].

Кариотип пациента, изученный с помощью молекулярно-цитогенетического метода FISH, записывают согласно правилам Международной системы номенклатуры хромосом человека (ISCN) с указанием вида использованной для диагностики ДНК-пробы.

Примеры записи кариотипов.

Пример 1. 47,XY,+mar.ish inv dup(18)(p10)(wcp18+)

Запись означает: в результате стандартного цитогенетического анализа в мужском кариотипе установлено общее число хромосом, равное 47, в т. ч. обнаружена добавочная маркерная хромосома. Запись этой информации ограничена точкой. Далее без интервала следует аббревиатура ish, означающая «*in situ hybridization*», и после интервала записаны результаты молекулярно-цитогенетических исследований: маркерной является хромосома, образованная посредством инвертированной дупликации короткого плеча хромосомы 18 вокруг точки центromеры 18p10.

Пример 2. Правила записи кариотипа в случаях обнаружения или отсутствия микроделеции критического локуса в 7-й, 15-й и 22-й хромосомах

Микроделеция есть:

46,XX.ish del(7)(q11.23q11.23)(ELN-, LIMKI-, D7S613-)

46,XY.ish del(15)(q11.2q11.2)(SNRPN-)

46,XX.ish del(22)(q11.2q11.2)(TUPLE-)

Микроделеции нет:

46,XX.ish 7q11.23(ELN × 2, LIMKI × 2, D7S613 × 2)

46,XY.ish 15q11 ~ë13(D15S10 × 2)

46,XY.ish 22q11.2(N25 × 2).

По завершении анализа оформляется заключение о результатах молекулярно-цитогенетической диагностики.

Разновидности FISH-метода

Spectral karyotyping (SKY) — разновидность FISH-метода, в котором все пары хромосом одновременно окрашиваются разными флуорохромами и визуализируются в разных цветах при одной гибридизации. Методом SKY определяют уникальный спектральный профиль каждой хромосомы, генерируемый конкретными комбинациями различных флуорохромов (рис. 11.21).

Multiplex *in situ* hybridization (M-FISH) — мультиплексная гибридизация *in situ* является 24-цветным методом кариотипирования. Он позволяет проводить анализ сложных межхромосомных перестроек.

Основные этапы процесса M-FISH:

1. Множественная маркировка всех хромосом в геноме с конечным числом спектрально различных флуорохромов, так что каждая гомологичная пара хромосом однозначно помечена.
2. Микроскопическая визуализация и цифровое получение каждого флуорохрома с использованием конкретных наборов однополосных фильтров и специального программного обеспечения M-FISH. Полученные изображения затем накладываются друг на друга, что позволяет классифицировать отдельные хромосомы на основе фторсодержащей композиции в соответствии с комбинационной схемой маркировки используемого коктейля зондов M-FISH.
3. Обработка записанной информации, связанной с разделением сигнала и фона, а также с количественной оценкой сигнала. Осуществляется с помощью специального программного обеспечения, которое переводит информацию об уровне сигналов флуорохромов в каждой точке изображения в псевдоцвета. Основными ограничениями для использования ДНК-зондов являются число доступных флуорохромов с неперекрывающимися спектрами возбуждения и эмиссии и наличие соответствующих комплектов фильтров.

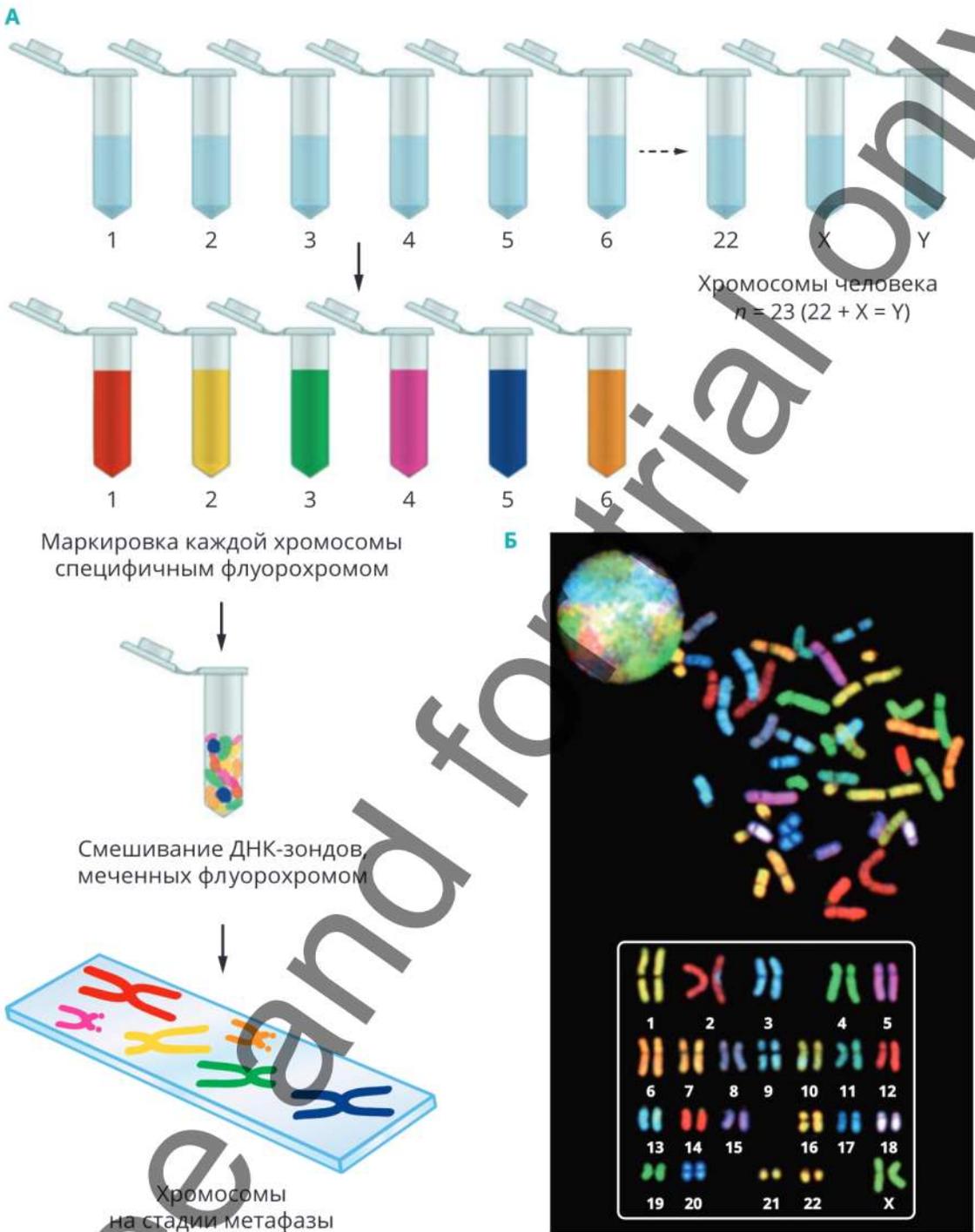
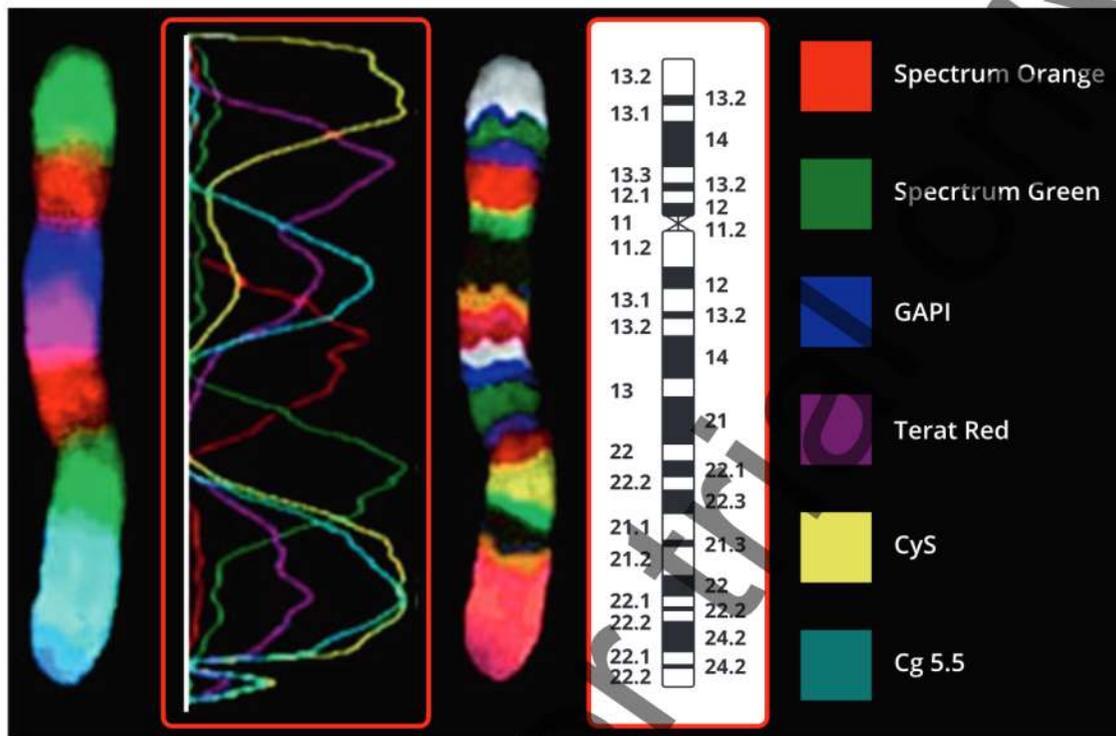


Рис. 11.21. Мечение флуорохромами (А) и результат окрашивания при спектральном кариотипировании (SKY FISH) и мультиплексной гибридизации (M-FISH) *in situ*:

А — схема мечения флуорохромами; Б — фото метафазного и интерфазного ядра, кариограмма*

Цит. по O'Connor C. Fluorescence in situ hybridization (FISH). Nature Education. 2008; 1(1):171.
E-pub: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/fluorescence-in-situ-hybridization-fish-327>

А



Б

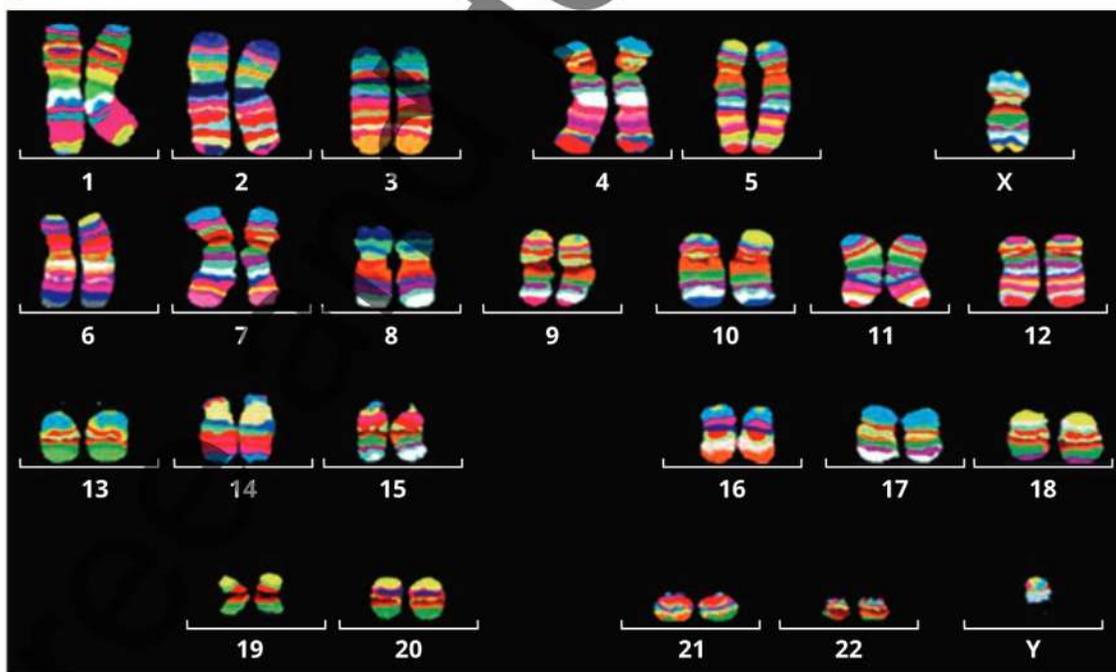


Рис. 11.22. Метод многоцветного бэндинга хромосом*:

А — многоцветный бэндинг пятой хромосомы человека; Б — кариограмма мужского кариотипа

Combined Binary Ratio-FISH (COBRA-FISH) — это многоцветная методология FISH, которая позволяет распознавать все хромосомные плечи. Она также позволяет картировать сайт геной и вирусной интеграции в контексте окраски плеч хромосом.

MultiColor Banding (MCB) — метод многоцветного бэндинга хромосом (см. рис. 11.22). Данный метод предназначен не для полного анализа всех хромосом, а для проведения детального анализа отдельной хромосомы. Локус-специфичные ДНК-зонды метят различными флуорохромами или комбинациями флуорохромов так, что уровень сигнала каждого из ДНК-зондов варьирует по интенсивности. Перекрытие профилей интенсивности сигналов ДНК-зондов обеспечивает вариации соотношений интенсивностей флуоресценций различных флуорохромов вдоль хромосомы. Отношения интенсивностей могут быть переведены в псевдоцвета, и, таким образом, каждой точке изображения, а следовательно, каждому из хромосомных локусов, будет соответствовать свой псевдоцвет. Данный вариант многоцветного FISH-метода оказался высокоэффективным при анализе не только межхромосомных, но и внутрихромосомных перестроек при онкологических заболеваниях. Однако для его успешного применения необходимо предварительно определить хромосому, которая будет исследована. Таким образом, данный метод молекулярной цитогенетики подходит для анализа нарушений кариотипа, ассоциированных с определенными хромосомами.

Мутации, выявляемые FISH-методом

При анализе метафазных хромосом можно определять геномные и хромосомные мутации. Однако наиболее часто этот метод используют при выявлении транслокаций и других aberrаций стабильного типа (рис. 11.23).

При анализе интерфазных хромосом определяют в основном генные/точечные мутации, например, в опухолевой и нормальной ткани (см. рис. 11.24). Также мутации в ДНК сперматозоидов возможно выявлять FISH-анализом интерфазных ядер (см. рис. 11.25).

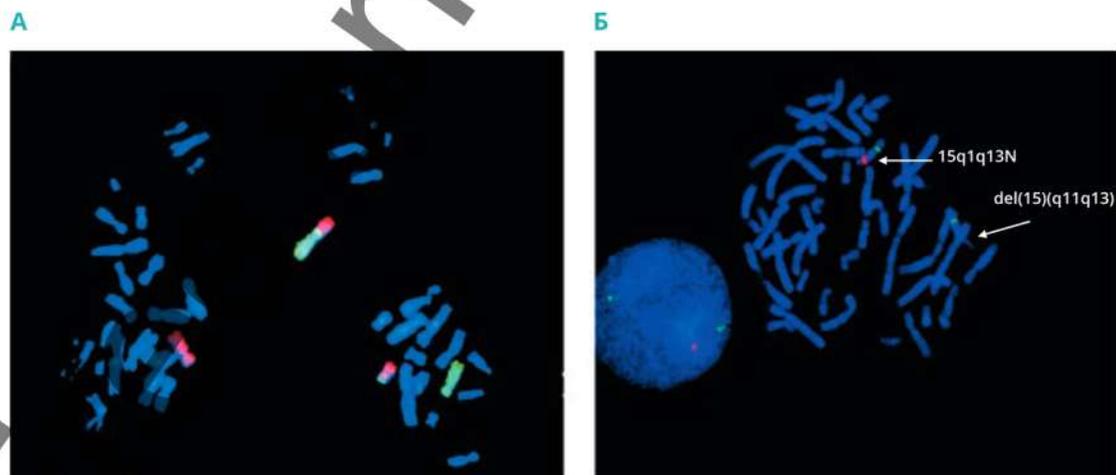


Рис. 11.23. Метафазное FISH-исследование (фото):

А — реципрокная транслокация (10;12)(q21.2;p13.2); Б — микроделеция при синдроме Прадера—Вилли: 46,XX,del(15)(q11q13);del(15)(q1q13N)

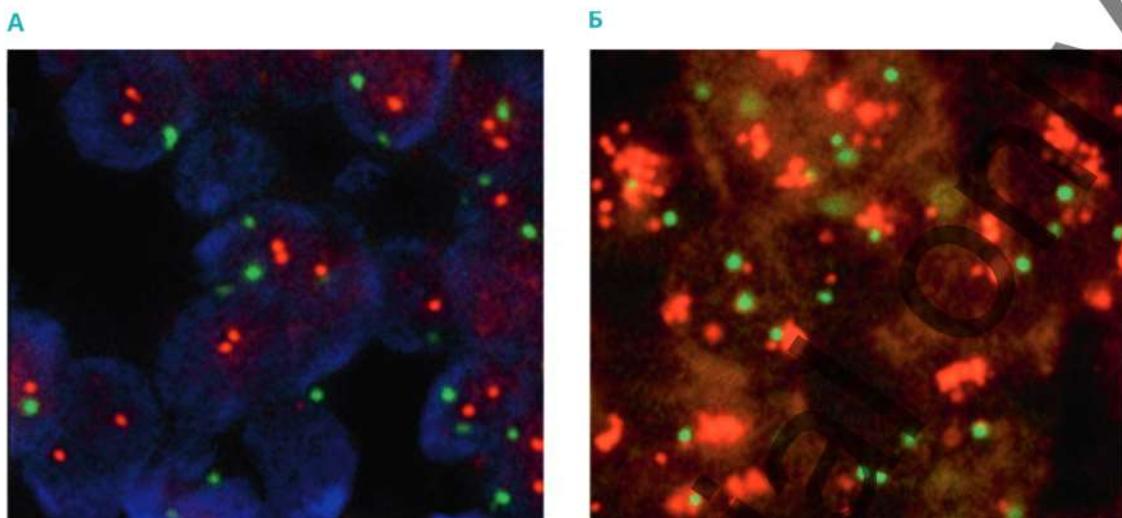


Рис. 11.24. Амплификация гена *Her-2/neu* в хромосоме (17q12–q21) в интерфазных ядрах при FISH-анализе (фото):

А — нормальная ткань; **Б** — опухолевая ткань

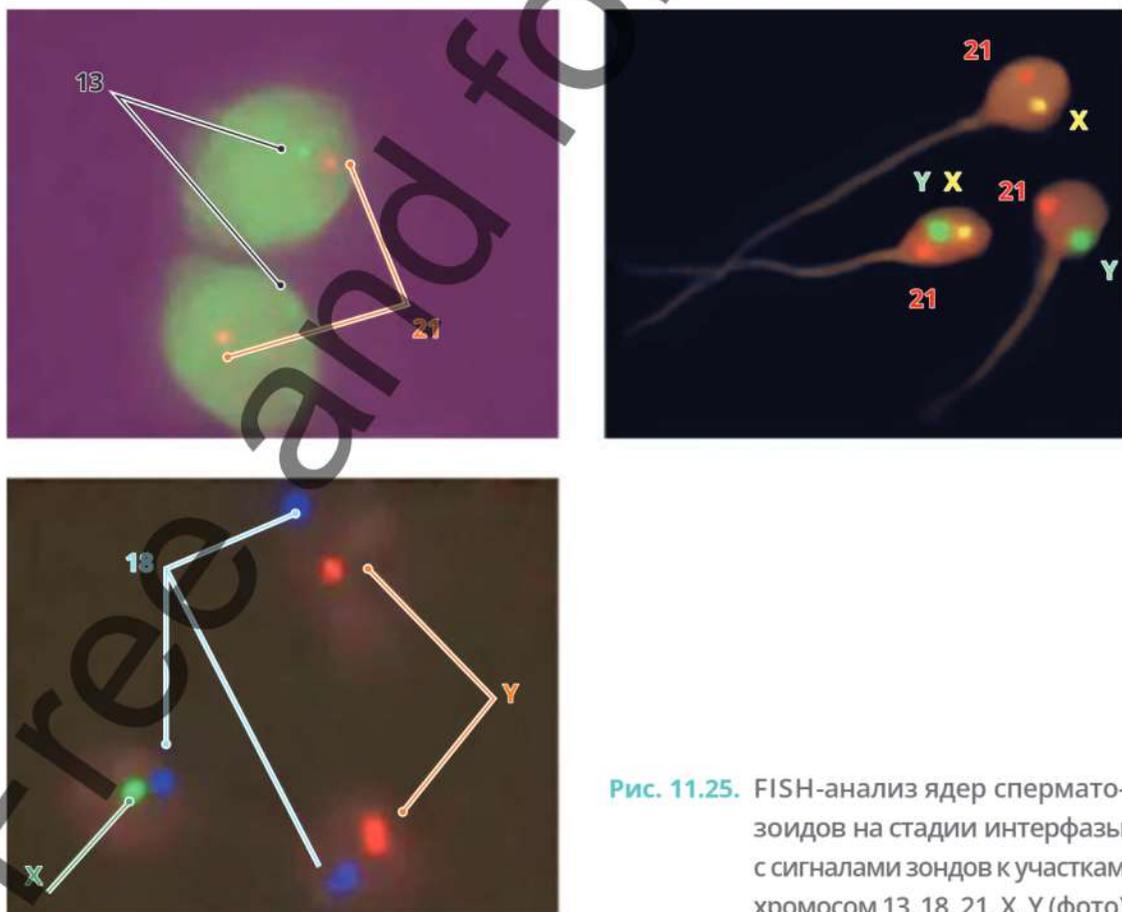


Рис. 11.25. FISH-анализ ядер сперматозоидов на стадии интерфазы с сигналами зондов к участкам хромосом 13, 18, 21, X, Y (фото)

Ограничение применения FISH-метода

FISH является таргетным методом и позволяет оценить в основном только количество копий определенных хромосом или их районов. Небольшого числа флуорохромов недостаточно для выявления внутривхромосомных aberrаций в пределах одного цветового бэнда или в немеченых участках.

11.1.5.2. Сравнительная геномная гибридизация

Технология CGH объединила стандартную цитогенетическую методику карiotипирования и FISH-анализ. CGH была создана для выявления количественных нарушений в геноме (дупликации или делеции) и основана на проведении реакции гибридизации *in situ* с использованием в качестве ДНК-зонда всего генома [Lee K. Y., Shin E., 2017; Yokoyama-Rebollar E. et al., 2015; Grygalewicz B. et al., 2016].

Метод CGH позволяет диагностировать микроделеционные и микродупликационные aberrации, анеуплоидии во всех хромосомах человека (см. рис. 11.26).

CGH имеет ряд преимуществ для диагностики геномного дисбаланса, к которым относятся:

- проведение скрининга всего генома в одной реакции гибридизации;
- возможность выполнить анализ при использовании даже малого количества материала, из которого можно выделить ДНК;
- не требуется приготовления хромосомного препарата пациента для проведения реакции гибридизации, что позволяет избежать появления артефактов, связанных с процессом культивирования клеток.

Ограничение применения CGH-метода

CGH-технология позволяет выявлять только геномный дисбаланс в виде делеции или дупликации, однако не дает информацию о происхождении этого дисбаланса. Более того, все структурные перестройки, не изменяющие количество хромосомного материала в геноме, останутся не диагностируемыми (например, выявление сбалансированных транслокаций, инверсий или инсерций). Еще одним недостатком метода является отсутствие возможности выявления полиплоидии, т. к. при проведении CGH используются эквивалентные количества опытной и референсной ДНК [Zitzelsberger H. et al., 1997].

Сравнительная геномная гибридизация имеет три разновидности:

- 1) метафазную;
- 2) высокого разрешения;
- 3) микроматричную.

Метафазная сравнительная геномная гибридизация

Технология метафазной сравнительной геномной гибридизации (*Metaphase Comparative Genomic Hybridization, mCGH*) основана на сравнении тестируемой и контрольной ДНК, меченных разными флуорохромами, которые смешиваются в соотношении 1 : 1 и гибридизуются на метафазных хромосомах человека с нормальным карiotипом (см. рис. 11.27). Контрольная ДНК иначе называется *референсной*, полученной от лица с нормальным карiotипом. Тестируемую или опытную ДНК получают от пациента.

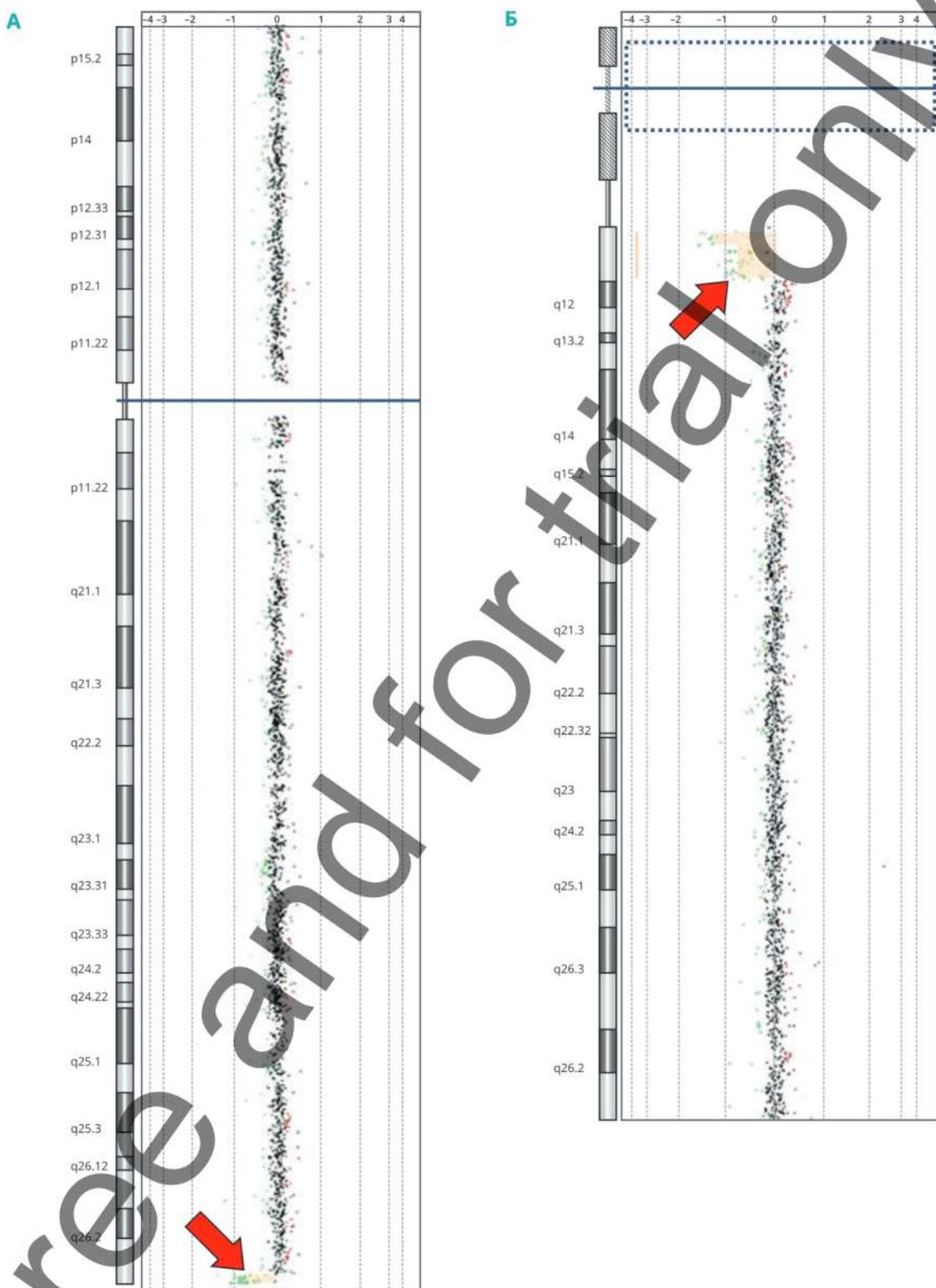


Рис. 11.26. Результаты анализа сравнительной геномной гибридизации пробанда (III-1) с мутацией (45,XX,der(10)tr(10;15)(q26,3;q11,2) (стрелками показаны мутации) (цит. по [Yokoyama-Rebollar E. et al., 2015]):

А — хромосома 15; Б — хромосома 10

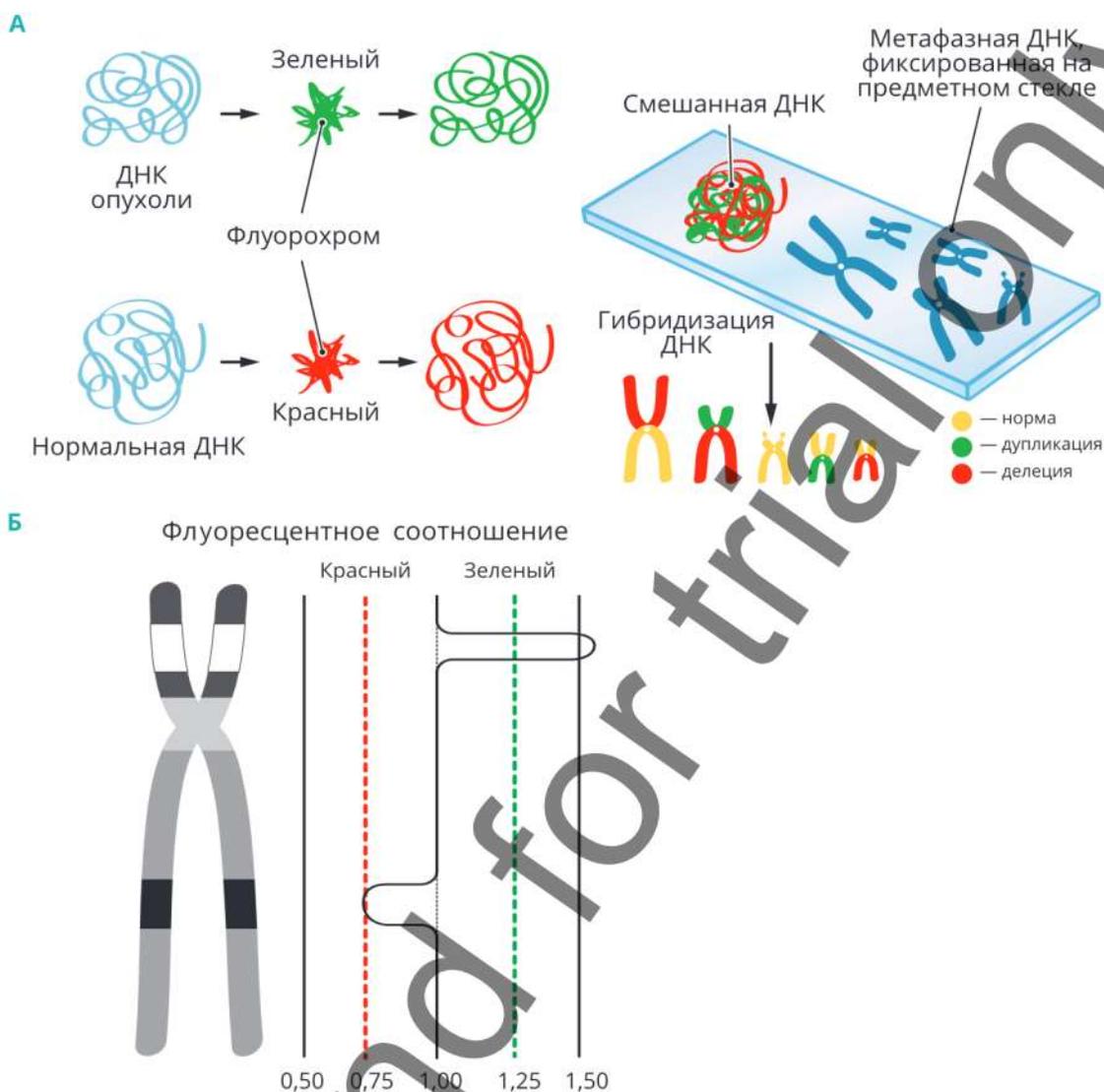


Рис. 11.27. Схема этапов метафазной сравнительной геномной гибридизации (А) и детекция результатов (Б)

Обычно опытная и референсная ДНК метятся в реакции *ник*-трансляции флуорохромами, имеющими зеленое (например, FITC) и красное (например, Texas Red) свечение.

Анализ проводится при использовании специальной компьютерной программы обработки цифрового изображения (см. рис. 11.28). Программа оценивает соотношение интенсивностей флуоресцентных сигналов (красный/зеленый) по средней оси хромосомы, что графически отображается в виде *профиля гибридизации* для каждой пары хромосом (табл. 11.12).

Разрешающая способность метафазной CGH достаточно низкая — 10–12 млн п. н. и более, что не позволяет использовать ее для выявления хромосомных перестроек меньшего размера.

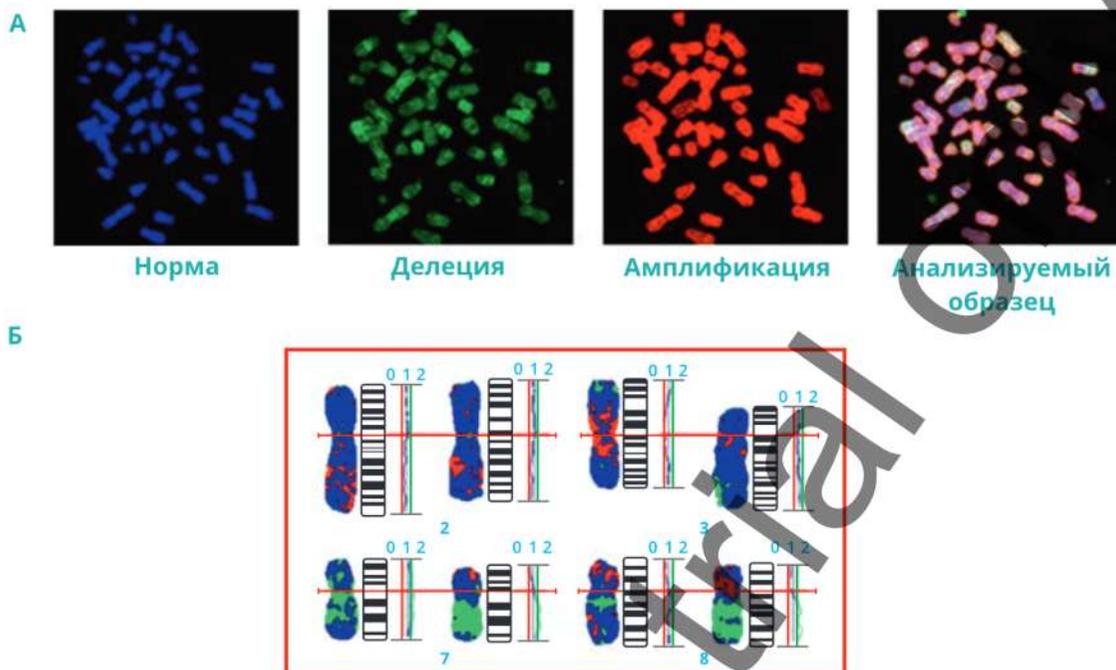


Рис. 11.28. Детекция результатов метафазной сравнительной геномной гибридизации (А, фото) и сравнительные характеристики хромосом 2, 3, 7 и 8 человека в компьютерной обработке (Б)

Таблица 11.12. Показатели соотношения флуоресцентных сигналов вдоль хромосомы при анализе результатов метафазной сравнительной геномной гибридизации

Дисбаланс	Отклонение профиля гибридизации	Соотношение интенсивности флуоресцентных сигналов вдоль всей хромосомы
Нет численного нарушения	Нет	1,0
Делеция	Есть	< 0,5
Дупликация		> 1,5
При наличии 50 % мозаичного клона клеток	Есть	Отклонение будет
Моносомия		0,75
Трисомия		1,25

Сравнительная геномная гибридизация высокого разрешения

Перспективным направлением молекулярной цитогенетики стало развитие и усовершенствование метода CGH, связанное с увеличением его разрешающей способности. Был разработан метод CGH высокого разрешения (*High-Resolution Comparative Genomic Hybridization, HR-CGH*), где для оценки отклонения профиля гибридизации использовали динамические стандартные референсные интервалы, индивидуальные для каждой

хромосомы (рис. 11.29). Эти интервалы были построены при анализе результатов 16 гибридизаций с использованием меченых образцов ДНК, полученных от разных индивидов с нормальным кариотипом (гибридизация «норма на норму»). Обязательным условием является то, что интервалы должны быть построены строго в той лаборатории, в которой они будут использоваться. Таким образом, на базе средних статистических профилей гибридизации формируется модель для диагностики хромосомного дисбаланса, где анализируемый профиль гибридизации (или его доверительный интервал) сравнивается с контрольным. Район, где эти интервалы не перекрываются, считается aberrантным.

Современное программное обеспечение предусматривает опцию HR-CGH. Для ее активации необходимо получить базу данных собственных контрольных профилей гибридизации. На основе этой базы автоматически формируются стандартные референсные интервалы, необходимые для анализа высокого разрешения.

Микроматричная сравнительная геномная гибридизация

Технология микроматричной сравнительной геномной гибридизации (*Array Comparative Genomic Hybridization, aCGH*) позволяет проводить полногеномную идентификацию aberrаций хромосом без необходимости культивирования материала и приготовления из него цитогенетических препаратов. При aCGH была проведена замена метафазных хромосом в препарате на большое количество клонов, нанесенных на стекло-микроматрицу. Этот способ значительно повысил разрешающую способность метода для скрининга геномного дисбаланса.

Разрешающая способность метода зависит от дизайна биочипа, т. е. от размера клонов и плотности фрагментов ДНК на микроматрице. Полногеномные CGH-чипы (*whole genome array*) представлены клонами ДНК-последовательностей, равномерно распределенных по всему геному. Также существуют и так называемые таргетные матрицы (*targeted array*), сконструированные с использованием клонов, соответствующих специфичным районам, наиболее часто вовлеченных в хромосомные перестройки.

Тем не менее при использовании этого метода существуют определенные сложности, связанные именно с его высоким разрешением. Интерпретация результатов aCGH достаточно проблематична в связи с явлением полиморфизма по числу копий крупных блоков хромосом (*Copy Number Variations, CNVs*) [Webber C. et al., 2009]. В этом случае любые два индивидуальных генома отличаются более чем на тысячу CNVs размером от 500 п. н. до 2 млн п. н.

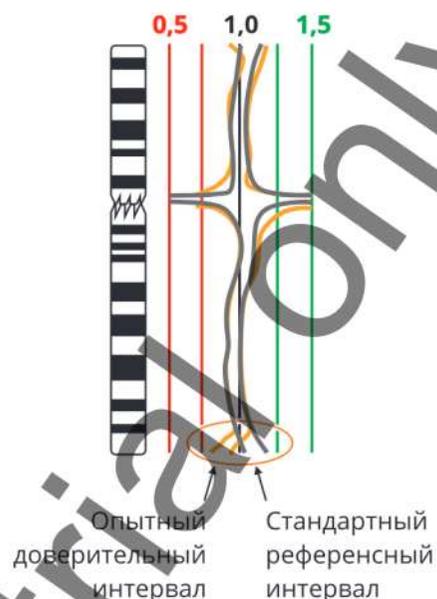


Рис. 11.29. Принцип диагностики aberrации при анализе интервалов для метафазной сравнительной геномной гибридизации высокого разрешения

11.1.6. Автоматические станции

Цифровая микроскопия — это новейшее направление современной микроскопии. Она базируется на анализе изображений, получаемых с помощью цифровых комплексов. Автоматизированные системы анализа изображения были внедрены для сокращения времени анализа кариотипа, а результаты анализа были важны для клинической цитогенетики. Создание этих систем облегчило работу специалистов-цитогенетиков и позволило выдавать результаты пациентам в более короткие сроки [Huber R. et al., 1995; Urbankova H. et al., 2014; Schumann M. et al., 2016; Rogan P. K. et al., 2016; Krutzke S. K. et al., 2016; M'kacher R. et al., 2014, 2015].

Десятилетия назад первые системы имели только предметный стол микроскопа, который перемещался автоматически, и камеру для съемки метафаз в течение ночи, а анализ проводился на следующий день. В первых системах анализа изображений от пользователя требовалось «вырезать» хромосомы и с помощью мыши помещать их в кадр для составления кариограммы. Эти системы состояли из микроскопа, подключенного к компьютеру и принтеру. Стандартные методы автоматического кариотипирования основаны на цветовом режиме изображения — сером, который используется для определения таких хромосомных признаков, как длина, структура полос и положение центромеры хромосомы. Система сканирует метафазы и интерфазные ядра, используя разные контрастные методы и увеличение, и находит целевые объекты. Программное обеспечение этих систем поддерживает захват изображений как со всего экрана, так и с отдельной его части, выстраивает кариограмму и проводит подсчет хромосом. Программные средства, встроенные в такие системы, всегда используют последнюю версию ISCN. Однако некоторые метафазы содержат перекрывающиеся хромосомы, и программное обеспечение анализа изображений их не идентифицирует. В таких случаях пользователь вручную, с помощью мыши, разделяет изображения хромосом и сам создает точную кариограмму.

Автоматическая обработка изображений экономит время, применение четко определенных стандартов и устранение ошибок счетчика увеличивают воспроизводимость результата. Поскольку такие системы подключены к компьютеру, существуют также прямой неограниченный доступ ко всем данным пациента, удобное отображение результатов и полный контроль всех параметров оценки. При работе с флуоресцентным микроскопом получаемые результаты, если не используются специальные программы захвата и анализа изображений, достаточно субъективны и могут привести к возникновению ошибки. Кроме того, анализ под флуоресцентным микроскопом не позволяет выделить необходимый сигнал, подкорректировать его, убрать фоновый шум. Освещено бывает не только поле зрения под объективом, но и весь препарат, поэтому выжигаются сигналы по всему препарату.

Использование цифровых сканеров дает огромный ряд преимуществ. Цифровой микроскоп — это единый модуль, в котором элементы комплекса подбираются по совместимости оптических свойств. Принцип сканирования позволяет в первую очередь получить полноценное изображение, затем создать цифровую копию, которую можно многократно увеличивать, просматривая отдельные фрагменты в высоком качестве.

Оно максимально приближено к тому, которое традиционно получают с помощью обычного микроскопа. В результате пользователь может создать архив исследуемых изображений. Микроскопические образцы отличаются друг от друга, и поэтому автоматизация анализа требует гибкости. Многие из таких систем могут переключать анализ с одного метода на другой, после чего открывается соответствующая программа для анализа данных. Программное обеспечение и аппаратные средства являются модульными, и это позволяет разработать конкретные характеристики анализа изображений, запрашиваемых пользователем. Поскольку FISH применяется в онкологии и онкогематологии, в пренатальной и постнатальной диагностике, анализ флуоресцентных изображений имеет большое значение. При многоцветовом FISH-методе каждая хромосома имеет разную комбинацию цветов, обычно используется пять флуорохромов. В связи с тем, что человеческий глаз не способен распознать все комбинации цветов используемых в настоящее время флуорохромов, было разработано программное обеспечение, которое может анализировать изображение на разных цветовых каналах. Однако в основном из-за наложения хромосом общая точность составляет 82,4 %, а время, требуемое для классификации, — 36,4 с. Для лучшего углубленного анализа с помощью программного обеспечения можно изменять цвета, смешивать, применять и инвертировать шкалу серого и т. д. Пробы FISH можно анализировать автоматически по интенсивности. Каждый зонд состоит из частично перекрывающихся хромосомных цветовых маркеров. Изменение коэффициентов интенсивности флуоресценции вдоль хромосом используется в программном обеспечении для назначения различных псевдоцветов отдельным регионам хромосомы. В результате можно идентифицировать и локализовать также и внутривитрихромосомные аберрации.

Хромосом-специфичные (центромерные) зонды (Chromosome Enumeration Probe, CEP) могут применяться либо в том же цветовом канале, что и теломерные зонды, либо с другим флуорохромом. ДНК-зонды к теломерным участкам хромосом (Telomeric Probe, TEL) используются для выявления перестроек, затрагивающих концевые участки плеч хромосом и для количественного определения теломерной ДНК в опухолевых образцах. Результаты измерения теломерных областей автоматически сохраняются в текстовых файлах. Данные могут отображаться на экране либо в виде таблицы, либо в виде графика и суммируются для всех проанализированных кариограмм. Кроме того, при удаленном обзоре анализа можно оптимизировать рабочее время специалистов.

На сегодняшний день применяются автоматические станции для анализа хромосом (см. рис. 11.30). Сканирующая станция Leica CytoVision (Leica Microsystems, Германия) включает:

- полностью автоматизированный микроскоп Leica;
- дозатор иммерсионного масла;
- монохромную цифровую камеру;
- управляющую станцию на базе ПК с программным обеспечением CytoVision;
- автоматический загрузчик препаратов (позволяет выполнить полностью автоматическое сканирование каждого препарата: во время сканирования все изображения сохраняются в базе данных и сразу доступны для кариотипирования или анализа флуоресценции).



Рис. 11.30. Станция Leica CytoVision — система получения и анализа изображений для цитогенетических исследований*

Программное обеспечение CytoVision имеет модульную структуру и позволяет проводить:

- кариотипирование хромосом человека;
- FISH: на **метафазных хромосомах**;
- FISH: на **интерфазных ядрах**;
- FISH: на срезах;
- CGH и многоцветную FISH.

11.1.7. Сравнительная характеристика методов классической и молекулярной цитогенетики

Описанные ранее методы классической и молекулярной цитогенетики и их модификации имеют ряд достоинств и недостатков (табл. 11.13). Применение этих методов в лабораторной диагностике зависит от поставленных целей и задач врача или исследователя.

Таблица 11.13. Характеристики методов классической и молекулярной цитогенетики

Метод окрашивания хромосом	Преимущество	Недостаток
Монохромная окраска	<ul style="list-style-type: none"> • Кариотипирование хромосом по размеру. • Возможность более четко определять радиационно-индуцированные aberrации хромосом (<i>dic, ring</i>) 	Невозможность кариотипирования всех хромосом
Дифференциальная окраска	Картирование всего хромосомного набора	Низкое разрешение (до 4–10 Мб)
Флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i> (FISH)	<ul style="list-style-type: none"> • Определение <i>уникальных последовательностей ДНК</i>. • Визуализация <i>целых хромосом</i>. • Визуализация <i>всего генома</i>. • Визуализация <i>необходимого участка на стадии интерфазы</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Ограниченное число флуорохромов. • Невозможность выявления <i>внутрихромосомных aberrаций</i> в пределах одного цветового бэнда или в немеченых участках
Сравнительная геномная гибридизация (CGH)	<ul style="list-style-type: none"> • Скрининг <i>всего генома</i>. • Количественное определение <i>уникальных последовательностей ДНК</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Разрешение от 0,2 тыс. п. н. • Невозможность детекции <i>сбалансированных перестроек</i>. • Ограниченная возможность детекции <i>полиплоидии и мозаицизма</i>

11.2. Молекулярно-генетические методы

Молекулярная генетика стала активно развиваться в конце XX в. Она успешно решает ряд важных задач в биологии, теоретической и практической медицине.

В клинической диагностике методы молекулярной генетики дают возможность определить: генные мутации в молекуле ДНК, полиморфизм и уровень экспрессии генов, метилирование ДНК или метилирование/ацетилирование гистоновых белков, вирусную нагрузку и др.

Методов молекулярной генетики довольно много. На основе определенных технологий для решения различных задач появляются модификации уже известных методов. Однако в клинической практике используются только хорошо отлаженные методы молекулярной диагностики. К ним в основном относятся:

- полимеразная цепная реакция;

- секвенирование ДНК по Сэнгеру — прочтение нуклеотидной последовательности определенной длины;
- секвенирование нового поколения (полногеномное и массовое параллельное секвенирование).

Перечисленные технологии будут рассмотрены далее.

11.2.1. Выделение нуклеиновых кислот

Для того чтобы провести молекулярную диагностику, необходимо выделить нуклеиновую кислоту (ДНК, РНК или ДНК/РНК). Это наиболее важный этап молекулярно-генетического исследования. От качества его выполнения зависит успех всех последующих его этапов и конечный результат. Неправильный выбор метода выделения ДНК, РНК или его неверное осуществление могут привести либо к получению загрязненной ДНК/РНК, непригодной для исследования, либо вообще к потере этих молекул.

Существует большое количество методов для выделения нуклеиновых кислот. Они предназначены для решения различных задач. Их применение зависит от субстрата, из которого должны быть выделены эти молекулы, полноты извлечения из этого субстрата, степени очистки итогового препарата ДНК или РНК, характеристики выделяемых молекул (размер, плазмидная или геномная и т. д.).

В молекулярно-генетических лабораториях ДНК или РНК выделяют из любой биологической жидкости (кровь, моча, слизь, слюна, сперма) или ткани (кожного покрова или внутренних органов). В судебно-медицинской экспертизе прибегают к забору образца практически из любых предметов, с чем могла соприкоснуться слюна, кровь, сперма и т. д.

Забор биоматериала проводят в стерильных условиях. Субстрат помещают в стерильную пробирку с необходимым реагентом. Например, кровь собирают в пробирку с этилендиаминтетрауксусной кислотой (*Ethylenediaminetetraacetic acid*). Если нужна транспортировка, то ее проводят в специальных боксах, где выдерживается низкая температура.

Весь процесс экстракции ДНК состоит из цепочки последовательных, связанных друг с другом этапов, проводится в специализированных ламинарных боксах с обязательным соблюдением стерильности. Лабораторный пластик является одноразовым; использованные инструменты и биоматериал впоследствии специально утилизируются.

Методов выделения ДНК существует множество. Экстракция в них проводится:

- под действием органических растворителей;
- с помощью гель-фильтрации;
- с помощью магнитных частиц;
- на бумажных фильтрах;
- с помощью ионообменных смол.

Это далеко не полный перечень доступных на сегодня методов выделения ДНК. Выбор способа экстракции зависит от вида и степени очистки исследуемого образца, от поставленной задачи и времени, планируемого для ее выполнения. В табл. 11.14 описан пример выделения из крови тотальной ДНК, представленной на сайте компании Genotek.

Таблица 11.14. Этапы выделения тотальной ДНК*

Этап	Описание
1. Разрушение мембраны клеток и клеточных ядер, чтобы все содержимое клетки (ДНК, белки, липиды и сахара) вышло в раствор. Если это ткани, то изначально необходимо механическое измельчение субстрата	Используется лизисный буфер с детергентом додецилсульфата натрия (Sodium dodecyl sulfate, SDS) для слюны или тиоцианатом гуанидина для крови. Детергент разрушает мембраны, а буферный компонент раствора поддерживает pH на оптимальном для ДНК уровне
2. Избавление от белков ДНК, вышедших в раствор, и инактивирование ферментов — ДНКаз	За разрушение клеточных белков отвечает еще один компонент лизисного буфера — протеин К. Этот фермент получают из микроскопических грибов рода <i>Engyodontium album</i> . Буква К в названии указывает на способность расщеплять кератин — белок в составе ногтей и волос
3. Отделение ДНК от примесей	Раствор центрифугируется в пробирках с кремниевой мембраной, которая связывается с ДНК и пропускает остальные органические компоненты клетки. Центрифугирование многократно увеличивает скорость фильтрации. Мембрану со связанной ДНК несколько раз промывают спиртом (изопропанолом или этанолом)
4. Растворение ДНК в буфере	Связанную с мембраной ДНК отмывают буфером для элюции (процесс выведения в раствор адсорбированного вещества)
5. Хранение ДНК	Растворенная в буфере ДНК может храниться при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение нескольких лет

Выделение РНК имеет некоторое сходство с выделением ДНК. Но есть и отличия. Приводим пример выделения высокоочищенной тотальной РНК из малого количества крови на спин-колонках — фильтрационных устройствах для разделения органических соединений (см. табл. 11.15).

* Цит. по материалам сайта: <https://medium.com/genotek/>

Таблица 11.15. Этапы выделения тотальной РНК*

Этап	Описание
1. Подготовка пробы, лизирование клеток	<ul style="list-style-type: none"> • Поместить 100 мкл крови в микроцентрифужную пробирку. • Добавить 500 мкл лизирующего буфера. • Перемешать на вортексе в течение 20 с
2. Загрузка колонок	<ul style="list-style-type: none"> • Добавление изопропанола. • Перемешать на вортексе. • Переместить смесь в спин-колонку. • Центрифугировать 20 с при максимальном ускорении 10 000 g. • Удалить отфильтрованную жидкость
3. Первичная отмывка	<ul style="list-style-type: none"> • Добавить в колонку отмывочный буфер. • Центрифугировать 30 с при ускорении 10 000 g. • Удалить отфильтрованную жидкость
4. Вторичная отмывка	<ul style="list-style-type: none"> • Добавить в колонку отмывочный буфер. • Центрифугировать 30 с при ускорении 10 000 g. • Удалить отфильтрованную жидкость. • Центрифугировать еще 2 мин при 10 000 g для удаления остатков этанола
5. Элюция РНК	<ul style="list-style-type: none"> • Поместить спин-колонку в чистую, свободную от ДНКаз/РНКаз микроцентрифужную пробирку. • Добавить элюционный буфер в центр мембраны колонки. • Инкубировать 1 мин при комнатной температуре. • Центрифугировать 1 мин при ускорении 10 000 g для извлечения ДНК в раствор
6. Хранение РНК	При -20 или -80 °C

На сегодняшний день во многих лабораториях и диагностических центрах выделение нуклеиновых кислот осуществляется с помощью *автоматических станций*. Возможность роботизации процесса выделения позволяет избежать значительного количества ошибок, связанных с человеческим фактором, сэкономить время на рутинных процедурах. Кроме того, показано, что при автоматической экстракции цикл выхода нуклеиновых кислот ниже, а воспроизводимость результатов выше, чем при ручном выделении.

11.2.2. Полимеразная цепная реакция

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) (*Polymerase chain reaction, PCR*) — молекулярно-биологический метод, позволяющий добиться колоссального (до 10¹² раз) увеличения числа копий (*амплификации*) определенного фрагмента ДНК *in vitro*.

Метод основан на многократном избирательном копировании определенного участка ДНК с помощью ферментов в искусственных условиях. При этом происходит копирование только того участка ДНК, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. Фактически ПЦР является искусственной многократной репликацией фрагмента ДНК.

Характеристика метода полимеразной цепной реакции

Метод ПЦР и процесс, проходящий в приборе (реакция амплификации), называются одинаково — *полимеразной цепной реакцией*.

Метод применяется в четыре этапа:

1. Выделение ДНК или РНК.
2. Приготовление реакционной смеси, добавление образцов ДНК или РНК.
3. Проведение ПЦР в амплификаторе.
4. Детекция результатов амплификации.

11.2.2.1. Компоненты реакционной смеси

Для проведения ПЦР необходимо наличие в реакционной смеси ряда компонентов: праймеров, полимеразы Tag, смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ), буфера, анализируемого образца ДНК, дополнительных компонентов.

1. **Праймеры** (*primer*) — искусственно синтезированные олигонуклеотиды, имеющие, как правило, размер от 15 до 30 нуклеотидов, идентичные соответствующим участкам ДНК-и или РНК-мишени. Они играют ключевую роль в образовании продуктов реакции амплификации.

Правильно подобранные праймеры должны отвечать ряду критериев:

- *быть специфичными.* Особое внимание уделяют 3'-концам праймеров, т. к. именно с них Taq-полимераза начинает достраивать комплементарную цепь ДНК. Если их специфичность недостаточна, то высока вероятность, что в пробирке с реакционной смесью будут происходить процессы неспецифического связывания и синтеза фрагментов различной длины, отличной от искомым. Часть праймеров и дНТФ расходуется на синтез неспецифической ДНК, что приводит к значительной потере чувствительности;
 - *не должны образовывать димеры и петли,* т. е. не должно образовываться устойчивых двойных цепей в результате отжига (комплементарного присоединения) праймеров самих на себя или друг с другом;
 - *область отжига праймеров должна находиться вне зон мутаций.* При попадании на такую зону отжиг праймеров не произойдет и, как следствие, будет получен ложноотрицательный результат.
2. **Taq-полимераза** — термостабильный фермент, обеспечивающий достраивание 3'-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности (*Thermus aquaticus* — грамотрицательная палочковидная экстремально термофильная бактерия, из которой выделяют фермент. Преимуществом данного фермента в отличие от ДНК-полимеразы является способность стабильно работать при повышенных температурах, оптимально — 72–80 °С).

3. **Смесь дНТФ** — «строительный материал», используемый Taq-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК:
 - дезоксиаденозинтрифосфат (дАТФ);
 - дезоксигуанозинтрифосфат (дГТФ);
 - дезоксицитозинтрифосфат (дЦТФ);
 - дезокситимидинтрифосфат (дТТФ).
4. **Буфер** — смесь катионов и анионов в определенной концентрации. Обеспечивает оптимальные условия для реакции, а также стабильное значение pH.
5. **Анализируемый образец ДНК** — подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, который может содержать искомую ДНК.
6. **Дополнительные компоненты.** Внутренние контроли, ДНК-зонды — искусственно синтезированные олигонуклеотиды небольшого размера (около 30 нуклеотидов), комплементарные специфическим ампликонам (продуктам реакции амплификации).

11.2.2.2. Циклический температурный режим в приборе

ПЦР проводится в амплификаторе (термоциклер) — прибор (рис. 11.31) обеспечивает периодическое охлаждение и нагревание пробирок (температурный режим), обычно с точностью не менее 0,1 °С. В нем проходит реакция амплификации — увеличение копий ДНК.

Каждый цикл амплификации проходит в три этапа (рис. 11.32):

1. **Денатурация** — переход ДНК из двунитовой формы в однонитевую при разрыве водородных связей между комплементарными парами оснований под воздействием высоких температур (94 °С).
2. **Отжиг** — присоединение праймеров к одноцепочечной ДНК-мишени. Праймеры подбирают так, чтобы они ограничивали искомый фрагмент и были комплементарны противоположным цепям ДНК. Отжиг происходит в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа. Если это условие не соблюдено, отжиг праймеров не происходит.
3. **Элонгация (синтез).** После отжига праймеров Taq-полимераза начинает достраивание второй цепи ДНК с 3'-конца праймера.



Рис. 11.31. ДНК-амплификатор, реакционный блок 1 × 96 × 0,2 мл/микропланшет, SimpliAmp (компания Thermo Fisher Scientific, США)

Температуру в реакционной смеси доводят до оптимума работы Taq-полимеразы, которая с максимальной эффективностью начинает синтез второй цепи ДНК от 3'-конца праймера, связанного с матрицей, и движется в направлении от 3'- к 5'-концу.

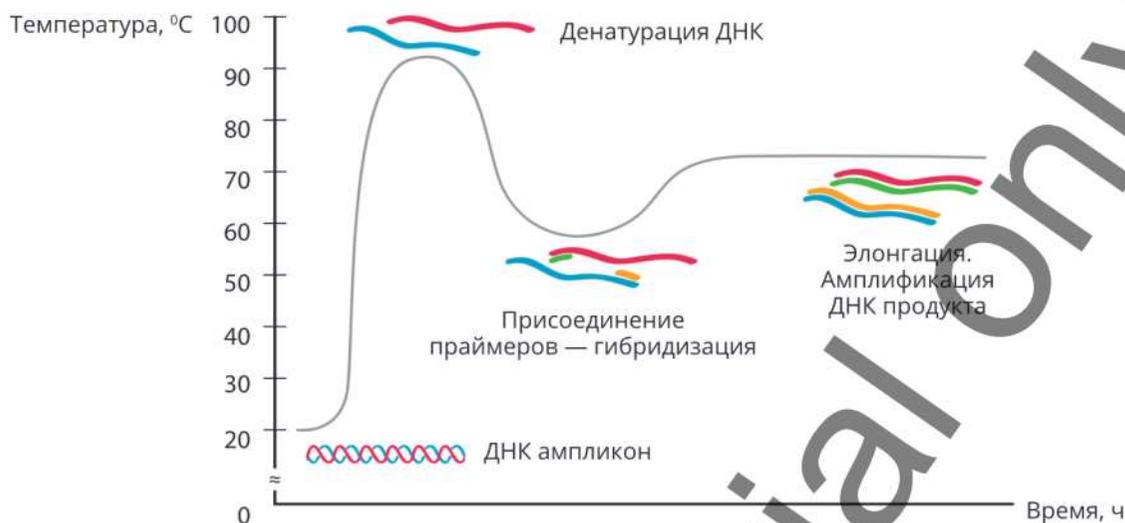


Рис. 11.32. Этапы полимеразной цепной реакции (время колеблется в зависимости от разных факторов и задач производителя)

Результатом циклического процесса является экспоненциальное увеличение количества специфического фрагмента ДНК (рис. 11.33), которое можно описать формулой:

$$A = M \times (2^n - n - 1) \sim 2^n,$$

где A — количество специфических (ограниченных праймерами) продуктов реакции амплификации; M — начальное количество ДНК-мишеней; n — число циклов амплификации.

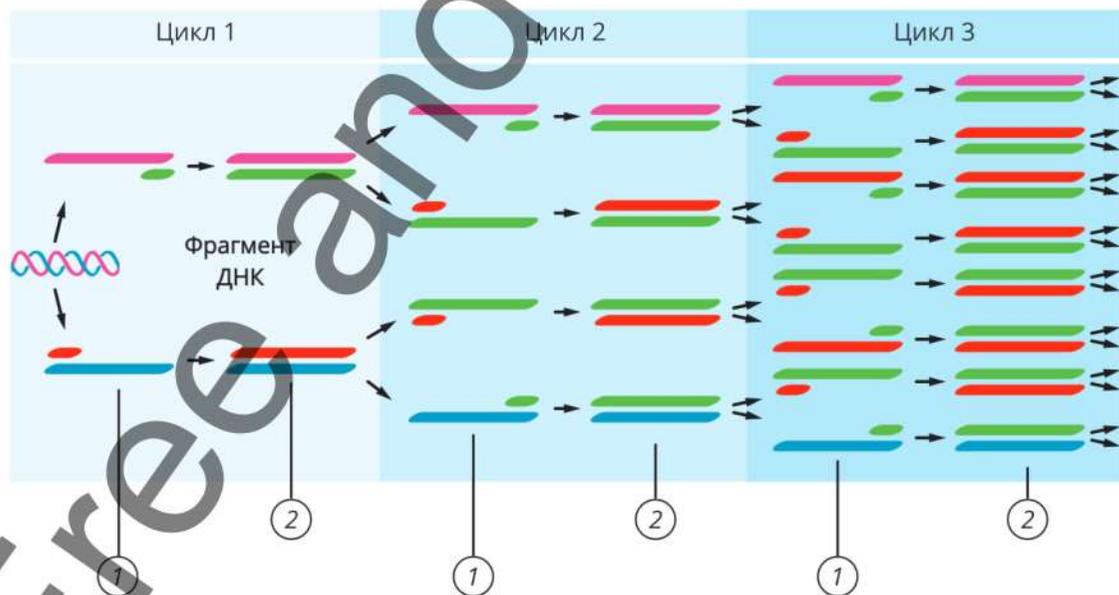


Рис. 11.33. Процесс амплификации необходимого участка ДНК при полимеразной цепной реакции:

1 — разделенные цепи ДНК и присоединившиеся праймеры; 2 — синтез ДНК

На сегодняшний день существует несколько основных способов детекции результатов амплификации ДНК, или иначе ПЦР. Основными из них являются *гель-электрофорез* и ПЦР в реальном времени (ПЦР РВ) (*Real-time PCR — RT PCR*).

11.2.2.3. Детекция результатов полимеразной цепной реакции в агарозном геле

Детекция результатов методом гель-электрофореза проходит в специальной камере, заполненной буферной смесью, где под воздействием электрического тока исследуемый участок ДНК, нанесенный в лунки с гелем (агарозного или полиакриломидного), разделяется на фрагменты (рис. 11.34). После этого гель перемещают на специальный прибор (*трансиллюминатор*) с ультрафиолетовой лампой. Там ДНК, меченная бромистым этидием, светится. По расположению светящихся полос, при сравнении с контрольными образцами, можно получить результат.

Существуют экспериментально разработанные *маркеры длин ДНК (DNA Ladder)* (рис. 11.35). Они необходимы при проведении гель-электрофореза для определения длины амплифицированной двухцепочечной молекулы ДНК. Маркеры длин ДНК состоят из фрагментов двухцепочечной ДНК строго определенной длины. Все фрагменты имеют «тупые концы». Маркеры могут быть также использованы для приблизительной оценки массы фрагмента ДНК в образце путем сравнения интенсивности полосы образца с полосой маркера той же длины.

Электрофоретическая детекция позволяет осуществлять только качественный анализ и сопряжена с рядом трудностей, например, с большими затратами времени на стадию детекции; сложностью и субъективностью трактовки результатов; высоким риском контаминации и большими затратами на ее устранение; невозможностью автоматизации.

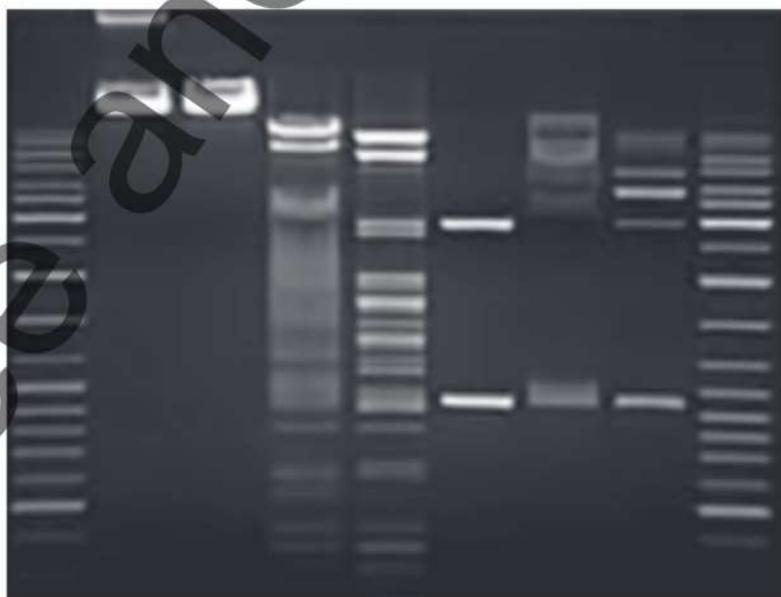


Рис. 11.34. Разделение молекул ДНК в агарозном геле (фото)

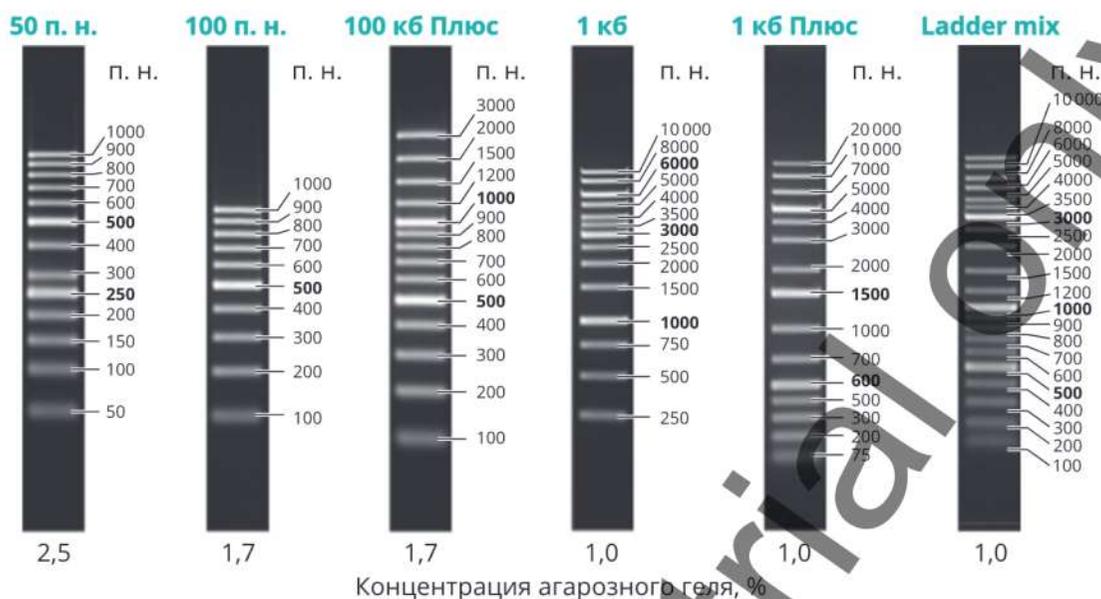


Рис 11.35. Характеристики маркеров длин ДНК

Определение размеров ДНК производят путем сравнения наборов коммерческих фрагментов ДНК известной длины («DNA ladder», «линейка», «маркеры ДНК») и ДНК в проверяемых образцах.

11.2.2.4. Полимеразно-цепная реакция в реальном времени

Полимеразно-цепная реакция в реальном времени (ПЦР РВ) является наиболее эффективным методом и позволяет реализовать возможность проведения как качественного, так и количественного анализа искомым участкам молекулы ДНК/РНК, увеличить эффективность реакции, снизить риск образования неспецифических продуктов, проводить анализ экспрессии генов [Ребриков Д. В. и др., 2019].

В реакционную смесь добавляют ДНК-зонды, в состав которых входят флуоресцентная метка в 5'-положении, гаситель флуоресценции в 3'-положении, а также фосфатная группа в 3'-положении. Эти зонды имеют места посадки внутри амплифицируемой области. Гаситель поглощает испускаемое флуоресцентной меткой излучение, а фосфатная группа в 3'-положении блокирует полимеразу.

В ходе ПЦР во время стадии отжига праймеров происходит присоединение ДНК-зонда к комплементарной цепи ДНК. Во время стадии элонгации полимеразы синтезирует комплементарную цепь ДНК и при достижении зонда начинает его расщеплять благодаря наличию 5'-экзонуклеазной активности.

Все результаты считываются на графических схемах, построенных программой компьютера (см. рис. 11.36).

11.2.2.5. Основные разновидности метода полимеразно-цепной реакции

Существует множество модификаций ПЦР, в которых сохраняется основной принцип этой технологии:

- Вложенная ПЦР (*Nested PCR*).

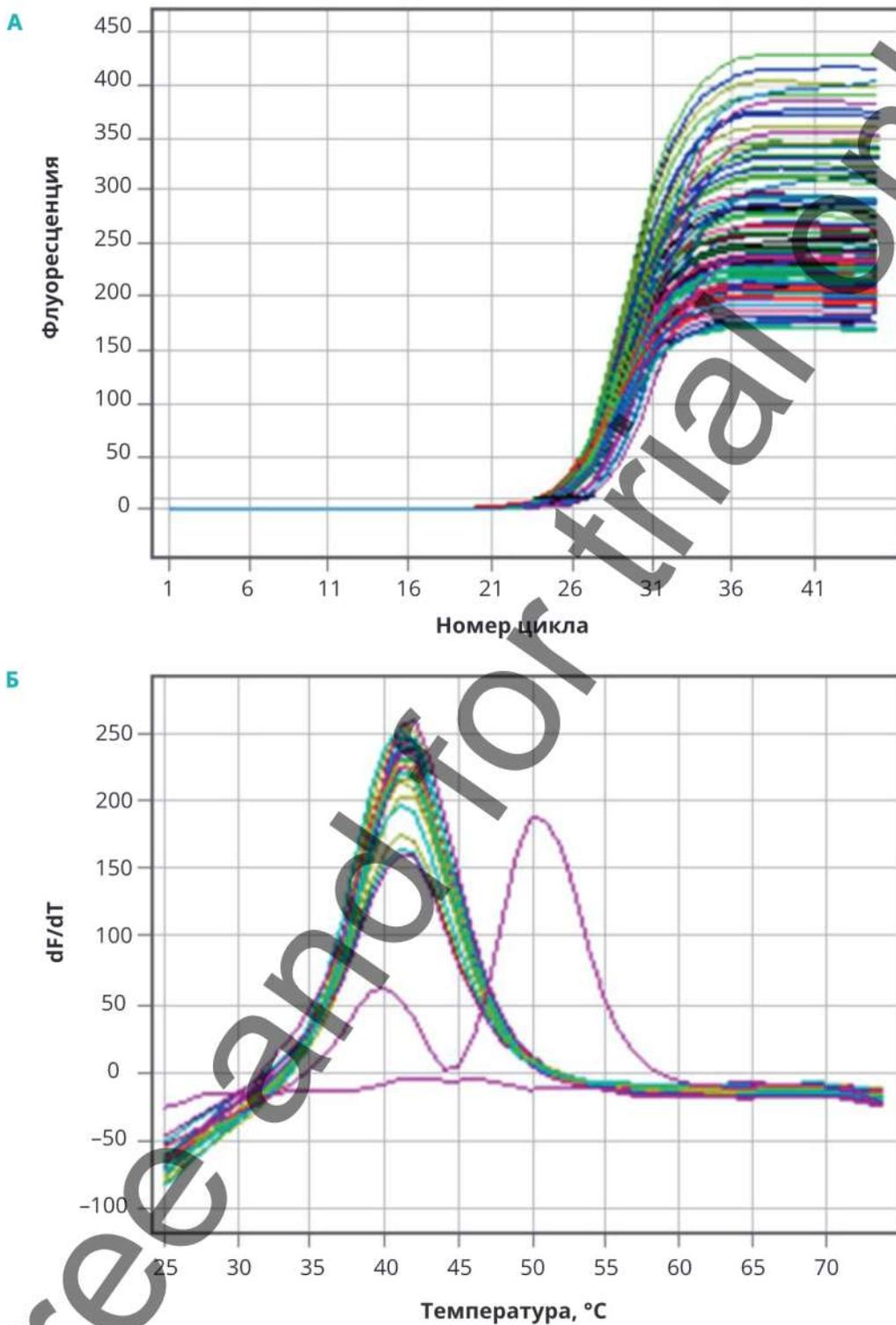


Рис. 11.36. Результаты анализа оптических измерений (на приборах и по технологии компании «ДНК-технология», Россия):

А — зависимость флуоресценции канала ROX от номера цикла; Б — зависимость флуоресценции канала HEX от номера цикла (dF/dT — соотношение уровня флуоресценции и показателей температуры)

- Инвертированная ПЦР (*Inverse PCR*).
- Асимметричная ПЦР (*Asymmetric PCR*).
- Количественная ПЦР (*Quantitative PCR*, Q-PCR) или ПЦР в реальном времени.
- Ступенчатая ПЦР (*Touchdown PCR*).
- Метод молекулярных колоний — ПЦР в геле (*Colony — PCR Colony*).
- ПЦР с быстрой амплификацией концов кДНК (*Rapid amplification of cDNA ends*, RACE-PCR).
- ПЦР длинных фрагментов (*Long-range PCR*).
- ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК (*Random Amplification of Polymorphic DNA*, RAPD).
- Групп-специфическая ПЦР (*group-specific PCR*).
- ПЦР с использованием горячего старта (*Hot-start PCR*).
- Виртуальная ПЦР — цифровая ПЦР, электронная ПЦР, e-ПЦР (*in silico PCR*).

11.2.3. Секвенирование нуклеиновых кислот

Секвенирование нуклеиновых кислот (от лат. *sequentum* — последовательность) — это расшифровка нуклеотидной последовательности первичной структуры линейных молекул ДНК или РНК, состоящих из последовательности нуклеозидтрифосфатов: дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ и УТФ. Обычно их именуют по азотистому основанию, входящему в их состав, — аденин (А), гуанин (G), цитозин (С), тимин (Т), а также урацил (U) в случае РНК.

Сейчас разработано несколько способов секвенирования нуклеиновых кислот [Wang K. et al., 2015; Heather J. M., Chain B., 2016]. Основные и надежные из них — это секвенирование по Сэнгеру и секвенирование нового поколения (*next-generation sequencing*, NGS).

Если же рассматривать усовершенствование этой технологии и приборов — *секвенаторов*, в которых осуществляется весь процесс считывания нужного участка ДНК или РНК и детекция результатов, то можно говорить о технологиях секвенирования первого (*Sanger sequencing*), второго (Roche, Illumina, Ion Torrent, AB — applied biosystems) и уже третьего (Helicos, Pacific Biosciences) поколений.

11.2.3.1. Секвенирование первого поколения

Секвенирование по Сэнгеру позволяет «считывать» последовательности до 1000 п. о. и используется для небольших фрагментов генома/генов или для валидации результатов более современного — NGS.

Методику секвенирования ДНК предложили Фредерик Сэнгер (*единственный ученый в истории мировой науки, получивший две Нобелевские премии по химии*: в 1958 г. — за установление структур белков, особенно инсулина; и в 1980 г. — за разработку методов определения первичной последовательности нуклеиновых кислот) и его коллеги в 1977 г., причем с течением времени этот метод несколько

раз модифицировался и к настоящему моменту считается **«золотым стандартом» современного секвенирования**.

Начиная с середины 1970-х гг. этот метод претерпел ряд изменений (табл. 11.16, рис. 11.37) [Heather J. M., Chain B., 2016]. На сегодняшний день в клинических лабораториях активно применяют автоматизированную модификацию секвенирования по Сэнгеру (см. рис. 11.38).

Таблица 11.16. Этапы модификации секвенирования по Сэнгеру

Секвенирование нуклеиновых кислот	Характеристика
«Плюс-минус»-метод (рис. 11.37, А)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Полимеразная цепная реакция, в которой используются ДНК, фермент (ДНК-полимераза), олигонуклеотидные праймеры и смесь четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТФ, или dNTP): аденин (А), тимин (Т), гуанин (G) и цитозин (С), причем один из дезоксинуклеотидов радиоактивно помечен по α-положению фосфата (^{32}P). 2. Очистка смеси амплифицированных фрагментов от дезоксинуклеозидтрифосфатов, не вступивших в реакцию (например, на колонках). Смесь делят на восемь равных частей (в разных пробирках). В «плюс»-системе проводят четыре ПЦР-реакции в присутствии каждого из четырех типов дезоксинуклеозидтрифосфатов; параллельно в «минус»-системе проводят четыре ПЦР-реакции в отсутствие каждого из них. 3. Далее результаты визуализируют с помощью электрофореза и определяют последовательность ДНК, исходя из того, что в «плюс»-системе терминация (прерывание) ПЦР происходит после конкретного дНТФ, а в «минус»-системе — перед ним
Метод «терминаторов», или метод «обрыва цепи» (рис. 11.37, Б)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Используют ДНК-полимеразу, олигонуклеотидные праймеры и смесь четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТФ): А, Т, G и С, один из которых радиоактивно помечен по α-положению фосфата (^{32}P). 2. В каждую из четырех реакций добавляется по одному 2',3'-дидезоксинуклеозидтрифосфату (ддАТФ, ддТТФ, ддЦТФ или ддГТФ), которые терминируют дальнейшую реакцию (синтез комплементарной молекулы ДНК с матрицы). Таким образом, в каждой пробирке образуется набор фрагментов ДНК разной длины, которые заканчиваются одним и тем же нуклеотидом. 3. Затем полученные фрагменты визуализируют с помощью электрофореза и, сравнивая длины фрагментов из четырех реакций с ддАТФ, ддТТФ, ддЦТФ или ддГТФ, восстанавливают последовательность ДНК. По образовавшемуся «обломку» можно определить последнюю букву секвенируемого фрагмента ДНК

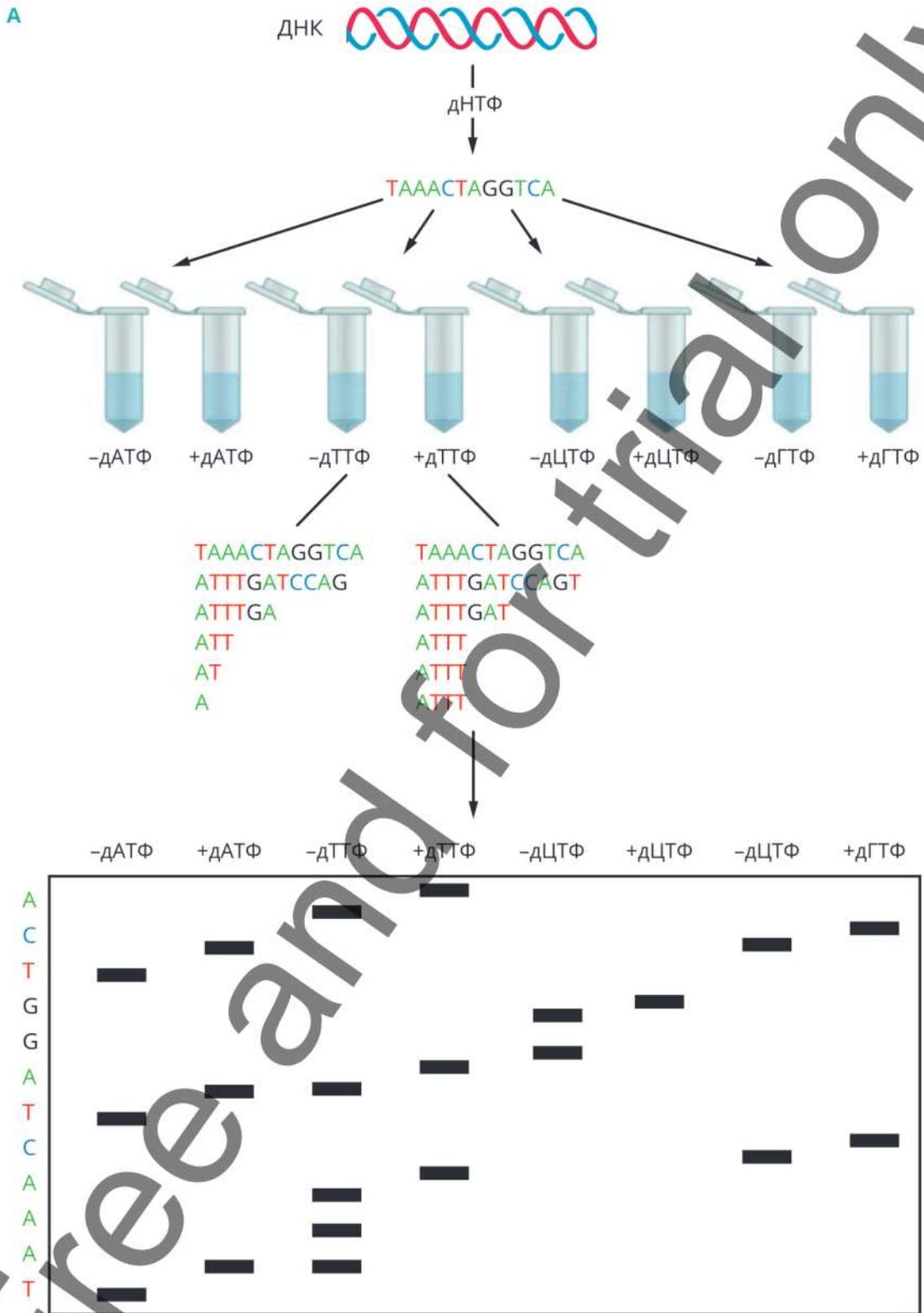


Рис. 11.37. (начало) Этапы секвенирования старого поколения:

A — «плюс-минус»-метод;

Б

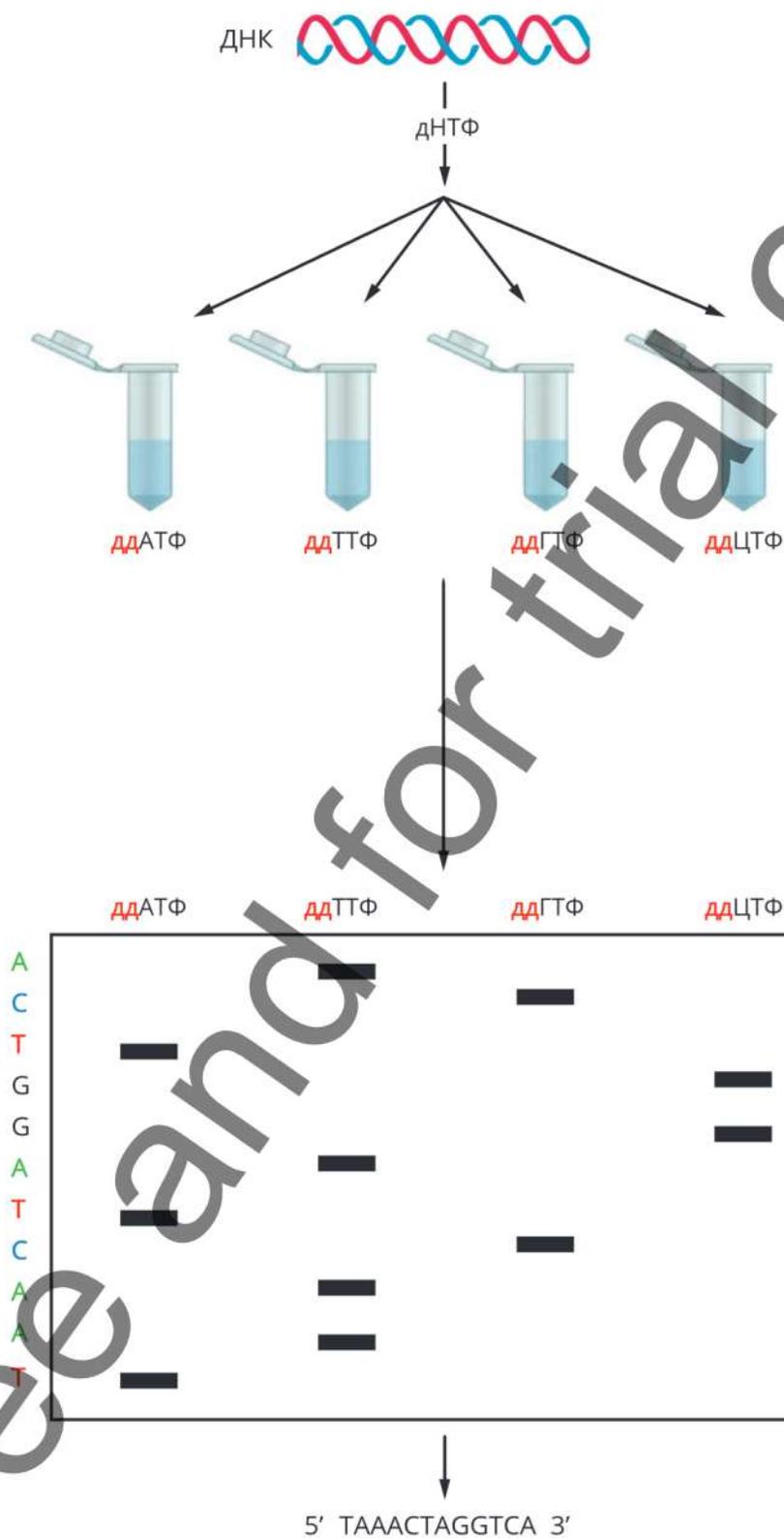


Рис. 11.37. (окончание) Этапы секвенирования старого поколения:

Б — метод «терминаторов»

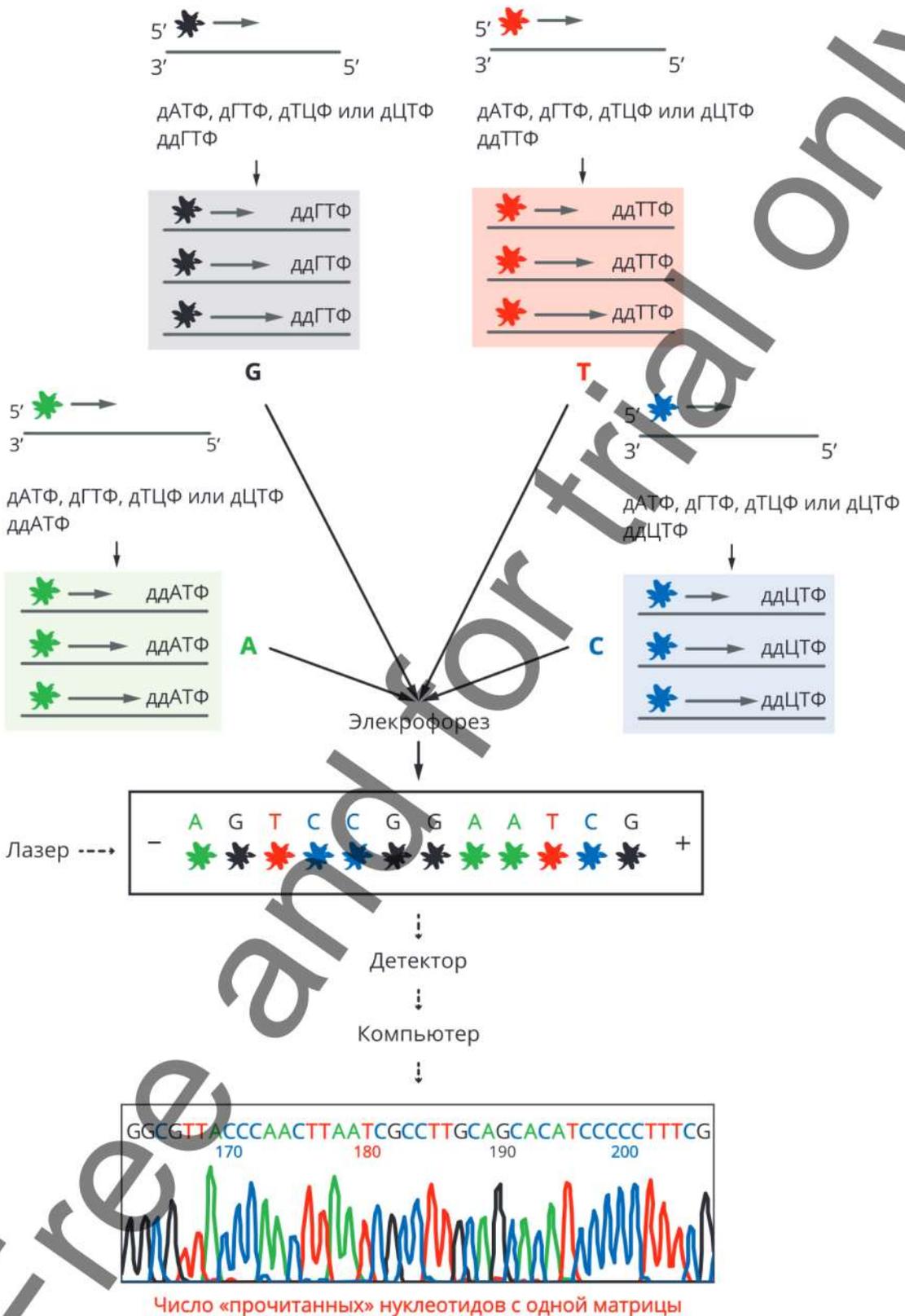


Рис. 11.38. Этапы секвенирования по Сэнгеру

Фактически это совершенствование представляет собой автоматизированную модификацию метода «терминаторов». Однако вместо радиоактивной метки стали использовать различные флуорохромы (флуоресцентные молекулы с разными длинами волн испускания), что сделало возможным проведение реакции в одной пробирке. Реакционную смесь разделяют *капиллярным электрофорезом*, а выстроившиеся в синтезируемую цепочку меченые нуклеотиды затем регистрируют детекторами флуоресценции, предоставляя возможность считывать последовательность всего секвенируемого ДНК-фрагмента. Результат анализируют с помощью компьютера и представляют в виде последовательности разноцветных пиков, соответствующих четырем нуклеотидам (рис. 11.39).

Практическое применение секвенирования по Сэнгеру позволяет проводить:

- анализ генных мутаций и полиморфизмов;
- анализ делеций и инсерций (малых и протяженных);
- идентификацию вирусов;
- валидацию данных, полученных на платформах NGS;
- микросателлитный анализ;
- анализ метилирования ДНК.

К другим методам секвенирования «старого поколения» относится **метод химической дегградации**, разработанный А. Максамом и У. Гилбертом. Он не получил дальнейшего распространения из-за быстрого развития *энзимологии* (раздел биохимии, изучающий ферменты), которая предоставила преимущество методу «терминаторов» Сэнгера. Препарат меченой ДНК разделяли на четыре раствора



Рис. 11.39. Пример капиллярного секвенатора ДНК «Applied Biosystems» (Thermo Fisher Scientific, США)

и каждый обрабатывали веществом, модифицирующим одно или два из четырех оснований. Авторы метода предложили модифицировать пуриновые основания диметилсульфатом. Последующий электрофорез в полиакриламидном геле позволял восстановить полную структуру исследуемого фрагмента.

11.2.3.2. Секвенирование второго поколения

Методы NGS (секвенирование нового поколения, массовое параллельное секвенирование) используют для глубокого (многократного) прочтения генетического материала во многих областях практической и теоретической медицины, биологии [Dijk E. L. et al., 2014; Buermans H. P. J., den Dunnen J. T., 2014; Soto J. et al., 2016; Garg S. K., Yung R., 2015; Ребриков Д. В. и др., 2019]. Размер одного прочитанного фрагмента варьирует от 25 до 500 п. о.

Эти технологии позволили значительно ускорить определение полной последовательности миллионов геномов организмов, начиная от бактерий и заканчивая человеком. Развитие новых технологий сопровождается прогрессом программного обеспечения, которое позволило геномике и эпигеномике развиваться быстрее и использовать более сложные алгоритмы. Эти алгоритмы могут включать в себя сразу несколько приложений и программ и позволяют работать с очень большим объемом данных.

Одним из первых методов глубокого секвенирования было так называемое **пиросеквенирование**. Данным методом можно определять нуклеотидную последовательность фрагментов геномной ДНК размером 300–500 п. о. Основной смысл этого типа секвенирования заключается в последовательном синтезе ДНК на ДНК-фрагментах изучаемого организма в специальных пиколитровых «реакторах». В ходе синтеза дочерней цепочки ДНК детектируют пирофосфаты, высвобождающиеся при включении нуклеотида в синтезируемую на матрице (участке молекулы ДНК, служащем матрицей для синтеза) комплементарную цепь. Эту технологию воплотили в приборе GS FLX 454 компании Roche.

Современные технологии делают процесс секвенирования ДНК рутинной процедурой. У разных коммерческих компаний принципы работы этих технологий и секвенторов несколько различаются; так, у компании Illumina (приборы MiSeq, NovaSeq) — технология секвенирования на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченных нуклеотидов, у компании Thermo Fisher Scientific (приборы Ion Proton, Ion Personal Genome Machine) — технология ионного полупроводникового секвенирования [Batoyskaa J. et al., 2017], у компании Oxford Nanopore Technologies (приборы MinION, GridION X5, PromethION и SmidgION) — технология нанопорового секвенирования.

Как пример работы секвенирования нового поколения представляем принцип метода фирмы Illumina, который состоит из нескольких основных этапов (рис. 11.40, 11.41):

1. Фрагментация и лигирование ДНК. Присоединение к фрагментам адаптеров.
2. ДНК пропускают через каналы ячейки, покрытые праймерами, комплементарными концам адаптеров.

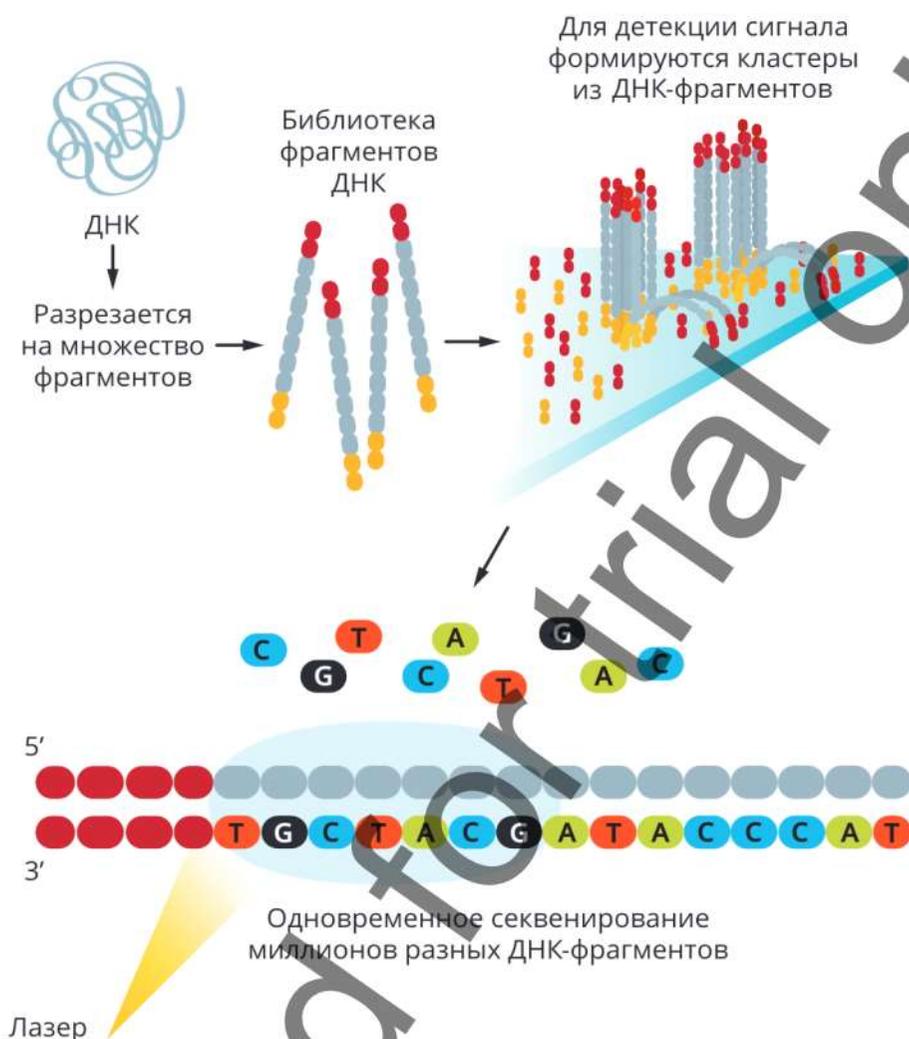


Рис. 11.40. Схематическое изображение основных этапов секвенирования нового поколения (Illumina)



Рис. 11.41. Полногеномный секвенатор MiSeq Illumina

Система высокопроизводительного секвенирования Illumina MiSeq основана на инновационном методе параллельного секвенирования миллионов фрагментов ДНК с использованием технологии секвенирования на молекулярных кластерах с помощью флуоресцентно меченных нуклеотидных зондов.

3. Через ячейку пропускают реагенты для достраивания второй цепи ДНК.
4. Двухцепочечные фрагменты денатурируют.
5. Этапы 3 и 4 повторяются 30–50 раз.
6. Каждый фрагмент оказывается окружен группой идентичных молекул «кластеров».
7. Через ячейку пропускают реагенты (флюоресцентно меченные терминированные дНТФ и полимеразу).
8. На ячейку светят лазером и проводят съемку.
9. Через ячейку пропускают реагенты, отщепляющие флуорохром и терминатор.
10. Этапы 7 и 9 повторяются от 50 до 300 раз. Число циклов соответствует длине чтения.

Использование методов секвенирования нового поколения позволяет проводить следующие исследования:

1. **Полногеномный анализ** (*genome-wide analysis*). Включает ресеквенирование и секвенирование *de novo*.

Полногеномное ресеквенирование (genome-wide sequencing) — это секвенирование генома вида, для которого существует референсный геном. Референсный геном — это уже секвенированный, собранный и проаннотированный геном организма того же вида, к которому относится анализируемый образец. Ресеквенирование полных геномов человека дает возможность осуществлять поиск мутаций, ассоциированных с болезнями, картирование генов в интересах персонализированной медицины.

Секвенирование de novo (de novo sequencing) — это секвенирование генома вида, для которого нет референсного генома, отправная точка большинства молекулярно-биологических и генетических исследований.

2. **Секвенирование РНК**. Позволяет оценивать экспрессию генов не только качественно, но и количественно, и отдельно — экспрессию кодирующих и регуляторных РНК. Данные методики направлены на изучение работы генома (активности его генов, в том числе генов-регуляторов) в разных клетках, тканях и органах.
3. **Таргетное секвенирование (targeted sequencing)**, или экзомное секвенирование; секвенирование митохондриальных генов и ампликонов. Секвенирование отдельных (выбранных исследователем) участков генома, например, только генов митохондриальной ДНК, кодирующих белки генов или генов, для которых уже описано участие в процессах онкогенеза. Таргетное секвенирование позволяет значительно снизить стоимость эксперимента (из расчета на один образец) и многократно увеличить количество анализируемых образцов.
4. **Метагеномное секвенирование (metagenomic sequencing)**. Позволяет оценить разнообразие микроорганизмов в различных образцах и бактериальное разнообразие в различных средах, например, в кишечнике человека, донных отложениях озера Байкал или горячих источниках Камчатки.
5. **Анализ ДНК-белковых взаимодействий (chromatin immunoprecipitation sequencing)**. Предназначен для изучения влияния транскрипционных факторов и других ДНК-связывающих белков на экспрессию генов, а через нее — на фенотипические и физиологические особенности клеток, органов и тканей.

6. **Бисульфитное секвенирование и его модификации** (например, RRBS-reduced representation bisulfite sequencing). Используют для оценки метилирования в геноме или его участках, влияния метилирования регуляторных участков генома на уровень экспрессии генов через подавление их транскрипционной активности.

11.2.3.3. Секвенирование третьего поколения

Секвенирование третьего поколения — это секвенирование единичных молекул. Технологии секвенирования третьего поколения работают по совершенно иному принципу, чем технологии, применяемые в секвенаторах второго поколения [Batovskaa J. et al., 2017]. Характерной особенностью секвенаторов третьего поколения является их сверхкомпактность.

Технология одномолекулярного секвенирования (*true Single Molecule Sequencing*, tSMS) компании Helicos Biosciences похожа на технологию секвенирования на молекулярных кластерах (Illumina), однако позволяет обходиться без ПЦР при пробоподготовке. Используется для высокоточного анализа экспрессии генов, имеет небольшую длину чтения (до 50 п. н.), однако допускает много ошибок (3–5 %). Технология не получила широкого распространения.

SMRT-секвенирование (*single molecule real time sequencing*), разработанное компанией Pacific Biosciences, позволило отказаться от проведения ПЦР при пробоподготовке, дало возможность наблюдать за работой ДНК-полимеразы, наращивающей синтезируемую цепь, в реальном времени. Возможны очень длинные чтения (> 10 т. п. н.), но частота ошибок высока (до 10 %). Используется для секвенирования *de novo*, ошибки корректируются по данным Illumina.

Принцип нанопорового секвенирования, коммерциализованный компанией Oxford Nanopore Technologies. Данный тип секвенирования основан на измерении меняющейся силы тока при прохождении молекул ДНК или РНК сквозь белковую нанопору в двухслойной мембране. Позволяет избежать стадий ПЦР-амплификации и химического мечения ДНК и РНК.

11.2.4. Другие виды молекулярно-генетических технологий

Создан ряд молекулярно-генетических технологий, выполняющих различные задачи (табл. 11.17), и множество модификаций этих технологий. Наиболее часто в клинической практике используются электрофорез в геле и капиллярный электрофорез.

ДНК-микрочип (*DNA microarray*) — небольшая поверхность, на которую с большой плотностью в определенном порядке нанесены фрагменты одноцепочечных синтетических ДНК-зондов, с которыми гибридизуются (образуют двухцепочечные молекулы) комплементарные им цепи ДНК из исследуемого образца, меченные флуоресцентным красителем. После гибридизации поверхность микрочипа сканируется, и в результате каждой последовательности ДНК ставится в соответствие тот или иной уровень сигнала, пропорциональный числу молекул ДНК с данной последовательностью, присутствующих в смеси.

Таблица 11.17. Краткая характеристика некоторых видов молекулярно-генетических технологий

Метод	Характеристика и применение
Электрофорез в геле (<i>gel electrophoresis</i>)	Разделение фрагментов ДНК по длине. Сахарофосфатный участок ДНК в водном растворе заряжен отрицательно, и поэтому цепи ДНК двигаются от катода (-) к аноду (+). Более длинные молекулы мигрируют медленнее, т. к. задерживаются в геле, а короткие молекулы двигаются быстрее
Капиллярный электрофорез (<i>capillary electrophoresis</i>)	Разделение молекул ДНК по заряду и размеру в тонком капилляре, заполненном электролитом
Саузерн-блот (<i>Southern blot</i>)	Определение числа копий генов в геноме. Проводят с геномной ДНК, обработанной ферментами — эндонуклеазами рестрикции. Используют гибридизацию ДНК, с помощью которой можно понять, какая из полос содержит фрагмент со строго определенной последовательностью. Гибридизация — это образование водородных связей между двумя цепями ДНК: ДНК-зондом (одноцепочечной молекулой ДНК длиной 10–1000 нуклеотидов) и исходной ДНК. За счет флуоресцентной метки или радиоизотопов, встроенных в зонд, результаты можно видеть
Нозерн-блот (<i>Northern blot</i>)	Исследование экспрессии генов путем тестирования молекул РНК (мРНК) и их фрагментов в образцах
Клонирование ДНК (генов)	Процесс выделения заданной последовательности ДНК и получения многих ее копий <i>in vitro</i> . Существует два основных метода с использованием быстро делящихся организмов (обычно бактерий <i>Escherichia coli</i> — кишечной палочки или дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i>). Клонирование ДНК часто применяют для амплификации фрагментов, содержащих гены, а также любые другие последовательности — например промоторы, некодирующие последовательности, химически синтезированные олигонуклеотиды и случайные участки ДНК
Изучение экспрессии генов	Выделение РНК из ткани, далее проведение обратной транскрипции (т. е. синтез кДНК — комплементарной ДНК) и затем проведение количественной ПЦР. В зависимости от того, прошла ли реакция амплификации, можно узнать, имеется ли матричная РНК исследуемого гена в ткани
Изучение профиля экспрессии генов с помощью ДНК-чипа (см. рис. 11.42)	ДНК-микрочипы используются для определения ДНК или РНК (обычно после обратной транскрипции — получения кДНК), которые могут быть как кодирующими белок, так и не кодирующими. ДНК-микрочип представляет собой множество небольших одноцепочечных молекул — ДНК-зондов, помеченных флуорохромом, которые ковалентно пришиты к твердому основанию — чипу. Если место флуоресценции совпадает с положением молекулы ДНК, то в данной ткани этот ген экспрессирован. На современных микрочипах можно полностью расположить целый геном, каждый известный ген которого будет являться зондом. Амплифицированные фрагменты ДНК при помощи микроманипулятора наносят на кремниевые или стеклянные пластины, ковалентно закрепляя зонды

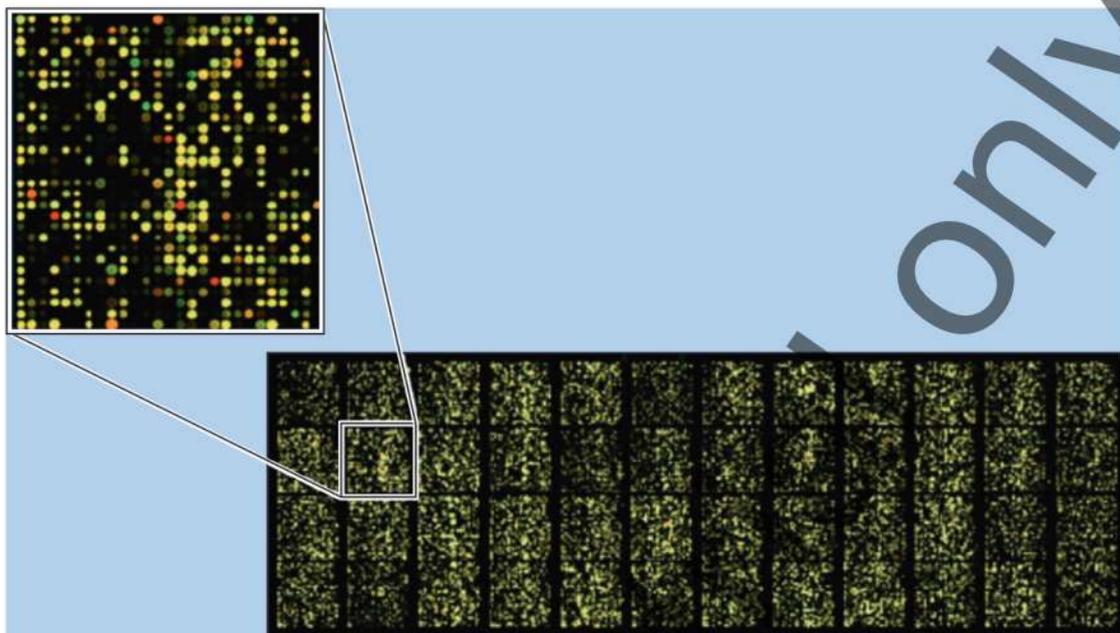


Рис. 11.42. Флуоресценция на ДНК-микрочипе после обработки раствором комплементарной ДНК

Применение методов генетики

Глава 12. Картирование генома человека	342
Глава 13. Применение методов медицинской генетики	379

Картирование генома человека

12.1. Генетические и физические карты генома

С момента возникновения знаний о существовании генов, хромосом, генома, их особенностей и связанных с ними функций возник вопрос об упорядочении этой информации.

Еще в начале XX в. стали создаваться **генетические карты**, или генетические карты сцепления. Такие карты представляют собой одномерную схему взаиморасположения локусов генов в группах сцепления (на индивидуальных хромосомах) данного организма с указанием расстояний между ними. Первая генетическая карта была получена для плодовой мушки (*Drosophila melanogaster*), у которой имеются четыре пары хромосом. Использовали *гибридологический метод*, который заключался в скрещивании организмов с различными признаками и анализе признаков у потомков. Расположение генов на хромосомах определяли по *частоте кроссинговера*, который проходит между хроматидами гомологичных хромосом в профазу мейоза I. Такие карты создавались на основе данных о *сцеплении генов во время кроссинговера*. Схематически генетические карты располагают горизонтально и указывают расстояние между генами в сантиморганах (сМ : 1 сМ соответствует частоте кроссинговера в 1 %). Эта единица измерения была предложена в *честь Т. Моргана*, который со своими сотрудниками открыл *закон сцепленного наследования* и работал над созданием генетических карт организмов (*рис. 12.1*).

Генетические карты сцепления правильно отражают порядок расположения генетических маркеров на хромосомах, однако полученные при этом значения расстояний между ними не соответствуют реальным физическим расстояниям. Частоты рекомбинации варьируют в различных частях генома, что обуславливает возможность получения лишь ориентировочной информации о физическом (реальном) расстоянии при использовании генетических карт. Это связывают с тем, что эффективность рекомбинации между хроматидами на отдельных участках хромосом может сильно различаться. Данные различия могут быть связаны с такими причинами, как непрохождение рекомбинации в гетерохроматиновых участках хромосом, или с тем, что в хромосомах часто встречаются «горячие точки» рекомбинации.



Рис. 12.1. Схема генетической карты второй хромосомы у плодовой мухи из рода дрозофил (*Drosophila melanogaster*)

Физические карты хромосом и генома в целом наиболее точные. Их составляют с использованием различных методов молекулярной генетики [Cherniak C., Rodriguez-Esteban R., 2019; Naumenko F.M. et al., 2018; Su C.F. et al., 2015]. Физические карты целой хромосомы или ее сегмента строятся на основе прямого исследования генетического материала и дают представление о реальном расположении генов в ДНК, расстояние между которыми и фланкирующими их маркерами выражается в парах нуклеотидов (п. н.), что облегчает их идентификацию и изучение, а также секвенирование.

Физические карты различаются по степени их разрешения. Полная физическая карта генома человека максимального разрешения (крупномасштабная) будет содержать всю нуклеотидную последовательность всех его хромосом. Физические карты с минимальным разрешением (мелкомасштабные) — это цитогенетические карты генома или генетические карты с расстоянием между соседними маркерами в 7–10 млн п. н.

В 1971 г. была принята Парижская классификация хромосом человека, которая представляла собой графическое изображение всех хромосом в виде кариограммы (идиограммы). Первая **цитогенетическая карта хромосом человека** показывала пространственное взаимное расположение структурных элементов хромосом (например, их дифференциально окрашенных гетеро- и эухроматиновых участков) или локусов. На сегодняшний день ее используют в биологии, теоретической и практической медицине для решения многих задач. А с развитием молекулярно-генетических методов цитогенетики карты хромосом человека стали более подробными и имеют три основных уровня разрешения: 400, 550, 850 п. н. (см. рис. 12.2).

Далее можно говорить только о различных методах построения физических карт генома. Для этого исследователю необходимо иметь набор хорошо охарактеризованных маркеров, перекрывающих весь геном человека с определенной частотой. В качестве маркеров применяют либо сами гены, либо уже охарактеризованные фрагменты ДНК, могут использоваться и рестриктные сайты, клонированные последовательности ДНК, известные гены.

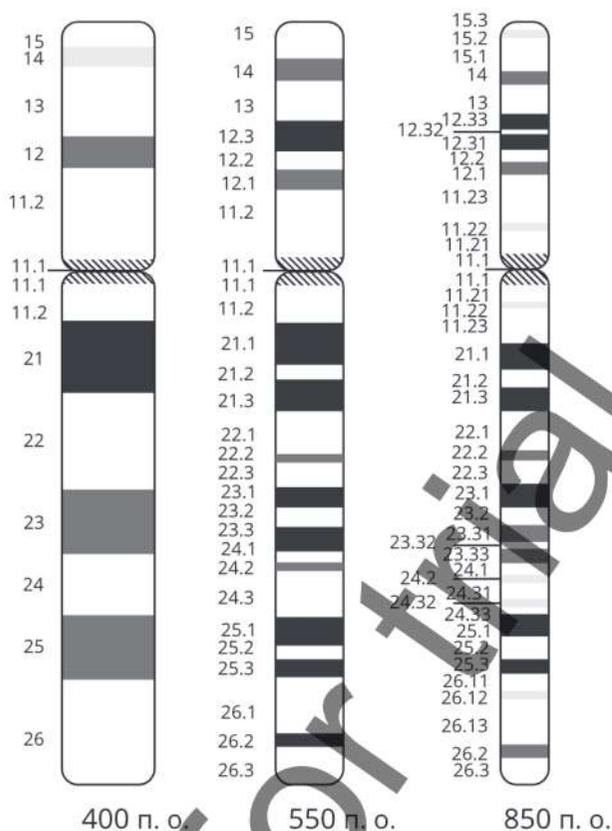


Рис. 12.2. Идиограмма 10-й хромосомы человека в трех разрешениях, пар оснований (п. о.) в гаплоидном наборе хромосомы (G-бэндинг). Номенклатура ISCN (2013)

Карты, основанные на *контигах* (*contiguous*), представляют полную информацию о структуре отдельных сегментов хромосом и позволяют локализовать отдельные гены. (Континг — это, перекрывающиеся фрагменты нуклеиновой кислоты, которые в совокупности представляют собой консенсусную область ДНК.) Такой способ картирования генома называется «снизу вверх» (*bottom-up mapping*) (рис. 12.3) [Пузырев В. П., Степанов В. А., 1997]. В качестве вектора для клонирования часто используют искусственные синтезированные хромосомы бактерий или дрожжей. Перекрывающиеся и частично дополняющие друг друга клоны образуют непрерывную соприкасающуюся (*contiguous*) последовательность нуклеотидов ДНК размером от 10 до 1000 т. п. о. Правильность полученных контигов подтверждают FISH-методом.

Однако такие карты трудно применять для реконструкции целых хромосом или их протяженных участков.

Рестрикционная карта — это вид физической карты, изображающей взаимное расположение сайтов рестрикции для разных рестриктаз и расстояния между ними (см. рис. 12.4). Экспериментально этот способ реализуется при картировании «сверху вниз» (*top-down mapping*). Маркерами этой карты являются рестрикционные фрагменты (сайты рестрикции), каждый из которых является строго

определенной последовательностью нуклеотидов ДНК. Рестрикционные карты строят при исследовании протяженных (до 40 т. п. о.) клонированных последовательностей нуклеотидов, включающих исследуемые гены.

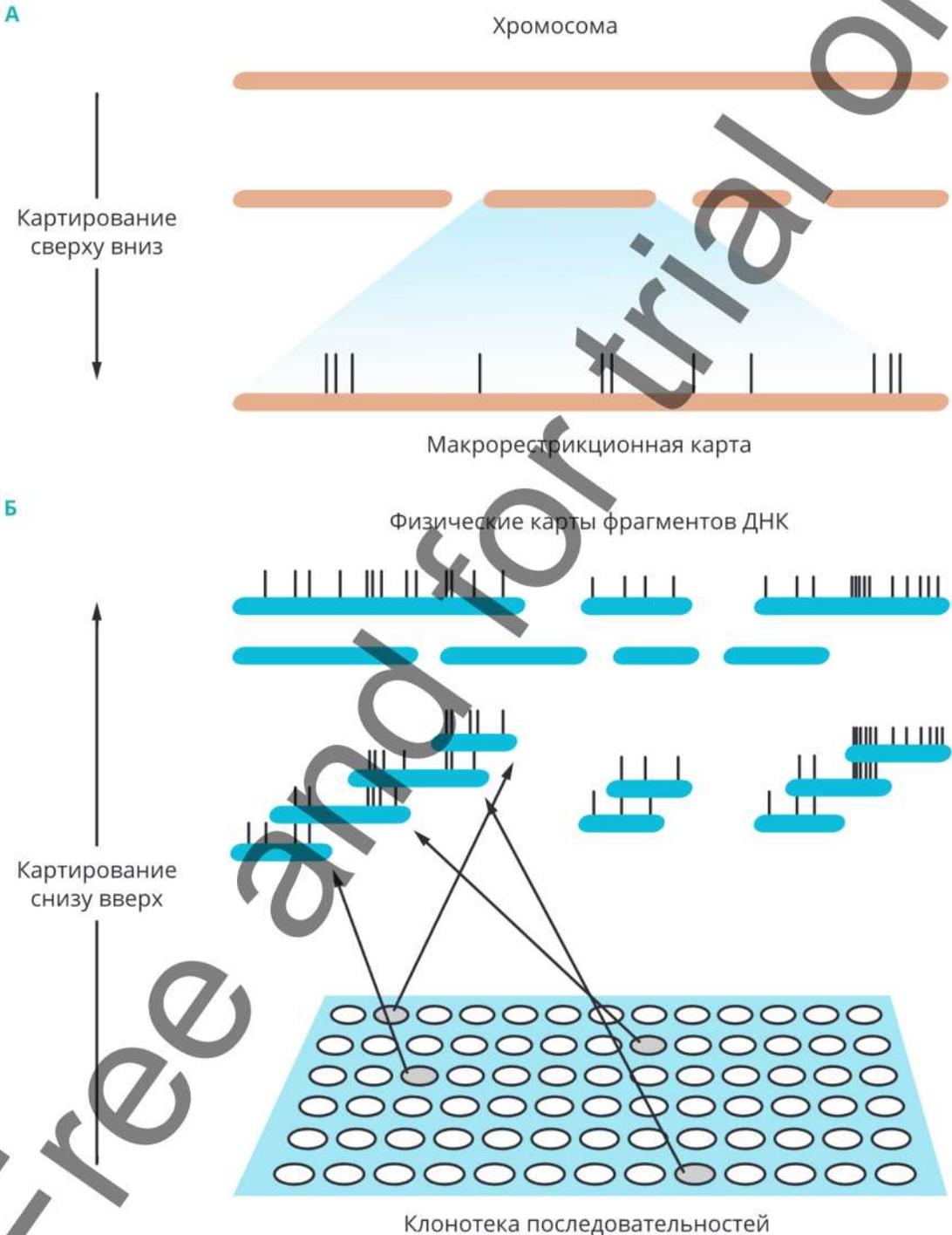


Рис. 12.3. Два основных способа картирования генома:

А — стратегия «сверху вниз»; Б — стратегия «снизу вверх»

Транскрипционные карты предоставляют информацию о расположении на хромосоме (комплементарной ДНК [кДНК] — ДНК, синтезированной на матрице зрелой мРНК в реакции, катализируемой обратной транскриптазой) (рис. 12.4). Синтезированные искусственно с использованием в качестве матрицы мРНК или химическим путем (по известной аминокислотной последовательности) и меченые кДНК-зонды локализуют методом гибридизации *in situ*. Более точный метод построения транскрипционной карты основан на частичном секвенировании отдельных кДНК-клонов и выявлении специфических маркерных сайтов (*sequence tagged sites*, STS), называемых экспрессируемыми маркерными сайтами (eSTS). Транскрипционные карты позволяют обнаруживать гены-кандидаты для тех или иных заболеваний.

Многолетняя программа секвенирования генома *Homo sapiens* (проект «Человеческий геном» — Human Genome Project) завершилась в 2003 г. и позволила значительно облегчить процедуру картирования. Преимущество этих данных заключалось в том, что, анализируя уже известную нуклеотидную последовательность определенного региона, можно более точно и быстро выбрать ген-кандидат для подтверждения его роли в развитии наследственного заболевания.

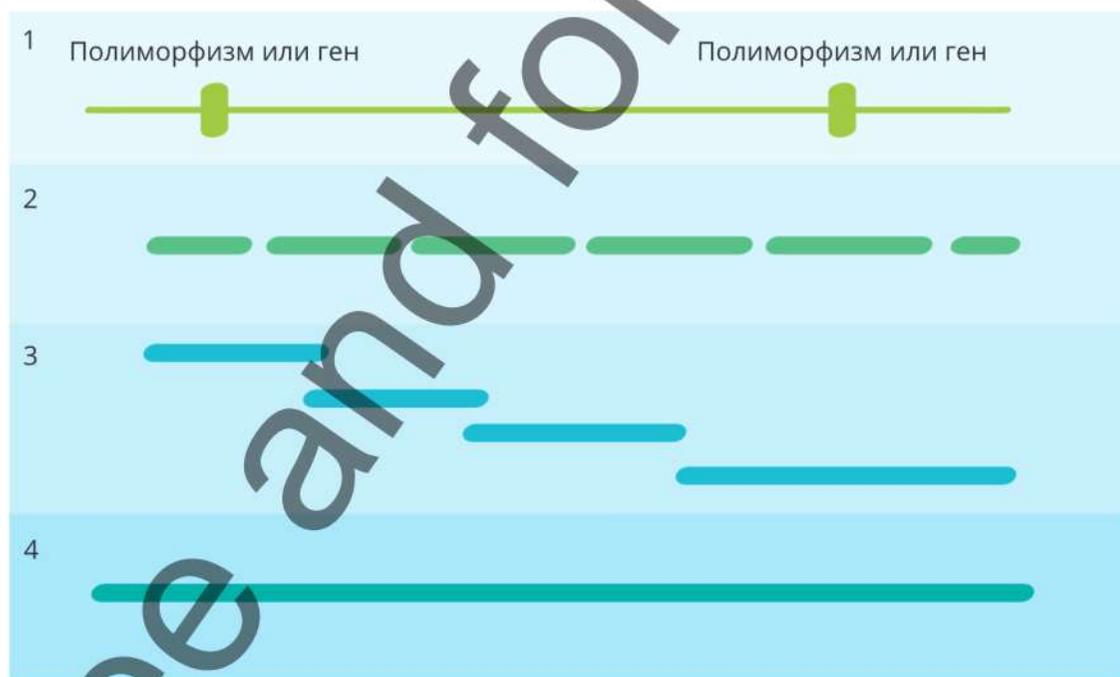


Рис. 12.4. Различные виды карт генома на одном и том же участке хромосомы:

1 — генетическая карта сцепления; 2 — физическая рестрикционная карта (пробелы обозначают места расщепления ДНК рестриктазами); 3 — физическая карта контигов, показаны перекрывающиеся клоны ДНК, полученные с помощью YAC-векторов (*yeast artificial chromosome* — искусственно полученная мини-хромосома дрожжей); 4 — исчерпывающая физическая карта в виде последовательности нуклеотидов ДНК (цит. по [Лузырев В.П., Степанов В.А., 1997])

На сегодняшний день для ученых недостаточно только знания первичной структуры ДНК. Целью дальнейших исследований является определение функциональной роли той или иной нуклеотидной последовательности. Сейчас активно развивается новый проект «Человеческий геном» — *функциональная геномика*.

12.2. Карты генома человека

Карта генома — это схема, определяющая взаиморасположение (порядок и расстояние) генов и других компонентов генома **на хромосоме**.

В 1980 г. В. Мак-Кьюсик предложил понятие «*анатомия генома человека*», которое включало основы функциональной и патологической анатомии генома человека.

Картирование генов человека и других организмов имеет большое значение в медицине. Продолжает пополняться информация о полиморфизмах/мутациях, являющихся основной причиной заболеваний. В большей степени это касается данных о наследственных заболеваниях. Так, известны локализации мутации (мутаций), являющейся причиной большинства моногенных заболеваний и синдромов.

Далее мы представляем карты всех хромосом человека в разрешении 850 п. о. (G-бэндинг), необходимые цитогенетику при кариотипировании (рис. 12.5–12.28*). Этот тип идиограммы обычно используется в браузерах генома (например, Ensembl, UCSC Genome Browser); далее при использовании баз данных устанавливается взаимосвязь аберрации или генной мутации с патологией).

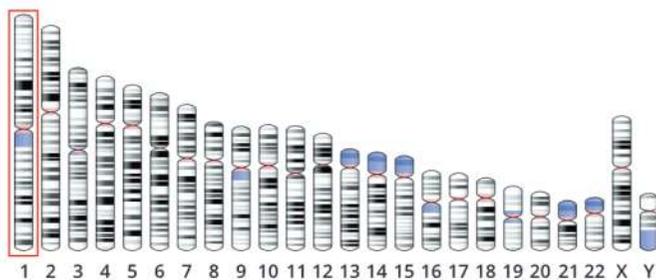
Проект базы данных Ensembl Genome (1999) — это совместный научный проект Европейского института биоинформатики и Института Сэнгера. Он представляет собой браузер генома/геномов позвоночных для поддержки исследований в сравнительной геномике, эволюции, изменения последовательности нуклеотидов и регуляции транскрипции, а также служит для сбора данных о заболеваниях.

UCSC Genome Browser (2000) является графическим средством просмотра, которое оптимизировано для поддержки быстрой интерактивной производительности, визуализации, проверки и запроса данных на многих уровнях. Он был создан на платформе веб-сайта Университета Калифорнии как ресурс для распространения результатов прочтения генома человека. В последующем сайт расширился и теперь включает обширную коллекцию генетической информации позвоночных животных и других организмов. Сегодня браузер используется генетиками, молекулярными биологами и врачами для доступа к геномной информации.

В клинической генетике, в практической и теоретической медицине использование баз данных активно применяется для молекулярно-генетической диагностики, выбора лечения пациента и решения множества других задач.

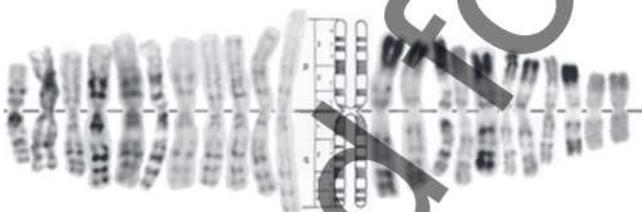
* Данные приведены по NBCI, 2017.

А



Доля от всего материала ДНК клетки, %	8
Пары оснований нуклеиновых кислот	248 956 422
Гены, кодирующие белки, <i>n</i>	2093
Гены, не кодирующие белки, <i>n</i>	1790
Псевдогены, <i>n</i>	1426

В



Б

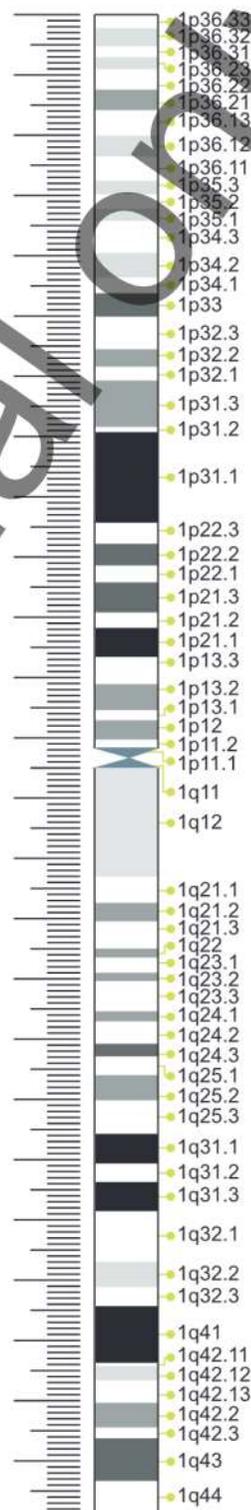
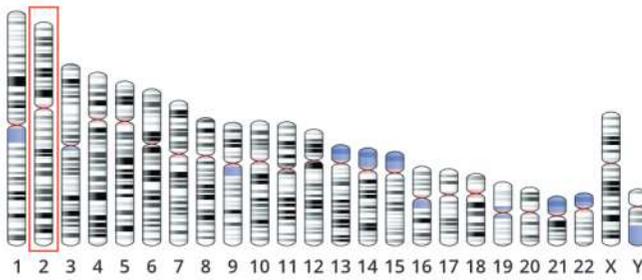


Рис. 129. Карта хромосомы 1 человека: 1–248 956 422 п. о. (248 956,422 кб):

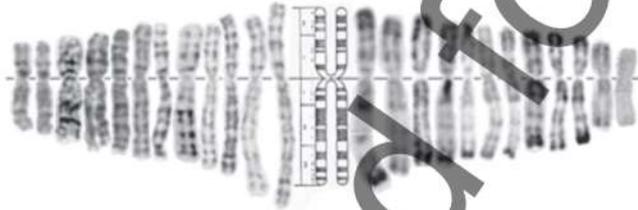
А и Б — G-полосные идиограммы хромосомы (соответственно визуализация в ДНК клетки и с расположением локусов); В — идиограмма и фото хромосомы с дифференциальным окрашиванием, G- и R-бэндинг (слева и справа)

А



Доля от всего материала ДНК клетки, %	до 8
Пары оснований нуклеиновых кислот	242 193 529
Гены, кодирующие белки, <i>n</i>	1281
Гены, не кодирующие белки, <i>n</i>	1446
Псевдогены, <i>n</i>	1207

В



Б

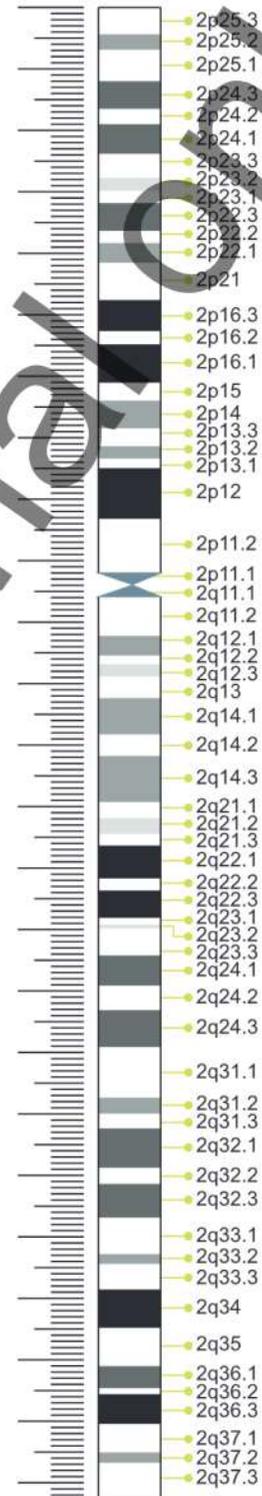
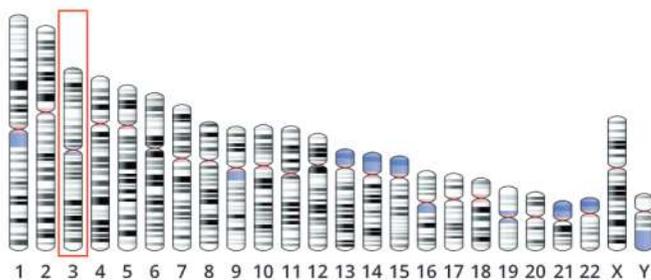


Рис. 12.6. Карта хромосомы 2 человека: 1–242 193 529 п. о. (242 193,529 кб):

А и Б — G-полосные идиограммы хромосомы (соответственно визуализация в ДНК клетки и с расположением локусов); В — идиограмма и фото хромосомы с дифференциальным окрашиванием, G- и R-бэндинг (слева и справа)

А



Доля от всего материала ДНК клетки, %	6,5
Пары оснований нуклеиновых кислот	198 295 559
Гены, кодирующие белки, <i>n</i>	1085
Гены, не кодирующие белки, <i>n</i>	1108
Псевдогены, <i>n</i>	902

В



Б

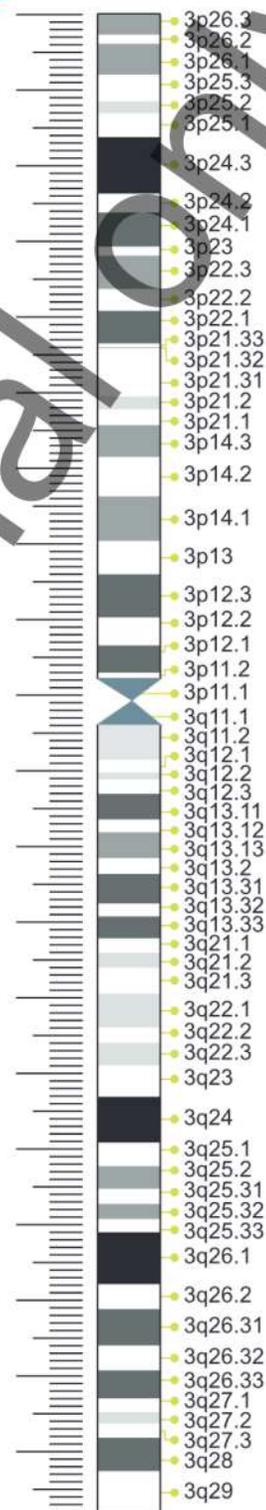
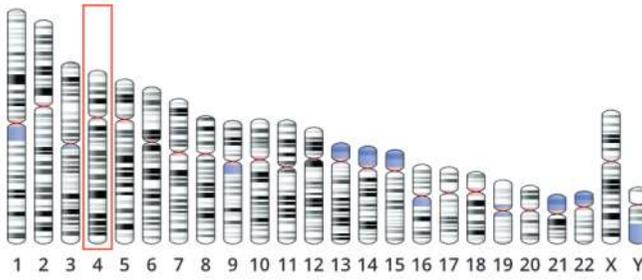


Рис. 127. Карта хромосомы 3 человека: 1–198 295 559 п. о. (198 295,559 кб):

А и Б — G-полосные идиограммы хромосомы (соответственно визуализация в ДНК клетки и с расположением локусов); В — идиограмма и фото хромосомы с дифференциальным окрашиванием, G- и R-бэндинг (слева и справа)

А



Доля от всего материала ДНК клетки, %	6,0 до 6,5
Пары оснований нуклеиновых кислот	190 214 555
Гены, кодирующие белки, <i>n</i>	769
Гены, не кодирующие белки, <i>n</i>	934
Псевдогены, <i>n</i>	819

В



Б

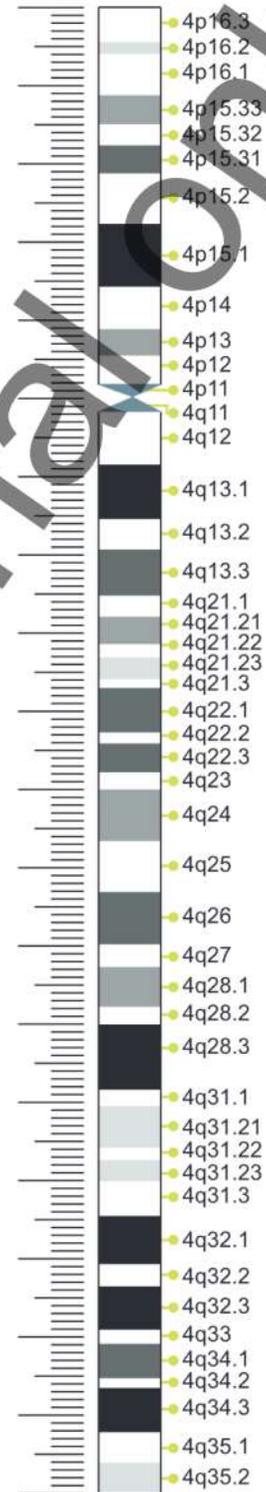
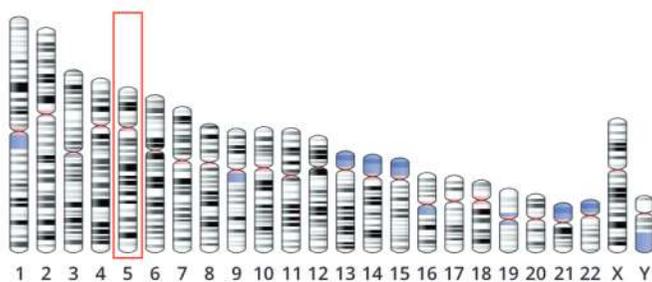


Рис. 12.8. Карта хромосомы 4 человека: 1–190 214 555 п. о. (190 214,555 кб):

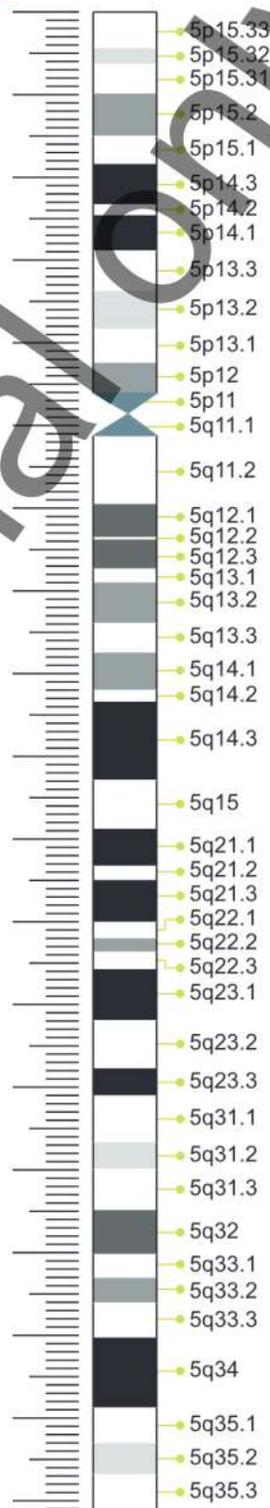
А и Б — G-полосные идиограммы хромосомы (соответственно визуализация в ДНК клетки и с расположением локусов); В — идиограмма и фото хромосомы с дифференциальным окрашиванием, G- и R-бэндинг (слева и справа)

А



Доля от всего материала ДНК клетки, %	6
Пары оснований нуклеиновых кислот	181 538 259
Гены, кодирующие белки, <i>n</i>	886
Гены, не кодирующие белки, <i>n</i>	981
Псевдогены, <i>n</i>	785

Б



В

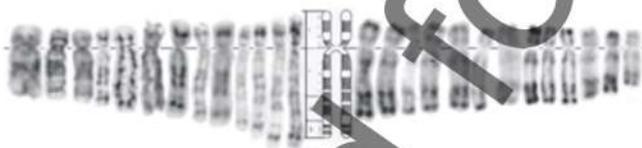
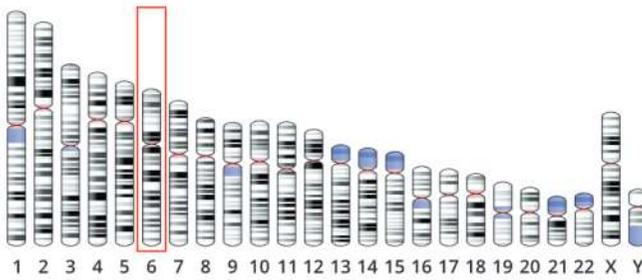


Рис. 129. Карта хромосомы 5 человека: 1–181 538 259 п. о. (181 538,259 кб):

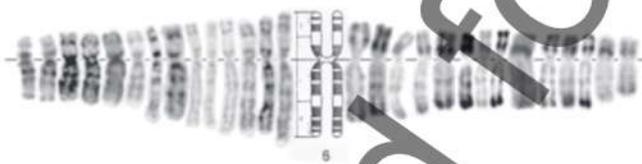
А и Б — G-полосные идиограммы хромосомы (соответственно визуализация в ДНК клетки и с расположением локусов); В — идиограмма и фото хромосомы с дифференциальным окрашиванием, G- и R-бэндинг (слева и справа)

А



Доля от всего материала ДНК клетки, %	5,5 до 6,0
Пары оснований нуклеиновых кислот	171 000 000
Гены, кодирующие белки, <i>n</i>	1053
Гены, не кодирующие белки, <i>n</i>	1188
Псевдогены, <i>n</i>	91

В



Б

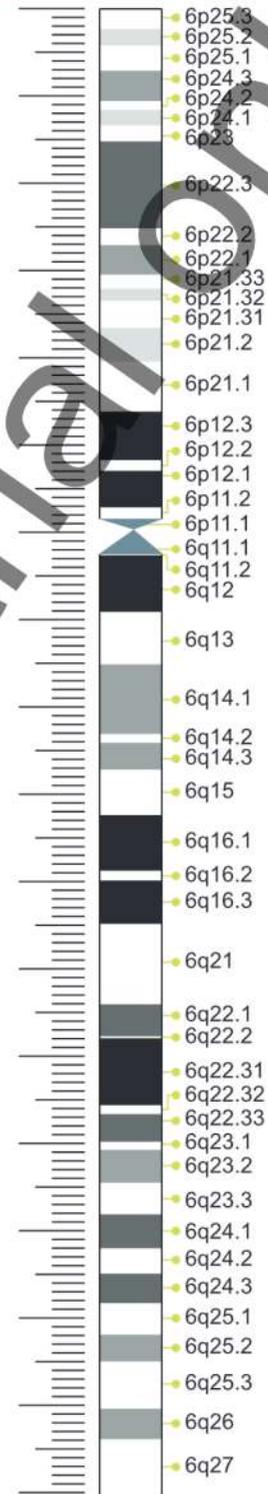
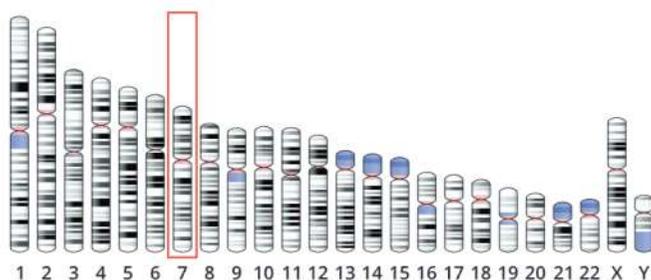


Рис. 12.10. Карта хромосомы 6 человека: 1–170 805 979 п. о. (170 805,979 кб):

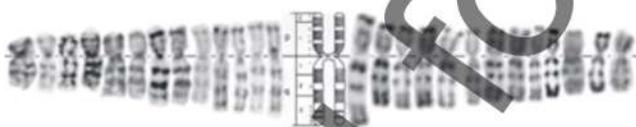
А и Б — G-полосные идиограммы хромосомы (соответственно визуализация в ДНК клетки и с расположением локусов); В — идиограмма и фото хромосомы с дифференциальным окрашиванием, G- и R-бэндинг (слева и справа)

А



Доля от всего материала ДНК клетки, %	5,0 до 5,5
Пары оснований нуклеиновых кислот	159 345 973
Гены, кодирующие белки, <i>n</i>	948
Гены, не кодирующие белки, <i>n</i>	905
Псевдогены, <i>n</i>	933

В



Б

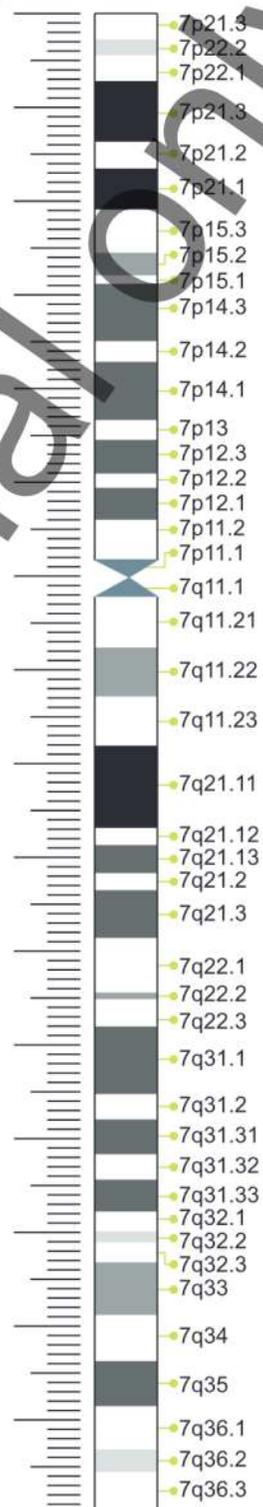
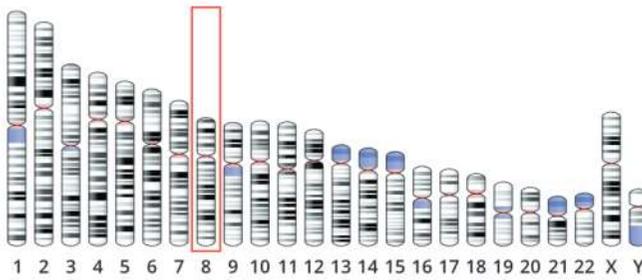


Рис. 12.71. Карта хромосомы 7 человека: 1–159 345 973 п. о. (159 345,973 кб):

А и Б — G-полосные идиограммы хромосомы (соответственно визуализация в ДНК клетки и с расположением локусов); В — идиограмма и фото хромосомы с дифференциальным окрашиванием, G- и R-бэндинг (слева и справа)

А



Доля от всего материала ДНК клетки, %	4,5 до 5,0
Пары оснований нуклеиновых кислот	145 138 636
Гены, кодирующие белки, <i>n</i>	719
Гены, не кодирующие белки, <i>n</i>	848
Псевдогены, <i>n</i>	682

В



Б

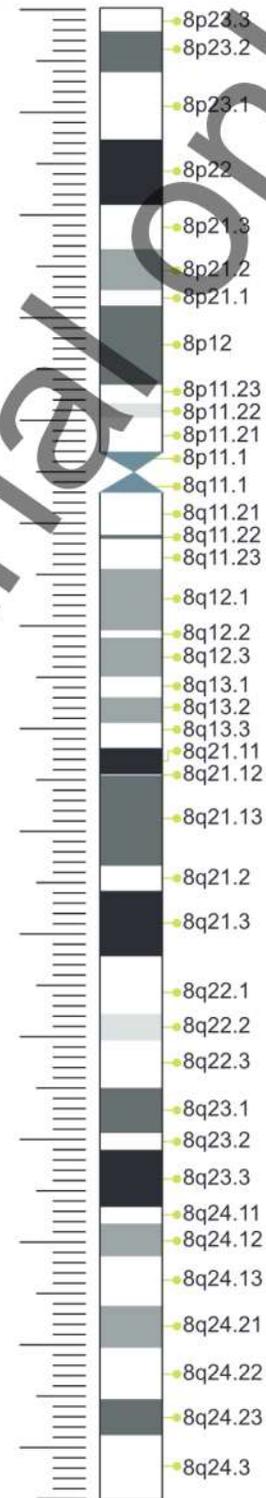
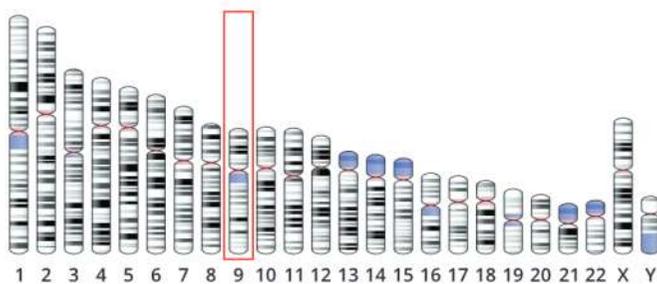


Рис. 12.12. Карта хромосомы 8 человека: 1–145 138 636 п. о. (145 138,636 кб):

А и Б — G-полосные идиограммы хромосомы (соответственно визуализация в ДНК клетки и с расположением локусов); В — идиограмма и фото хромосомы с дифференциальным окрашиванием, G- и R-бэндинг (слева и справа)

А



Доля от всего материала ДНК клетки, %	4,0 до 4,5
Пары оснований нуклеиновых кислот	138 394 717
Гены, кодирующие белки, <i>n</i>	822
Гены, не кодирующие белки, <i>n</i>	830
Псевдогены, <i>n</i>	738

В



Б

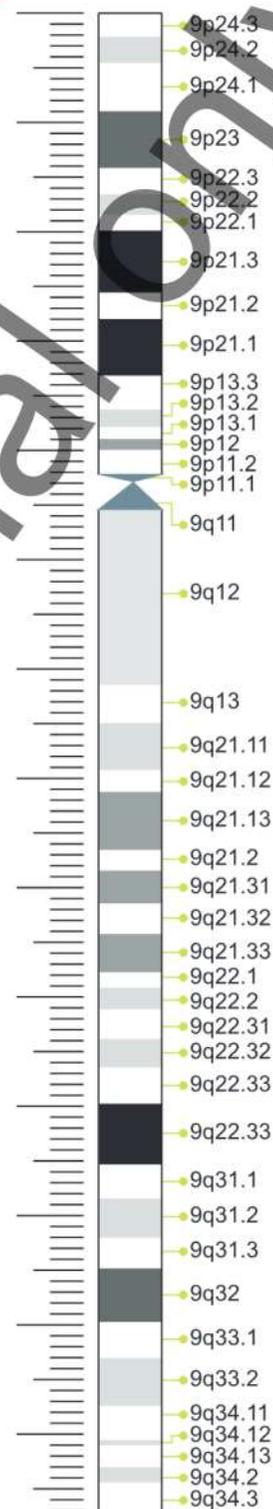
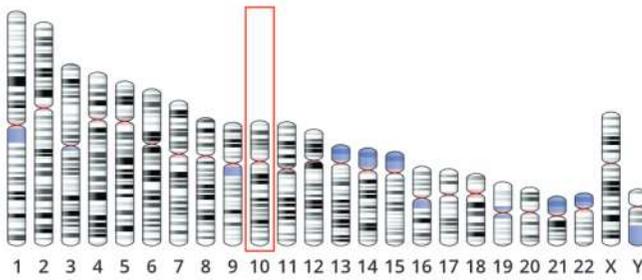


Рис. 12.73. Карта хромосомы 9 человека: 1–138 394 717 п. о. (138 394,717 кб):

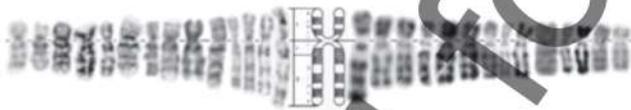
А и Б — G-полосные идиограммы хромосомы (соответственно визуализация в ДНК клетки и с расположением локусов); В — идиограмма и фото хромосомы с дифференциальным окрашиванием, G- и R-бэндинг (слева и справа)

А



Доля от всего материала ДНК клетки, %	4,0 до 4,5
Пары оснований нуклеиновых кислот	133 797 422
Гены, кодирующие белки, <i>n</i>	754
Гены, не кодирующие белки, <i>n</i>	842
Псевдогены, <i>n</i>	654

В



Б

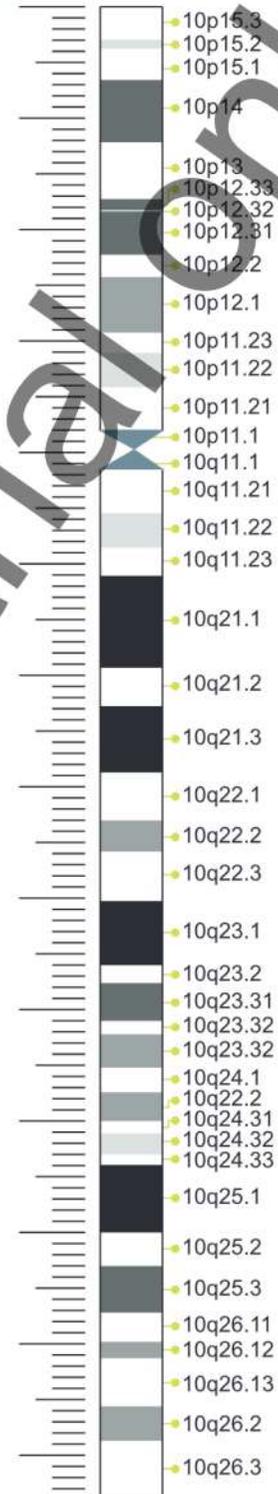
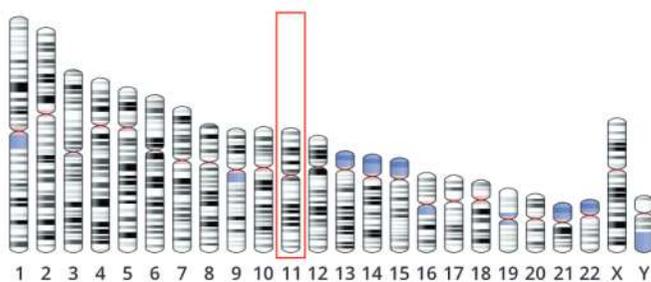


Рис. 12.14. Карта хромосомы 10 человека: 1–133 797 422 п. о. (133 797,422 кб):

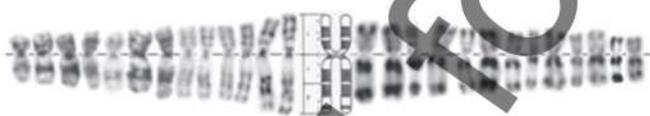
А и Б — G-полосные идиограммы хромосомы (соответственно визуализация в ДНК клетки и с расположением локусов); В — идиограмма и фото хромосомы с дифференциальным окрашиванием, G- и R-бэндинг (слева и справа)

А



Доля от всего материала ДНК клетки, %	4,0 до 4,5
Пары оснований нуклеиновых кислот	135 086 622
Гены, кодирующие белки, <i>n</i>	1,314
Гены, не кодирующие белки, <i>n</i>	860
Псевдогены, <i>n</i>	839

В



Б

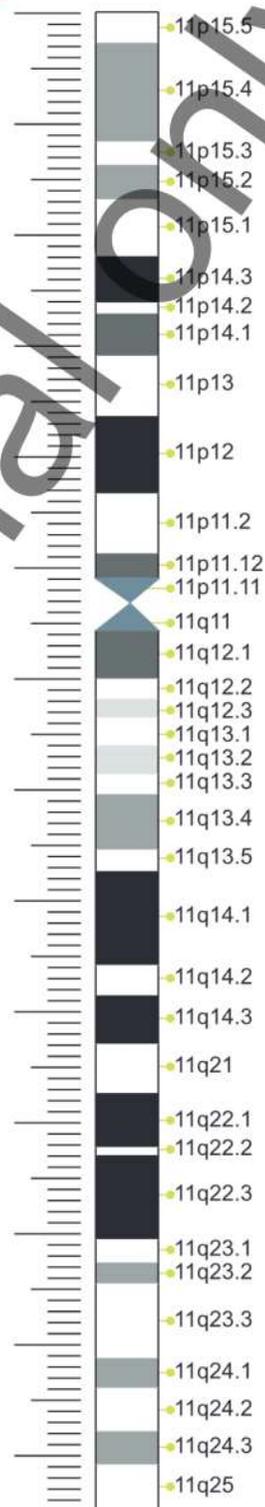
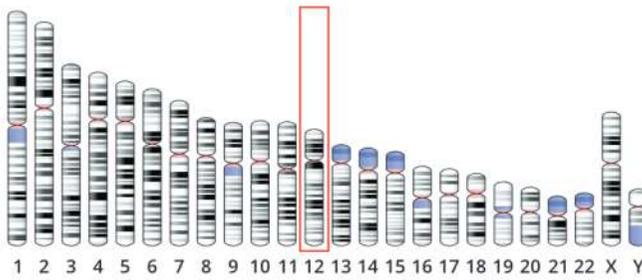


Рис. 1295. Карта хромосомы 11 человека: 1–135 086 622 п. о. (135 086,622 кб):

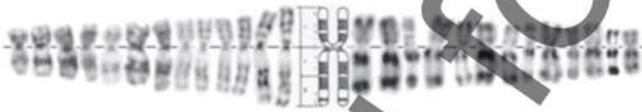
А и Б — G-полосные идиограммы хромосомы (соответственно визуализация в ДНК клетки и с расположением локусов); В — идиограмма и фото хромосомы с дифференциальным окрашиванием, G- и R-бэндинг (слева и справа)

А



Доля от всего материала ДНК клетки, %	4,0 до 4,5
Пары оснований нуклеиновых кислот	133 275 309
Гены, кодирующие белки, <i>n</i>	1,036
Гены, не кодирующие белки, <i>n</i>	853
Псевдогены, <i>n</i>	693

В



Б

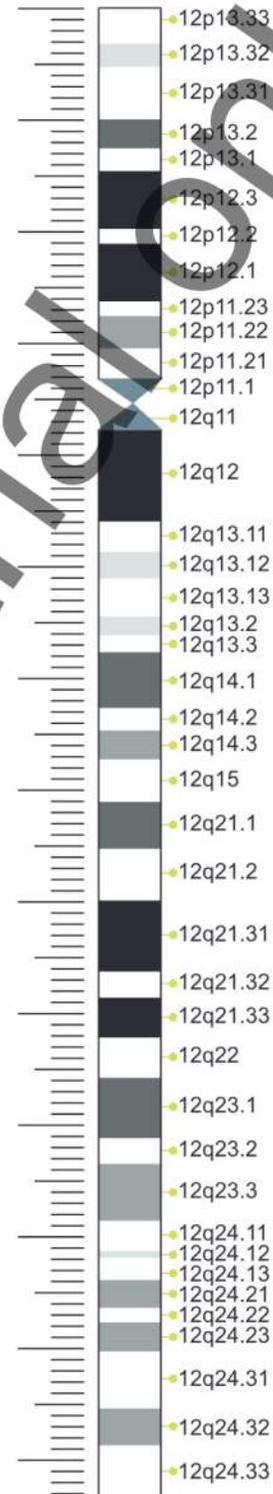
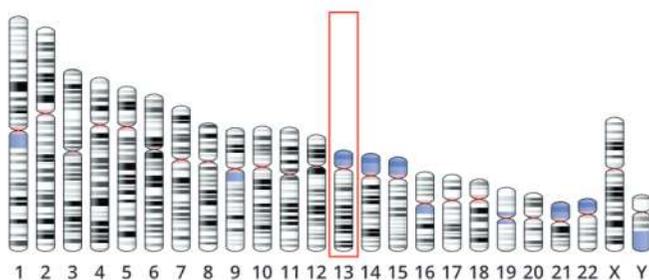


Рис. 12.16. Карта хромосомы 12 человека: 1–133 275 309 п. о. (133 275,309 кб):

А и Б — G-полосные идиограммы хромосомы (соответственно визуализация в ДНК клетки и с расположением локусов); В — идиограмма и фото хромосомы с дифференциальным окрашиванием, G- и R-бэндинг (слева и справа)

А



Доля от всего материала ДНК клетки, %	3,5 до 4,0
Пары оснований нуклеиновых кислот	114 364 328
Гены, кодирующие белки, <i>n</i>	343
Гены, не кодирующие белки, <i>n</i>	622
Псевдогены, <i>n</i>	481

В



Б

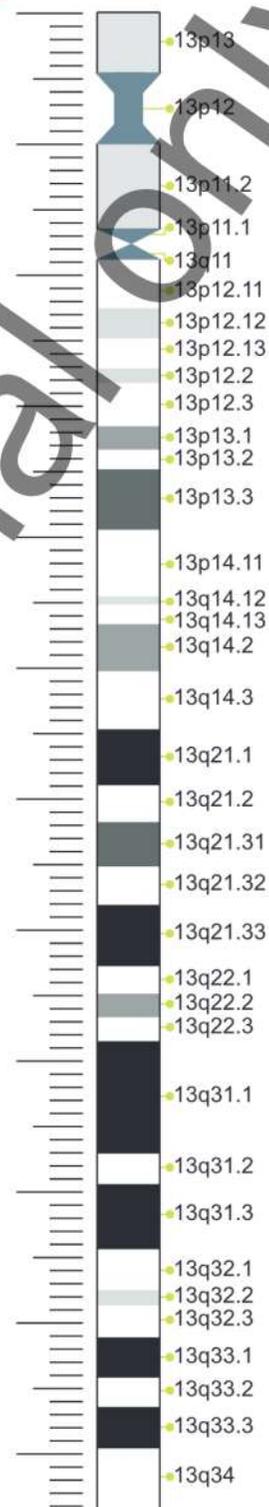
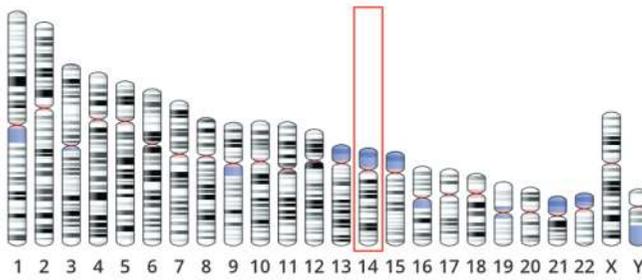


Рис. 12.77. Карта хромосомы 13 человека: 1–114 364 328 п. о. (114 364,328 кб):

А и Б — G-полосные идиограммы хромосомы (соответственно визуализация в ДНК клетки и с расположением локусов); В — идиограмма и фото хромосомы с дифференциальным окрашиванием, G- и R-бэндинг (слева и справа)

А



Доля от всего материала ДНК клетки, %	3,0 до 3,5
Пары оснований нуклеиновых кислот	107 043 718
Гены, кодирующие белки, <i>n</i>	621
Гены, не кодирующие белки, <i>n</i>	690
Псевдогены, <i>n</i>	598

В



Б

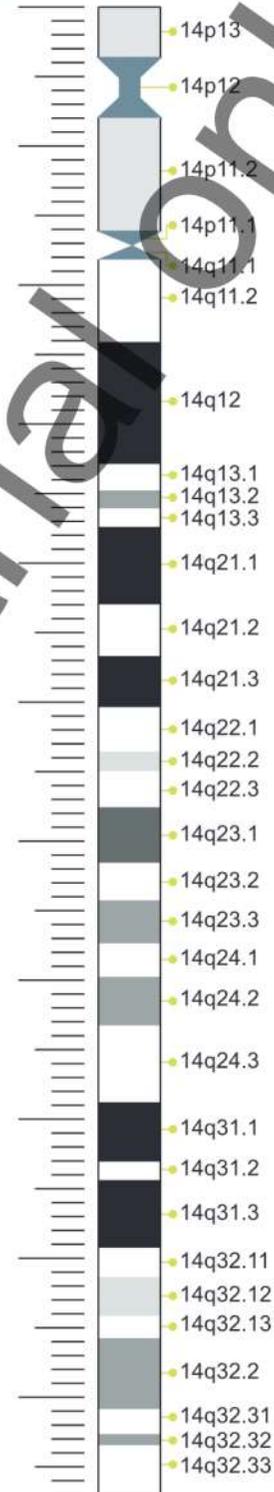
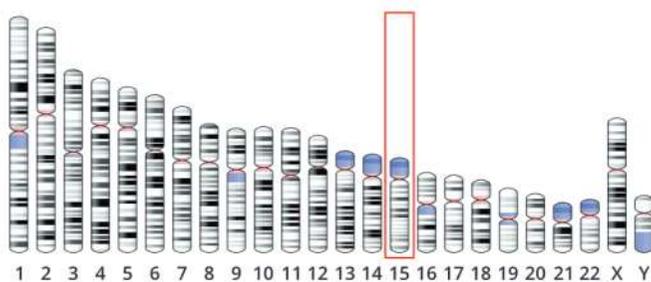


Рис. 12.18. Карта хромосомы 14 человека: 1–107 043 718 п. о. (107 043,718 кб):

А и Б — G-полосные идиограммы хромосомы (соответственно визуализация в ДНК клетки и с расположением локусов); В — идиограмма и фото хромосомы с дифференциальным окрашиванием, G- и R-бэндинг (слева и справа)

А



Доля от всего материала ДНК клетки, %	3,0 до 3,5
Пары оснований нуклеиновых кислот	101 991 189
Гены, кодирующие белки, <i>n</i>	629
Гены, не кодирующие белки, <i>n</i>	716
Псевдогены, <i>n</i>	594

Б



Б

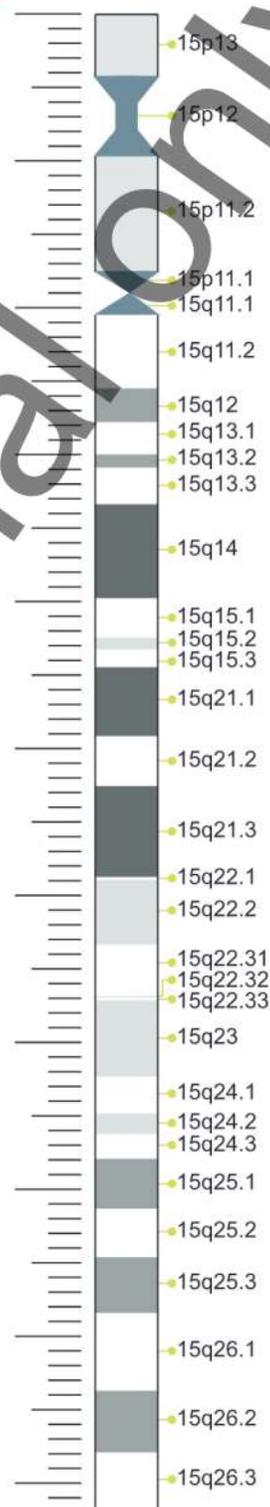
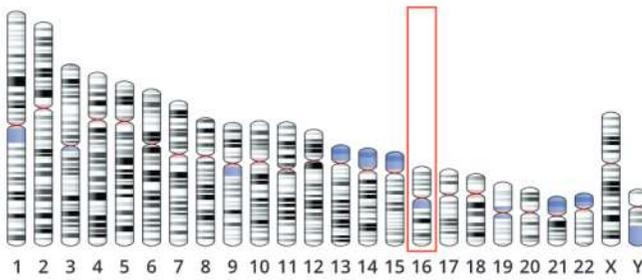


Рис. 1279. Карта хромосомы 15 человека: 1–101 991 189 п. о. (101 991,189 кб):

А и Б — G-полосные идиограммы хромосомы (соответственно визуализация в ДНК клетки и с расположением локусов); В — идиограмма и фото хромосомы с дифференциальным окрашиванием, G- и R-бэндинг (слева и справа)

А



Доля от всего материала ДНК клетки, %	до 3
Пары оснований нуклеиновых кислот	90 338 345
Гены, кодирующие белки, <i>n</i>	912
Гены, не кодирующие белки, <i>n</i>	652
Псевдогены, <i>n</i>	502

В



Б

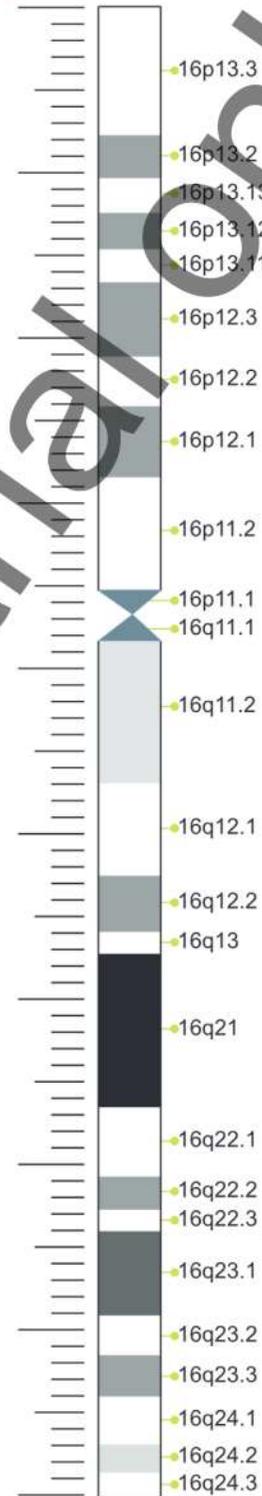
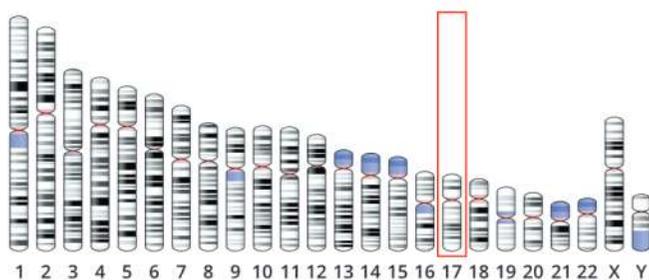


Рис. 12.20. Карта хромосомы 16 человека: 1–90 338 345 п. о. (90 338,345 кб):

А и Б — G-полосные идиограммы хромосомы (соответственно визуализация в ДНК клетки и с расположением локусов); В — идиограмма и фото хромосомы с дифференциальным окрашиванием, G- и R-бэндинг (слева и справа)

А



Доля от всего материала ДНК клетки, %	2,5 до 3,0
Пары оснований нуклеиновых кислот	83 257 441
Гены, кодирующие белки, <i>n</i>	1199
Гены, не кодирующие белки, <i>n</i>	757
Псевдогены, <i>n</i>	566

В



Б

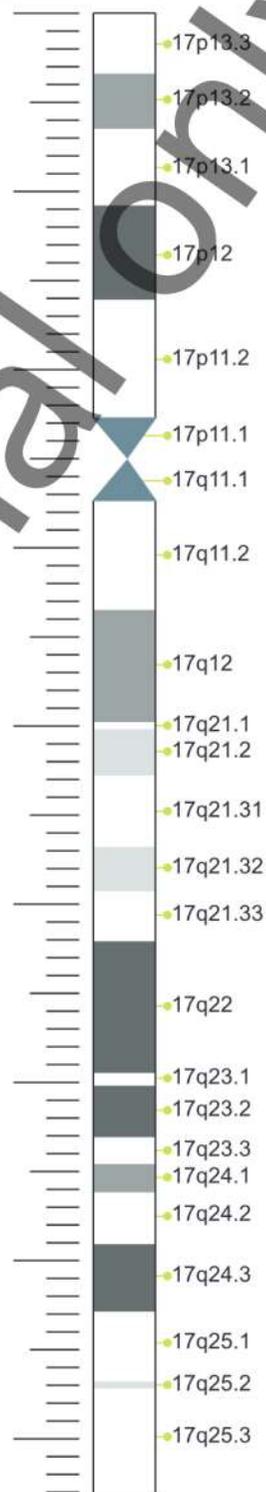
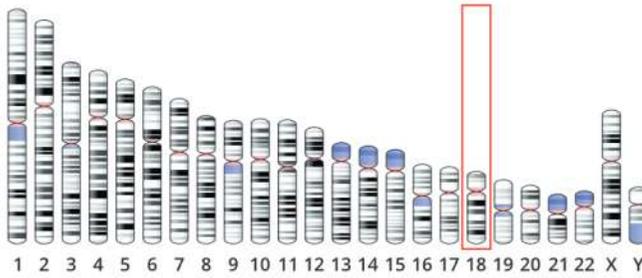


Рис. 1221. Карта хромосомы 17 человека: 1–83 257 441 п. о. (83 257,441 кб):

А и Б — G-полосные идиограммы хромосомы (соответственно визуализация в ДНК клетки и с расположением локусов); В — идиограмма и фото хромосомы с дифференциальным окрашиванием, G- и R-бэндинг (слева и справа)

А



Доля от всего материала ДНК клетки, %	до 2,5
Пары оснований нуклеиновых кислот	80 373 285
Гены, кодирующие белки, <i>n</i>	285
Гены, не кодирующие белки, <i>n</i>	432
Псевдогены, <i>n</i>	304

В



Б

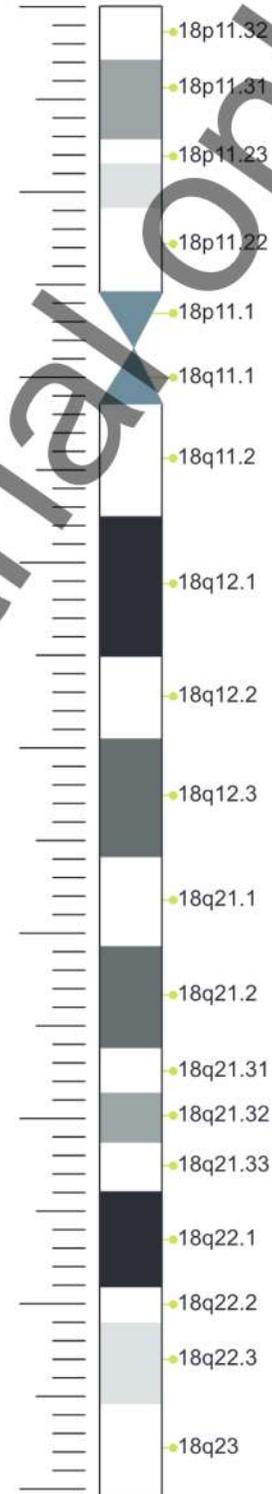
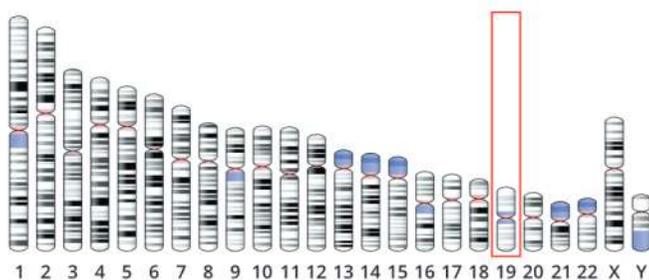


Рис. 12.22. Карта хромосомы 18 человека: 1–80 373 285 п. о. (80 373,285 кб):

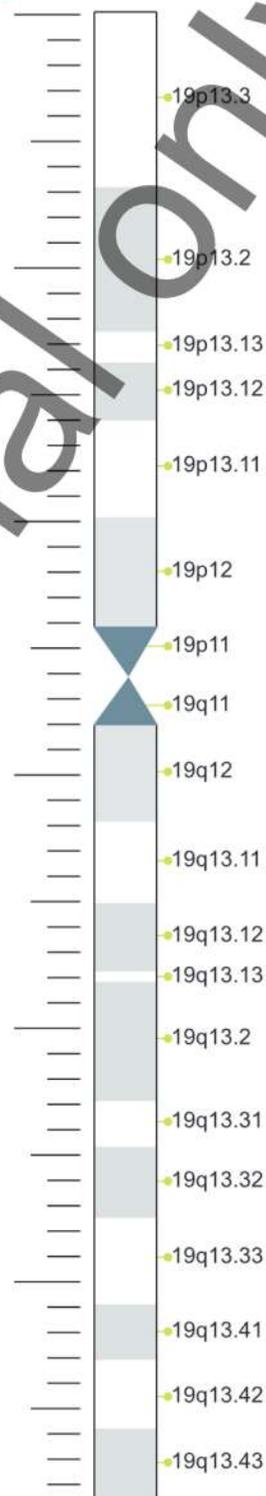
А и Б — G-полосные идиограммы хромосомы (соответственно визуализация в ДНК клетки и с расположением локусов); В — идиограмма и фото хромосомы с дифференциальным окрашиванием, G- и R-бэндинг (слева и справа)

А



Доля от всего материала ДНК клетки, %	2,0 до 2,5
Пары оснований нуклеиновых кислот	58 617 616
Гены, кодирующие белки, <i>n</i>	1430
Гены, не кодирующие белки, <i>n</i>	604
Псевдогены, <i>n</i>	528

Б



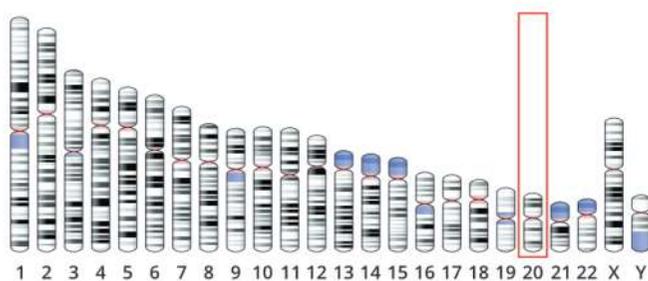
В



Рис. 12.23. Карта хромосомы 19 человека: 1–58 617 616 п. о. (58 617,616 кб):

А и Б — G-полосные идиограммы хромосомы (соответственно визуализация в ДНК клетки и с расположением локусов); В — идиограмма и фото хромосомы с дифференциальным окрашиванием, G- и R-бэндинг (слева и справа)

А



Доля от всего материала ДНК клетки, %	2,0 до 2,5
Пары оснований нуклеиновых кислот	64 444 167
Гены, кодирующие белки, <i>n</i>	555
Гены, не кодирующие белки, <i>n</i>	487
Псевдогены, <i>n</i>	383

В



Б

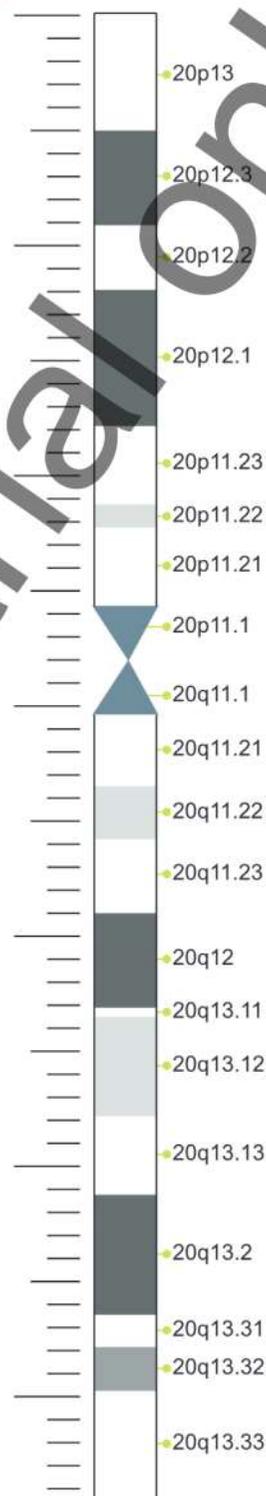
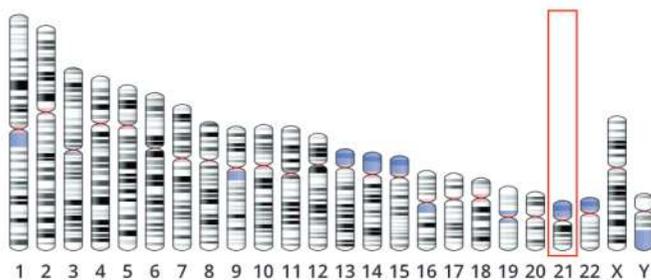


Рис. 12.24. Карта хромосомы 20 человека: 1–64 444 167 п. о. (64 444,167 кб):

А и Б — G-полосные идиограммы хромосомы (соответственно визуализация в ДНК клетки и с расположением локусов); В — идиограмма и фото хромосомы с дифференциальным окрашиванием, G- и R-бэндинг (слева и справа)

А



Доля от всего материала ДНК клетки, %	1,5
Пары оснований нуклеиновых кислот	46 709 983
Гены, кодирующие белки, <i>n</i>	256
Гены, не кодирующие белки, <i>n</i>	356
Псевдогены, <i>n</i>	207

Б



Б

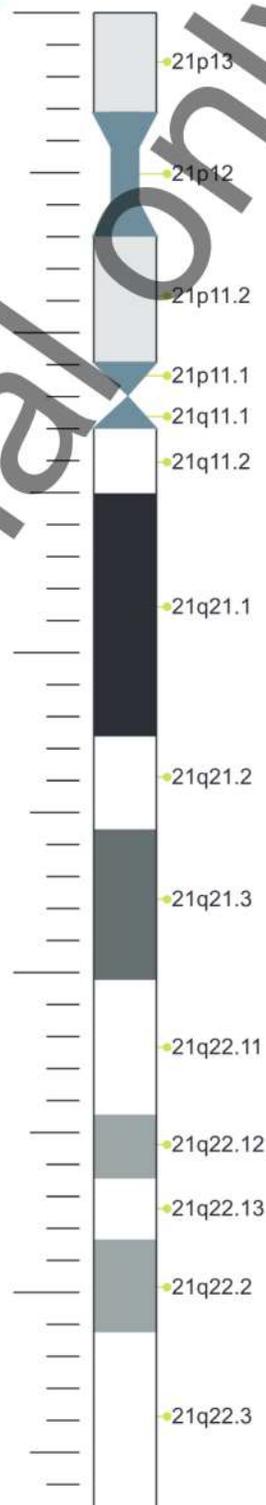
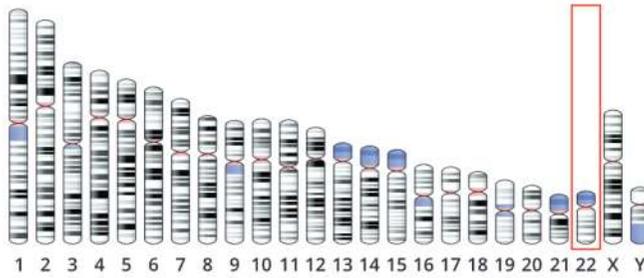


Рис. 1225. Карта хромосомы 21 человека: 1–46 709 983 п. о. (46 709,983 кб):

А и Б — G-полосные идиограммы хромосомы (соответственно визуализация в ДНК клетки и с расположением локусов); В — идиограмма и фото хромосомы с дифференциальным окрашиванием, G- и R-бэндинг (слева и справа)

А



Доля от всего материала ДНК клетки, %	1,5 до 2,0
Пары оснований нуклеиновых кислот	50 818 468
Гены, кодирующие белки, <i>n</i>	474
Гены, не кодирующие белки, <i>n</i>	392
Псевдогены, <i>n</i>	379

В



Б

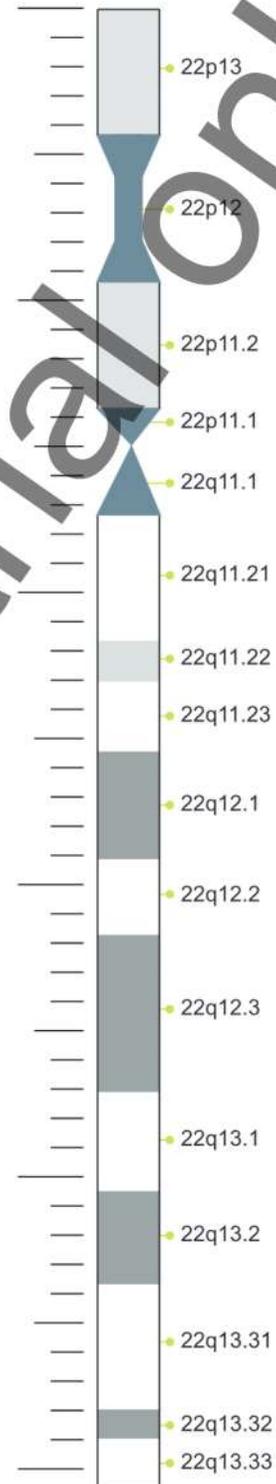
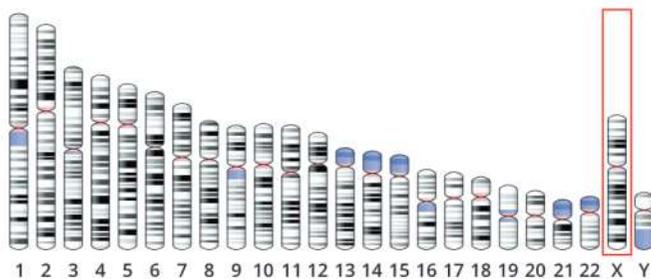


Рис. 12.26. Карта хромосомы 22 человека: 1–50 818 468 п. о. (50 818,468 кб):

А и Б — G-полосные идиограммы хромосомы (соответственно визуализация в ДНК клетки и с расположением локусов); В — идиограмма и фото хромосомы с дифференциальным окрашиванием, G- и R-бэндинг (слева и справа)

А



Доля от всего материала ДНК клетки, %	~5
Пары оснований нуклеиновых кислот	156 040 895
Гены, кодирующие белки, <i>n</i>	874
Гены, не кодирующие белки, <i>n</i>	494
Псевдогены, <i>n</i>	879

В



Б

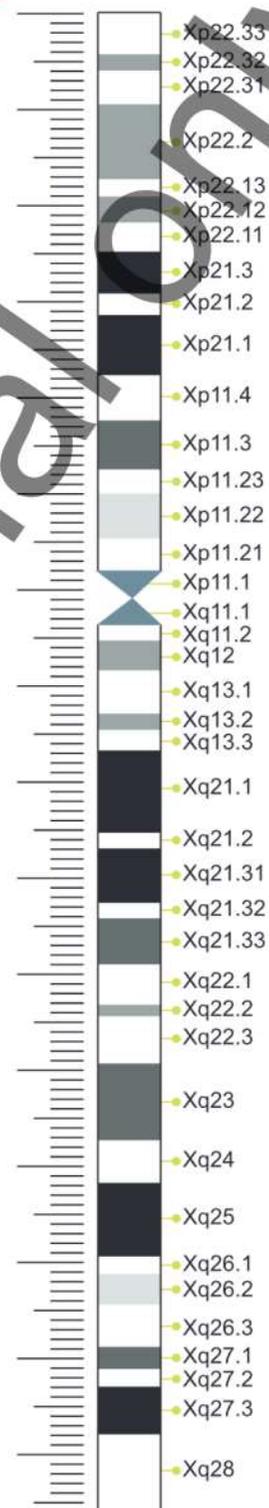
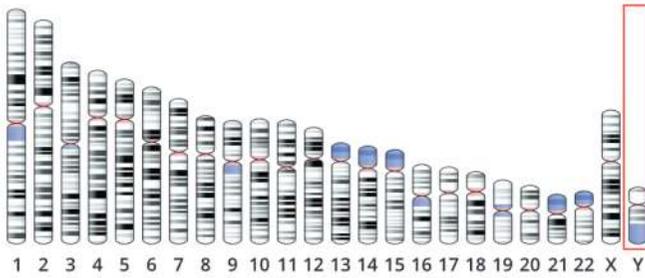


рис. 12.27. Карта хромосомы X человека: 1–156 040 895 п. о. (156 040,895 кб):

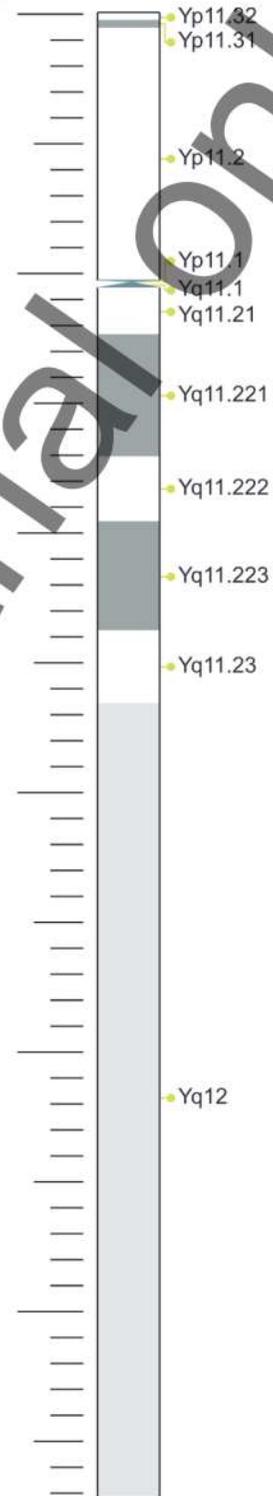
А и Б — G-полосные идиограммы хромосомы (соответственно визуализация в ДНК клетки и с расположением локусов); В — идиограмма и фото хромосомы с дифференциальным окрашиванием, G- и R-бэндинг (слева и справа)

А



Доля от всего материала ДНК клетки, %	~2
Пары оснований нуклеиновых кислот	57 227 415
Гены, кодирующие белки, <i>n</i>	73
Гены, не кодирующие белки, <i>n</i>	122
Псевдогены, <i>n</i>	400

Б



В



Рис. 12.28. Карта хромосомы Y человека: 1–57 227 415 п. н. (57 227,415 кб):

А и Б — G-полосные идиограммы хромосомы (соответственно визуализация в ДНК клетки и с расположением локусов); В — идиограмма и фото хромосомы с дифференциальным окрашиванием, G- и R-бэндинг (слева и справа)

12.3. Патологическая анатомия генома человека на примере первой хромосомы

Секвенирование самой большой хромосомы в целях изучения патологической анатомии генома человека (табл. 12.1) было самым длительным. Оно началось в 1990 г. и его основной этап закончился в 2003 г. Необходимо отметить, что к выходу этого издания в свет некоторая информация о генах, полиморфизмах генов, генных мутациях и др., а также о взаимосвязи с наследственной патологией может быть несколько изменена и дополнена.

Таблица 12.1. Патологическая анатомия генома человека на примере первой хромосомы

Локализация на хромосоме	Ген / номер в MIM	Фенотип	Тип наследования	Номер фенотипа в MIM
1p13.2	<i>TSHB</i> / 188540	<i>Hypothyroidism, congenital, nongoitrous</i> Врожденный гипотиреоз, негнойный	Аутосомно-рецессивный (АР)	275100
1p21.1	<i>COL11A1</i>	<i>Fibrochondrogenesis 1</i> Фиброхондрогенез 1		228520
1p21.2	<i>DBT</i> / 248610	<i>Marshall syndrome</i> Синдром Маршалла	Аутосомно-доминантный (АД)	154780
		<i>Stickler syndrome, type II</i> Синдром Стиклера II типа		604841
1p21.2	<i>DBT</i> / 248610	<i>Maple syrup urine disease, type II</i> Заболевание мочи с запахом кленового сиропа	АР	248600
1p31.1	<i>ACADM</i> / 607008	<i>Acyl-CoA dehydrogenase, medium chain, deficiency of</i> Недостаточность дегидрогеназы средней цепи ацил-кофермента А		201450
1p31.3	<i>RPE65</i> / 204100 <i>RPE65</i> / 613794	<i>Leber congenital amaurosis 2</i> Врожденный амовроз Лебера 2 <i>Retinitis pigmentosa 20</i> Пигментный ретинит 20		180069
1p32.1	<i>TACSTD2</i> / 137290	<i>Gelatinous drop-like corneal dystrophy</i> Желатиновая каплевидная дистрофия роговицы		20487
1p32.2	<i>C8 A</i> / 613790	<i>C8 deficiency, type I</i> Недостаточность C8 I типа		120950
	<i>C8 B</i> / 613789	<i>C8 deficiency, type II</i> Недостаточность C8 II типа		120960

Продолжение табл. 12.1

Локализация на хромосоме	Ген / номер в MIM	Фенотип	Тип наследования	Номер фенотипа в MIM
1p32.3	CPT2 / 600650	<i>Carnitine palmitoyltransferase II deficiency</i> Недостаточность карнитин-пальмитотрансферазы II	AP	600649
		<i>Carnitine palmitoyltransferase II deficiency, lethal neonatal</i> Недостаточность карнитин-пальмитотрансферазы II типа, летальные формы		608836
		<i>Carnitine palmitoyltransferase II deficiency, myopathic, stress-induced</i> Недостаточность карнитин-пальмитотрансферазы II, миопатическая, стресс-индуцируемая	АД, AP	255110
		<i>Encephalopathy, acute, Infection-induced, 4, susceptibility to</i> Энцефалопатия, острая, инфекционно-индуцированная, 4, восприимчивость к ней		614212
1p34.1-p32	PTOS1	<i>Ptosis, hereditary congenital, 1</i> Птоз наследственный врожденный, 1	АД	178300
1p34.1	UROD / 176100	<i>Porphyria, hepatoerythropoietic</i> Порфирия, гепатоэритропоэтическая	АД, AP	613521
	MUTYH / 604933	<i>Adenomas, multiple colorectal</i> Множественная колоректальная аденома	AP	608456
1p34.2	COL9A2 / 600204	<i>Epiphyseal dysplasia, multiple, 2</i> Множественная эпифизарная дисплазия 2	АД	120260
	PPT1 / 256730	<i>Ceroid lipofuscinosis, neuronal, 1</i> Нейрональный цероидный липофуциноз, 1	AP	600722
	KCNQ4 / 603537	<i>Deafness, autosomal dominant 2A</i> Тугоухость аутосомно-доминантная 2A	АД	600101

Продолжение табл. 12.1

Локализация на хромосоме	Ген / номер в MIM	Фенотип	Тип наследования	Номер фенотипа в MIM
1p34.2	<i>SLC2A1</i> / 601042	<i>Dystonia 9</i> Дистония 9	АД	138140
1p34.3	<i>GCSFR</i> / 617014	<i>Neutropenia, severe congenital, 7</i> Нейтропения я тяжелая, врожденная, 7	АР	138971
1p36.11	<i>FUCA1</i> / 230000	<i>Fucosidosis</i> Фукозидоз		612280
	<i>GALE</i> / 606953	<i>Galactose epimerase deficiency</i> <i>Galactosemia III</i> Дефицит галактозаминазы, галактоземия III типа		230350
1p36.12	<i>PINK1</i> / 608309	<i>Parkinson disease 6, early onset</i> Болезнь Паркинсона 6, раннего проявления		605909
1p36.13	<i>CLCNKB</i> / 607364	<i>Bartter syndrome, type 3</i> Синдром Барттера III типа		602023
	<i>SDHB</i> / 185470	<i>Paragangliomas 4</i> Параганглиомы 4	АД	115310
	<i>SDHB</i> / 185470	<i>Pheochromocytoma</i> Феохромоцитома	АР	171300
1p36.22	<i>MFN2</i> / 608507	<i>Charcot—Marie—Tooth disease, axonal, type 2A2</i> Нейропатия Шарко—Мари—Туса, аксональный тип 2A2	АД	609260
	<i>KIF1B</i> / 605995	<i>Charcot—Marie—Tooth disease, type 2A1</i> Нейропатия Шарко—Мари—Туса, тип 2A1		118210
	<i>PLOD1</i> / 153454	<i>Ehlers—Danlos syndrome, kyphoscoliotic type, 1</i> Синдром Элерса—Данлоса, кифосколиотического типа 1	АР	225400
	<i>MTHFR</i> / 607093	<i>Thromboembolism, susceptibility to</i> Тромбоземболия, предрасположенность к ней	АД	188050
	<i>MTHFR</i> / 607093	<i>Homocystinuria due to MTHFR deficiency</i> Гомоцистинурия, обусловленная недостаточностью <i>MTHFR</i>	АР	236250

Продолжение табл. 12.1

Локализация на хромосоме	Ген / номер в MIM	Фенотип	Тип наследования	Номер фенотипа в MIM
1p36.22	<i>UBIAD1</i> / 611632	<i>Corneal dystrophy, Schnyder type</i> Дистрофия роговицы по типу Шнайдера	АД	121800
1p36.2-p36.1	<i>GLC3B</i>	<i>Glaucoma 3, primary infantile, B</i> Глаукома 3, первичная, инфальтильная, В	АР	600975
1p36.23	<i>DJ1</i> / 602533	<i>Parkinson disease autosomal recessive early-onset</i> Болезнь Паркинсона, аутосомно-рецессивная раннего проявления		606324
1p36.31	<i>ESPN</i> / 06351	<i>Deafness, autosomal recessive</i> Глухота аутосомно-рецессивная		609006
1p36.33	<i>B3GALT6</i> / 615291	<i>Ehlers—Danlos syndrome, spondylodysplastic type 2</i> Синдром Элерса—Данлоса спондилодиспластического типа 2		615349
1q21.1	<i>HJV</i> / 608374	<i>Hemochromatosis</i> Гемахроматоз		602390
1q22	<i>GBA</i> / 606463	<i>Gaucher disease, perinatal lethal</i> Болезнь Гоше летальная		608013
		<i>Gaucher disease, type I</i> Болезнь Гоше I типа		230800
		<i>Gaucher disease, type II</i> Болезнь Гоше II типа		230900
		<i>Gaucher disease, type III</i> Болезнь Гоше III типа		231000
		<i>Gaucher disease, type IIIC</i> Болезнь Гоше IIIC типа		231005
		<i>Lewy body dementia, susceptibility to</i> Деменция с тельцами Леви, предрасположенность к ней	АД	127750
		<i>Parkinson disease, late-onset, susceptibility to</i> Болезнь Паркинсона позднего проявления	Му, IC	168600

Продолжение табл. 12.1

Локализация на хромосоме	Ген / номер в MIM	Фенотип	Тип наследования	Номер фенотипа в MIM
1q22	LMNA / 150330	<i>Charcot—Marie—Tooth disease, type 2B1</i> Болезнь Шарко—Мари—Туса, тип 2B1	AP	605588
		<i>Hutchinson—Gilford progeria</i> Синдром Хатчинсона—Гилфорда	AP, АД	176670
		<i>Lipodystrophy, familial partial, type 2</i> Липодистрофия, семейная, очаговая, тип 2	АД	151660
		<i>Muscular dystrophy, congenital</i> Мышечная дистрофия, врожденная		613205
1q23.3	MPZ / 159440	<i>Charcot—Marie—Tooth disease, dominant intermediate D</i> Болезнь Шарко—Мари—Туса, тип D		607791
		<i>Charcot—Marie—Tooth disease, type 1B</i> Болезнь Шарко—Мари—Туса, тип 1B		118200
		<i>Charcot—Marie—Tooth disease, type 2I</i> Болезнь Шарко—Мари—Туса, тип 2I		607677
		<i>Charcot—Marie—Tooth disease, type 2J</i> Болезнь Шарко—Мари—Туса, тип 2J		607736
		<i>Dejerine—Sottas disease neuropathy</i> Гипертрофическая нейропатия Дежерина—Соттаса	AP, АД	145900
		<i>Neuropathy, congenital hypomyelinating</i> Нейропатия, врожденная гипомиелинизирующая	АД	605253
		<i>Roussy—Levy syndrome</i> Синдром Русси—Леви, нейромышечное расстройство		180800

Продолжение табл. 12.1

Локализация на хромосоме	Ген / номер в MIM	Фенотип	Тип наследования	Номер фенотипа в MIM
1q24.3	MYOC / 601652	<i>Glaucoma 1A, primary open angle</i> Глаукома, первичная открытоугольная	АД	137750
1q24.2	F5 / 612309	<i>Factor V Leiden thrombophilia</i> Тромбофилия, связанная с мутацией фактора V Лейден	АД	188055
		<i>Thrombophilia due to activated protein C resistance</i> Тромбоземболия, зависящая от устойчивости к активному С-белку		188055
		<i>Factor V deficiency</i> Дефицит фактора V	AP	227400
		<i>Budd—Chiari syndrome</i> Синдром Бадда—Киари		600880
1q24.3	FMO3 / 136132	<i>Trimethylaminuria</i> Триметиламинурия		602079
1q25	RNASEL / 180435	<i>Prostate cancer 1</i> Рак предстательной железы 1	АД	601518
1q31.3	ASPM / 605481	<i>Microcephaly 5, primary, autosomal recessive</i> Первичная аутомно-рецессивная микроцефалия 5	AP	608716
1q32.1	TNNT2 / 191045	<i>Cardiomyopathy, dilated, 1D</i> Кардиомиопатия дилатационная, 1Д	АД	601494
1q32.2	IRF6 / 607199	<i>van der Woude syndrome</i> Синдром Ван-дер-Вуда		119300
	IRF6 / 607199	<i>Popliteal pterygium syndrome 1</i> Синдром подколенного птеригиума 1		119500
1p34.1	MUTYH / 604933	<i>Adenomas, multiple colorectal</i> Семейный аденоматозный полипоз	AP	608456
1q41	USH2A / 608400	<i>Usher syndrome, type 2A</i> Синдром Ашера II типа (2A)		276901
1q42.13	PSEN2 / 600759	<i>Alzheimer disease</i> Болезнь Альцгеймера	АД	606889

Окончание табл. 12.1

Локализация на хромосоме	Ген / номер в MIM	Фенотип	Тип наследования	Номер фенотипа в MIM
1q43	<i>MTR</i> / 156570	<i>Homocystinuria-megaloblastic anemia, cblG complementation type</i> Гомоцистинурия — мегалобластная анемия	АР	250940
1q44	<i>NLRP3</i> / 606416	<i>Familial cold inflammatory syndrome 1</i> Семейный холодовой аутовоспалительный синдром 1	АД	120100

Применение методов медицинской генетики

Среди всех методов медицинской генетики в клинической практике наиболее распространены методы лабораторной генетики. Их используют практически во всех областях медицины, где требуется диагностика наследственных заболеваний. В этой главе приводятся примеры применения методов лабораторной генетики в клинической практике.

Обычно достаточно только одного метода диагностики. Разные методы классической и молекулярной цитогенетики (FISH, CGH и др.), молекулярной генетики (ПЦР, секвенирование нуклеиновых кислот и др.) применяют, с одной стороны, для более точной диагностики, а с другой — для верификации уже полученных результатов.

13.1. Пренатальная диагностика

Врожденные аномалии встречаются в 20–25 % случаев перинатальной смертности. Дети, рожденные с большими или малыми врожденными пороками развития, составляют 3–5 % от всех новорожденных. При этом надо учитывать, что в зависимости от ряда причин эти цифры могут варьировать в разных популяциях.

Основной целью пренатальной диагностики является диагностика патологии плода, информированность родителей об этом и ранняя элиминация плода. При использовании всех современных методов исследования возможно предотвратить примерно в 15–20 % случаев рождение ребенка с тяжелыми врожденными пороками развития или наследственными заболеваниями.

Пренатальная диагностика использует различные методы определения состояния эмбриона/плода. Принципиально все методы пренатальной диагностики подразделяются на неинвазивные и инвазивные.

13.1.1. Неинвазивные методы пренатальной диагностики

Неинвазивные методы бывают непрямые, когда объектом исследования выступает беременная (табл. 13.1), и прямыми, при которых объект исследования — плод (табл. 13.2).

Таблица 13.1. Непрямые методы пренатальной диагностики (обследование беременной)

Метод	Предмет исследования
Биохимический	Анализ фетальных маркеров (исследование сыворотки крови/белков): <ol style="list-style-type: none"> 1) материнского сывороточного на α-фетопротеин; 2) хорионический гонадотропин; 3) неконъюгированный эстриол; 4) ассоциированный с беременностью белок А плазмы (pregnancy-associated plasma protein A, PAPPА)
Медико-генетический	<ul style="list-style-type: none"> • Генеалогический анализ родословной. • Цитогенетическое и молекулярно-цитогенетическое обследование. • Молекулярно-генетическое обследование

Таблица 13.2. Прямые методы пренатальной диагностики (обследование плода)

Метод	Вид исследования
Неинвазивный	<p>Лучевая диагностика:</p> <ul style="list-style-type: none"> • ультразвуковое сканирование; • электрокардиография; • рентгенография <p>Лабораторные анализы:</p> <ul style="list-style-type: none"> • биохимический; • цитогенетический и молекулярно-цитогенетический; • молекулярно-генетический; • иммунологический; • иммунногистохимический
Инвазивный (получение плодного материала)	<p>Диагностические процедуры:</p> <ul style="list-style-type: none"> • амниоцентез; • кордоцентез; • биопсия хориона; • биопсия органов плода с последующим лабораторным исследованием полученного материала методами, соответствующими конкретным целям пренатального исследования; • амниоскопия; • фетоскопия

К неинвазивным методам относят:

- ультразвуковое исследование (сканирование);
- иммунорадиологический и иммуноферментный анализ факторов материнской сыворотки крови.

Используют также:

- *целомоцентез* — смыв клеток цервикального канала беременной;
- выделение клеток плода из крови матери (клетки, прошедшие через плацентарный барьер, циркулируют в кровотоке беременной как в норме, так и при различной патологии).

Неинвазивные тесты, такие как биохимические методы и ультразвук, предусмотрены для всех беременных независимо от возраста или состояния здоровья. В целях выявления лиц с повышенным риском возникновения определенной врожденной патологии проводят систематическое тестирование. Достоверность пренатального теста оценивается на основании его чувствительности и риска ложноположительных показателей.

Критериями проведения скрининга являются:

- уже известная патология с определенной частотой встречаемости в популяции;
- безопасность и доступность теста с четко определенными возможностями.

Пренатальная диагностика используется для выявления наследственных болезней трех основных групп:

- 1) хромосомных болезней с изменением числа и структуры хромосом;
- 2) моногенных заболеваний, вызванных индивидуальными мутациями гена;
- 3) полигенных/многофакторных заболеваний, вызванных мутациями в нескольких генетических областях с вовлеченными экзогенными факторами.

Наиболее распространенными причинами для проведения цитогенетического, молекулярно-цитогенетического и молекулярно-генетического анализа плода являются:

- возраст матери: вероятность хромосомной аномалии возрастает с возрастом матери. Около половины хромосомных аномалий являются трисомией 21 (синдром Дауна);
- выявление патологии после ультразвукового исследования, что обычно свидетельствует о хромосомных аномалиях;
- семейные особенности, когда один из родителей несет стабильную аберрацию хромосомного типа (делецию, сбалансированную транслокацию, инверсию, инсерцию или маркерную хромосому) или генную/точковую мутацию. Это увеличивает риск серьезной патологии. Отмечено, что большую роль в этом играет возраст матери;
- уже родившийся ребенок с хромосомными аномалиями. Например, после рождения ребенка с трисомией риск числовых хромосомных аномалий увеличился на 1 % для каждого последующего ребенка в семье по сравнению с другими родителями того же возраста.

13.1.2. Инвазивные методы пренатальной диагностики

13.1.2.1. Амниоцентез

Амниоцентез — это процедура пункции амниотической полости с целью аспирации амниотической жидкости. Производится трансабдоминальным или трансвагинальным способом (пункцируется передний свод влагалища). Амниоцентез обычно проводится под ультразвукографическим контролем между 15-й и 17-й неделями беременности. Обычно аспирируют около 15 мл амниотической жидкости. При хромосомном анализе требуется проведение культивирования клеток в среднем до двух недель. Метафазные хромосомы подвергаются численному и структурному анализу. Остаток амниотической жидкости может использоваться для определения уровней *альфа-фетопroteина* (АФП), который присутствует в повышенных концентрациях при дефектах нервной трубки и других расстройствах, таких как дефекты брюшной стенки (например, *гастрошизис*). При повышенном уровне АФП *ацетилхолинэстераза* измеряется как маркер дефектов нервной трубки.

Амниоцентез можно также использовать на некультуральной амниотической жидкости в сочетании с традиционным цитогенетическим анализом. Используя FISH-анализ с хромосомными зондами на межфазных ядрах или посредством молекулярно-генетического анализа высокополиморфных маркеров на ДНК-зонде, изолированном от некультурных амниотических клеток, можно получить информацию о числовых аномалиях хромосом 13, 18 и 21, X- и Y-хромосом.

Этот тест позволяет обнаруживать в сжатые сроки (1–3 дня) самые распространенные хромосомные аномалии. Он имеет особое значение при обнаружении морфологических аномалий, потенциально связанных с вышеуказанными состояниями, и для постановки быстрого диагноза на поздней стадии беременности.

13.1.2.2. Биопсия хориона

Забор ворсинок хориона обычно проводится на 11–12-й неделе беременности. Биопсию ворсинок хориона нельзя проводить до 11-й недели, что связано с повышенным риском травмы у плода (аномалии конечностей, сосудистый инфаркт и др.). В зависимости от места плаценты биопсия может выполняться либо трансцервикально, либо трансабдоминально. При аккуратном взятии биопсии риск индивидуального выкидыша — менее 1 %.

Хромосомный анализ проводят либо в виде прямого препарата, либо после краткого культивирования (приблизительно 24 ч), а также после полноценного культивирования клеток (от 7 до 10 дней).

13.1.2.3. Кордоцентез

Кордоцентез — это процедура пункции вены пуповины для получения плодной крови. В настоящее время является наиболее актуальным методом пренатальной диагностики.

Чаще всего кордоцентез применяют после 18 недель беременности. Метод важен, когда необходимо получить быстрый результат в конце беременности, например,

при ультразвуковой диагностике аномалий или серьезного ограничения роста плода, что может указывать на хромосомную аномалию. Результат хромосомного анализа лимфоцитов из пуповинной крови может быть доступен через три-пять дней.

Риск осложнений после кордоцентеза колеблется от 1,5 до 2,5 %. Основным осложнением является продолжительное кровотечение из прокола вены пуповины, вследствие чего развивается внутриутробная анемия и гипоксия плода, что в ряде случаев может привести к его гибели. В различные сроки беременности допускается аспирация от 0,5 до 5 мл крови плода.

13.1.3. Ограничения пренатальной диагностики

Пренатальное обследование методами классической цитогенетики (G-бэндинг) и молекулярной цитогенетики (FISH, CGH) является надежной процедурой, но, как и все тесты, ограничивается факторами, которые могут быть техническими или биологическими [Кузнецова Т. В. и др., 2019].

Сбой в проведении анализа возможен:

- на этапе культивирования клеток;
- при микроскопическом анализе хромосом. Структурная хромосомная аномалия может быть не выявлена из-за возможностей метода;
- в случае мозаичной формы мутации, где могут присутствовать две клеточные линии или более;
- определенные структурные аномалии, такие как транслокация или инверсия, часто требуют дальнейшего изучения.

Обычно при пренатальной диагностике не ограничиваются одним методом, а используют разные методы — цитогенетические, молекулярно-цитогенетические и молекулярно-генетические. Это делается, с одной стороны, для собственно диагностики, а с другой — для верификации уже полученных результатов.

13.2. Преимплантационная диагностика

Преимплантационная диагностика — это метод диагностики изолированных генных и хромосомных дефектов в ооцитах, сперматозоидах и эмбрионах, а также определения пола эмбриона при сцепленных с полом наследственных заболеваниях.

Преимплантационная диагностика разработана для тестирования генома женщин и мужчин, имеющих высокий риск рождения детей с наследственной патологией, как альтернативный метод пренатальной диагностики.

Исследования могут быть проведены на полярных тельцах ооцитов и/или биоптате бластомера эмбриона.

Показания к преимплантационной диагностике — это риск рождения детей с мутацией любого типа, которая может быть причиной высокого риска возникновения генетических болезней.

Проводят скрининг анеуплоидий и других мутаций, который рекомендован в случаях:

- неоднократных неудачных попыток применения методов *вспомогательных репродуктивных технологий* в анамнезе при наличии на момент переноса более двух эмбрионов высокого качества;
- более двух выкидышей ранних сроков;
- нарушения сперматогенеза;
- возраста женщины более 35 лет;
- числовых и структурных аномалий кариотипа.

13.2.1. **Вспомогательные репродуктивные технологии**

Методы преодоления бесплодия, при которых отдельные или все этапы зачатия и раннего развития эмбрионов осуществляются вне организма женщины, называются вспомогательными репродуктивными технологиями. Они включают: *экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО)*, *микроманипуляционные* методы (инъекция сперматозоида в цитоплазму ооцита, рассечение оболочки эмбриона — хетчинг), *донорство* (спермы, ооцитов, эмбрионов), *перенос гамет и эмбрионов в маточную трубу, суррогатное материнство, криоконсервацию* (гамет, эмбрионов, ткани яичника), *искусственную инсеминацию*.

Проведение вспомогательных репродуктивных технологий как медицинских услуг возможно только по медицинским показаниям, при отсутствии противопоказаний и наличии письменного информированного согласия пациентов.

13.2.1.1. **Экстракорпоральное оплодотворение**

Экстракорпоральное оплодотворение включает в себя:

- индукцию суперовуляции;
- пункцию фолликулов и получение ооцитов;
- инсеминацию ооцитов и культивирование эмбрионов;
- перенос эмбрионов в полость матки;
- поддержку лютеиновой фазы после переноса эмбрионов в полость матки;
- диагностику беременности ранних сроков.

Проведение ЭКО возможно с использованием индукции суперовуляции в естественном менструальном цикле.

13.2.1.2. **Микроманипуляционные методы**

Достичь высокой эффективности лечения бесплодия позволил метод ИКСИ (*ICSI: IntraCytoplasmic Sperm Injection* — интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида), при котором сперматозоид вводят в цитоплазму ооцита. Манипуляция ИКСИ выполняется на лабораторном этапе ЭКО и проводится с использованием инвертированного микроскопа и микроманипуляторов.

Показаниями к ИКСИ являются:

- патозооспермия;
- отсутствие оплодотворения *in vitro* в предшествующих процедурах ЭКО;
- неудовлетворительное оплодотворение в предыдущих попытках ЭКО (частота оплодотворения — менее 50 %);
- возраст пациентки — более 40 лет;
- количество ооцитов ≤ 4 ;
- две предыдущие неудачные попытки и более;
- иммунологическое бесплодие (МАР-тест — более 50 %).

13.2.1.3. Донорство гамет и эмбрионов

Доноры гамет — это лица, которые предоставляют свои гаметы (сперму, ооциты) другим лицам для преодоления бесплодия и отказываются от родительских прав и обязанностей по отношению к будущему ребенку. Возможна криоконсервация нормальных половых клеток и эмбрионов на длительный срок.

13.2.1.4. Криоконсервация гамет и эмбрионов

Криоконсервация спермы и эмбрионов пациентов проводится только при наличии их письменного заявления — информированного согласия.

13.2.1.5. Перенос гамет и эмбрионов в фаллопиеву трубу

В настоящее время используются редко. Обязательным условием для применения этих методов является наличие хотя бы одной функционально полноценной маточной трубы. Перенос гамет, зигот или эмбрионов в фаллопиеву трубу может быть выполнен трансабдоминально при лапароскопии или трансцервикально под ультразвуковым контролем.

13.2.1.6. Суррогатное материнство

Суррогатная мать — это женщина, у которой беременность наступила после переноса эмбриона, полученного в результате оплодотворения ооцитов третьей стороны спермой третьей стороны. Супружеская пара, которым принадлежит эмбрион, и «суррогатная» мать дают информированное согласие на участие в программе и заключают договор с медицинским центром о проведении медицинской услуги.

13.2.1.7. Искусственная инсеминация спермой мужа/донора

Искусственная инсеминация (ИИ) может быть проведена путем введения спермы во влагалище, цервикальный канал, полость матки. Процедуру выполняют как в естественном менструальном цикле, так и с применением индукторов овуляции. Обязательным условием для применения ИИ является наличие хотя бы одной функционально полноценной маточной трубы. Показаниями для проведения этой процедуры служат мужское бесплодие, неблагоприятный медико-генетический прогноз, отсутствие полового партнера.

13.3. Постнатальная диагностика у детей

13.3.1. Подтверждение клинического диагноза у новорожденных

При рождении детей с явными аномалиями развития (при подозрении на наличие хромосомной патологии) врачам акушерам-гинекологам, неонатологам, педиатрам рекомендуется провести забор крови у новорожденного для цитогенетического или молекулярно-цитогенетического анализа [Nielsen J., Wohler M., 1991]. Обычно в таких случаях выявляют геномную или хромосомную мутацию, реже генную. Используют такие методы, как G-бэндинг, разновидности FISH и CGH.

К наиболее часто диагностируемым хромосомным болезням относятся синдромы Дауна, Клайнфельтера, Шершевского—Тернера и др. Очень важно выявление мозаичных форм синдромов.

Также существует программа неонатального скрининга новорожденных в первые четверо суток после рождения. Это обследование позволяет провести раннюю диагностику пяти наследственных болезней обмена веществ. По рекомендации ВОЗ скрининг новорожденных включен в перечень обязательных медицинских тестов для малышей. По показаниям могут быть применены методы селективного скрининга с использованием цитогенетики, молекулярной цитогенетики, молекулярной генетики, биохимии и др.

В нашей стране обязательный неонатальный скрининг включает диагностику следующих заболеваний: *гипотиреоз* (патология щитовидной железы), *андрогенитальный синдром* (патология коры надпочечников), *муковисцидоз*, *фенилкетонурия*, *галактоземия* (болезни обмена). При ранней диагностике этих патологий возможно значительно облегчить последствия заболевания при назначении патогенетической терапии.

Однако список патологий, которые можно определить при скрининге, намного шире, и при желании родители могут провести дополнительные тесты.

13.3.2. Диагностика наследственных заболеваний и пороков развития у детей

Есть множество наследственных заболеваний, которые проявляются не сразу, а с возрастом [Воробцова И. Е. и др., 2000]. Для выявления генетической причины недуга используют методы классической и молекулярной цитогенетики и молекулярной генетики. Далее, в главе 14, представлены данные о генах, мутации в которых являются основной причиной наследственных заболеваний. Диагностика этих заболеваний возможна только с использованием различных модификаций методов лабораторной генетики. Кроме того, применение этих новейших технологий в сочетании с методами кариотипирования позволяет выявлять новые нозологические формы наследственной патологии. Ниже приведены примеры использования разных методов для более точной диагностики заболевания у детей.

Группой авторов [Колотий А.Д. и др., 2013] был представлен оригинальный алгоритм анализа aberrаций хромосом у детей с недифференцированными формами умственной отсталости, задержкой развития, пороками и/или малыми аномалиями развития. При проведении цитогенетического исследования методами дифференциального окрашивания хромосомная патология у этих детей не была выявлена (табл. 13.3). Данные случаи сложны для цитогенетической диагностики, поскольку могут быть связаны с микроаномалиями кариотипа, выявление которых возможно только на хромосомах высокого разрешения с применением молекулярно-цитогенетических методов исследования. Применение методов FISH, MCB и aCGH позволило выявить микроаномалии кариотипа и определить этиологические причины умственной отсталости, задержки и аномалий развития у всех детей.

Таблица 13.3. Aberrации хромосом, выявленные у детей с недифференцированной умственной отсталостью (цит. по [Колотий А.Д. и др., 2013])

№ случая	Первичное кариотипирование	Молекулярно-цитогенетическая диагностика	Метод диагностики
1	46,XX	46,XX,del(20)(q11.23q13.11)	FISH
2		46,XX,del(1)(p31.2p22.2)	MCB
3		46,XX,del(9)(q22.33q31.2)	
4		46,XX,del(4)(q27q31.1)	FISH, MCB
5		46,XY,del(4)(p16.1)	FISH
6		46,XX,del(2)(q37.3)	
7		46,XX,del(9)(p22.3)	
8		46,XX,del(18)(q21.2q21.32),inv(8)(p11.21q11.2)	aCGH, MCB
9		46,Y,dup(X)(q28)	FISH
10		46,XX,der(4)t(4;14)(q31.3;q24.3) mat	FISH с WCP-зондами
11		46,XX,der(1)t(1;16)(q44;p13.12) pat	aCGH
12		46,XX,der(6)t(6;12)(q25.3;q24.2) pat	FISH с WCP-зондами
13	46,XX,4p+	46,XX,t(4;6)(p16.3;p23),del(4)(p16.3)	CGH, FISH

Сокращения: aCGH — микроматричная сравнительная геномная гибридизация; FISH — флюоресцентная гибридизация *in situ*; wcp (Whole Chromosome Painting) — «пейнтинговая» ДНК-проба для окрашивания гомологичных хромосом; MCB — метод многоцветного окрашивания хромосом.

Другой пример — это молекулярно-цитогенетическое подтверждение синдромов аутистических расстройств [Ворсанова С.Г. и др., 2014]. Одним из них является синдром Ретта (*Rett Syndrome*, MIM 312750) — орфанное психическое заболевание (частота: 1 : 10 000–1 : 15 000), связанное с нарушением развития центральной нервной системы. Этиология заболевания связана с мутациями в гене *MECP2* (*methyl-CpG binding*

protein 2, локализация: Xq28). Белок **MECP2** играет ключевую роль в эпигенетической регуляции активности генов центральной нервной системы. Помимо гена **MECP2** выявлены мутации и в других генах: **FOXG1** (*forkhead boxprotein G1*, локализация: 14q12), **CDKL5** (*cycline-dependentkinase-like 5*, локализация: Xp22.13) в 28 % случаев.

Методы прямого секвенирования гена **MECP2** позволяют выявить точковые мутации примерно до 90 % больных с классической картиной и до 60 % — с атипичной картиной этого синдрома. Молекулярные причины болезни остаются неизвестными у 10–20 % больных с классическими и у 40 % — с атипичными формами синдрома Ретта. Также методом полногеномного сканирования (aCGH) проведено молекулярное кариотипирование 33 девочек с синдромом Ретта, у которых не обнаружено мутаций гена **MECP2**, но клинические проявления соответствовали критериям различных форм этого синдрома. У них выявлены микроделеции в участке q28 хромосомы X, захватывающие в основном целиком ген **MECP2**, а также прилегающие к нему последовательности ДНК за границами этого гена. В ходе проведенного молекулярно-цитогенетического исследования были подтверждены ранее опровергнутые молекулярно-генетическими методами клинические диагнозы синдрома Ретта у девочек с геномными делециями в участке Xq28. При этом у девочек с клиническим диагнозом этого синдрома и полными делециями гена **MECP2** наблюдается особый подтип заболевания, проявляющийся в виде клинически более легких, чем при классическом варианте, форм болезни.

Классическими синдромами с повышенной ломкостью хромосом являются: атаксия-телеангиэктазия (*ataxia telangiectasia*), или синдром Луи-Бар (MIM 208900), синдром Блума (*Bloom*, MIM 210900), анемия Фанкони (*Fanconi*, MIM 603467), синдром Ниймеген (*Nijmegen*, MIM 251260), синдром Робертса (*Roberts*, MIM 268300), синдром Вернера (*Werner*, MIM 277700), ICF-синдром (*Immunodeficiency, Centromeric instability, and Facial abnormalities*, MIM 242860, MIM 614069) и мозаичная смешанная анеусомия (*Mosaic Variegated Aneuploidy [MVA] syndrome*, MIM 257300). Для диагностики атаксии-телеангиэктазия, синдрома Блума и анемии Фанкони проводят кластогенные исследования (т. е. исследования с применением кластогенных агентов, вызывающих разрывы хромосом, для определения уровня индуцированных хромосомных aberrаций) с использованием в том числе и СХО (сестринские хроматидные обмены) анализа. Для диагностики синдрома Робертса и ICF-синдрома используют дифференциальную окраску хромосом.

13.4. Диагностика и ведение больных с онкологическими заболеваниями

Проблема ранней диагностики онкопатологии является одной из важнейших задач современной медицины и биологии. Известно, что канцерогенез (лат. *cancerogenesis*;

cancer — рак + др.-греч. γένεσις — зарождение, развитие) — сложный многоэтапный патофизиологический процесс зарождения и развития опухоли. Иначе этот термин еще называют онкогенезом. Основными генетическими аспектами канцерогенеза являются нарушения в контроле деления, роста и дифференцировки клеток.

Ключевыми генами, контролирующими пролиферацию клеток организма, являются:

- *протоонкогены* — стимулируют пролиферацию клеток. Превращение протоонкогена в онкоген (ген, определяющий опухолевые свойства клеток) в результате мутации является одним из механизмов возникновения опухолевых клеток;
- *гены-супрессоры* — подавляют пролиферацию клеток. Инактивация генов-супрессоров ведет к развитию некоторых онкологических заболеваний;
- *гены, контролирующие клеточный цикл.*

Показано, что с момента возникновения первой опухолевой клетки до развития клинически диагностируемой злокачественной опухоли может пройти, по разным данным, от нескольких месяцев до двух десятков лет. На модели развития рака молочной железы (РМЖ) показана «естественная история роста» (т. е. время от гипотетической раковой клетки до смерти больного). Согласно этой модели, РМЖ начинается от первой гипотетической клетки и завершается после увеличения объема опухоли в 40 раз. При этом клеточная популяция достигает численности 10^{13} , а опухолевая масса — 1 кг. Более $\frac{3}{4}$ этого периода (от первой клетки до 109 клеток или 1 см³ объема) приходится на доклинический этап и только $\frac{1}{4}$ — на клинический [Моисеенко В. М., 2002].

Таким образом, какой бы «ранней» ни была злокачественная опухоль с клинической точки зрения, с биологической точки зрения она будет «поздней», т. к. существует уже в течение длительного времени. Продолжительность же «естественной истории развития» опухоли в каждом конкретном случае определяется скоростью ее роста. При этом необходимо также учитывать, как и когда начинается метастазирование. Поэтому актуальным представляется изучение не только клинически впервые диагностированных злокачественных патологий, но и начальных, молекулярно-генетических этапов их возникновения.

Опухоль — это образование, состоящее из патологически разросшейся ткани, которая состоит из опухолевых клеток. Эти клетки обладают свойствами, не характерными для клеток организма, такими как бесконтрольный интенсивный рост, автономность по отношению к организму хозяина, нетипичное строение, способность к метастазированию и др. Различают *доброкачественные* и *злокачественные* новообразования.

Генетические нарушения в опухолевых клетках распределены неравномерно по всему геному. Выделяют опухоли, происходящие из *полипотентных*, *плюрипотентных* и *дифференцированных клеток* (из них и образуется большинство опухолей у взрослых). Специфические хромосомы, локусы хромосом или генные мутации участвуют в различной неоплазии [Hao D. et al., 2016].

Злокачественные опухоли классифицируют на *системные* и *солидные*. В первом случае поражается весь организм и опухоль не имеет конкретной локализации. К системным опухолям относятся онкологические процессы в системе крови

и кроветворения (онкогематологические заболевания). Солитарное новообразование — это опухоль с конкретной локализацией, причем она может быть расположена в одном органе (*солитарная*) или одновременно в нескольких (*множественная*).

Кроме того, среди злокачественных опухолей различают *первичные* (первоначально возникшие в данном органе или ткани) и *вторичные* (метастатические, «отсевы первичных опухолей» другой локализации).

В случае одновременного появления однотипной опухоли в разных локализациях говорят о *первично-множественной опухоли*. Если очаги роста находятся в одном органе, то это *систематизированные первично-множественные опухоли*, если в парных органах — *корреспондирующие опухоли*. Если же новообразования располагаются в совершенно разных органах, то такие опухоли называются несистематизированными. Выявленные в срок до 6 мес. множественные опухоли получили название *синхронных*, свыше 6 мес. — *метахронных*.

Все опухоли, как доброкачественные, так и злокачественные, бывают *эпителиальными* и *неэпителиальными* в зависимости от источника их происхождения.

В онкологии важно учитывать, что любая онкопатология может быть *спорадической* или *наследственной*. В различных популяциях наследственные формы злокачественных новообразований могут составить примерно 5–10 % от общего числа больных [Имянитов Е.Н., 2010].

Ниже будут рассмотрены некоторые примеры генетической диагностики *системных* и *солитарных* опухолей.

13.4.1. Диагностика онкогематологических заболеваний

Опухоли лимфатической системы (лимфопролиферативные заболевания) разделяют по месту первичного возникновения на две большие группы. Первично возникающие в костном мозге обозначаются термином «лейкоз», возникающие в лимфоидной ткани, расположенной вне костного мозга, — термином «лимфома» (злокачественная лимфома).

Первой типичной хромосомной мутацией, обнаруженной в опухолевых клетках человека, была *филадельфийская хромосома (Ph'-хромосома)*, характерная для хронического миелолейкоза в 95 % случаев. Это результат реципрокной транслокации между хромосомами 9 и 22 [Soverini S. et al., 2019]. Данное открытие привело к созданию эталонного образца патогенеза злокачественного новообразования.

Диагноз различных заболеваний лимфатической системы базируется на морфологических, иммунологических, цитогенетических, молекулярно-цитогенетических и молекулярно-генетических характеристиках клеток этой системы*. Стандартное

* Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 2006; <https://molecularcytogenetics.biomedcentral.com/>; https://www.e-c-a.eu/files/downloads/Guidelines/Specific_Constitutional_Guidelines_NL30.pdf; Association for Clinical Cytogenetics. URL: <http://www.cytogenetics.org.uk>; http://www.agnc.org.uk/media/986340/agreed_acc_council_minutes_02_june_2009.pdf

цитогенетическое исследование является необходимым компонентом диагностических процедур у пациента [Riggins G.J., 2001; Mitelman F. et al., 2018; Мамвеева Е.А. и др., 2012]. Для определения кариотипа достоверным считается только исследование как минимум 20 метафаз. Аномалии в кариотипе могут устанавливаться на основании анализа клеток как периферической крови, так и костного мозга. При неудавшемся цитогенетическом исследовании с дифференциальным окрашиванием (G-бэндинг) используют FISH-метод. Далее устанавливают молекулярно-генетические особенности патологии. Определение тех или иных аномалий генома методами лабораторной диагностики на ранних этапах обследования больного может определить терапевтическую тактику лечения.

13.4.1.1. Острый лимфобластный лейкоз

МКБ-10: C91

Это гетерогенная группа клональных заболеваний системы крови, возникающих вследствие мутации в Т- или В-клетках. Острый лимфобластный лейкоз (*acute lymphoblastic leukemia*) составляет около 25 % случаев всех злокачественных опухолей у больных в возрасте до 18 лет и является самым частым онкологическим заболеванием детского возраста. Пик заболеваемости острым лимфобластным лейкозом приходится на дошкольный возраст (2–5 лет при медиане 4,7 года). Несколько чаще болеют мальчики — 1,4 : 1.

Цитогенетическое исследование лейкоэмических клеток должно включать в себя кариотипирование и исследование методом FISH для выявления характерных перестроек. Также обязательно проводится диагностика молекулярно-генетическими и другими методами. Из множества мутаций, выявленных при этой патологии, в настоящее время лишь две транслокации однозначно имеют клиническое значение — $t(9;22)(q34;q11)$ и $t(4;11)(q21;q23)$ у детей младше года (табл. 13.4).

Таблица 13.4. Аберрации хромосом и вовлеченные гены при остром лимфобластном лейкозе

Тип острого лимфобластного лейкоза	Локализация аберрации хромосом	Ген	Частота встречаемости, %
В-клеточный	$t(9;22)(q34;q11)$	<i>BCR ABL</i>	Взрослые: 30 Дети: 3
	$t(12;21)(p33;q22)$	<i>TEL AML1</i>	Взрослые: < 1 Дети: 20
	$t(4;11)(q21;q23)$	<i>MLL AF4</i>	Взрослые: 5 Дети младшего возраста: 60
	$t(1;19)(q23;p33)$	<i>E2A PBX1</i>	Взрослые: 5
	$t(8;14)(q24;q32)$	<i>c-MYC IgH</i>	1

Окончание табл. 13.4

Тип острого лимфобластного лейкоза	Локализация aberrации хромосом	Ген	Частота встречаемости, %
В-клеточный	t(17;19)(q22;p33)	<i>E2A HLF</i>	< 1
	t(11;19)(q23;p33)	<i>MLL ENL</i>	< 1
	Мутации JAK1/2/3	<i>JAK1/2/3</i>	10
Т-клеточный	t(10;14)(q24;q11)	<i>HOX11 TCRα/β</i>	Взрослые: 31 Дети: 7
	t(7;10)(q34;q24)	<i>HOX11 TCRP</i>	
	t(5;14)(q35;q32)	<i>HOX11L2 TCRα/β</i>	Взрослые: 13 Дети: 20
	t(1;14)(p32;q11)	<i>TALI TCRα/β</i>	Взрослые: 1–3
	Нормальный Ip32	<i>SIL TALI</i>	9–30
	inv(7)(p15q34), t(7;7)	<i>HOXA TCRP</i>	5
	t(10;11)(p33;q14–21)	<i>CALM AF10</i>	10
	t(9;9)(q34;q34)	<i>NUP214 ABL1</i>	6
	t(9;14)(q34;q34)	<i>EML1 ABL1</i>	< 1
	Мутации NOTCH1	<i>NOTCH1</i>	50
	Мутации JAK1	<i>JAK1</i>	18

Определение других транслокаций желательно, особенно в рамках мультицентровых клинических исследований, однако их клиническое значение для принятия терапевтических решений остается неясным (табл. 13.5).

Таблица 13.5. Aberrации хромосом, выявленные при остром лимфобластном лейкозе

Тип aberrации	Локализация aberrации, диапазон повреждения
Транслокация	t(1;7)(p32–34;q34), t(1;11)(p32;q23), t(1;14)(p32–34;q11.2), t(1;19)(q23;p13.3), t(2;8)(p12;q24.1), t(4;11)(q21;p15), t(4;11)(q21;q23), t(7;9)(q34–36;q34), t(7;10)(q34–36;q24), t(7;14)(p15;q32), t(8;14)(q24.1;q11.2), t(8;14)(q24.1;q32), t(8;22)(q24.1;q11.2), t(9;22)(q34;q11.2), t(10;11)(p13–14;q14–21), t(10;14)(q24;q11), t(11;14)(p13–15;q11.2), t(11;19)(q23;p13.3), t(12;17)(p13;q21), t(14;18)(q32;q21), t(14;22)(q32;q11)
Делеция	del(6)(q13–q27), del(9)(p21–p22), del(12)(p12)
Изохромосома	i(9q), i(17q)
Дицентрик	dic(9;20)(p11–13;q11.2)

13.4.1.2. Острый миелоидный лейкоз

МКБ-10: C92

Острый миелоидный лейкоз (*acute myeloid leukemia*) является спорадическим заболеванием, причиной которого могут быть мутации всех типов (точечные, аномалии числа копий, транслокации) в гемопоэтических клетках-предшественниках. Дефектные клетки перестают дифференцироваться и начинается неконтролируемая пролиферация злокачественных аналогов миелоидных предшественников [Merino A. et al., 2018].

При этой патологии описано более 100 типов мутаций некоторые из которых представлены в таблице (табл. 13.6). В табл. 13.7 представлена частота встречаемости хромосомных и генных мутаций у взрослых и детей при различных формах острого миелобластного лейкоза.

Таблица 13.6. Аберрации хромосом, выявленные при остром миелоидном лейкозе

Тип аберрации	Локализация аберрации, диапазон повреждения
Транслокация	t(1;3)(p36.1;q21), t(1;11)(q21;q23), t(1;22)(p13;q13), t(3;3)(q21;q26), t(3;5)(q21-25;q31-35), t(3;21)(q26.2;q22), t(6;9)(p23;q34), t(6;11)(q27;q23), t(7;11)(p15;p15), t(8;16)(p11;p13), t(8;21)(q22;q22), t(9;11)(p21-22;q23), t(9;22)(q34;q11.2), t(10;11)(p11-15;q13-23), t(11;15)(q23;q21), t(11;17)(q23;q21), t(11;17)(q23;q25), t(11;19)(q23;p13.1), t(11;19)(q23;p13.3), t(15;17)(q24;q21), t(16;16)(p13.1;q22), t(16;21)(p11;q22)
Делеция	del(5)(q13q35);del(7)(q11.2-q36);del(9)(q21-q22);del(12)(p12);del(20)(q11.2);del(20)(q11.2q13.1)
Изохромосома	i(17)(q10);idic(X)(q13)
Инсерция	ins(3;3)(q26;q21q26)
Инверсия	inv(3)(q21q26.2);inv(16)(p13.1q22)
Трисомия	+21
Моносомия	-7

Таблица 13.7. Аберрации хромосом и вовлеченные гены при остром миелобластном лейкозе

Аномалия генотипа	Частота встречаемости, %		Аномальный транскрипт
	Дети	Взрослые	
t(8;21)(q22;q22)	12	6	CBFA2(AML1ETO, RUNX1)
inv(16)(p13.1q22)/t(16;16)	6	8	CBFB-MYH11
t(15;17)(q22;q12-21)	9	10	PML-RARα

Окончание табл. 13.7

Аномалия генотипа	Частота встречаемости, %		Аномальный транскрипт
	Дети	Взрослые	
t(5;17)(q32;q12)	< 1	< 1	<i>NPM-RARα</i>
t(11;17)(q23;q21)	< 1	< 1	<i>PLZF-RARα</i>
t(11;17)(q13;q21)	< 1	< 1	<i>NUMA-RARα</i>
dup(17)(q21.3-q23)	< 1	< 1	<i>STAT5b-RARα</i>
-7/del(7q)	5	8	Неизвестен
-5/del(5q)	3	7	Неизвестен
t(1;22)(p13;q13)	1	0	<i>RBM15-MLK</i>
t(3;5)(q25.1;q34)	1	1	<i>NPM-MLF1</i>
inv(3)(q21;q26)/t(3;3)	1	1	<i>RPN1-EV11</i>
t(11q23;V)	18	5	Варианты <i>MLL</i>
t(9;11)(p22;q23)	7	2	<i>MLLT3(AF9)</i>
t(6;9)(p23;q34)	1	< 1	<i>DEK-NUP214</i>
<i>MLL</i> -парциальная тандемная дупликация	< 1	6–11	<i>MLL</i>
<i>Flt3</i> -внутренняя тандемная дупликация	10–15	20–30	<i>Flt3</i>
<i>Flt3</i> -точечная мутация	Различная	5–10	<i>Flt3</i>
<i>NPM1</i> -мутация	2–8	27–35	<i>NPM1</i>
<i>CEBPA</i> -мутация	Различная	11	<i>CEBPA</i>
<i>RAS</i> -мутация	3	30	<i>RAS</i>
<i>KIT</i> -мутация, делеция, вставка	Различная	< 10	<i>KIT</i>

13.4.1.3. Хронический миелоидный лейкоз (хронический миелолейкоз)

МКБ-10: C92.1

Патогенетически хронический миелолейкоз (*chronic myeloid/granulocytic leukemia*) представляет собой клональный миелопролиферативный процесс, развивающийся в результате злокачественной трансформации в ранних гемопоэтических стволовых клетках.

Особенность этой патологии — наличие специфического маркера в опухолевых клетках: транслокации $t(9;22)(q34;q11)$, так называемой филадельфийской хромосомы (Ph'-хромосома) (рис. 13.1). При этой транслокации происходит объединение гена тирозинкиназы *ABL1* (*ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase*, локализация 9q34.12, МИМ 189980) хромосомы 9 с геном *BCR* (*BCR, RhoGEF and GTPase activating protein*, локализация: 22q11.23, МИМ 151410) хромосомы 22. В результате образуется единая рамка считывания (рис. 13.2). Химерный белок **BCR-Abl** (белок p210) приводит к активации путей внутриклеточной передачи сигнала, что делает клетку нечувствительной к воздействию факторов роста и вызывает ее избыточную пролиферацию. По мере изучения природы белка **BCR-ABL** и его тирозинкиназной активности была разработана таргетная (целевая) терапия, позволяющая специфически ингибировать эту активность. Ингибиторы тирозинкиназ могут способствовать полной ремиссии этого заболевания.

Помимо этой мутации выявлены другие aberrации хромосом (см. табл. 13.8).

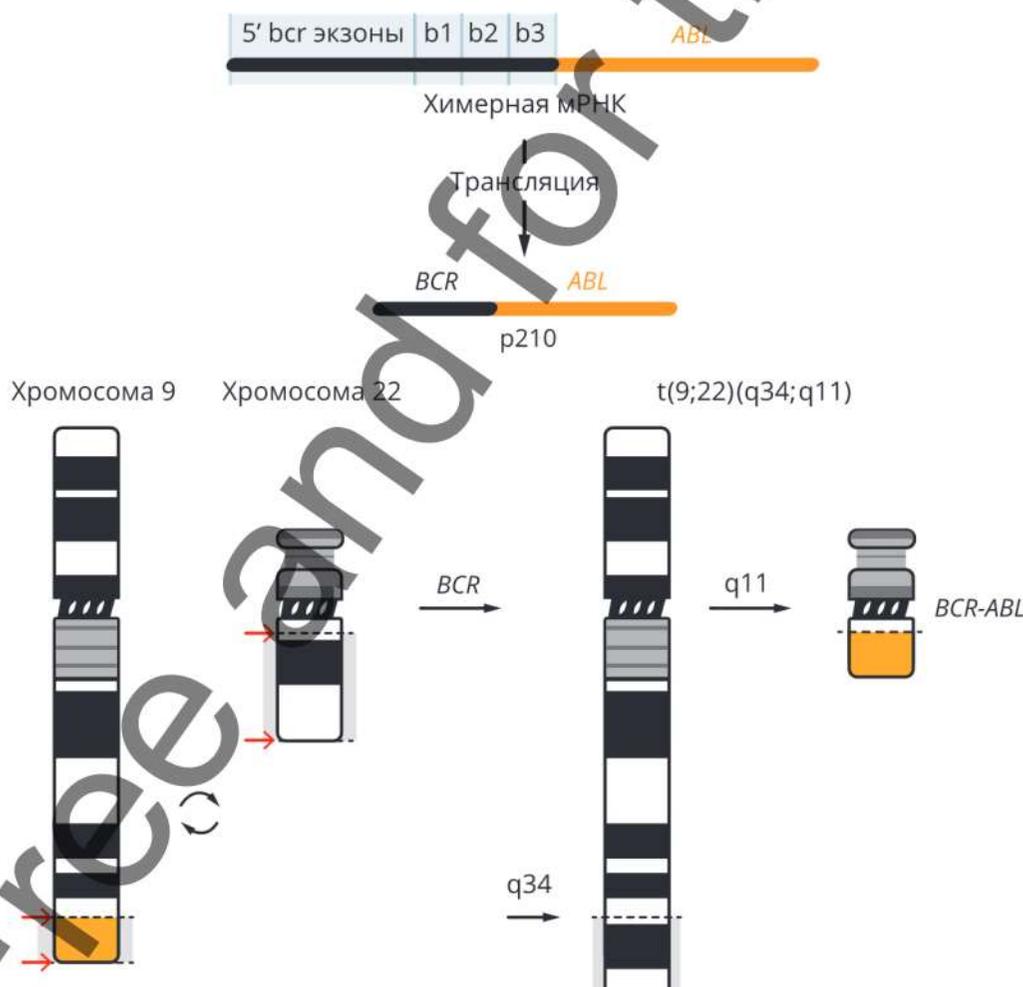


Рис. 13.1. Механизм образования химерного белка p210 в результате транслокации $t(9;22)(q34;q11)$

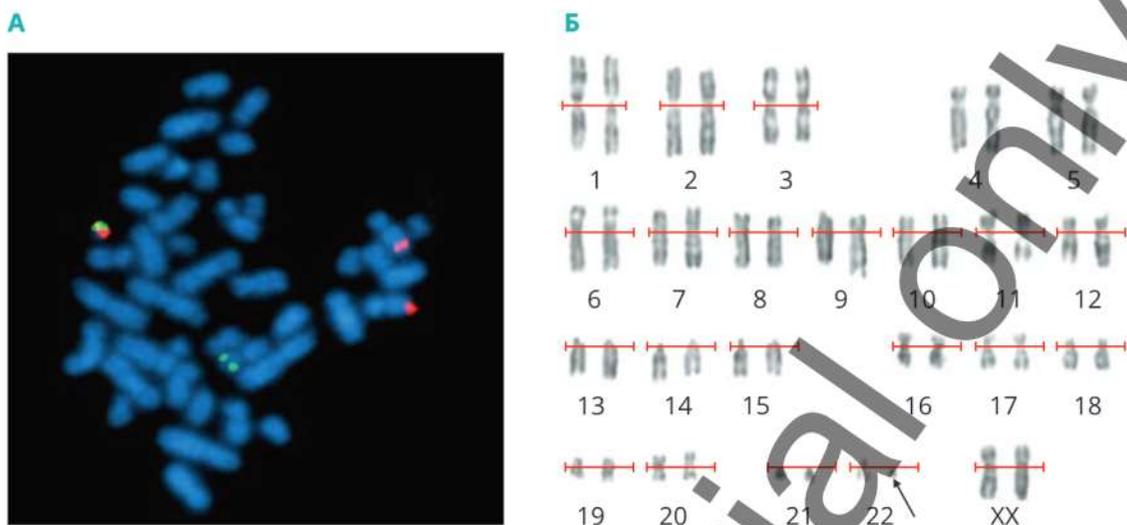


Рис. 13.2. Филадельфийская хромосома $t(9;22)$, выявленная у девочки:

А — метафазные хромосомы (FISH-окрашивание); Б — кариограмма с аберрацией (показана стрелкой); дифференциальное окрашивание (G-бэндинг)

Таблица 13.8. Аберрации хромосом, выявляемые при хроническом миелоидном лейкозе

Транслокация	Трисомия	Дериват*	Изохромосома
$t(9;22)(q34;q11.2)$	+8	+der(22)t(9;22)	i(17q)

* Термин «дериват» (т.е. источник происхождения вновь образованной хромосомы) применяется к хромосоме, имеющей интактную центромеру.

13.4.1.4. Хроническая лимфоцитарная лейкемия (лимфолейкоз)

МКБ-10: C91.1

Острая злокачественность мелких лимфоцитов (почти всегда В-клеток) с участием крови и костного мозга. Лейкозные клетки также проникают в лимфатические узлы (создавая картину, неотличимую от малой лимфоцитарной лимфомы), селезенки и других органов. Возникает в старших возрастных группах.

Хронический лимфоцитарный лейкоз (*chronic lymphocytic leukemia*) — самый частый вид лейкозов у взрослых. Частота выявляемости в европейских странах составляет 4 : 100 000 в год и непосредственно связана с возрастом: у лиц старше 80 лет она составляет 30 : 100 000 человек в год. Медиана возраста на момент установления диагноза в европейских странах составляет 69 лет. В России это заболевание выявляется реже.

Главным цитогенетическим маркером, непосредственно влияющим на выбор терапии, является делеция 17p(1a). Рекомендуется проводить скрининг на делецию 17p у всех больных, имеющих показания к началу терапии. Кроме того, желательно исследовать на наличие $t(11;14)$, $t(11q;V)$, +12, $del(11q)$, $del(13q)$.

При хронической лимфоцитарной лейкемии выявляются и другие аберрации хромосом (табл. 13.9).

Таблица 13.9. Аберрации хромосом, выявляемые при хронической лимфоцитарной лейкемии

Транслокация	Делеция	Инверсия	Трисомия	Другая мутация
t(9;14)(p13;q32)	del(6q)	inv(14)(q11q32)	+12	14q32
t(11;14)(q13;q32)				
t(14;14)(q11;q32)				
t(14;16)(q32;q23)				
t(14;18)(q32;q21)				
t(14;19)(q32;q13.3)				

13.4.1.5. Болезнь Ходжкина (лимфогранулематоз)

МКБ-10: C81.0, C81.2, C81.3

Болезнь Ходжкина (*Hodgkin's disease, lymphogranulomatosis*) — злокачественная опухоль лимфоидной ткани с клональной пролиферацией В-клеток зародышевых центров лимфоузлов, по частоте встречаемости занимает пятое место среди злокачественных заболеваний у детей, уступая лимфобластному лейкозу, неходжкинским лимфомам, опухолям мозга и нейробластоме (5–7 % в структуре онкозаболеваний). Выявляемость лимфомы Ходжкина у детей составляет 0,7–0,9 на 100 тыс. детского населения (по данным международных регистров). Повышен риск заболеть лимфомой Ходжкина у детей с атаксией-телеангиоэктазией, агаммаглобулинемией, ревматоидным артритом.

13.4.1.6. Неходжкинские лимфомы

МКБ-10: C81–C85

Неходжкинские лимфомы (*non-Hodgkin lymphomas*) — системные злокачественные опухоли иммунной системы из клеток внекостномозговой лимфоидной ткани различной гистогенетической принадлежности и степени дифференцировки, что определяет разнообразие и особенности вариантов этих опухолей. Среди злокачественных опухолей у детей неходжкинские лимфомы составляют 5–7 % случаев, у подростков старше 15 лет — до 10 %. Распространенность патологии у детей и подростков до 18 лет в странах Европы и Северной Америки составляет 0,6–1,5 случая на 100 тыс., в России этот показатель, по данным статистики, находится в таких же пределах. Резко повышен риск развития неходжкинских лимфом у детей с первичными иммунодефицитными состояниями, болезнями нестабильности хромосом, после трансплантации органов и тканей.

Цитогенетическое и молекулярно-цитогенетическое исследование при лимфомах проводится с целью подтверждения/исключения диагноза лимфомы Беркитта. Основным методом исследования в этом случае — FISH. В остальных случаях (крайне редко) хромосомные перестройки носят разнообразный характер и не имеют прогностического и диагностического значения. Для их выявления необходимо цитогенетическое исследование субстрата опухоли (лимфатического узла и др.) после культивирования.

Среди различных типов лимфом выявляются в основном транслокации (табл. 13.10).

Таблица 13.10. Аберрации хромосом, выявляемые при различных типах лимфом

Транслокация	Трисомия	Делеция	Перестройка
t(2;3)(p12;q27), t(2;5)(p23;q35), t(2;8)(p12;q24.1),	+12	del(11q)	14q11
t(2;18)(p12;q21), t(3;14)(q27;q32), t(3;22)(q27;q11),		del(14q)	14q32
t(8;14)(q24.1;q32), t(8;22)(q24.1;q11.2), t(9;14)(p13;q32)			
t(10;14)(q24;q32), t(11;14)(q13;q32), t(11;18)(q21;q21),			
t(12;16)(q13;p11.2), t(14;18)(q32;q21), t(14;19)(q32;q13.3),			
t(18;22)(q21;q11)			

Мониторинг минимальной остаточной болезни — лимфомы Беркитта, ALK-позитивных лимфом — может проводиться методом FISH только в случае первоначального поражения костного мозга и при обязательном выявлении перестроек гена *MYC* (*MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor*, локализация: 8q24.21, MIM 190080) в составе транслокаций t(8;14)(q24;q32), t(8;22)(p12;q24;q) или t(2;8)(p12;q24.1) или перестройки ALK (*ALK receptor tyrosine kinase*, локализация: 2p23.2–p23.1, MIM 105590) в первичном образце.

13.4.1.7. Миелодиспластические синдромы

МКБ-10: D46

Миелодиспластические синдромы (*myelodysplastic syndromes*) — группа гетерогенных клональных заболеваний, характеризующаяся наличием *цитопении* (дефицит одного или нескольких видов клеток крови: эозинопения, эритропения, лимфоцитопения, нейтропения, панцитопения, тромбоцитопения) в периферической крови, дисплазии в костном мозге и риском трансформации в острый лейкоз. По этой причине миелодиспластический синдром называется *прелейкемией*.

Две редкие и специфические формы имеют название связанной хромосомной аномалии (табл. 13.11).

Таблица 13.11. Аберрации хромосом, выявляемые при синдроме моносомии хромосомы 7 и синдроме делеции 5q

Геномные мутации	Делеции	Инсерция	Инверсия	Транслокация
-5	del(5)(q13q35)	ins(3;3)(q21;q21q26)	inv(3)(q21q26.2)	t(1;3)(p36.1;q21)
-7	del(7)(q11-q36)			t(1;7)(q10;p10)
+8	del(11q)			t(3;3)(q21;q26)
+21	del(12p)			t(3;21)(q26.2;q22)
	del(13q)			t(6;9)(p23;q34)
	del(20)(q11.2)			t(16;16)(p13.1;q22)
	del(20)(q11.2q13.1)			

13.4.1.8. Синдром моносомии хромосомы 7

Характеризуется появлением у новорожденных анемии, тромбоцитопении и лейкоцитоза, включая моноцитоз. Внутри костного мозга могут быть диспластические изменения и небольшое количество мегакариоцитов (гигантских клеток костного мозга).

13.4.1.9. Синдром делеции длинного плеча хромосомы 5

Характеризуется появлением у взрослых пациентов (чаще болеют женщины) в форме умеренной и тяжелой анемии с нормальным уровнем лейкоцитов и тромбоцитов. В костном мозге обнаруживаются скопления аномальных мегакариоцитов с круглыми ядрами, возможен избыток миелобластов. В анамнезе нет случаев лечения лучевой терапией или химиотерапией.

13.4.2. Диагностика солидных опухолей

При диагностике солидных опухолей в зависимости от поставленной задачи используются практически все методы медицинской генетики. Наиболее востребованными из них являются полимеразная цепная реакция, секвенирование ДНК, массовое параллельное секвенирование, интерфазный FISH. В основном для персонифицированной генетической диагностики патологии могут использовать несколько методов в совокупности с методами гистологии, гистохимии, иммуногистохимии и т. д.

13.4.2.1. Применение методов лабораторной генетики при наследственных онкопатологиях

Описано более 200 различных наследственных опухолевых синдромов, поражающих различные органы и системы организма. Выделяют ряд общих клинико-генетических характеристик этих заболеваний:

- тип наследования в большинстве случаев — доминантный;

- отягощенный семейный анамнез: при наследственных онкопатологиях доминантность признака сочетается с высокими шансами дожить до детородного возраста, а также нормальной фертильностью; следовательно, риск возникновения злокачественного новообразования передается из поколения в поколение с высокой частотой;
- ранний возраст появления опухоли;
- более агрессивное течение заболевания;
- наличие первично-множественных опухолей. Поскольку наследственная мутация содержится во всех клетках организма, велика вероятность того, что она реализуется более чем в одном органе.

Многочисленные научные данные свидетельствуют о биологической особенности наследственно-обусловленных опухолей, которые проявляются в характере клинического течения заболевания и чувствительности к различным лекарственным препаратам [Hao D. et al., 2016].

Возникновение таких опухолей связано с наличием герминальных мутаций:

- в высокопенетрантных генах — *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *STK11*, *CDH1*;
- среднепенетрантных генах — *ATM*, *CHEK2*, *PALB*, *BARD1*, *BRIP1*, *MRE11A*, *NBN*, *RAD50*, *RAD51C*, *XRCC2*, *RAD51D*, *ABRAXAS*;
- низкопенетрантных генах — *MAP3K1*, *FGFR2*, *LSP1*, *TNRC19*, *H19* [Apostolou P., Fostira F., 2013].

Применение новых технологий NGS позволило исследовать спектр наследственных мутаций во множестве генов. Например, полноэкзомное секвенирование с использованием панели из 94 генов и 262 полиморфизмов компании **Illumina** намного расширило возможности онкодиагностики (табл. 13.12).

Ниже описаны несколько примеров применения методов лабораторной генетики для диагностики наследственных онкологических заболеваний.

Таблица 13.12. Перечень 94 генов, использующихся для диагностики наследственной

A	B	C	E	F	G	H	K
<i>AIP</i>	<i>BAP1</i>	<i>CDC73</i>	<i>EGFR</i>	<i>FANCA</i>	<i>GATA2</i>	<i>HNF1A</i>	<i>KIT</i>
<i>ALK</i>	<i>BLM</i>	<i>CDH1</i>	<i>EPCAM</i>	<i>FANCB</i>	<i>GPC3</i>	<i>HRAS</i>	
<i>APC</i>	<i>BMPR1A</i>	<i>CDK4</i>	<i>ERCC2</i>	<i>FANCC</i>			
<i>ATM</i>	<i>BRCA1</i>	<i>CDKN1C</i>	<i>ERCC3</i>	<i>FANCD2</i>			
	<i>BRCA2</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>ERCC5</i>	<i>FANCE</i>			
	<i>BRIP1</i>	<i>CEBPA</i>	<i>EXT1</i>	<i>FANCF</i>			
	<i>BUB18</i>	<i>CEP57</i>	<i>EXT2</i>	<i>FANCG</i>			
		<i>CHEK2</i>	<i>EZH2</i>	<i>FANCI</i>			
		<i>CYLD</i>		<i>FANCL</i>			
				<i>FANCM</i>			
				<i>FN</i>			
				<i>FLCN</i>			

Наследственный рак молочной железы

МКБ-10: C-50 (MIM 114480)

Одними из основных генов-супрессоров, ответственных за наследственную форму рака молочной железы (*hereditary breast cancer syndrome*), являются высокопенетрантные гены **BRCA1** (*Breast Cancer 1*, MIM 113705) и **BRCA2** (*Breast Cancer 2*, MIM 600185). Гены семейства **BRCA** контролируют процессы репарации ДНК путем гомологичной рекомбинации, клеточной пролиферации. Эти гены участвуют в сложных механизмах предотвращения геномной нестабильности клеток. Следует отметить, что спектр наследственных мутаций в генах **BRCA1** и **BRCA2** очень разнообразен, но при этом специфичен для разных стран и этнических групп. Герминальные мутации этих генов характеризуются аутосомно-доминантным типом наследования и высокой *пенетрантностью* (вероятность того, что ген будет иметь любые фенотипические проявления).

При выявлении мутации говорят о *BRCA-ассоциированной (наследственной) онкопатологии молочной железы*. Разработаны подробные клинические рекомендации по корректированию тактики терапевтического и хирургического лечения этих пациенток [Balmana J. et al., 2009]. Приглашают на обследование родственников. При выявлении мутации у лиц без онкопатологии, учитывая ряд факторов (например, наличие детей), рекомендуется применение профилактических методов хирургического вмешательства. Риск развития рака молочной железы в течение жизни у носителей этих мутаций составляет 45–80 %.

Дальнейшие исследования показали, что присутствуют BRCA-ассоциированные наследственные типы онкологии других органов как у женщин, так и мужчин. У носителей мутаций **BRCA1** существует риск возникновения *рака желудка, шейки матки, эндометрия, поджелудочной железы, кишечника, яичек, простаты* [Thompson D., Easton D.F., 2002]. Мутации гена **BRCA2** повышают риск развития рака *поджелудочной*

онкопатологии (*Illumina*)

M	N	P	R	S	T	V
MAX	NBN	PALB2	RAD51C	SBDS	TMEM127	VHL
MEN1	NF1	PHOX2B	RAD51D	SDHAF2	TP53	
MET	NF2	PMS1	RB1	SDHB	TSC1	
MLH1	NSD1	PMS2	RECQL4	SDHC	TSC2	
MSH2		PRFPTCH11	RET	SDHD		
MSH6		PRKAR1A	RHBDF2	SLX4		
MUTYH		PTEN	RUNX1	SMAD4		
				SMARCB1		
				STK11		
				SUFU		

железы, печени, желудка, мочевого пузыря, желчевыводящих путей, рака простаты, меланомы и опухолей головы и шеи [Friedenson B., 2005].

Есть значимые мутации в других генах, часто встречающиеся у пациенток с раком молочной железы, например, **CHEK2** (*Checkpoint kinase 2*, MIM 604373), **NBS1** (*NIBRIN*, MIM 602667), **BLM** (*Bloom syndrome*, MIM 210900).

Наследственный рак яичника

МКБ-10: C56

Наследственный рак яичника (*hereditary ovarian cancer syndrome*) встречается редко. С целью выявления наследственного характера рака яичников проводят молекулярно-генетическое обследование на мутации в генах **BRCA1** и **BRCA2**. Если они выявляются, то лечение несколько отличается от лечения пациенток со спорадическим раком яичников. Рекомендуется обследовать родственников.

Идентифицированы несколько наследственных синдромов, проявляющихся семейной предрасположенностью к возникновению рака органов женской репродуктивной системы, наиболее изученными из них являются две независимые формы наследственного рака яичников:

- 1) синдром рака молочной железы и яичников (*breast-ovarian cancer syndrome*), на него приходится 90–95 % всех случаев наследственного рака яичников;
- 2) синдром Линча II (*Lynch syndrome II*) — семейный неполипозный первично-множественный рак толстой кишки, ассоциированный с раками других гормононезависимых органов.

Показано, что у пациентов с уже установленным диагнозом рака яичников выявляются мутации в гене **BRCA1** в 40–50 % случаев, а в гене **BRCA2** — в 20–30 % случаев [Lynch H.T. et al., 2009]. В работе [Cassil. et al., 2003] показано, что наибольшая частота встречаемости BRCA-ассоциированного рака яичников наблюдается в популяции евреев ашкенази (47 %), а в других популяциях колеблется от 3 до 40 %.

Наследственный неполипозный рак толстой кишки

МКБ-10: C15–C26

Наследственный неполипозный рак толстой кишки (*hereditary non-polyposis colorectal cancer*), **синдром Линча** (MIM 120435), может клинически проявляться в виде опухолей эндометрия, тонкого кишечника, желудка, яичников, уретры, мочевыводящих путей. Предварительная диагностика синдрома Линча сводится к выявлению *микросателлитной нестабильности* (*microsatellite instability*) в опухолевой ткани. Для этого рекомендуется использовать стандартную панель маркеров (**BAT26**, **BAT25**, **BAT40**). Причем один-единственный маркер **BAT26** обладает почти 100%-й чувствительностью и специфичностью. В случае обнаружения множественных мутаций микросателлитных последовательностей целесообразно анализировать мутации в пяти генах-супрессорах, ответственных за репарацию неспаренных оснований: **MSH2**, **MLH1**, **MSH6**, **PMS2**, **PMS1**.

Семейный аденоматоз толстой кишки

МКБ-10: D12.6

Семейный аденоматоз толстой кишки (*familial adenomatosis coli*, MIM 175100) характеризуется появлением сотен полипов на слизистой оболочке органа. Анализируют гетерозиготную инактивацию гена *APC* (*APC regulator of WNT signaling pathway*, 5q22.2, MIM 611731). Несколько реже APC-ассоциированного семейного аденоматоэза толстой кишки наблюдается его «легкая» разновидность, при которой количество полипов измеряется не сотнями, а десятками. В этом случае анализируют в гене *MUTYH* (*МУН*, *mutY DNA glycosylase*, MIM 604933). Пациентам с уже имеющимися клиническими признаками заболевания рекомендована профилактическая операция. Также разработаны официальные стандарты лекарственного лечения.

Наследственный рак щитовидной железы

МКБ-10: C73

Наследственный рак щитовидной железы (*hereditary thyroid cancer*, MIM 155240). Среди этой категории неоплазм наиболее часто встречается медулярный рак щитовидной железы. Он проявляется как в виде отдельного заболевания, так и в рамках синдрома множественных эндокринных неоплазий. Наследственный рак щитовидной железы ассоциирован с мутацией в онкогене *RET* (*ret proto-oncogene*, MIM 164761), характеризующейся высокой пенетрантностью (около 100 %). Выявление мутации в гене *RET* служит показанием к профилактической тиреоидэктомии, осуществляемой в детском возрасте. Важно, что с помощью заместительной терапии можно полностью компенсировать последствия утраты органа.

13.4.2.2. Применение методов лабораторной генетики при выборе индивидуальных схем лечения в онкологии

Белковый продукт гена *Her2/neu* (*ERBB2 erb-b2 receptor tyrosine kinase 2*; локализация: 17q12, другие названия: *ERBB2*, *NEU*, *NGL*, *HER2*, *TKR1*, *CD340*, *HER-2*, *MLN19*; MIM 164870) относится к семейству рецепторов эпидермального фактора роста, вовлеченных в активацию сигнальных путей регуляции нормального роста и развития ткани. Анализ гиперэкспрессии гена *Her2/neu* при некоторых подтипах рака молочной железы важен, т. к. этот процесс ведет к усилению пролиферации и ангиогенеза, нарушению регуляции апоптоза (см. рис. 13.3). Данные о статусе рецептора *Her2/neu* могут помочь принять оптимальное решение при выборе схем адъювантной терапии и прогнозировать эффективность противоопухолевых препаратов различных классов у этих пациенток [Hicks D. G., Kulkarni S., 2008; Borley A. et al., 2014; Senkus E. et al., 2015]. При раке желудка (МКБ-10: C16) также анализируют гиперэкспрессию/амплификацию гена *Her2/neu*.

При немелкоклеточном раке легкого (МКБ-10: C34) анализируют мутации в генах *EGFR*, *ALK*. Пациенты с мутациями *EGFR* в опухолях дают уровень ответа на лечение таргетными препаратами намного выше, чем ответа на стандартную

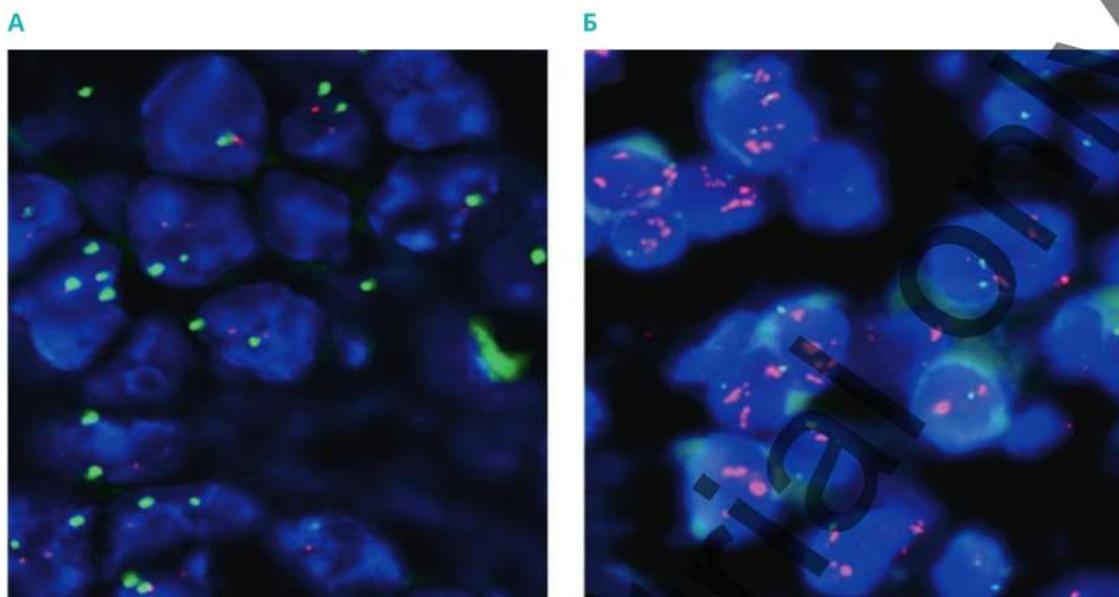


Рис. 13.3. Фото интерфазных ядер нормальных (А) и опухолевых (Б) тканей при раке молочной железы (амплификация гена *Her2/neu*)

химиотерапию [Reck M. et al., 2014]. Пациентам с перестройкой гена *ALK* в опухолевой ткани рекомендуется назначение целевой терапии (кризотинибом или его аналогами).

Ген *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*) (локализация: 7p11.2; MIM 131550) — рецептор эпидермального фактора роста, трансмембранный рецептор, связывающий экстраклеточные лиганды из группы эпидермальных факторов роста.

Молекулярно-генетическими методами анализируют наиболее распространенные мутации гена *EGFR*: делеции в экзоне 19, точковые мутации в экзонах 21 (Leu858Arg) и 18 (Gly719Cys, Gly719Ala, Gly719Ser). Ввиду того что рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) участвует в процессах, связанных с клеточным механизмом роста злокачественных новообразований, он стал мишенью для большого класса таргетных препаратов. Ответ на лечение таргетными препаратами у пациентов с мутациями в гене *EGFR* в опухолях гораздо лучше, чем на лечение препаратами стандартной химиотерапии.

В случаях, когда мутация не обнаружена, FISH-методом анализируют интерфазные ядра опухолевой и нормальной ткани на наличие транслокации гена *ALK* (рис. 13.4). Этот анализ показан больным с распространенным немелкоклеточным раком легкого и отрицательным статусом EGFR-мутации.

Ген *ALK* (*anaplastic lymphoma kinase*, Ki-1; локализация: 2p23; MIM 105590). *ALK* является рецепторной тирозинкиназой из семейства инсулинзависимых рецепторов. В норме протеин ALK активно экспрессируется в нервной ткани только во время эмбриогенеза, регулируя пролиферацию нейронов. Как и у любой тирозинкиназы, основная функция этого рецептора заключается в передаче сигнала. Основными сигнальными путями, задействованными в передаче, являются пути PI3K/ERK и RAS/MAPK, т. е. те же, что участвуют в передаче сигнала EGFR.

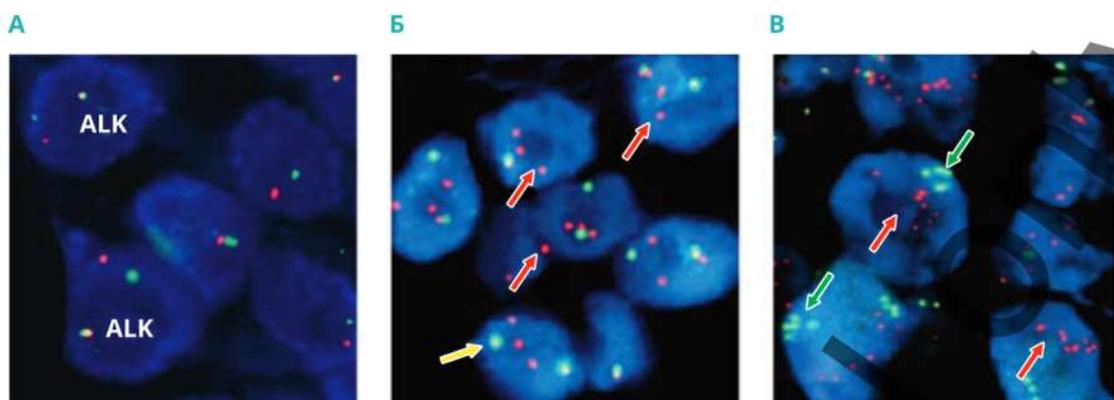


Рис. 13.4. Фото интерфазных ядер нормальных (А) и опухолевых тканей (Б) при немелкоклеточном раке легкого (амплификация гена *ALK*) (стрелками показаны различные мутации)

Транслокация гена *ALK* — это внутривнутрихромосомная перестройка (парацентрическая инверсия) короткого плеча хромосомы 2, ведущая к образованию химерного онкогена *EML4/ALK* примерно в 95 % случаев. Еще в 5 % случаев транслокация возникает с участием других генов, представляя собой, как правило, истинную реципрокную транслокацию.

При наличии транслокации назначают химиотерапию кризотинибом. Понимание роли транслокации гена *ALK* в развитии немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) стало одним из важнейших шагов в дальнейшей расшифровке генома этого заболевания и расширении возможностей персонализации его лечения.

13.5. Диагностика и ведение больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смерти во всем мире. По данным ВОЗ, в 2016 г. от ССЗ умерло 17,9 млн человек, что составило 31 % всех случаев смерти в мире, в т. ч. 85 % этих смертей произошло в результате сердечного приступа и инсульта*.

ССЗ представляют собой группу болезней сердца и кровеносных сосудов, которую составляют:

- ишемическая болезнь сердца — болезнь кровеносных сосудов, снабжающих кровью сердечную мышцу;

Цит. по материалам сайта: [https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))

- *болезнь сосудов головного мозга* — болезнь кровеносных сосудов, снабжающих кровью мозг;
- *болезнь периферических артерий* — болезнь кровеносных сосудов, снабжающих кровью конечности;
- *ревмокардит* — поражение сердечной мышцы и сердечных клапанов в результате ревматической атаки, вызываемой стрептококковыми бактериями;
- *врожденный порок сердца* — существующие с рождения деформации строения сердца;
- *тромбоз глубоких вен и эмболия легких* — образование в венах нижних конечностей сгустков крови, которые могут смещаться и двигаться к сердцу и легким.

Такие заболевания, как ишемическая болезнь сердца, атеросклероз, артериальная гипертензия и др., являются мультифакториальными. В формировании и прогрессировании этих заболеваний участвуют как наследственный фактор, так и образ жизни (употребление табака, нездоровое питание и ожирение, отсутствие физической активности, злоупотребление алкоголем, стресс). Предпосылками также являются повышенное кровяное давление, диабет и гиперлипидемия.

Помимо мультифакториальных заболеваний сердечно-сосудистой системы существует большое количество моногенных заболеваний с поражением органов сердечно-сосудистой системы. Среди них около 100 наследственных синдромов, при которых поражения сердца и сосудов являются ведущими в клинической картине.

В табл. 13.13 представлены некоторые синдромы и гены/локусы, мутации в которых являются причинами этих патологий.

Таблица 13.13. Моногенные наследственные заболевания сердечно-сосудистой системы и ассоциированные с ними гены или локусы

Наследственное заболевание	Тип наследования	Ген (локус)
Семейная гиперхолестеринемия	АД, АР	<i>USF1</i> (1q22–q23) <i>ARH</i> (1p36–p35) <i>LDLR</i> (19p13.2)
Псевдогипоальдостеронизм		<i>PHA2A</i> (1q31–q42) <i>WNK4</i> (12p13.3) <i>WNK1</i> (17q21)
Синдром удлиненного интервала QT (электрическое заболевание сердца, характеризующееся удлинением интервала QT на ЭКГ покоя с приступами потери сознания, развития полиморфной желудочковой тахикардии типа «пируэт» или фибрилляции желудочков)		<i>SCN5A</i> (3p21–24) <i>ANKB</i> (4q25–27) <i>KCNH2</i> (7q3) <i>KCNQ1</i> (11p15.5) <i>KCNJ2</i> (17q23) <i>KCNE1</i> (21q22) <i>KCNE2</i> (21q22)
Синдром укороченного интервала QT (поражается электрическая система сердца)	АД	<i>KCNH2</i> (7q3) <i>KCNQ1</i> (11p15.5)

Окончание табл. 13.13

Наследственное заболевание	Тип наследования	Ген (локус)
Синдром Бругада	АД	<i>SCN5A</i> (3p21–24), 3p22–25
Аритмогенная правожелудочковая дисплазия/кардиомиопатия	АД, АР	<i>hRyR2</i> (1q42–q43), 2q32.1–q32.3, 3p23, <i>DSP</i> (6p24), 10p12–p14, 14q12–q22, 14q23–q24
Катехоламинергическая желудочковая тахикардия		<i>CASQ2</i> (1p13–21), <i>hRyR2</i> (1q42–q43)
Семейные формы фибрилляции предсердий	АД	<i>KCNQ1</i> (11p15.5)
Семейные формы слабости синусового узла		<i>SCN5A</i> (3p21–24)
Синдром Вольфа—Паркинсона—Уайта		<i>PRKAG2</i> (7q3)
Гипертрофическая кардиомиопатия		<i>TNNI2</i> (1q32), <i>TNNI3</i> (19q13.4), <i>TTN</i> (2q24.3), <i>MYL3</i> (3p), <i>PRKAG2</i> (7q36), <i>MYBPC3</i> (11p11.2), <i>MYHCB</i> (14q12), <i>TPM1</i> (15q22.1)

Комплексный анализ сопоставления генетических и клинических показателей позволяет считать, что существует прямая корреляция между первичным генетическим повреждением, особенностями клинической картины и прогнозом практически для всех заболеваний. Для диагностики заболеваний сердечно-сосудистой системы используются в основном молекулярно-генетические методы (ПЦР, секвенирование по Сэнгеру, NGS). Выявляются генные мутации/полиморфизмы. Так, показано, что около 30 % больных с синдромом удлиненного интервала QT имеют скрытое течение заболевания, при котором отсутствуют характерные изменения на ЭКГ [Priory S. G. et al., 2001, 2003]. Больные имеют высокий риск внезапной смерти во время первого в жизни обморока, синкопе (симптом, проявляющийся внезапной, кратковременной потерей сознания и сопровождающийся падением мышечного тонуса).

Пресимптоматическая генетическая диагностика позволяет сформировать оптимальную тактику наблюдения с применением других способов клинической диагностики. Разработаны терапевтические подходы, специфичные в отношении пораженного гена.

Была проанализирована суммарная вероятность острых кардиогенных эпизодов (синкопе, остановка сердца и др.) в зависимости от пораженного гена, пола и продолжительности интервала QT и предложена многофакторная оценка риска развития первого эпизода желудочковой тахикардии [Priory S., 2004].

Роль генетических факторов не ограничивается только спектром мутаций, приводящих к развитию моногенного сердечно-сосудистого заболевания. При лечении

лиц с сердечно-сосудистыми патологиями важно также учитывать влияние генетически детерминированных особенностей метаболизма лекарственных препаратов. Причинами различной чувствительности могут быть: особенности метаболизма лекарств, их способность связываться с мишенями, генетически детерминированные различия в патогенезе заболевания у пациентов [Заклязьминская Е. В. и др., 2004].

13.6. Биологическая дозиметрия

Методы классической и молекулярной цитогенетики являются основной тест-системой для количественной оценки действия мутагенных факторов радиационной природы. В методических рекомендациях МАГАТЭ (1986, 2001, 2011), ВОЗ (1976) и др. представлена информация по практическому использованию анализа хромосомных aberrаций для вычисления биологической дозы облучения [WHO, 1976; Cytogenetic analysis for radiation dose assessment..., 2001; Cytogenetic dosimetry..., 2011; UNSCEAR, 1986; Mettler F.A. et al. 1990].

Существуют и другие виды дозиметрии. Однако в отличие от доз, полученных с помощью физических или расчетных методов дозиметрии, «биологическая» доза, оцененная по частоте хромосомных aberrаций, является интегральным показателем повреждающего действия радиации, который учитывает индивидуальную радиочувствительность и состояние организма в момент облучения. Информация о «биологической» дозе позволяет более точно прогнозировать возможные последствия радиационного воздействия.

Aberrации хромосом, выявляемые в лимфоцитах периферической крови, являются объективным, высокочувствительным критерием степени радиационного воздействия в раннем и отдаленном периодах после воздействия мутагена и могут успешно использоваться для биологической индикации и оценки полученной дозы [Lloyd D. C., 1998; Sevan'kaev A. V. et al., 2000; Нугис В. Ю. и др., 2016; Снугирева Г. П. и др., 2003; Bonassi S. et al., 2005]. При этом данные цитогенетического анализа позволяют судить о характере различных типов ионизирующего излучения.

При исследовании радиационных аварий важно оценить дозу по следующим причинам:

1. В случае воздействия высоких доз ионизирующего излучения (> 1 Гр), особенно при остром облучении, информация о дозах помогает в планировании терапии и предупреждении врачей о вероятных детерминированных последствиях для здоровья, которые могут возникнуть в следующие недели и месяцы.
2. После воздействия средних доз облучения, в случае, когда требуется лечение, дозиметрическая информация имеет важное значение для врача в консультировании облученных лиц по риску развития поздних стохастических заболеваний — например, рака.
3. Для лиц, подвергающихся воздействию малых доз ионизирующего излучения (< 50 мГр), также важно знать величину дозы.

Во всех этих случаях биологическая дозиметрия может быть единственным средством количественной оценки дозы.

Биологическая дозиметрия также играет важную роль в раннем периоде после аварии (например, на атомных электростанциях), когда множество людей могут подвергнуться воздействию ионизирующего излучения. В это время распределение лиц с различной дозой облучения крайне важно для незамедлительного действия врачей.

Согласно рекомендациям МАГАТЭ, существуют четыре возможных цитогенетических метода, доступных в настоящее время для биодозиметрии. К ним относятся:

- определение повышенного уровня дицентриков;
- определение повышенного уровня реципрокных и нереципрокных транслокаций; тест на наличие микроядер;
- выявление предварительно конденсированных метафазных хромосом (*premature chromosome condensation*).

Анализ нестабильных хромосомных aberrаций (дицентриков и центрических колец) позволяет провести количественную оценку радиационного воздействия только в ранние сроки после облучения. Предполагается, что со временем клетки с этими aberrациями элиминируются. Однако ряд исследований показал, что, несмотря на значительный период времени, прошедший после облучения, в крови пострадавших людей наблюдается повышенная частота нестабильных хромосомных aberrаций, в том числе маркеров радиационного воздействия — дицентриков и центрических колец, которая коррелирует с уровнем дозовых нагрузок. Наиболее наглядными для визуализации метафаз с этими aberrациями являются монохромно окрашенные хромосомы [Cytogenetic dosimetry..., 2011].

В отдаленные сроки после облучения можно провести ретроспективную дозиметрию. Существует пять групп ретроспективного выявления последствий дозовых нагрузок на организм при внешнем и внутреннем облучении: цитогенетические, гематологические, иммунобактериологические, биохимические, биофизические тесты [Кудряшов Ю. Б., 2004].

При цитогенетической ретроспективной оценке доз используют анализ стабильных aberrаций хромосомного типа, таких как транслокации. При этом очень важно учитывать характер радиационного воздействия, тип излучения и диапазон доз. Метод FISH считают перспективным методом биологической дозиметрии для оценки величины дозы в отдаленные сроки после острого или пролонгированного облучения даже при низких уровнях радиационного воздействия [Edwards A.A. et al., 2005; Tucker J.D., 2002]. Показано, что достаточно использовать зонды на три крупные хромосомы из групп А, В и С (по выбору) с последующим пересчетом на весь геном по специальной формуле.

Однако наиболее полный учет транслокаций, о чем говорится в рекомендациях МАГАТЭ, возможен при использовании методик, обеспечивающих разноцветное окрашивание (после компьютерной обработки изображений) всех пар хромосом: mFISH (multicolor FISH) и SKY (спектральное кариотипирование). Полноценное использование этого подхода требует исследования фоновых значений регистрируемых при этом частот aberrаций хромосом и построения соответствующих дозовых кривых.

У лиц, подвергшихся воздействию ионизирующего излучения, наблюдается повышенная частота микроядер в лимфоцитах периферической крови и клетках буккального эпителия слизистой оболочки рта.

Микроядра (*m micronuclei*) — фрагмент ядра в эукариотической клетке, не содержащий полного генома, необходимого для ее выживания. Они образуются в результате неправильного хода клеточного деления или фрагментации ядра в процессе апоптоза. Микроядра являются патологической структурой и могут наблюдаться в клетках любых тканей.

Микроядра возникают из фрагментов хромосом, которые лишены центромер и поэтому исключаются из клеточных ядер в момент деления клеток. Иными словами, они являются ацентрическими фрагментами, возникшими в результате структурных нарушений хромосом и не попавшими во вновь формирующееся ядро при делении клеток. Кроме того, они могут образовываться из хромосом, оставшихся в анафазе.

В основном выделяют три типа микроядер, образовавшихся в результате нарушений нормального процесса формирования ядра:

- микроядра «стандартного» типа, небольшого размера, хорошо оформлены и находятся близко от основного ядра или на некотором удалении от него, иногда даже на периферии клетки;
- микроядра «основного» типа, не отличающиеся по размеру от основного ядра, зачастую в непосредственной близости друг к другу;
- неоформленный хромосомный материал, который представляет собой расположение хромосом в метафазе митоза.

Также предлагается использовать микроядерный тест в радиационных исследованиях только для выявления групп повышенного риска, а не для оценки дозы облучения. Это связано с тем, что образование микроядер происходит в результате различных мутагенов (ионизирующее, ультрафиолетовое излучения, химические соединения и т. д.). Для последующей оценки доз облучения необходимо использовать более специфические методы дозиметрии.

Кроме описанных выше цитогенетических методик, для биологической индикации дозы был разработан метод преждевременной конденсации хромосом (*premature chromosome condensation*, ПСС). Первоначальный вариант (который используется и сейчас) состоял в слиянии интерфазных лимфоцитов периферической крови человека с делящимися в культуре клетками млекопитающих или клетками HeLa под действием инактивированного вируса Сендай или полиэтиленгликоля [Hittelman W. N., Rao P. N., 1974]. В результате происходила определенная конденсация интерфазных человеческих хромосом. Этот метод технически достаточно труден, а индекс конденсации низок.

Позднее был предложен химический способ ПСС, индуцированной ингибиторами серин/треонин протеиновых фосфатаз типов 1 и 2А (окадаиновая кислота и калликулин А). Этот тест наиболее полезен при высоких дозах редкоионизирующих излучений, а также при действии плотноионизирующих излучений и имеет несколько вариаций, при которых могут быть учтены фрагменты или кольца (окрашивание по Гимзе), дицентрики (С-бэндинг), транслокации (FISH-окрашивание) [Durante M. et al., 1998].

Раздел IV

Наследственные болезни человека

Глава 14. Хромосомные болезни	415
Глава 15. Генные болезни	437
Глава 16. Болезни с нетрадиционным типом наследования	447

Один из пунктов Устава ВОЗ гласит: «Здоровье является состоянием полного физического, душевного и социального благополучия, а не только отсутствием болезней и физических дефектов».

Наследственные заболевания могут быть обусловлены разными типами мутаций, которые передаются в семье по наследству или появились после оплодотворения в некоторых клетках зародышевой линии. Частота встречаемости наследственных болезней и болезней с наследственной предрасположенностью варьирует в различных популяциях. Совершенствование методов медицинской генетики и биологии позволяет более точно устанавливать первичный диагноз заболевания, определять его наследственный характер. На сегодняшний день различают несколько классификаций болезней в целом [Гинтер Е. В., 2003; Мутовин Г. Р., 2010; Бочков Н. П. и др., 2016] (табл. IV.1).

Таблица IV.1. Классификация болезней по причине их возникновения

Болезни	Причины
I. Наследственные	Мутации (генные, хромосомные, геномные) в геноме, передающиеся гаметически или возникающие <i>de novo</i> в эмбриогенезе
II. С наследственной предрасположенностью	Этиологический фактор — нарушения в геноме, эпигеноме + вредное влияние факторов среды. Обычно проявляются с возрастом
III. Обусловленные влиянием факторов среды и генетической предрасположенностью (мультифакториальные заболевания)	Этиологическим фактором служит влияние среды, однако частота возникновения и тяжесть течения болезней существенно зависят от наследственного предрасположения
IV. Не связанные с изменением генетического материала	Травмы, воздействие биологических мутагенов и других тератогенных факторов, стресс

С целью создания условий для систематизированной регистрации, анализа, интерпретации и сравнения данных о смертности и заболеваемости, полученных в разных странах или регионах и в разное время, создана международная статистическая классификация болезней и проблем, связанных со здоровьем (МКБ) (*International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, ICD*). МКБ периодически (раз в десять лет) пересматривается под руководством ВОЗ. МКБ является нормативным документом, обеспечивающим единство методических подходов и международную сопоставимость материалов. В настоящее время действует Международная классификация болезней десятого пересмотра (МКБ-10).

Существуют различные электронные базы данных, дающие полную и подробную информацию о патологиях и синдромах, генетических картах хромосом человека, локализации и функциях отдельных генов, структуре генома в целом, эпигеноме, протеоме.

Наиболее всеобъемлющей и авторитетной является база данных генов человека и генетических фенотипов — Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)*. База находится в свободном доступе в интернете и обновляется ежедневно. Важно, что в OMIM можно найти множество ссылок на другие ресурсы и базы данных. OMIM содержит информацию о более чем 15 000 генах и обо всех известных менделирующих признаках и заболеваниях. Начало составления этой базы данных приходится на 1960 г. Руководителем данного проекта был профессор Виктор Мак-Кьюсик (*V. McKusick*, 1921–2008). Изначально был издан каталог менделевских признаков и расстройств под названием «Менделевское наследование у человека: каталог человеческих генов и генетических болезней» (*Mendelian inheritance in man: Catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive, and X-linked phenotypes, MIM*). Каждому локализованному менделирующему локусу в каталоге MIM присвоен шестизначный номер. Первая цифра определяет характер наследования: 1 — для аутосомно-доминантных генов; 2 — для аутосомно-рецессивных; 3 — для генов, локализованных в X-хромосоме; 4 — Y-хромосоме; 5 — для митохондриальных генов. Четыре цифры, следующие после точки непосредственно за шестизначным номером, предназначены для кодирования различных мутантных вариантов данного локуса.

Двенадцать книжных изданий MIM были опубликованы в период с 1966 по 1998 г. Онлайн-версия MIM была создана в 1985 г. Начиная с 1995 г. MIM доступен на сайте Национального центра биотехнологической информации (*National Center for Biotechnology Information, NCBI*). Программы OMIM совместимы с другими базами данных, например, с *Genome Database (GDB)*, содержащей полную информацию о всех картированных генах, ДНК-маркерах и ДНК-зондах человека, *GenBank* — полной базой данных известных нуклеотидных последовательностей ДНК и др.

Различают несколько классификаций наследственных болезней (табл. IV.2).

Таблица IV. 2. Классификация наследственных болезней

Критерий	Заболевания
Поражение органов и систем органов	<p>Наследственные заболевания:</p> <ul style="list-style-type: none"> • крови (<i>гемолитическая болезнь новорожденных, гемоглобинопатии</i>); • эндокринной системы (<i>адреногенитальный синдром, сахарный диабет</i>); • с преимущественным поражением почек (<i>фосфат-диабет, цистиноз</i>); • соединительной ткани (<i>синдром Марфана, мукополисахаридозы</i>); • с поражением нервно-мышечной системы (<i>прогрессирующие мышечные дистрофии</i>)
Характер метаболических расстройств	<p>Нарушения обмена:</p> <ul style="list-style-type: none"> • аминокислот (<i>алкаптонурия, тирозиноз, фенилпировиноградная олигофрения</i>); • липидов (<i>болезнь Нимана—Пика, болезнь Гоше</i>); • углеводов (<i>галактоземия, фруктозурия</i>); • минерального (<i>гепатоцеребральная дистрофия</i>); • билирубинового (<i>синдром Дубинина—Джонсона</i>)

* Цит. по материалам сайта: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>

Окончание табл. IV.2

Критерий	Заболевания
Характер изменения генома — генетическая классификация	<ul style="list-style-type: none"> • Хромосомные болезни (обусловленные геномными и хромосомными мутациями). • Генные болезни (обусловленные генной мутацией в одном гене). • Мультифакториальные (моно- и полигенные) — болезни с наследственным предрасположением. • Генетические болезни соматических клеток. • Болезни несовместимости матери и плода. • Митохондриальные болезни. • Прионные болезни. • Болезни импринтинга

Примеры некоторых типов наследственных заболеваний и синдромов с указанием генетических причин их возникновения, частоты встречаемости и краткой характеристикой признаков клинического проявления приведены в главе 14. Для каждого случая указан номер болезни по базам данных МКБ-10 и MIM. Информация (номер) о хромосомах, локусах и генах, являющихся причиной наследственной патологии, представлена по базе данных MIM.

Хромосомные болезни

Хромосомные болезни — заболевания, возникающие по причине геномных или хромосомных мутаций. Они передаются гаметически от родителей к детям или могут возникнуть *de novo* во время эмбрионального развития (мозаичная форма). Различают хромосомные болезни с изменением числа и структуры хромосом.

14.1. Хромосомные болезни с изменением числа хромосом

В классической цитогенетике диагностика хромосомных болезней с изменением числа хромосом проводилась с середины XX в. Известно и описано небольшое число таких заболеваний или синдромов (табл. 14.1).

Таблица 14.1. Хромосомные болезни с изменением числа хромосом

Заболевание	Тип мутации	Кариотип
<i>Изменение числа аутосом</i>		
Синдром Патау	Tri13	47,XX,+13; 47,XY,+13
Синдром Эдвардса	Tri18	47,XX,+18; 47,XY,+18
Синдром Дауна	Tri21	47,XX,+21; 47,XY,+21
Синдром Варкани	Tri8	mos 47,XY,+8/46,XY
		mos 47,XX,+8/46,XX
Синдром трисомии 14	Tri14	47,XX,+14; 47,XY,+14

Окончание табл. 14.1

Заблевание	Тип мутации	Кариотип
<i>Изменение числа половых хромосом</i>		
X-хромосомы		
Синдром Шерешевского—Тернера	Mon* XO	45,XO
XXX-синдром	TriXXX	47,XXX
Y-хромосомы		
Синдром Клайнфельтера	XXY, XXYY	47,XXY; 48,XXYY
Синдром Двойной Y-хромосомы	XYY	47,XYY

* Mon — моносомия.

14.1.1. Хромосомные болезни с изменением числа аутосом

14.1.1.1. Синдром Дауна (*Down syndrome*)

МКБ-10: Q90.0–90.9

Стандартная форма трисомии 21 (Tri21)

Кариотип ♀ (47,XX,+21)

Кариотип ♂ (47,XY,+21) (рис. 14.1)

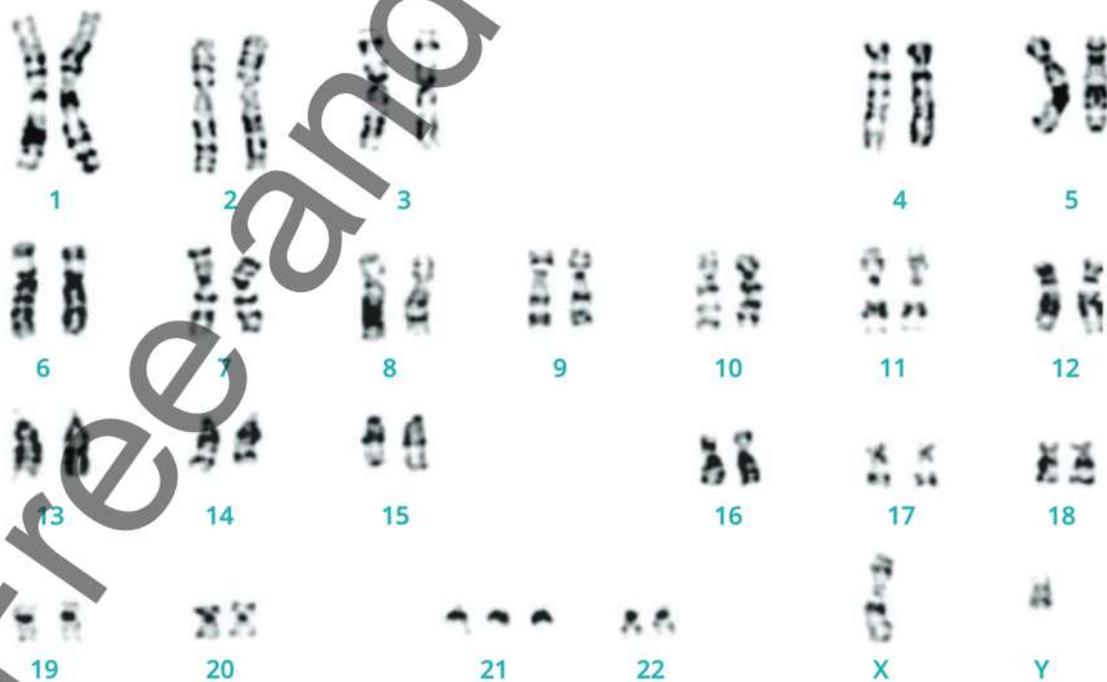


Рис. 14.1. Кариотип с трисомией по хромосоме 21 (47,XY,+21) при синдроме Дауна (фото)

Наиболее часто встречается анеуплоидия: 1 : 500–700 новорожденных. Эта трисомия наблюдается чаще у мальчиков, чем у девочек (3 : 2). Причиной является нарушение расхождения хромосом во время гаметогенеза (см. рис. 14.2, А и Б). При этом нерасхождение хромосом наблюдается чаще в гаметях женщин (80–90 %), чем в гаметях мужчин (10–20 %). Отмечено, что у матери нарушение возникает в 75 % случаев во время мейоза I и только в 25 % — в мейозе II [Бочков Н. П. и др., 2013]. Частота рождения таких детей зависит от возраста родителей (преимущественно от возраста матери) (см. рис. 14.3) [Erickson J. D. 1979; Roecker G. O., Huether C. A., 1983].

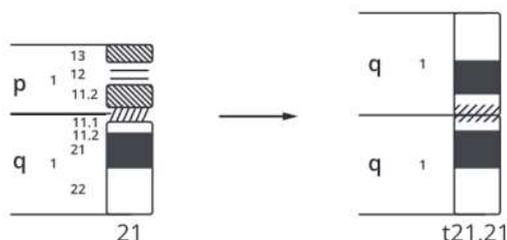
Клинические признаки. Хромосома 21 содержит 256 генов, кодирующих белки. Наиболее важные гены, ответственные за формирование характерных особенностей при синдроме Дауна, представлены в табл. 14.2.

Таблица 14.2. Гены, определяющие формирование клинических признаков при синдроме Дауна

Локализация на хромосоме	Ген	Номер MIM	Клинический признак
21q22.1	<i>IFNAR1</i> (Interferon-alpha receptor 1)	107450	Ослабление клеточного и гуморального иммунитета
	<i>IFNAR2</i> (Interferon-alpha, beta and omega receptor 2)	602376	
21q22.12	<i>RCAN1</i> (DSCR1) Regulator of calcineurin 1	602917	Умственная отсталость, пороки сердечно-сосудистой системы
21q22.3	<i>SUMO3</i> (Small ubiquitin-like modifier 3)	602231	Раннее старение, нарушение процессов репарации и апоптоза
	<i>PRMT2</i> (Protein arginine methyltransferase 2)	601961	
	<i>ETS2</i> (Erythroblastosis Virus E26 oncogene homolog 2)	164740	Умственная отсталость, образование злокачественной или доброкачественной опухоли

У новорожденных с синдромом Дауна существует значительное внутриутробное и постнатальное отставание в физическом развитии. Для пациентов с синдромом Дауна характерны умственная отсталость, низкорослость, избыточная масса тела, плоское лицо, монголоидный разрез глаз, гипертелоризм, складка кожи в углу глаза (эпикантус), открытый рот, выступающий из полости рта язык, брахицефалия, короткие конечности, короткие пальцы, поперечная ладонная складка, пороки сердца, снижение остроты зрения. Примерно 40 % детей с синдромом Дауна страдают сердечной недостаточностью. У них повышен риск развития лейкемии. Продолжительность жизни ограничена и во многом зависит от условий реабилитации детей.

А



Б

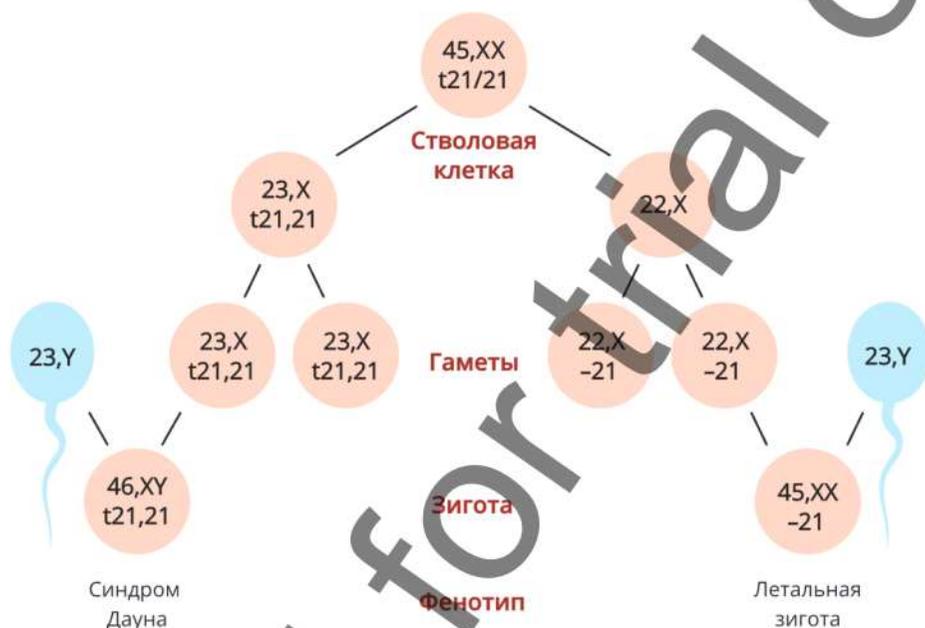


Рис. 14.2. Формирование и механизм передачи аберрации при различных формах синдрома Дауна

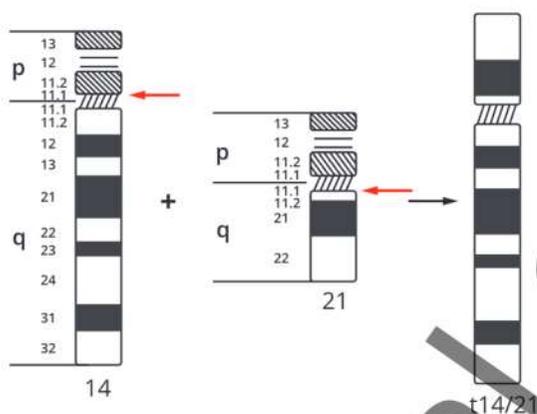
А — идиограммы нормальной хромосомы 21 и сбалансированной транслокации (t21;21);

Б — схема передачи транслокации (t21;21);

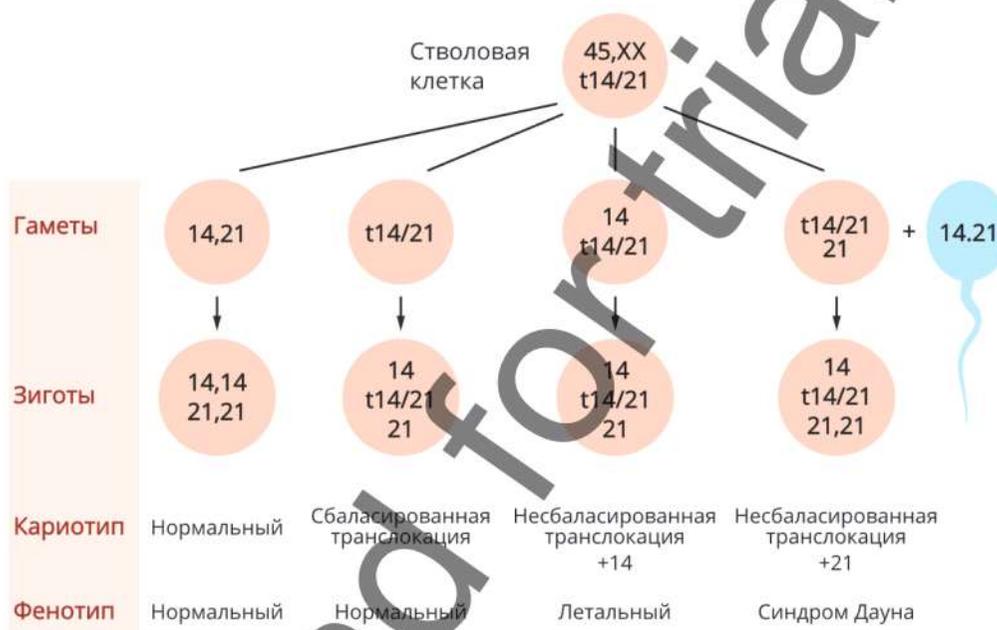
Генетические варианты. Стандартная форма трисомии хромосомы 21 обычно встречается в среднем в 90–95 % случаев и характеризуется в основном умственной отсталостью. Степень же фенотипического проявления может варьировать [Kruszka P. et al., 2017]. Около 1–2 % детей с синдромом Дауна имеют мозаичные формы трисомии 21. Примерно у 3–4 % больных обнаруживается транслокационная форма трисомии (см. рис. 14.4, В и Г).

Данные национального регистра синдрома Дауна (*National Down Syndrome Cytogenetic Register*) Англии и Уэльса позволили оценить частоту появления более редких кариотипов этого синдрома и описать их эпидемиологию. Цитогенетическое и эпидемиологическое обследование, проведенное в течение 10 лет, показало, что почти 97 % всех случаев были полной трисомией хромосомы 21; 2,9 % — с аберрацией

В



Г



В — идиограммы нормальных хромосом (14 и 21) и транслокации (t14;21); Г — схема передачи аберраций с вовлечением хромосом 14 и 21

хромосомы 21; 0,3% — двойные или тройные анеуплоидии с участием хромосомы 21; 1% — мозаичная форма патологии. Средний возраст матери при полной трисомии 21 составил 35 лет. Около 1% матерей имели рецидивы рождения детей с синдромом Дауна (гонадный мозаицизм). При мозаичной форме трисомии 21 средний возраст матери составил 33 года, и у 2,5% матерей отмечены повторные случаи деторождения с синдромом Дауна. Большинство транслокаций были робертсоновскими (21;21), в этом случае средний возраст матерей был меньше (28 лет). 54% робертсоновских транслокаций *der(14;21)* носили характер *de novo*, 41% имели материнское и 5% — отцовское происхождение. Риск повторного рождения больного ребенка увеличивается до 15,8% [Morris J.K. et al., 2012].

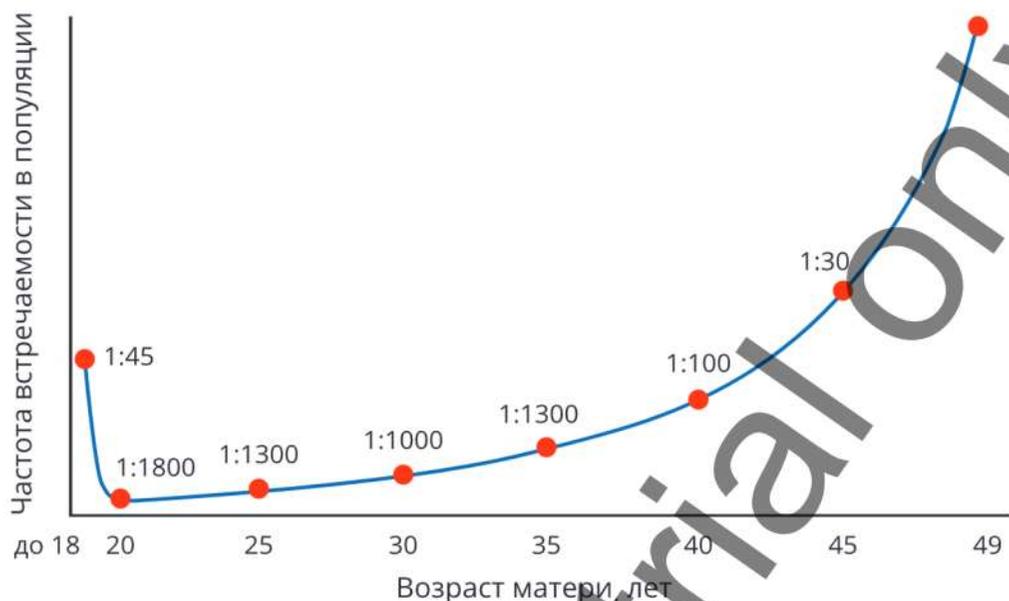


Рис. 14.3. Зависимость частоты рождения детей с синдромом Дауна от возраста матери

Далее приводятся цитогенетические варианты синдрома Дауна, описанные в работе [Zhao W. et al., 2015]. В этом исследовании проанализированы цитогенетические характеристики 7,133 случая трисомии 21 (Tri21), идентифицированные из 247 818 последовательных постнатальных случаев, кариотипированных в одной из лабораторий в течение четырех лет.

Трисомия 21 с вовлечением других типов аберраций хромосом

В редких случаях при трисомии хромосомы 21 у пациентов наблюдаются и другие аберрации хромосом (табл. 14.3).

Таблица 14.3. Примеры трисомий (Tri) по хромосоме 21 (Tri21) с вовлечением структурных и других аберраций хромосом

Немозаичные формы Tri21 + робертсоновские транслокации (der)	
der(13;14)	
♀ 46,XX,der(13;14)(q10;q10),+21	♂ 46,XY,der(13;14)(q10;q10),+21
der(13;21)	
♀ 46,XX,der(13;21)(q10;q10),+21	♂ 46,XY,der(13;21)(q10;q10),+21
der(14;21)	
♀ 46,XX,der(14;21)(q10;q10),+21	♂ 46,XY,der(14;21)(q10;q10),+21
—	♂ 46,XY,der(14;21)(q10;q10), t(6;12)(q21;q13),+21
der(15;21)	
♀ 46,XX,der(15;21)(q10;q10),+21	♂ 46,XY,der(15;21)(q10;q10),+21

Окончание табл. 14.3

Немозаичные формы Tri21 + робертсоновские транслокации (der)	
der(21;21)	
♀ 46,XX,der(21;21)(q10;q10)	♂ 46,XY,der(21;21)(q10;q10)
der(21;22)	
♀ 46,XX,der(21;22)(q10;q10),+21	♂ 46,XY,der(21;22)(q10;q10),+21
Аберрации, не связанные с робертсоновскими транслокациями (der), с Tri21	
♀ 47,XX,t(3;21)(q21;q22),+21	♂ 47,XY,t(19;21)(p11;p11),+21
♀ 47,XX,t(9;21)(p11;p11),+21	—
Tri21 + другие анеуплоидии Tri21	
♀ 48,XX,+21,+mar	♂ 47,XY,der(21;21)(q10;q10),+mar
♀ 48,XXX,+21	♂ 48,XXY,+21
♀ mos 48,XX,+21,+mar/47, XX,+21	♂ 48,XYY,+21
—	♂ mos 48,XYY,+21/47, XY,+21

Стандартные мозаичные формы трисомии 21

Кариотип ♀ (47,XX+21/46,XX)

Кариотип ♂ (47,XY+21/46,XY)

В редких случаях выявляется мозаичная форма синдрома Дауна, что является причиной возникновения данной анеуплоидии во время эмбриогенеза, когда происходит активное деление эмбриональных стволовых клеток (см. гл. 5, п. 5.4.6).

Мозаичные формы трисомии 21 (mos21) с вовлечением других аберраций хромосом

Описаны редко встречающиеся случаи мозаичных форм трисомии 21 с вовлечением других аберраций (табл. 14.4).

Таблица 14.4. Примеры мозаичных форм трисомии 21 (Tri21) с вовлечением сложных структурных аберраций

Мозаичные формы Tri21 + робертсоновские транслокации	
♂ mos 45,XY,der(13;21)(q10;q10)/46,XY,der(21;21)(q10;q10)	
♂ mos 45,XY,der(14;21)(q10;q10)/46,XY,der(14;21)(q10;q10),+21	
♂ mos 46,XY,der(21;21)(q10;q10)/46,XY	
♂ mos 45,XY,der(21;22)(q10;q10)/46,XY,der(21;22)(q10;q10),+21	
♀ mos 45,XX,der(21;21)(q10;q10)/46,XX,der(21;21)(q10;q10)	
♀ mos 46,XX,der(21;21)(q10;q10)/46,XX	

Моносомия хромосомы 21

Моносомия хромосомы 21 среди живорожденных встречается исключительно в редкой, мозаичной, форме. Известно около десяти живорожденных с регулярной моносомией хромосомы 21, подтвержденной молекулярными методами.

14.1.1.2. Синдром Патау

Кариотип ♀ (47,XX,+13)

Кариотип ♂ (47,XY,+13)

МКБ-10: Q91.0–91.3

Синдром Патау (*Patau syndrome*), описанный К. Патау и соавт. [Patau K. et al., 1960], — это трисомия аутосомы 13, встречающаяся с частотой 1 : 5000–7000 новорожденных и характеризующаяся тяжелыми врожденными пороками развития. Продолжительность жизни короткая. До 95 % детей умирают в первые месяцы жизни. В редких случаях, благодаря возможности современной детской хирургии и вспомогательной терапии, некоторые больные могут прожить до пяти (около 15 % больных) и даже до десяти лет (2–3 % больных). Соотношение полов при синдроме Патау близко к 1 : 1 [Alberman E. et al., 2012].

Клинические признаки. Наблюдаются пороки развития головного мозга (*arisen-cephaly*), неонатальные судороги, апноэ во сне, глубокая умственная отсталость, пороки развития глаз (эпикант, микрофтальм или анофтальмия), расщелина губы и нёба (хейло- и палатосхизис), почек (кистозные почки, обструктивные почки), пищеварительного тракта (злокачественная кишка), сердца (дефекты перегородки, дэкстракардия), половых органов (гипоплазия наружных половых органов), полидактилия, гемангиомы в области скальпа, очаговая аплазия кожи в теменно-затылочной области, аномальная дерматоглифика.

Генетические варианты. Генетической причиной возникновения патологии является трисомия по хромосоме 13 (рис. 14.4).

В редких случаях (до 6 %) наблюдается мозаичная форма трисомии по 13 хромосоме. Хотя клинические особенности, связанные с полной трисомией 13, были хорошо охарактеризованы, клинический результат, связанный с трисомией мозаики 13 менее ясен [Hook E.V., 1980]. В литературе сообщается о широком спектре возможных клинических исходов — от тяжелой умственной отсталости и врожденных дефектов к нормальному интеллекту. В этих случаях не существует единого мнения о типичном фенотипе, что делает генетическую консультацию после пренатальной диагностики мозаичной трисомии 13 особенно сложной.

В работе [Kunwar F. et al., 2016] описан случай с 24-летней девочкой со следующими фенотипическими характеристиками: короткие колумеллы (*кожная перегородка, разделяющая ноздри*), маленькие низко посаженные уши, судороги, расщепление языка, эпикант, гладкий фильтр (расстояние от корня носа до красной каймы верхней губы), микроцефалию, кариозные зубы, аномальная дерматоглифика, пропорциональная низкорослость, высокое нёбо, нарушение прикуса зубов и др. Цитогенетический анализ метафазных хромосом показал, что в 25 % клеток наблюдается кариотип 47,XX,+13. Интерфазный FISH-анализ выявил трисомию 13 в 15 % клеток (рис. 14.5).

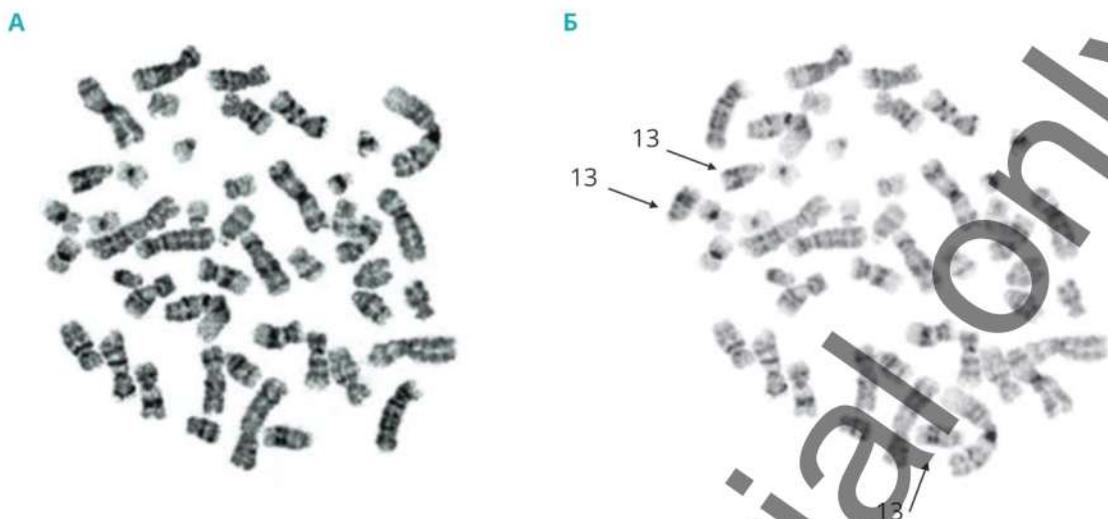


Рис. 14.4. Метафазные пластины с нормальным числом хромосом (А) и с анеуплоидией — трисомией по хромосоме 13 (Б, показано стрелками); G-бэндинг, фото

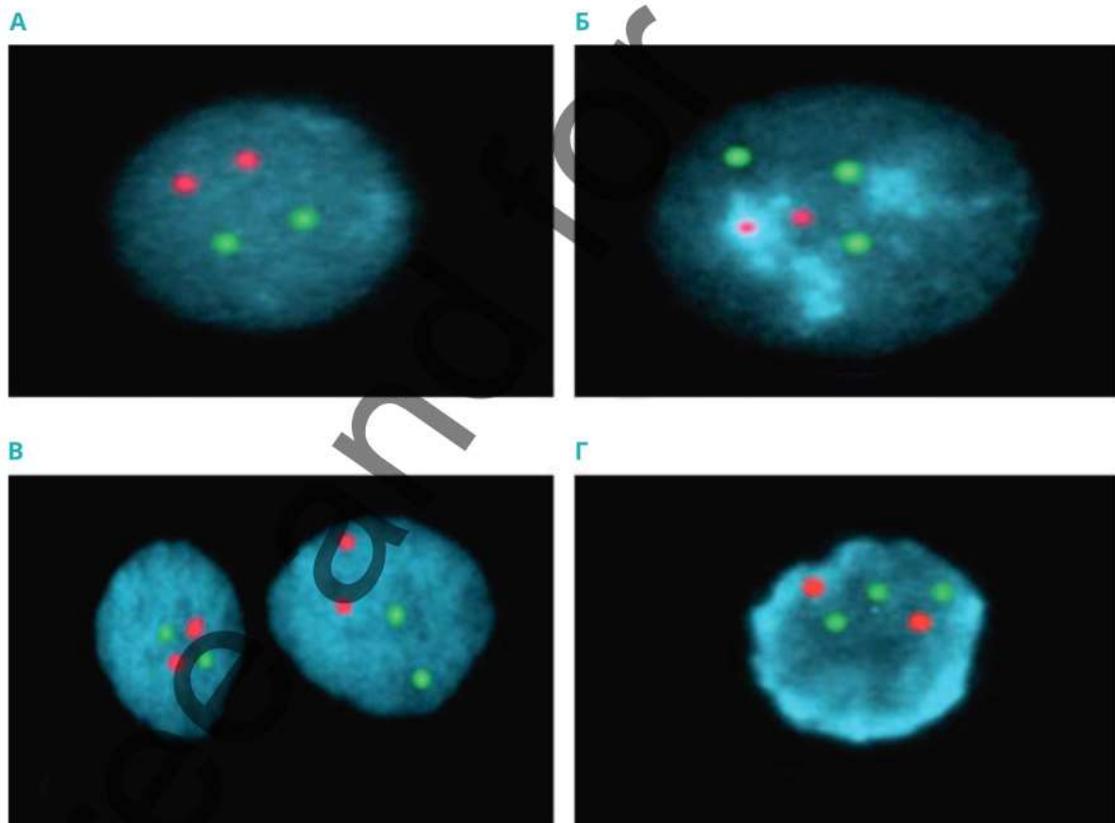


Рис. 14.5. Интерфазный FISH-анализ в случае мозаичной трисомии 13 в лимфоцитах крови и в буккальных клетках (фото)

Интерфазные клетки из лимфоцитов крови, показывающие нормальные сигналы (А) и трисомию 13 (Б); интерфазные клетки из буккального эпителия, показывающие нормальные сигналы (В), и трисомия 13 (Г) (цит. по [Kunwar F. et al., 2016])

В работе [Chen C.P. et al., 2017] описан случай мозаичной формы синдрома Патау. Цитогенетическое исследование было проведено с использованием G-бэндинга, FISH- и aCGH-методов. Женщина в возрасте 35 лет прошла процедуру амниоцентеза

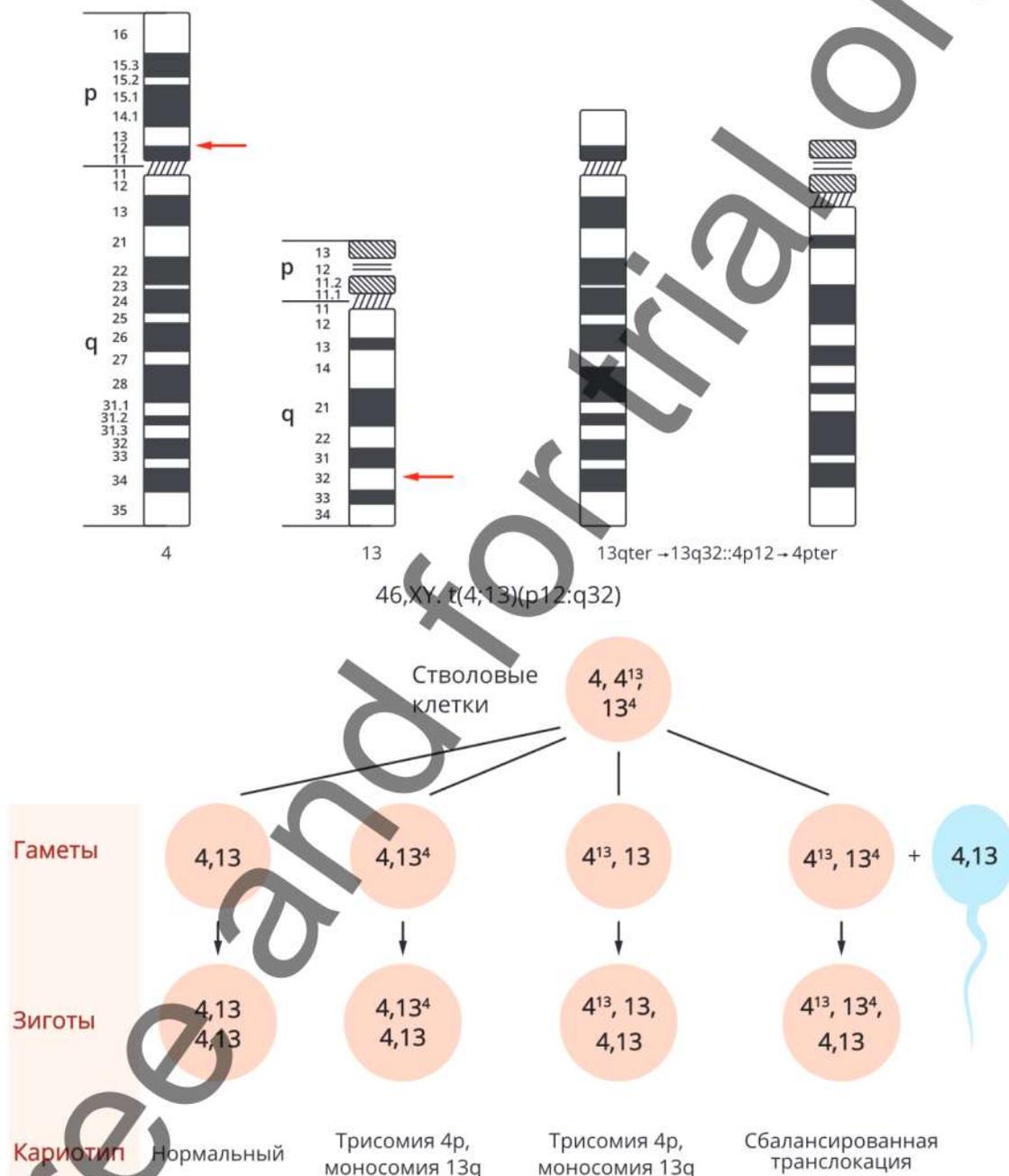


Рис. 14.6. Формирование и механизм передачи aberrации при различных формах синдрома Патау:

А — идиограммы нормальных хромосом (4 и 13) и их aberrантные формы (t(4;13); Б — схема передачи aberrаций с вовлечением хромосом 4 и 13

Сокращения: pter /qter — конец короткого/длинного плеча хромосомы.

на 18-й неделе беременности в связи с возрастом. Родительские кариотипы были нормальными. Роды состоялись на 37-й неделе беременности. Родился фенотипически нормальный мальчик весом 3600 г. Обследование ребенка в возрасте 8 мес. показало нормальное психомоторное развитие. По результатам цитогенетического исследования лимфоцитов периферической крови у мальчика был нормальный кариотип: 46,XY, а по данным интерфазного FISH-анализа выявлен уровень мозаичной формы трисомии хромосомы 13 в 4,4 % (2/45 клеток).

В работе [Morris J.K. et al., 2012] показано, что транслокации с вовлечением хромосомы 13 наблюдались у 8 % живых новорожденных. Чаще всего отмечается робертсоновская транслокация с вовлечением хромосом 4 и 13 (рис. 14.6).

14.1.1.3. Синдром Эдвардса

Кариотип ♀ (47,XX,+18)

Кариотип ♂ (47,XY,+18)

МКБ-10: Q91.4–91.7

Первый пациент с трисомией 18 был описан Дж. Эдвардсом в 1960 г. [Edwards J.H. et al., 1960]. Частота синдрома Эдвардса составляет 1 : 5000–8000 новорожденных, соотношение мальчиков и девочек — 1 : 4.

Клинические признаки. Внутриутробная гипоплазия (гидрамнион, малая плацента, низкий вес при рождении), пороки мозга (микро- или гидроцефалия, долькоцефалия), черепно-лицевые дисморфии (гипоплазия надбровных дуг, короткие глазные щели, монголоидный разрез глаз, микрофальмия, дисплазия ушей, маленький и узкий нос, маленькая челюсть, высокое нёбо), короткая грудина, грыжи, стопа «качалка», сжатые кулачки с перекрывающимися пальцами, полидактилия, аномальная дерматоглифика, укорочение и утолщение первого пальца стопы, аномалия сердца, почек и пищеварительного тракта. Прогноз для жизни сомнителен, большинство детей умирают в течение первого года жизни. Продолжительность жизни ограничена врожденными пороками развития внутренних органов. У всех детей наблюдается тяжелый психоневрологический дефицит [Cereda A., Carey J. C., 2012].

Генетические варианты. Мозаичная форма трисомии 18 возникает, когда две разные клеточные линии существуют у одного и того же человека: одна клеточная линия имеет две копии хромосомы 18, а другая — три копии. Кариотип мальчика с трисомией хромосомы 18 представлен на рис. 14.7. В работе [Tucker M.E. et al., 2007] представлены клинические случаи с мозаичной формой трисомии 18, которые фенотипически сильно различаются. Интеллектуальные возможности пациентов варьируют от глубокой умственной отсталости до среднего уровня интеллекта. Авторы предполагают, что нет никакой корреляции с процентом клеток с трисомией в фибробластах или лимфоцитах и тяжестью клинических проявлений. У четверых фенотипически здоровых родителей описана мозаичная форма трисомии 18, которая была идентифицирована у них только после рождения детей с полной трисомией 18. Транслокационные формы крайне редки.

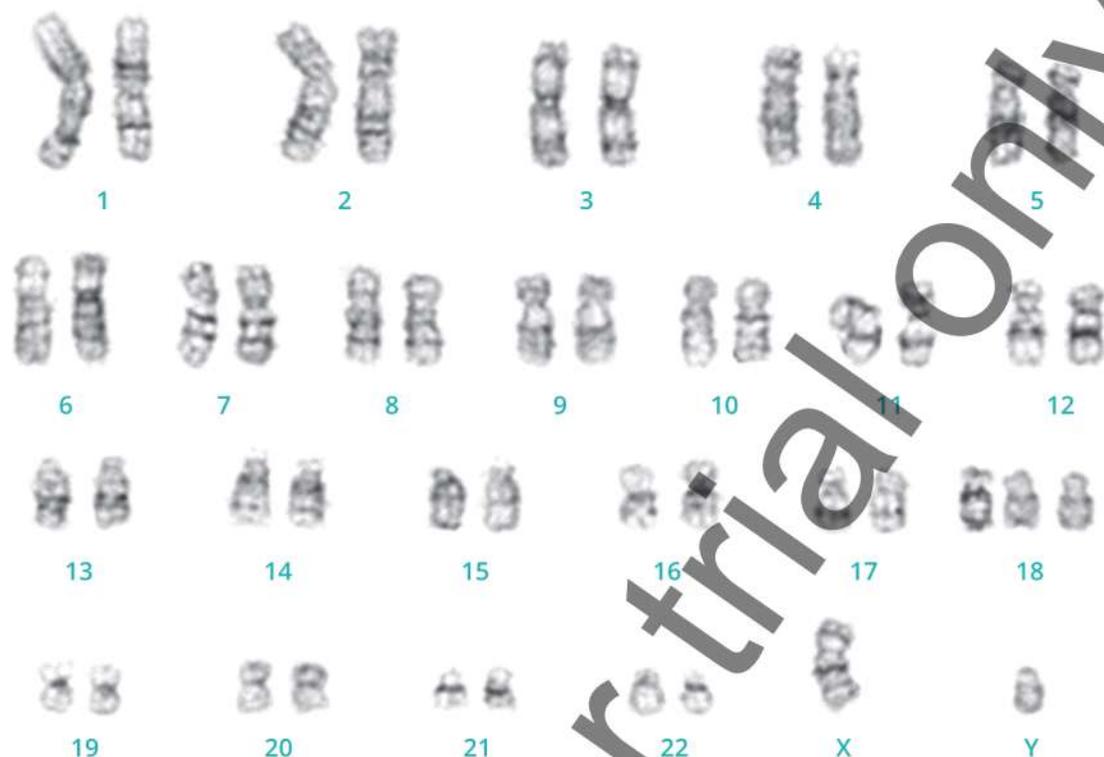


Рис. 14.7. Кариотип мальчика с трисомией хромосомы 18 (фото, G-бэндинг)

14.1.2. Хромосомные болезни с изменением числа половых хромосом

14.1.2.1. Синдром Клайнфельтера

Кариотип ♂ (47,XXY или 48,XXXXY)

МКБ-10: Q98.0

Синдром Клайнфельтера (*Klinefelter syndrome*) — это первая аномалия по половым хромосомам человека, клинически описанная в 40-х годах XX в. [*Klinefelter et al., 1942*]. Большинство пациентов с синдромом Клайнфельтера имеют кариотип 47,XXY (рис. 14.8). Частота синдрома составляет 1 : 500–1000 новорожденных мальчиков.

Клинические признаки. Высокий рост, гипоплазия яичка с дефицитом или отсутствием сперматогенеза с сохраненными клетками Лейдига, гинекомастия и интеллектуальный дефицит. Легкая умственная отсталость при синдроме Клайнфельтера встречается в 25–50 % случаев. До полового созревания этот синдром практически не диагностируют. Хромосомную патологию нередко обнаруживают у мужчин, обратившихся по поводу бесплодия.

Генетические варианты. Приблизительно у 15 % пациентов с этим синдромом встречается мозаичная форма трисомии. Кариотипы при мозаичных формах: 46,XY/47,XXY и 46,XX/47,XXY. Фенотипический полиморфизм, скорее всего, зависит от количества аномальных клеток и их местоположения в тканях организма.

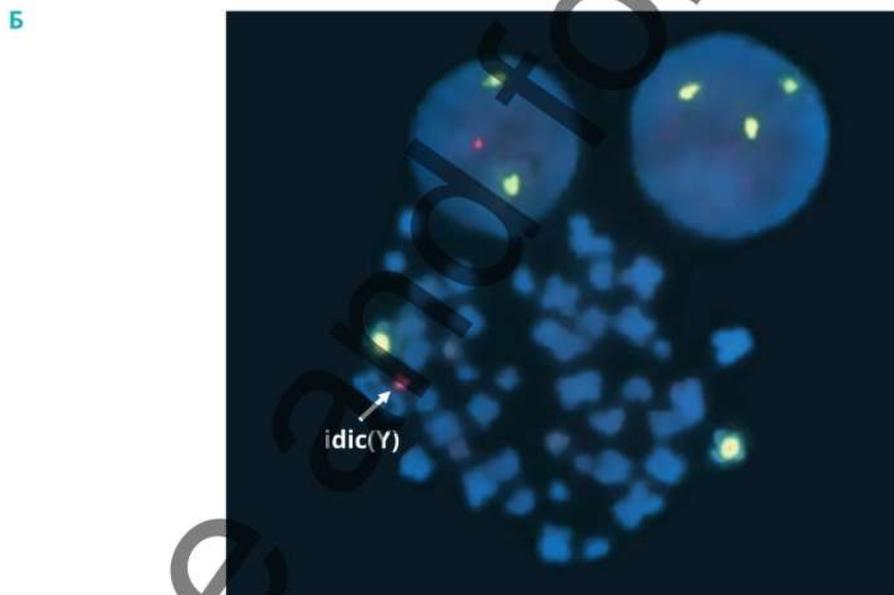
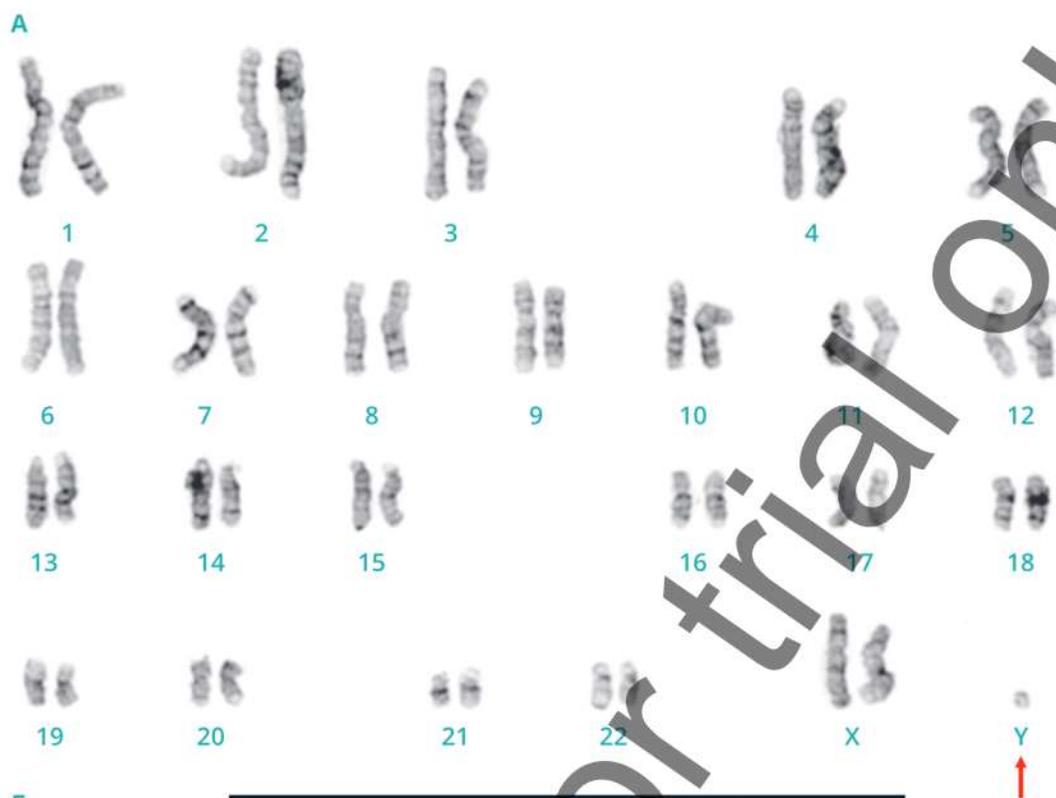


Рис. 14.8. Кариотип мужчины с мозаичной формой синдрома Клайнфельтера 47,XX,idic(Y):

А — метафазные хромосомы (фото, G-бэндинг); **Б** — интерфазное ядро (FISH-анализ с использованием специальных зондов для *DAZ* (длинные плечи Y-хромосом, красный цвет) и *DYZ3* (центромеры Y-хромосом, зеленый цвет). Маркеры хромосом (стрелка) имели два сигнала для *DYZ3*. Отсутствие сигналов для *DAZ* указывает на дефект в длинных плечах Y-хромосомы) (цит по [Tomomasa H. et al., 2008])

Часто в случаях с мозаичной формой синдрома Клайнфельтера диагностируется изодисцентрическая Y-хромосома [Wu H.H. et al., 2007; Neas K.R. et al., 2005]. Изодисцентрическая Y-хромосома является одним из наиболее распространенных структурных изменений Y-хромосом. Причиной такой мутации, вероятно, служит нерасхождение хромосом во время мейоза. Однако окончательный механизм возникновения изодисцентрической Y-хромосомы не совсем ясен.

В работе [Tomomasa H. et al., 2008] описана мозаичная форма синдрома Клайнфельтера, ассоциированная с изодисцентрической Y-хромосомой у 70-летнего мужчины с атрофией пениса. Его рост составлял 170 см, а вес — 60 кг. Гормональный анализ сыворотки показал гипергонадотропный гипогонадизм. Исследование FISH-методом выявило у пациента следующие кариотипы: 47,XXY, 46,XY/46,XX и 47,XX,idic(Y)(q11.2). Наличие как дисцентрической, так и нормальной Y-хромосомы также описано в работе [Bruyere H. et al., 2006], где у обследованных наблюдался нормальный фенотип. Описаны [Stankiewicz P. et al., 2001] два случая диагностики с использованием методов классической и молекулярной цитогенетики (FISH с Y-специфичными зондами) мозаичной формы синдрома Клайнфельтера с изодисцентрической Y-хромосомой (см. рис. 14.8). Анализ лимфоцитов периферической крови первого пациента выявил аномалии кариотипа: 45,X/46,X,+idic(Y)(p11.32); 47,XY+idic(Y)(p11.32); 47,X+2idic(Y)(p11.32). В удаленных гонадах не было обнаружено Y-хромосомного материала. Вторая мутация Y-хромосомы была выявлена у мальчика с умеренной умственной отсталостью и черепно-лицевыми аномалиями. У него в лимфоцитах периферической крови присутствовали кариотипы: 47,X,+idic(Y)(q11.23),+i(Y)(p10); 46,X+I(Y)(p10).

14.1.2.2. Синдром XYY (47,XYY)

Кариотип ♂ (47,XYY)

МКБ-10: Q98.5–98.9

Синдром XYY (*XYY syndrome*) четко не определен фенотипически и является главным образом цитогенетическим термином. Он встречается с частотой 1 : 1000 новорожденных мальчиков.

Клинические признаки. В первые годы жизни дети с синдромом YY фенотипически не отличаются от детей с нормальным кариотипом. Однако начиная с подросткового возраста, когда происходит активный рост организма и половое созревание, отмечаются высокий рост, макроцефалия, задержка речи, координационные нарушения, крупное надпереносье, большие уши, асимметрия лица, воронкообразная деформация грудины, в подростковом возрасте — угревая сыпь. У лиц с синдромом YY наблюдается повышенный риск возникновения социальной дезадаптации, эмоциональных нарушений, синдрома дефицита внимания, гиперактивности, аутизма и склонности к агрессивному поведению. Умственное развитие в пределах нормы, но речевое — задерживается. У большинства развитие и функции половых желез нормальные, однако известны случаи недоразвития яичек, бесплодия или пониженной фертильности [Ross J.L. et al., 2012; Stochholm K. et al., 2012; Bardsley M.Z. et al., 2013].

14.1.2.3. Синдром трисомии X (47,XXX)

Кариотип ♀ (47,XXX)

МКБ-10: Q97

Женщины с синдромом трисомии X (*Trisomy X*) фенотипически не отличаются от женщин с нормальным кариотипом. Этот синдром обнаруживается с частотой 1 : 1000 новорожденных девочек.

Клиническая картина. Высокорослость, снижение интеллекта, гипоплазия средней части лица, микрогнатия, клинодактилия, узкие плечи, нерегулярные менструации или аменорея. У некоторых из них наблюдаются эмоциональные трудности в социальной адаптации. Их дети обычно имеют нормальный кариотип.

Генетические варианты. В работе [Tuke M.A. et al., 2018] показаны распространенность и фенотипические последствия анеуплоидии X-хромосомы в популяции 244 848 женщин старше 40 лет из Великобритании. Из них — 110 с кариотипом 47,XXX. Распространенность случаев с 47,XXX (45/100 000) была ниже, чем ожидалось. Женщин с синдромом 47,XXX отличает более высокий рост и раннее наступление менопаузы.

14.1.2.4. Синдром тетрасомии X (48,XXXX)

Кариотип ♀ (48,XXXX)

МКБ-10: Q97.1

Синдром тетрасомии X (*Tetrasomy X*) представляет собой полисомию, характеризующуюся значительной умственной отсталостью с коэффициентом интеллекта ниже 50 %. Продолжительность жизни не нарушается. Фенотипически наблюдаются микроцефалия, овальное лицо, гипертония, эпикант, косоглазие и короткие пальцы с клинодактильными пальцами. Половое созревание в основном не отличается от полового созревания лиц с нормальным кариотипом.

14.1.2.5. Синдром Шерешевского—Тернера (моносомия X)

Кариотип ♀ (45,X0)

МКБ-10: Q96.0–96.9

Синдром Тернера (*Turner syndrome*) также был клинически описан намного раньше, чем состоялось открытие его генетической причины [Turner H.H., 1938], и это единственный пример моносомии, связанной с практически нормальной продолжительностью жизни (см. рис. 14.9). Частота встречаемости составляет 1 : 2500 новорожденных девочек. Предполагается, что рождаются только 1 : 40 детей с синдромом Тернера, а остальные анеуплоидии спонтанно прерываются в первые месяцы беременности.



Рис. 14.9. Кариотип девочки с синдромом Шерешевского—Тернера (фото, дифференциальное окрашивание G-бэндинг)

Клинические признаки. Низкорослость и дисгенезия гонад — наиболее постоянные признаки, встречающийся в 100 % случаев у лиц с синдромом Шерешевского—Тернера и более чем в 96 % — у лиц с мозаичным типом этой аномалии. Характерная особенность — это строение шеи с крыловидными кожными складками по бокам. Гипогонадизм встречается почти у 97 % больных. Также наблюдается дисфункция яичников, лимфедема, остеопороз, гипотиреоз, опущение век, далеко расположенные друг от друга соски, узкое нёбо, низкая линия роста волос на задней части головы, низко посаженные уши, короткие руки. В 20 % случаев диагностируют патологии сердечно-сосудистой системы, в 40–60 % случаев — аномальное строение почек. Отмечено нарушение зрения и слуха (прогрессирующая нейросенсорная тугоухость). Обычно у больных с синдромом Шерешевского—Тернера идет нормальное умственное развитие, с хорошими навыками речи и чтения. Тем не менее в некоторых случаях отмечаются проблемы с решением математических задач, памятью и мелкой моторикой пальцев.

Ожидаемая продолжительность жизни ребенка с этим синдромом зависит от наличия и тяжести аномалий сердца и почек. Терапия эстрогенами и прогестероном во время ожидаемого полового созревания может привести к появлению вторичных половых признаков и снизить риск развития психологических расстройств и раннего остеопороза.

Клинические особенности коррелируют с гаплоинтенсивностью генов X-хромосомы, которые вызывают такие патологии, как вырождение яичников, дефицит секреции гормонов и первичное бесплодие.

Генетические варианты. Моносомия X встречается в виде полной моносомии X (53,33 % случаев), мозаичной формы (22,52 %), частичной моносомии X (20,36 %) и других форм (3,79 %) [Gravholt C.H., 2004].

В работе [Tuke M.A., et al., 2019] исследовали анеуплоидию X-хромосомы у 244 848 женщин старше 40 лет из Великобритании. У 186 из них были выявлены мозаичная форма синдрома Шерешевского—Тернера и кариотип 45,X/46,XX. Выяснилось, что мозаичная форма синдрома встречалась значительно чаще (76 : 100 000), чем немозаичная форма (12/100 000). Женщины с кариотипом 45,X/46,XX имели нормальный рост и в основном нормальную репродуктивную функцию. У них отсутствовали сердечно-сосудистые осложнения. Однако в работе [Bouayed Abdelmoula N. et al., 2018] описывается редкий случай мозаичной формы синдрома Шерешевского—Тернера у пациентки с ишемической болезнью сердца, аневризмой аорты. Мозаицизм включал две клеточные линии с кариотипом 45,X/46,X,idic(Y)(pter → q11.2::q11.2 → pter).

В обзоре литературы было зарегистрировано 87 пациенток с различными цитогенетическими вариантами синдрома Шерешевского—Тернера, у которых наблюдалось 185 беременностей [Gorduja V., Petrariu F., 2015]. Кариотипы женщин были следующие: 45,X/46,XX; 45,X/47,XXX; 45,X/46,XX/47,XXX. У них отмечался повышенный риск развития аномальной беременности, частые выкидыши, а также высокий риск хромосомной аномалии у плода. Другими осложнениями гестации были: патология аорты, эндокринные болезни (сахарный диабет, гипотиреоз), артериальная гипертония.

В литературе описан чрезвычайно редкий случай мозаицизма у 30-летней женщины с синдромом Шерешевского—Тернера [Mačić-Durović M. et al., 2018]. Она обладала короткой шеей, а ее рост составлял 152 см. Анализ гормонального статуса показал повышенные уровни эстрадиола (340 пг/мл), тогда как другие гормоны [прогестерон (15 нг/мл) и фолликулостимулирующий гормон (7,3 мМЕ/мл)] находились в пределах контрольных значений. Около 90 % клеток имели моносомию хромосомы X (45,X), в 6 % клеток была выявлена трисомия по хромосоме 21 (47,XX,+21), 4 % клеток содержали нормальный кариотип 46,XX. У пациентки зафиксированы 2 естественные беременности. В обоих случаях родились дети с трисомией хромосомы 21 (синдром Дауна).

14.1.2.6. Трисомия хромосомы 8 (синдром Варкани)

Синдром трисомии 8 (*Trisomy 8, Warkany syndrome*) был описан в 60-х годах XX в. у детей с отставанием в умственном развитии и другими врожденными пороками развития. Частота синдрома составляет примерно 1 : 25 000–50 000 новорожденных. Среди больных чаще встречаются мальчики (примерное соотношение лиц мужского и женского пола — 5 : 2). Дети рождаются доношенными, с нормальной массой тела. При рождении и в дальнейшем они не отстают в росте. Возраст родителей не различается от общепопуляционных данных.

Клинические признаки. Различий в клинической картине полных и мозаичных форм не выявлено. Тяжесть клинической картины широко варьирует. В 98 % случаев у детей наблюдается умственная отсталость, у новорожденных — множественные пороки развития [Vacin K.S. и др., 2015]. Отмечены отклонения в строении лица, пороки опорно-двигательного аппарата и мочевой системы. При клиническом обследовании

выявляются выступающий лоб, косоглазие, эпикантус, глубоко посаженные глаза, гипертелоризм глаз и сосков, высокое нёбо (иногда расщелина), толстые губы, вывернутая нижняя губа, большие ушные раковины. Анализ итальянского регистра новорожденных выявил в общей сложности 17 последовательных случаев мозаицизма трисомии 8 [Cassina M. et al., 2018]. У новорожденных не наблюдалось серьезных врожденных дефектов. Задержка роста в пренатальном и постнатальном периодах развития выявлена только в одном случае.

Генетические варианты. Полные трисомии хромосомы 8 обнаруживают у пренатально погибших эмбрионов и плодов. Большинство описанных случаев (около 90 %) относится к мозаичным формам. До 1 % спонтанных потерь беременности связаны с трисомией данной хромосомы. В работе [Giraldo G. et al., 2016] описана мозаичная форма трисомии 8 (mos 47,XY,+8/46,XY) у мальчика в возрасте 14 лет с умственной отсталостью, гипотиреозом, аномалиями конечностей и другими пороками развития. Трисомия хромосомы 8 была выявлена в кожных фибробластах, тогда как в лимфоцитах периферической крови наблюдался нормальный кариотип.

14.2. Хромосомные болезни с изменением структуры хромосом

Хромосомные болезни с изменением структуры хромосом имеют низкую частоту встречаемости в популяции. Известно и описано небольшое число таких заболеваний или синдромов (табл. 14.5).

Таблица 14.5. Хромосомные болезни с изменением структуры хромосом

Заболевание	Тип мутации
Синдром Вольфа—Хиршхорна (синдром 4p-)	del(4p-)
Синдром кошачьего крика (моносомия 5p)	del(5p)
Синдром дупликации короткого плеча хромосомы 9 (синдром 9p+)	dup(9p+)
Синдром Альфи (синдром 9p-)	del(9p-)
Синдром моносомии короткого плеча хромосомы 18 (синдром 18p-)	del(18p-)

14.2.1. Синдром Вольфа—Хиршхорна (синдром 4p-)

МКБ-10: Q93.3 (WHS, MIM 194190)

Синдром Вольфа—Хиршхорна (Wolf-Hirschhorn Syndrome, WHS) является хорошо известным генетическим синдромом с распространенностью от 1 : 20000 до 1 : 50000

новорожденных. Он вызван делецией в коротком плече хромосомы 4. В большинстве случаев мутация возникает *de novo*. В 10 % случаев мутация носит наследственный характер [Battaglia A. et al., 2015].

Клинические признаки. Практически у всех детей наблюдается задержка психо-моторного развития. При рождении отмечается низкая масса тела, микроцефалия, клювовидный нос, гипертелоризм, микрогнатия, маленький рот с опущенными уголками губ. Уши крупные, оттопыренные, мочка и завиток, как правило, не выражены. Часто встречаются расщелины губы и нёба. У мальчиков отмечены гипоспадия и крипторхизм. Из внутренних пороков — поликистоз почек и поражение сердечно-сосудистой системы.

Генетические варианты. Критической областью, ответственной за формирование основных признаков синдрома, является сегмент 4p16. Приблизительно у 55 % лиц с этим синдромом выявляется делеция del(4)(p16.3), а у 40–45 % лиц — несбалансированные транслокации. Описаны случаи выявления других aberrаций хромосомы 4: интерстициальная делеция, кольцевая хромосома, инверсия, дупликация, изохромосома и транслокация t(4;8) [Corrêa T. et al., 2018].

Делеция охватывает две соседние критические области. Первая область, описываемая как критическая область WHS (WHSCR), имеет размер 165 кб на 4p16.3. В этой области присутствуют два гена — *WHSC1* и *NELFA* [Paradowska-Stolarz A. M., 2014]. *WHSC1* участвует в контроле над экспрессией нескольких генов и действует как агент в ремоделировании хроматина. Ген *NELFA* изменяет экспрессию генов-мишеней, участвуя в регуляции удлинения транскрипции РНК-полимеразы II. Вторая область представляет собой WHSCR2, который охватывает ген *LETM1* и 5'-конец гена *WHSC1*. *LETM1* кодирует белок, участвующий в метаболизме митохондрий, транспортируя ионы. В настоящее время WHSCR определяется в положении chr4: 419,224–2,010,962 в эталонном геноме (NCBI BuildGRCh38 / hg19).

У четырехлетней девочки с пороками развития была обнаружена гес(4)dup4p, унаследованная от матери с наличием inv(4)(p15q35). У нее наблюдались задержка развития и поведенческие проблемы, которые напоминают симптомы трисомии 4p. Обзор восьми других живых новорожденных с гес(4)dup4p показывает, что около 40 % из них также имеют общие проявления с трисомией 4p, но у остальных отмечается вариационный спектр пороков развития. В целом фенотип гес(4)dup4p не является специфическим [Garcia-Heras J., Martin J., 2002; Wu Y. et al., 2018].

14.2.2. Синдром кошачьего крика (моносомия 5p)

МКБ-10. Q-93.4 (MIM 123450)

Около 85 % случаев синдрома кошачьего крика (*Cri-du-chat*, CDC) являются мутациями *de novo*. В 10–15 % случаев эта делеция носит семейный характер [Lejeune J. et al., 1963]. Популяционная частота колеблется от 1 : 15 000 до 1 : 50 000 новорожденных.

Клинические признаки. Пренатальная задержка развития, микроцефалия, необычный крик или плач, напоминающий мяуканье кошки (особенно в первые недели после

рождения); антимонолоидный разрез глаз, косоглазие, лунообразное лицо, гипертелоризм, широкая переносица. Ушные раковины низко посажены и деформированы. Имеется поперечная ладонная складка, клинодактилия, синдактилия. Умственная отсталость в стадии имбецильности. Иногда встречаются крипторхизм и аномалии почек. Необходимо отметить, что такие признаки, как лунообразное лицо и «кошачий крик», с возрастом сглаживаются, а микроцефалия и косоглазие выявляются более отчетливо. Умственная отсталость имеется у всех пациентов. Продолжительность жизни зависит от тяжести врожденных пороков развития внутренних органов. Большинство больных погибают в первые годы жизни.

Генетические варианты варьируют от частичной до полной делеции короткого плеча хромосомы 5. Для развития основных признаков синдрома критическим участком является 5p15.3–5p15.2. Геномный анализ данного критического региона показал последовательность, богатую следующими генами: ген *FLJ25076*, гомолог конъюгирующего с убиквитином фермента UBC-E2, ген *FLJ20303*, кодирующий нуклеолярный белок NOP2, участвующий в регуляции клеточного цикла, и ген *MGC5309*, кодирующий белок Nut2 [Wu Q. et al., 2005].

В редких случаях синдром 5p может сопровождаться трисомией 5q. Эта комбинация практически всегда связана с родительскими большими перичентрическими инверсиями. В работе [Ohnuki Y. et al., 2010] описан случай синдрома кошачьего крика с делецией в коротком плече и удвоением длинного плеча хромосомы 5 (*der(5)inv(5)(p15.31q35.1) del(5)(p15.31) dup(5)(q35.1)*). Цитогенетическое тестирование родителей ребенка показало наличие у отца очень большой перичентрической инверсии с разрывами в терминальных областях 5p15.31 и 5q35.1.

14.2.3. Синдром Альфи (синдром 9p-)

MIM 158170

Одна из редких хромосомных болезней — синдром Альфи, или синдром 9p- (*Chromosome 9p- deletion syndrome, monosomy 9p syndrome*); впервые был описан в 1973 г. Причиной возникновения синдрома служат частичная делеция короткого плеча хромосомы 9, изохромосома по длинному плечу и несбалансированные транслокации, но всегда — потеря сегмента 9p22.

Клинические признаки. Преждевременное сращение лобного шва — тригоноцефалия, резко выступающий лоб, монголоидный разрез глаз, эпикант, экзофтальм, гипертелоризм, уплощенная и широкая переносица, маленький рот с большой верхней губой, высокое нёбо. Ушные раковины без мочки или она недоразвита, со сглаженным завитком. Шея короткая, отмечен гипертелоризм сосков. Пальцы рук и ног длинные, с дополнительными складками; ногти широкие, выпуклые, квадратной формы. У девочек выражена гипоплазия малых и больших половых губ, у мальчиков — гипоплазия мошонки и полового члена. Из пороков внутренних органов отмечены поражение сердечно-сосудистой системы и гидронефроз почек. Умственная отсталость в стадии

имбецильности, реже — дебильности. По характеру больные ласковые, спокойные, послушные. Прогноз жизни благоприятный [Alfi O. et al., 1973].

Генетические варианты. Комбинированные данные показали, что критическая область для 9p-делеционного синдрома отображается в области 4–6 Мб в 9p23–p22 между D9S286–D9S285. У 2-летнего японского мальчика с клиническими характеристиками синдрома моносомии 9p выявили делецию в гене *TYRP1* (MIM 115501) находящуюся в локусе 9p23 [Barbaro et al., 2009]. Отмечено, что отдельные области делеции на хромосоме были идентифицированы для 46,XY гонадального дизгенеза (MIM 154230) и синдрома делеции моносомного 9p: 9p24.3, простирающегося от генов *DMRT* (MIM 602424; 604935) до теломер для первого и 9p23–p22.3 для последнего [Vissers et al., 2011], выявили делецию в гене *FREMI* (MIM 608944) [Christ L.A. et al., 1999; Kawara H. et al., 2006].

14.2.4. Синдром 18q- (синдром кошачьего глаза/зрачков)

MIM 601808

Синдром делеции короткого плеча хромосомы 18, или синдром кошачьего глаза/зрачков (*chromosome 18q delation syndrome, Cat eye syndrome, CES*) впервые описан в 1964 г. Частота в популяции не установлена.

Клинические признаки. Типичными признаками заболевания являются: микроцефалия, гипоплазия средней части лица, глубоко посаженные глаза, рот «карпа», профиль лица плоский или вогнутый. Характерно высокое нёбо или его расщелина, деформированные ушные раковины с атрезией или сужением наружных слуховых каналов. Аномалии глаз включают нистагм, страбизм, глаукому, эпикант, атрофию зрительных нервов. У мальчиков отмечен крипторхизм, гипоплазия полового члена и мошонки, у девочек — гипоплазия малых половых губ. Из пороков внутренних органов встречаются пороки сердца, реже — почек. Умственная отсталость, как правило, глубокая и наблюдается в 100 % случаев. Типичны изменения дерматоглифики: избыток завитков на пальцах и поперечная ладонная складка [Brkanac Z. et al., 1998].

Генетические варианты. Исследователи [Katz S.G. et al., 1999; Hale D.E. et al., 2000] показали, что точка разрыва была в области 18q21.3 и проходила между двумя генами, являющимися ингибиторами сериновой протеазы (*serpin*), *SCCA1* (600 517) и *SCCA2* (600 518).

Обследование 29 пациентов с этим синдромом продемонстрировало, что у всех имелись разные точки разрыва хромосом, что указывает на отсутствие «горячей точки» [Feenstra I. et al., 2007]. Полученные результаты уточнили корреляции генотипа/фенотипа для нескольких критических областей, включая микроцефалию (18q21,33), низкорослость (18q12.1–q12.3, 18q21.1–q21.33 и 18q22.3–q23), лейкопатию, задержку миелинизации (18q22.3–q23), дефицит гормона роста (18q22.3–q23) и врожденную атрезии слуховых проходов (18q22.3). Умеренный интеллектуальный дефицит наблюдается у пациентов с дистальными делециями 18q21.33 и тяжелый — у пациентов с проксимальными делециями 18q21.31. При анализе фенотипа и размеров делеции

(151 пациент с делециями 18q) выявили, что критические регионы, связанные с конкретными фенотипами, находятся в пределах 18q22.3–q23 участка [Cody J.D. et al., 2009].

Исследователи [Feenstra I. et al., 2011] провели обследование лиц с синдромической врожденной атрезией слухового прохода из двух семейств с микроделециями 18q22.3–q23 и обнаружили перекрытие делеции 459 кб, область, содержащую один известный ген *TSHZ1* (MIM 614427).

14.2.5. Синдром моносомии короткого плеча хромосомы 18 (синдром 18p–)

MIM 146390

Синдром моносомии короткого плеча хромосомы 18 (*Chromosome 18p delation syndrome*) впервые описан Beuhler E.M. и соавт. в 1964 г. Тип наследования — аутосомно-доминантный. Большинство зарегистрированных случаев были *de novo*. Однако в литературе имеется сообщение о семье, в которой эта делеция была выявлена у матери, ее сына и дочери [Tsukahara M. et al., 2001]. В двух других статьях также представлены семейные случаи данного синдрома [Uchida I.A. et al., 1965; Velagaleti G.V.N. et al., 1996].

Клиническая картина. Низкая масса тела при рождении, мышечная гипотония, умеренная микроцефалия, высокий лоб, гипертелоризм, эпикант, птоз, широкая уплощенная переносица, микрогения, широкий рот с опущенными уголками губ и выпячиванием верхней губы в виде «полицейской фуражки», аномалии зубов, крупные деформированные ушные раковины. Часто встречаются: короткая шея, вдавленная грудная клетка, пупочная и паховая грыжи. Скелетные аномалии могут быть представлены вывихом бедра, деформацией локтевого сустава. Наблюдаются пороки внутренних органов. Выявляется также дефицит иммуноглобулина А. Все больные отстают в психомоторном развитии, во многих случаях до семи-девяти лет отсутствует фразовая речь [Chen C.-P. et al. 2006].

Генетические варианты. Исследовали семь пациентов с делециями *de novo* 18p [Wester J. et al., 2006]. Анализ генотипа-фенотипа показал, что у четырех пациентов с делециями, расположенными в центромерной области при 18p11.1, наблюдалась умственная отсталость, тогда как у двух пациентов из трех с 18p11.1 (18p11.22–p11.21) отмечен нормальный интеллект и у одного — пограничная умственная отсталость (предположительно критической областью, ассоциированной с умственной отсталостью, может быть 18p11.21 и 18p11.1). У всех пациентов с точкой разрыва в 18p11.1 было широкое лицо, которое наблюдалось только у одного из пациентов с более дистальной точкой остановки. Мышечная гипотония была очень распространена (шесть из семи пациентов).

Генные болезни

Генные болезни возникают вследствие мутаций в одном гене и могут быть унаследованы от одного или обоих родителей. Также возможны мозаичные формы заболевания, когда мутация образуется в соматической клетке и дает начало клону поврежденных клеток во время эмбрионального развития.

На сегодняшний день насчитывается около 5000 генных заболеваний. Большая часть их характеризуется многообразием фенотипических проявлений, что обусловлено многочисленными факторами, влияющими на *пенетрантность* (частота проявления доминантного признака у гетерозигот) и *экспрессивность* (степень проявления признака) генов, вызывающих патологию. Также важно учитывать *плейотропное* (множественное) действие гена, которое отвечает за проявление нескольких признаков.

Моногенные наследственные заболевания — *менделирующие болезни*, наследуются по законам Менделя [Carter C.O., 1977]. По характеру наследования их подразделяют на *аутосомно-доминантные*, *аутосомно-рецессивные*, *сцепленные с X-хромосомой с доминантным и рецессивным типом наследования*.

15.1. Моногенные болезни с аутосомно-доминантным типом наследования

Моногенные болезни с аутосомно-доминантным типом наследования наблюдаются во всех поколениях рода и характеризуются разной степенью пенетрантности мутантного гена (табл. 15.1 и 15.2).

Другими примерами болезней с аутосомно-доминантным типом наследования выступают: синдактилия, полидактилия, талассемия, геморрагическая телеангиэктазия, эллиптоцитоз.

Таблица 15.1. Генетическая характеристика некоторых моногенных болезней с аутосомно-доминантным типом наследования

Заболевание	Номер фенотипа в OMIM	Локализация на хромосоме	Ген	Номер гена в MIM
Ахондроплазия <i>Achondroplasia</i>	100800	4p16.3	<i>FGFR3</i>	134934
Синдром Марфана <i>Marfan syndrome</i>	154700	15q21.1	<i>FBN1</i>	134797
Нейрофиброматоз I типа <i>Neurofibromatosis, type 1</i>	162200	17q11.2	<i>NF1</i>	613113
Нейрофиброматоз, семейный, позвоночника <i>Neurofibromatosis, familial spinal</i>	162210			
Наследственный рак молочной железы и яичников <i>Breast-ovarian cancer, familial</i>	604370	17q21.31	<i>BRCA1</i>	113705
Несовершенный остеогенез, тип I <i>Osteogenesis imperfecta, type I</i>	166200	17q21.33	<i>COL1A1</i>	120150

Таблица 15.2. Клиническая картина некоторых моногенных болезней с аутосомно-доминантным типом наследования

Заболевание	Код МКБ	Частота встречаемости	Клиническая картина	Литература
Ахондроплазия	Q77.4	1 : 15 000–40 000	Диспропорциональная низкорослость с короткими конечностями, большая голова, выпуклый лоб, гипоплазия середины лица, поясничный гиперлордоз, гипоплазия тазовых костей. Короткие, веерообразно расположенные пальцы. Интеллект не нарушен	<i>Wynn J. et al., 2007; Ornitz D.M. et al., 2017</i>

Окончание табл. 15.2

Заболевание	Код МКБ	Частота встречаемости	Клиническая картина	Литература
Синдром Марфана	Q87.4	1 : 5000	Высокий рост, непропорционально длинные конечности («паучьи пальцы»), килевидная или воронкообразная деформация грудной клетки, слабость суставов, деформация позвоночника (сколиоз и торакальный лордоз), узкое высокое арковидное небо, мышечная гипоплазия и миопатия. Поражение глаз: подвывих хрусталика. Сердечно-сосудистая система: расширение восходящей дуги аорты, расслаивающаяся аневризма дуги аорты. Легкие: спонтанный пневмоторакс	<i>Voermans N.S.</i> et al., 2009; <i>Stheneur C.</i> et al., 2014
Нейрофиброматоз	Q85.0	1 : 3000–50 000	Более пяти пятен цвета «кофе с молоком» диаметром 5 мм в возрасте пяти лет на боковых поверхностях туловища и в подмышечных впадинах, нейрофибромы (доброкачественные опухоли из оболочек нервов), дерматофибромы, глиомы зрительных и слуховых нервов (у 7,5 % пациентов), деформации скелета, врожденные ложные суставы, гамартомы	<i>Sarnat N.B.</i> , et al., 2013; <i>Dunning-Davies B.M.</i> , et al., 2016
Несовершенный остеогенез («хрустального человека»)	Q78.0	1 : 30 000	Множественные переломы костей после минимальной травмы. Внутриутробные переломы. Деформации суставов и кифосколиоз, грыжа. Тонкая, легкотравмируемая кожа, голубые склеры и помутнение по краю роговицы — «старческая дуга», пролапс митрального клапана, аортальная клапанная недостаточность и диаметр корня аорты немного больше нормального	<i>Hansen B.</i> , <i>Jemec G.B.</i> , 2002; <i>Marini G.C.</i> , et al., 2017

15.2. Моногенные болезни с аутосомно-рецессивным типом наследования

Моногенные болезни с аутосомно-рецессивным типом наследования встречаются в популяции чаще, чем другие генные болезни (табл. 15.3 и 15.4). Они наследуются в роду через одно или два поколения.

Таблица 15.3. Генетическая характеристика некоторых моногенных болезней с аутосомно-рецессивным типом наследования

Заболевание	Номер фенотипа в MIM	Локализация на хромосоме	Ген	Номер гена в MIM
Муковисцидоз <i>Pseudomonas aeruginosa, susceptibility to chronic infection by, in cystic fibrosis</i>	219700	1q23.3	FCGR2A	146790
Кистозный фиброз <i>Cystic fibrosis</i>		7q31.2	CFTR	602421
Кистозный фиброз с легочными проявлениями <i>Cystic fibrosis lung disease</i>		19q13.2	TGFB1	190180
Болезнь Вильсона—Коновалова <i>Wilson disease</i>	277900	13q14.3	ATP7B	606882
Фенилкетонурия <i>Phenylketonuria</i>	261600	12q23.2	PAH	612349
Галактоземия <i>Galactosemia</i>	230400	9p13.3	GALT	606999
Гомоцистинурия <i>Homocystinuria</i>	236200	21q22.3	CBS	613381

Другие примеры генных заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования: алкаптонурия, альбинизм и другие энзимопатии, дефект твердого нёба («волчья пасть»), верхней губы («заячья губа»), миоклоническая эпилепсия (табл. 15.4).

Таблица 15.4. Клиническая картина некоторых моногенных болезней с аутосомно-рецессивным типом наследования

Заблевание	Код МКБ	Частота встречаемости	Клиническая картина	Литература
Муковисцидоз	E84	1 : 2000– 10 000	Системное наследственное заболевание. Поражение экзокринных желез. Кистозное перерождение поджелудочной железы, желез кишечника. Тяжелые нарушения функций органов дыхания	Bendiak G.N. et al., 2009
Болезнь Вильсона—Коновалова	E83.0	3 : 100 000	Врожденное нарушение метаболизма меди, приводящее к тяжелейшим поражениям центральной нервной системы и внутренних органов. Диагностируется у 5–10 % больных циррозом печени дошкольного и школьного возраста. Наблюдается патология в работе сердечно-сосудистой системы. Повышен риск развития рака печени	Czlonkowska A. et al., 2018; Jackson M. et al., 2018
Фенилкетонурия	E70.0	1 : 4000– 80 000	Наследственное заболевание группы ферментопатий, связанное с нарушением метаболизма аминокислот, главным образом фенилаланина. При несоблюдении низкобелковой диеты сопровождается накоплением фенилаланина и его токсических продуктов, что приводит к тяжелому поражению центральной нервной системы, проявляющемуся, в частности, в виде нарушения умственного развития (фенилпировиноградной олигофрении). Симптомы: «мышинный» запах, ленивая интеллигентия; особенности походки, особенности стоячей и сидячей позы; экзема, эпилепсия. Одно из немногих наследственных заболеваний, поддающихся успешному лечению. Ранняя диагностика фенилкетонурии важна, потому что ее можно лечить с помощью диеты	Blau N., 2016
Галактоземия	E74.2	1 : 47 000	Возникает из-за дефицита активности фермента галактоза-1-фосфатуридил-трансферазы, отвечающего за усвоение организмом галактозы. Задержка в развитии. Рвота или диарея обычно начинается в течение нескольких дней после приема молока. В первые две недели жизни клиническими проявлениями будут желтуха и геморрагический диатез	Demirbas D. et al., 2018
Гомоцистинурия	E72.1	1 : 50 000– 250 000	<i>В₆-зависимая форма:</i> при ней в организме не хватает витамина В ₆ . Проявления: подвывихи хрусталика, умственная отсталость, короткое туловище с длинными конечностями и пальцами, искривленный позвоночник, остеопороз. <i>В₆-резистентная форма:</i> при ней поступление витамина В ₆ не вызывает улучшений	Kumar T. et al., 2016

15.3. Моногенные болезни, сцепленные с половыми хромосомами

15.3.1. Моногенные болезни, сцепленные с X-хромосомой (доминантный тип наследования)

X-сцепленные моногенные болезни с доминантным типом наследования относят к малочисленным (табл. 15.5 и 15.6). Они наследуются во всех поколениях рода.

Таблица 15.5. Генетическая характеристика некоторых сцепленных с X-хромосомой доминантных моногенных болезней

Заболевание	Номер фенотипа в ММ	Локализация на хромосоме	Ген	Номер гена в ММ
X-сцепленный гипофосфатемический рахит <i>Hypophosphatemic rickets, X-linked dominant</i>	307800	Xp22.11	<i>PHEX</i>	300550
Гипоплазия зубной эмали <i>Amelogenesis imperfecta, type 1E</i>	301200	Xp22.2	<i>AMELX</i>	300391

Таблица 15.6. Клиническая картина некоторых сцепленных с X-хромосомой доминантных моногенных болезней

Заболевание	Код МКБ	Частота встречаемости	Клиническая картина	Литература
X-сцепленный гипофосфатемический рахит	E55.9	1 : 20 000–25 000	Нарушение реабсорбции фосфата в канальцах почек и его всасывания в тонкой кишке. Проявляется повышением активности щелочной фосфатазы и развитием рахитоподобных изменений, не поддающихся лечению витамином D в обычных дозах. У взрослых, особенно у мужчин, может развиваться прогрессирующий анкилоз позвоночника и крупных суставов	<i>Pettifor J.M. et al., 2012; Fuente R. et al., 2017</i>
Гипоплазия зубной эмали	K00.4	1 : 15 000	Приводит к недостаточному развитию поверхностного слоя (эмали) молочных или постоянных зубов. Наиболее часто гипоплазия эмали ведет к развитию глубокого кариеса и формированию неправильного прикуса	<i>Urzúa B. et al., 2011; Smith C.E.L. et al., 2017</i>

15.3.2. Моногенные болезни, сцепленные с X-хромосомой (рецессивный тип наследования)

X-сцепленные моногенные болезни с рецессивным типом наследования более многочисленны в сравнении с доминантным типом наследования. Они передаются в роду с пропуском поколений (табл. 15.7 и 15.8).

Таблица 15.7. Генетическая характеристика некоторых сцепленных с X-хромосомой рецессивных моногенных болезней

Заболевание	Номер фенотипа в MIM	Локализация на хромосоме	Ген	Номер гена в MIM
Миопатия Дюшенна <i>Duchenne muscular dystrophy</i>	310200	Xp21.2–p21.1	<i>DMD</i>	300377
Гемофилия А и В <i>Hemophilia A, B</i>	306700 306900	Xq28 Xq27.1	<i>F8</i> <i>F9</i>	300841 300746
Синдром Леша—Найхана <i>Lesch—Nyhan syndrome</i>	300322	Xq26.2–q26.3	<i>HPRT1</i>	308000
Синдром Хантера (мукополисахаридоз II типа) <i>Mucopolysaccharidosis II Hunter Syndrome</i>	309900	Xq28	<i>IDS</i>	300823
Дальтонизм, дейтан-дефект <i>Colorblindness, deutan</i>	303800	Xq28	<i>OPN1MW</i>	300821
Ихтиоз <i>Ichthyosis</i>	308100	Xp22.31	<i>STS</i>	300747
Болезнь Фабри <i>Fabry disease</i>	301500	Xq22.1	<i>GLA</i>	300644
Нефрогенный несахарный диабет <i>Diabetes insipidus, nephrogenic</i>	304800	Xq28	<i>AVPR2</i>	300538

Таблица 15.8. Клиническая картина некоторых моногенных болезней, сцепленных

Заболевание	Код МКБ	Частота встречаемости
Миопатия Дюшенна	G71.2	1 : 3500
Гемофилия А	D66	1 : 10 000 мужчин
Гемофилия В	—	1 : 50 000 мужчин
Синдром Леша—Найхана	E79.1	1 : 300 000
Мукополисахаридоз II типа — синдром Хантера	E76	1 : 140 000–156 000
Дальтонизм	H53.3	2–8 % мужчин и только 0,8 % женщин
Ихтиоз	Q80	1 : 2000–6000 мужчин
Болезнь Фабри	E75.2	1 : 47 000–1 : 117 000
Нефрогенный несахарный диабет	E74.8	3 : 100 000

с X-хромосомой (рецессивный тип наследования)

Причины развития, клиническая картина	Литература
Прогрессирующая форма мышечной дистрофии вследствие дефицита <i>дистрофина</i> — белка, поддерживающего целостность мембран мышечных волокон. Мышечная слабость различной степени прогрессирования с характерной псевдогипертрофией мышц. Кардиомиопатия	Noguchi S. et al., 2003; Barthélémy F. et al., 2018
Вызвана недостаточной активностью <i>фактора свертываемости VIII</i> . Характерны спонтанные или посттравматические кровотечения. Поражаются суставы, вызывая отек, боль, снижение функции и дегенеративный артрит. Внутрочерепное кровоизлияние может возникнуть после легкой травмы головы и привести к тяжелым осложнениям. Кровотечение от разрывов языка или губ часто бывает постоянным	Franchini M. et al., 2013
Фенотипически неотличима от гемофилии А. Отмечен комбинированный дефект дефицита коагуляционного фактора	George LA, 2017; Mahangu J.N, 2018
Полный дефицит активности HPRT-фермента гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы. Развивается в грудном возрасте. Проявляется мышечным гипертонусом, повышенной рефлекторной возбудимостью, олигофренией, импульсивной склонностью ребенка к самоповреждениям, умственной отсталостью, спастическим церебральным параличом, хореоатетозом, камнями в мочевом пузыре	Bell S., 2016
Недостаток лизосомного фермента — <i>идуронат-2-сульфатазы</i> . Приводит к прогрессирующему накоплению глюкозаминогликанов практически во всех тканях, органах и клетках. Наблюдается тяжелая обструкция дыхательных путей, деформация скелета, кардиомиопатия, а у большинства пациентов — неврологический регресс. Разработана заместительная ферментная терапия	Scarpa M., 2007; Wraith J.E. et al., 2008
Цветовая слепота: <ul style="list-style-type: none"> • <i>Протанопия</i> — неспособность видеть красные оттенки. • <i>Тританопия</i> — неспособность различать сине-фиолетовую часть спектра. • <i>Дейтеранопия</i> — неспособность различать зеленый цвет. • <i>Ахроматопсия</i> — больные все видят в черно-белых оттенках 	Hassall M.M. et al., 2017
Заболевание кожи, вызванное наследственным дефицитом фермента <i>стероидной сульфатазы</i> . Кожа темно-коричневая, многоугольные чешуйки, которые появляются вскоре после рождения и не изменяются с возрастом. Глубокая непрозрачность роговицы глаза	Oji V. et al., 2009; Rodrigo-Nicolás B. et al., 2018
Дефицит <i>α-галактозидазы А</i> . Диагностируется в детском и подростковом возрасте. Мелкие красновато-фиолетовые безболезненные папулы на коже — <i>ангиокератомы</i> . Почечная недостаточность, помутнение роговицы, аритмии, пролапс митрального клапана, высокочастотная сенсоревральная глухота, инсульты, сенсорная полиневропатия, сопровождающаяся тяжелыми болевыми приступами (<i>кризы Фабри</i>)	Schiffmann R., 2009; Testai F.D., Gorelick P.B., 2010; Семякина А.Н. и др., 2018
Развивается на фоне относительного или абсолютного дефицита <i>антидиуретического гормона</i> . Нарушение функции почек гипоталамуса, гипофиза. У маленьких детей развивается поражение головного мозга со снижением интеллекта. Даже на фоне лечения у таких детей часто наблюдается задержка физического развития, в основном из-за постоянной дегидратации	Milano S. et al., 2017

15.4. Моногенные болезни, сцепленные с Y-хромосомой

В настоящее время известно несколько Y-сцепленных моногенных болезней (табл. 15.9). Это связано с тем, что хромосома Y относится к малым актоцентрикам и имеет небольшое число генов.

Таблица 15.9. Генетическая характеристика сцепленных с Y-хромосомой моногенных болезней

Заболевание	Номер фенотипа в MIM	Локализация на хромосоме	Ген	Номер фенотипа в MIM
Олигоспермия/азооспермия <i>Spermatogenic failure nonobstructive, Y-linked;</i> <i>Azoospermia nonobstructive, Y-linked;</i> <i>Oligospermia nonobstructive, Y-linked;</i> <i>Spermatogenic arrest nonobstructive, Y-linked</i>	415000	Yq11.221	<i>AZF1/</i> <i>SP3</i>	400005
Сертоли-клеточный синдром <i>Deleted in azoospermia;</i> <i>Sertoli-cell-only syndrome</i>	—	Yq11.223	<i>DAZ1/</i> <i>SPGY</i>	400003

Олигоспермия

МКБ-10: N46

Y-связанная сперматогенная недостаточность 2 (*Spermatogenic failure, Y-linked 2, SPGFY2*) чаще всего вызвана интерстициальными делециями на Y-хромосоме. Является наиболее распространенной среди известных генетических причин мужского бесплодия. Кроме того, мутации в гене *USP9Y* связаны с азооспермией и гипосперматогенезом [Tepalo L., Zuffardi O., 1976]. Большая часть делеций происходит *de novo*.

Цитогенетические варианты. Роль человеческой Y-хромосомы в сперматогенезе была впервые изложена в исследованиях, в которых кариотипировали 1170 пациентов с недостаточностью и идентифицировали 6 азооспермических лиц с микроскопически обнаруживаемыми делециями дистального района длинного плеча Yq. На основании этих *de novo* делеций было предложено существование гена сперматогенеза, или «фактора азооспермии» (AZF) на Yq. Исследователи Lange J. и соавт. [2009] идентифицировали изодицентрические (idic) или изоцентрические (iso) Y-хромосомы, хромосомы idicYr и isoYr у здоровых мужчин со значительно уменьшенным производством спермы или ее отсутствием и заявили, что такие хромосомные аномалии являются одними из наиболее распространенных генетических причин тяжелой сперматогенной недостаточности.

Болезни с нетрадиционным типом наследования

16.1. Митохондриальные болезни

Митохондриальные болезни — это большая группа заболеваний, вызванных генетическими, структурными, биохимическими дефектами митохондрий. Это приводит к нарушению тканевого дыхания, снижению синтеза АТФ и, как следствие, к недостаточности энергетического обмена. Дефекты мтДНК не проявляются изолированно. На экспрессию генома митохондрий и функцию дыхательной цепи влияют также генотип ядра и факторы внешней среды [David G. et al., 1997].

В первую очередь страдают наиболее энергозависимые органы и ткани — нервная система (*энцефалопатии, полиневропатии*), мышечная система (*миопатии*), сердце (*кардиомиопатии*), почки, печень, эндокринная система и другие. Ранее все эти заболевания диагностировались как другие патологические формы. К настоящему времени выявлено более 200 заболеваний, причиной которых являются мутации митохондриальной ДНК.

Митохондриальное наследование отличается от менделевского. Для него характерны: материнское наследование, гетероплазмия, митотическая сегрегация, что определяет выраженный фенотипический полиморфизм и мультисистемность поражения.

Митохондриальные болезни классифицируют по двум основным принципам [Гинтер Е. В., 2003] (табл. 16.1):

- 1) по участию мутантного белка в реакциях окислительного фосфорилирования;
- 2) кодированию мутантного белка внехромосомной (митохондриальной) или хромосомной (ядерной) ДНК.

При анализе этиологии и патогенеза митохондриальных заболеваний [Taanman J.-W. et al., 2009] необходимо учитывать следующее:

- наследование только по материнской линии;
- множество органелл в клетке (сотни);
- большое число (тысячи) мтДНК;

- новые мутации могут возникать в отдельных молекулах мтДНК, что ведет к *гетероплазмии* (одновременное существование в клетке нормального («дикий») и мутантного типов ДНК);
- если мутация патогенная, доля мутантных молекул в гетероплазматической популяции влияет на тяжесть биохимического нарушения;
- возможна *митотическая сегрегация* (оба типа мтДНК в процессе деления клетки могут распределяться случайным образом между дочерними клетками) как в пользу мутантных, так и нормальных мтДНК, т. к. мтДНК наследуется в ряду клеточных поколений по стохастическим законам;
- клиническое течение болезни и ее исход определяется уровнем гетероплазмии и динамикой митотической сегрегации, т. к. клетки разных тканей имеют различный минимальный уровень энергозатрат.

Приводим генетическую и клиническую характеристики некоторых из митохондриальных болезней, вызванных мутациями в ядерной ДНК (табл. 16.2 и 16.3).

Таблица 16.1. Классификация митохондриальных болезней

Класс	Подкласс	Условия развития
I. Вызваны первичными дефектами окислительного фосфорилирования	Заболевания, возникающие в результате мутаций в генах мтДНК (кодируют митохондриальные тРНК, рРНК, субъединицы белков окислительного фосфорилирования)	Мутации могут проявляться, только если они имеются в более 60 % случаев
	Заболевания, возникающие в результате мутаций в генах хромосомной/ядерной ДНК (кодируют субъединицы белков окислительного фосфорилирования)	Мутации могут проявляться при поражении более 70 % ядерной ДНК
II. Вызваны мутациями в хромосомной/ядерной ДНК	Кодируемые генами хромосомной ДНК белки участвуют в экспрессии генов митохондриальной ДНК (репликации, репарации, транскрипции, трансляции)	Наследование генов (мутаций в генах) и, соответственно, болезней осуществляется по законам Менделя

Таблица 16.2. Генетическая характеристика митохондриальных болезней, вызванных мутациями в ядерной ДНК, с аутосомно-рецессивным (АР) и аутосомно-доминантным (АД) типами наследования

Заболевание. Тип наследования	Номер фенотипа в МIM	Локализация на хромосоме	Ген	Номер гена в МIM
Синдром истощения митохондриальной ДНК 4А (синдром Альперса) <i>Mitochondrial DNA depletion syndrome 4A (Alpers type)</i> АР	203700	15q26.1	<i>POLG</i>	174763

Окончание табл. 16.2

Заболевание. Тип наследования	Номер фенотипа в MIM	Локализация на хромосоме	Ген	Номер гена в MIM
Синдром истощения митохондриальной ДНК 7 (гепатоцеребральный синдром) <i>Mitochondrial DNA depletion syndrome 7 (Hepatocerebral type)</i> АР	271245	10q24.31	<i>TWNK</i>	606075
Спиноцеребральная атаксия <i>Spinocerebellar ataxia 7</i> АД	164500	3p14.1	<i>ATXN7</i>	607640
Митохондриальная нейрогастроинтестинальная энцефаломиопатия <i>Mitochondrial DNA depletion syndrome 1 (neurogastrointestinal encephalopathy syndrome)</i> АР	603041	22q13.33	<i>TP</i>	131222

Таблица 16.3. Клиническая характеристика митохондриальных болезней, вызванных мутациями в ядерной ДНК

Заболевание. Код МКБ-10	Частота встречаемости	Клиническая картина	Литература
Синдром истощения митохондриальной ДНК 4А (синдром Альперса) G31.8	1 : 100 000–250 000	Тяжелый энцефалопатический фенотип с фармакорезистентной эпилепсией и поражением печени. Прогрессирующая регрессия развития. Рождение обычно бывает нормальным, с некоторой задержкой развития в младенчестве. Чаще всего наблюдается смерть в первые годы жизни	<i>Wiltshire E. et al., 2008; Isohanni P. et al., 2011</i>
Спиноцеребральная атаксия G11		Заболевание манифестирует в молодом возрасте и проявляется набором типичных для митохондриальных болезней неврологических симптомов в сочетании с выраженной дисфункцией желудочно-кишечного тракта (синдром кишечной псевдообструкции с приступами повторной рвоты, диареей, потерей массы тела)	<i>Gouw L.G. et al., 1995; David G. et al., 1997</i>
Митохондриальная нейрогастроинтестинальная энцефаломиопатия G93-4	—	Сокращение продолжительности жизни. Боль в животе, судороги, закупорка пищеварительного канала, приводящая к тяжелой потере веса. Бессимптомные диффузные поражения белого вещества головного мозга. Сенсоневральная глухота.	<i>Giordano C. et al., 2008; Taanman J.-W. et al., 2009</i>

16.2. Болезни импринтинга

Болезни импринтинга (болезни геномной памяти) — это заболевания, в основе которых лежит нарушение функции импринтированных участков генома. Насчитывается более 30 видов таких заболеваний (табл. 16.4 и 16.5). Наследование импринтированных генов и признаков происходит не по законам Менделя (за некоторым исключением).

Геномный импринтинг — это процесс, при котором экспрессия определенных генов осуществляется в зависимости от того, от какого родителя поступили аллели. В геноме импринтируемые гены образуют кластеры. Импринтинг осуществляется посредством метилирования ДНК в промоторах, в результате чего транскрипция гена блокируется. Импринтинг генов осуществляется с помощью процесса метилирования ДНК. Если по каким-то причинам процесс импринтинга не происходит, то с высокой вероятностью возникает наследственное заболевание.

Таблица 16.4. Генетическая характеристика болезней импринтинга с аутосомно-доминантным (АД) наследованием

Заболевание. Тип наследования	Номер фенотипа в MIM	Локализация на хромосоме	Ген	Номер гена в MIM
Синдром Ангельмана <i>Angelman syndrome</i>	105830	15q11.2	<i>UBE3A</i>	601623
Синдром Прадера—Вилли <i>Prader—Willi syndrome</i>	176270	15q11.2	<i>NDN</i> <i>SNRPN</i>	602117 182279
Синдром Сильвера—Рассела <i>Silver—Russell syndrome</i>	180860	7p11.2	<i>H19</i> <i>IGF2</i>	103280 147470
Билатеральная спорадическая ретинобластома <i>Retinoblastoma</i> АД	180200	13q14.2	<i>RB1</i>	614 041
Нейрофиброматоз Реклингхаузена (тип 2) <i>Neurofibromatosis, type 2</i> АД	101000	22q12.2	<i>NF2</i>	607379
Синдром Корнелии де Ланге <i>Cornelia de Lange syndrome 1</i> АД	122470	5p13.2	<i>NIPBL</i>	608667
Синдром Беквита—Видемана <i>Beckwith—Wiedemann syndrome</i> АД	130650	11p15.5	<i>H19</i> <i>ICR1</i> <i>KCNQ1</i> <i>OT1</i> <i>CDKN1C</i>	103280 616186 604115 600856
Наследственная остеодистрофия Мак-Кьюна—Олбрайта <i>McCune—Albright syndrome, somatic, mosaic</i> АД	174800	20q13.32	<i>GNAS</i>	139320

Таблица 16.5. Клиническая характеристика некоторых болезней импринтинга

Заболевание. Код МКБ	Частота встречаемости	Клиническая картина	Литература
Синдром Ангельмана Q93.5	1 : 10 000– 20 000	Болезнь называют <i>синдромом Петрушки</i> или <i>синдромом счастливой куклы</i> . Умственная отсталость, аномальная форма черепа, сильная моторная и интеллектуальная отсталость, атаксия, гипотония, эпилепсия, отсутствие речи и необычное выражение лица, характеризующееся большой нижней челюстью и открытым ртом, раскрывающим язык. У пациентов немотивированный (пароксизмальный) смех и плач, аномальная хориоидальная пигментация (коричневый цвет глазного дна). Цитогенетика: del 15q11–q12; del 15q11.2–q13; t(15;22)(q13;q11) в материнской хромосоме	Michielotto P. et al., 2008
Синдром Прадера— Вилли Q93.6	1 : 15 000	Новорожденные характеризуются тяжелой мышечной гипотонией, что провоцирует апноэ. Кроме того, наблюдается умеренное замедление роста, гипорекфлексия. Слабый или отсутствующий крик, характерный высокий выдающийся лоб, миндалевидный разрез глаз, маленькие кисти и стопы, гипоплазия наружных гениталий. Ожирение становится самой яркой особенностью пациентов с этим синдромом. Цитогенетика: del 15q11–q13; del 6q16.1–q21; del 6q16.2–q21; del 6q22.2–q23.1; dup 6q24.3–q27; t(1;6)(p22.1;q16.2)	Oiglane-Shlik E. et al., 2006
Синдром Сильвера— Рассела Q87.1	1 : 30 000	Характеризуется тяжелой внутриутробной задержкой роста, асимметрией тела: гемигипоплазия справа, маленькое треугольное лицо с широким выступающим лбом и узким подбородком при нормальной окружности головы. Отстают в росте в раннем и подростковом возрасте. Цитогенетика: t(7;16)(q21;q24); t(17;20)(q25;q13); tris1q32.1–q42.1; dup11p15,5	Gronlund M.F. et al., 2011; Chiesa N. et al., 2012

Окончание табл. 16.5

Заболевание. Код МКБ	Частота встречаемости	Клиническая картина	Литература
Ретинобластома C69.2	1 : 15 000–34 000	Злокачественное новообразование детского возраста, поражающее сетчатку, сосудистую оболочку глаза, орбиту и часто дающее отдаленные метастазы (поражаются одновременно оба глаза). Лейкокория (поздний признак) и косоглазие (ранний признак). Цитогенетика: mon22; r22	<i>Boimer A. et al., 2006; Soliman S.E. et al., 2017</i>
Нейро-фиброматоз Реклингхаузена Q85.0	1 : 2500–7800	Вестибулярный шванн (акустическая неврома), черепные менингиомы (опухоль, растущая из клеток паутинной мозговой оболочки) и спинальные опухоли, односторонняя глухота, катаракта. Цитогенетика: tris qter-3q21; t(3;17)(q26.3;q23.1)	<i>Ardern-Holmes S. et al., 2017</i>
Синдром Корнелии де Ланге Q87.1	1 : 10 000	Умственная отсталость и множественные аномалии развития: микроцефалия (значительное уменьшение размеров черепа и, соответственно, головного мозга), аномалии конечностей, замедленное созревание скелета, аномальная конфигурация груди	<i>Avagliano L. et al., 2017; Marchisio P. et al., 2008</i>
Синдром Беквита— Видемана Q87.3	1 : 13 000	Макросомия (избыточный рост и масса тела), умственная отсталость умеренная или отсутствует, макроглоссия (большой, выступающий наружу язык), экзофтальм, аномалия прикуса, насечки на мочках ушной раковины, нефромегалия. Существует предрасположенность к эмбриональным злокачественным новообразованиям	<i>Weksberg R. et al., 2010; Chiessa N. et al., 2012</i>
Наследственная остеодистрофия Олбрайта E20	Описано около 300 случаев	Гормонально активная опухоль паращитовидных желез, характеризуется остеопорозом любых костей; асимметрии костей черепа и костей лица, псевдоартроз, переломы и деформации костей. Пигментные поражения кожи могут быть ограничены преимущественно одной стороной. Преждевременное половое созревание (чаще у женщин). Гипертиреоз (гиперфункция щитовидной железы)	<i>Boyce A.M. et al., 2015</i>

16.3. Болезни с нарушением репарации ДНК

Репарация ДНК является сложным многоступенчатым процессом, необходимым клетке для нормальной жизнедеятельности (см. гл. 5 п. 5.3). Нарушение процессов репарации ДНК приводит или к гибели клетки, или к возникновению патологии (например, к преждевременному старению, онко- и аутоиммунным заболеваниям) (табл. 16.6 и 16.7).

Таблица 16.6. Генетическая характеристика болезней с нарушением репарации ДНК с аутосомно-рецессивным (АР) и аутосомно-доминантным (АД) типами наследования

Синдром. Тип наследования	Номер фенотипа в МIM	Локализация на хромосоме	Ген	Номер гена (локуса) в МIM	Система репарации
Пигментная ксеродерма, группа E <i>Xeroderma pigmentosum, group E, DDB-negative subtype</i> АР	278740	11p11.2	<i>DDB</i>	2600811	Экцизионная репарация нуклеотидов
Пигментная ксеродерма, группа D <i>Xeroderma pigmentosum, group D</i> АР	278730	19q13.32	<i>ERCC2</i>	126340	
Пигментная ксеродерма, группа G <i>Xeroderma pigmentosum, group G</i> АР	278780	13q33.1	<i>ERCC5</i>	133530	
Пигментная ксеродерма, группа C <i>Xeroderma pigmentosum, group C</i> АР	278720	3p25.1	<i>XPC</i>	613208	
Синдром Коккейна, тип B <i>Cockayne syndrome, type B</i> АР	133540	10q11.23	<i>ERCC6</i>	609413	Дефекты репарирующих эндонуклеаз
Синдром Коккейна, тип A <i>Cockayne syndrome, type A</i> АР	216400	5q12.1	<i>ERCC8</i>	609412	

Окончание табл. 16.6

Синдром. Тип наследования	Номер фенотипа в ММ	Локализация на хромосоме	Ген	Номер гена (локуса) в ММ	Система репарации
Анемия Фанкони, группа F <i>Fanconi anemia,</i> <i>complementation group</i> АР	603467	11p14.3	<i>FANCF</i>	613897	Нарушение вырезания пиримидиновых димеров
Атаксия- телеангиэктазия <i>Ataxia telangiectasia</i> АР	208900	11q22.3	<i>ATM</i>	607585	Дефекты репаративного синтеза ДНК
Синдром Блума <i>Bloom syndrome</i> АР	210900	15q26.1	<i>RECQL3</i>	604610	Подавленный репаративный синтез и замедленная репликация
Наследственный неполипозный рак прямой кишки <i>Colorectal cancer,</i> <i>hereditary nonpolyposis,</i> <i>type 1. Lynch syndrome</i> АД	120435	2p21-p16	<i>MSH2</i>	609309	Mismatch- репарация
Трихотиодистрофия нефоточувствительная, тип 4 <i>Trichothiodystrophy 4,</i> <i>nonphoto-sensitive</i> АР	234050	7p14.1	<i>MPLKIP</i>	609188	Эксцизионная репарация
Трихотиодистрофия фоточувствительная, тип 1 <i>Trichothiodystrophy 1,</i> <i>photosensitive</i> АР	601675	19q13.32	<i>ERCC2</i>	126340	

Таблица 16.7. Клиническая характеристика болезней с нарушением репарации ДНК

Патология. Код МКБ-10	Клиническая картина	Литература
Пигментная ксеродерма Q82.1	Различные симптомы поражения кожи, фоточувствительность, злокачественные новообразования	<i>Kondo S.</i> <i>et al., 1988</i>

Продолжение табл. 16.7

Патология. Код МКБ-10	Клиническая картина	Литература
Пигментная ксеродерма, группа E	Мягкие симптомы поражения кожи, неврологические отклонения. У двух пациентов были развиты базальноклеточные карциномы в пожилом возрасте	<i>Kondo S. et al., 1988</i>
Пигментная ксеродерма, группа D	Легкие поражения кожи и отсутствие явных неврологических аномалий, аномалии центральной нервной системы, которые считались отличительной чертой группы D	<i>Johnson R.T., Squires S., 1992</i>
Пигментная ксеродерма, группа G	Крайне редкий подтип, характеризующийся достаточно сильной клинической изменчивостью. Описаны случаи двусторонней врожденной катаракты, нарушения слуха, светочувствительной реакции с эритемой и вздутием после минимального воздействия солнца, что медленно вызвало мелкие раковые заболевания кожи	<i>Zafeiriou D.I. et al., 2001</i>
Пигментная ксеродерма, группа C	Более позднее развитие основного заболевания и опухолей, а также отсутствие неврологической симптоматики. Наблюдались кожная атрофия, телеангиэктазия, кератозы и множественный рак кожи, включая плоскоклеточные карциномы, карциномы базальных клеток и меланомы. Поражения кожи начинаются в возрасте от 3 до 5 лет	<i>Khan S.G. et al., 2004</i>
Синдром Коккейна Q87.1	Поражение кожи, органов зрения, слуха; карликовость, микроцефалия, тяжелая умственная отсталость и внутричерепная кальцификация, развитие гидроцефалии, деменции	<i>Zafeiriou D.I. et al., 2001; Mahmoud A.A.H. et al., 2002</i>
Анемия Фанкони E72.0	Врожденная или приобретенная диффузная дисфункция проксимальных извитых почечных канальцев. Короткий рост, пятна «кофе с молоком» на коже, поражение сердечной, желудочно-кишечной, центральной нервной систем, различные скелетные аномалии. Генитальные аномалии были распространены у пациентов мужского пола. Цитогенетические варианты: многочисленные хроматидные обмены обычно между негомологичными хромосомами	<i>Mehta P.A. et al., 2002</i>
Атаксия-телеангиэктазия G11.3	Заболевание с мозжечковой атаксией, нарушением иммунитета и склонностью к злокачественным новообразованиям. В раннем детстве (от 3 до 5 лет) наблюдается прогрессирующая мозжечковая атаксия (поражение полушарий мозжечка), затем развивается конъюнктивальная телеангиэктазия (расширение сосудов конъюнктивы) и другая прогрессирующая неврологическая дегенерация, злокачественные новообразования. Также наблюдается хореоатетоз — комбинация хореи (быстрые,	<i>Gatti R.A. et al., 1991; Woods C.G., Taylor A.M.R., 1992</i>

Окончание табл. 16.7

Патология. Код МКБ-10	Клиническая картина	Литература
	<p>порывистые движения) и атетоза (медленные судорожные движения). Дистония встречается у 90 % пациентов. В возрасте 20–30 лет развивается прогрессирующая мышечная атрофия спинного мозга, затрагивая главным образом руки и ноги. Умственная отсталость не наблюдается.</p> <p>Цитогенетические варианты: множественные хромосомные разрывы. Область 14q12 является высокоспецифичной точкой обмена. Также описаны t(14;14)(q11;q32), t(14;14)(q12;q32)</p>	
Синдром Блума Q82	<p>Задержка роста, повышенная чувствительность к солнцу, гипо- и гиперпигментация кожи, склонность к образованию злокачественных опухолей, сахарному диабету, острая лейкемия, легочный фиброз, лимфома Ходжкина и лейкемия.</p> <p>Цитогенетические варианты: повышенная частота сестринских хроматидных обменов (маркер диагностики). Большинство произошло между гомологичными хромосомами</p>	<i>Passarge E., 1991; Chisholm C.A. et al., 2001</i>
Наследственный непוליозный рак прямой кишки	Колоректальный рак был первым проявлением заболевания у 89 % пораженных мужчин и только у 66 % пораженных женщин. Рак эндометрия был первым проявлением у 26 % пораженных женщин	<i>Parc Y. et al., 2003</i>
Трихотиодистрофия нефоточувствительная	Проявляется у детей обоего пола в виде микроцефалии, умственной и физической отсталости и узловой трихоклазии (самопроизвольной ломкости), связанной с уменьшением содержания белка с высоким содержанием серы в волосах. Кроме того, поражается нервная система, возникает гипотония, умственная отсталость	<i>Pollitt R.J. et al., 1968; Rizzo R. et al., 1992</i>
Трихотиодистрофия фоточувствительная	Диагностический признак — специфическая ломкость волос, обусловленная уменьшением содержания в них низкомолекулярных богатых серой белков. Характеризуется ихтиозиформным генерализованным гиперкератозом, умственной отсталостью, несколько прогерийным видом и узловой трихоклазией. Повышенная светочувствительность	<i>Tay C.H., 1971; Price V.H. et al., 1980</i>

Вопросы и задания

Раздел I

БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ, МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ОБЩАЯ ГЕНЕТИКА

Глава 1. Клетка — структурно-функциональная единица организма

1. Что входит в структурно-функциональный комплекс клетки?
2. Какова структура плазматической мембраны клетки?
3. Каковы химический состав и свойства плазматической мембраны?
4. Перечислите функции плазматической мембраны.
5. Какие типы мембранного транспорта существуют?
6. Что составляет внутреннюю среду клетки?
7. Какова современная классификация органоидов клетки?
8. Какие органоиды составляют канальцево-вакуолярную систему клетки?
9. В чем отличие рибосом прокариот от рибосом эукариот?
10. Какие органоиды образуют опорно-двигательную систему клетки?
11. Почему ядро считается структурой клетки?
12. Что такое метаболизм?
13. Каковы функции аппарата внутриклеточного пищеварения и дезинтоксикации в клетке?
14. Какой органоид выполняет энергетическую функцию в клетке?
15. Перечислите функции опорно-двигательного аппарата клетки во время метаболизма.
16. Какие межклеточные контакты важны для образования тканей организма?
17. Опишите функциональные типы межклеточных контактов.
18. Какие бывают замыкающие контакты?
19. Как формируются адгезионные контакты?

Задание 1. Заполните таблицу, указав органоиды клетки, выполняющие различные функции во время метаболизма

Функция в клетке	Органоид	Характеристика органоида
Внутриклеточное пищеварение и дезинтоксикация		

Окончание табл.

Функция в клетке	Органоид	Характеристика органоида
Энергетическая		
Опорно-двигательная		
Канальцево-вакуолярная система		

Глава 2. Химический состав клетки

1. Что принято считать элементарной единицей нуклеиновых кислот?
2. Опишите различия в структуре нуклеотидов ДНК и РНК?
3. Какие химические связи формируют первичную структуру нуклеиновых кислот?
4. Как формируется вторичная структура ДНК?
5. В чем заключается правило Чаргаффа?
6. Какие встречаются формы вторичной структуры ДНК?
7. В чем разница между различными формами вторичной структуры ДНК?
8. В каком из видов ДНК нарушается правило комплементарности?
9. В чем отличие геномной ДНК от ДНК митохондрий?
10. Какова роль свободной внеклеточной ДНК в организме?
11. Что относится к ретротранспозонам?
12. Какие ферменты работают при перемещении мобильных генетических элементов по геному?
13. Какие есть виды нуклеосомной ДНК?
14. Какими структурами представлена молекула РНК?
15. Что представляют собой вторичные и третичные структуры РНК?
16. Опишите виды РНК.
17. Какие виды молекулы РНК участвуют в трансляции и ее регуляции?
18. Какой вид РНК участвует в репликации?
19. Какая из видов РНК имеет нелинейную структуру?
20. Какие молекулы РНК имеют длительное время жизни?
21. Какие виды РНК принимают участие в модификации пре-РНК?

Задание 2. Заполните таблицу, указав виды нуклеиновых кислот и их функции

Нуклеиновая кислота	Локализация	Функция
ДНК		
РНК		

Глава 3. Реализация наследственной информации

1. Приведите современное определение термина «ген».
2. Какие элементы входят в структуру генома человека?
3. Что относят к диспергированным повторам генома?
4. Какие последовательности генома относят к уникальным?
5. В чем особенность экзонно-интронного строения гена?
6. Какие свойства характерны для гена?
7. Какие гены относятся к регуляторным?
8. Чем представлен генный кластер?
9. Что входит в состав ядерного генома?
10. Что представляет собой генетический код?
11. В чем выражена универсальность генетического гена?
12. Какие свойства генетического кода противоречат друг другу?
13. Какие аминокислоты кодируются только одним триплетом?
14. Что означает коллинеарность генетического кода?
15. О чем гласит центральная догма молекулярной биологии?
16. Что понимают под термином «экспрессия генов»?
17. Какие процессы проходят для реализации наследственной информации?
18. Почему для реализации наследственной информации процессы синтеза ДНК, РНК и белка проходят последовательно?

Регуляция репликации

1. В чем заключен смысл процесса репликации?
2. Назовите основные принципы синтеза ДНК.
3. В чем заключается биологический смысл репликации?
4. Чем представлены точки *ori* репликации?
5. Какова продолжительность процесса репликации у млекопитающих?
6. Какой фермент помогает прикреплению полимераз к синтезируемой цепи у эукариот?
7. Какой фермент синтеза ДНК является ключевым у про- и эукариот?
8. В чем выражена эндонуклеазная активность ферментов?
9. Назовите отличия в этапе терминации у про- и эукариот.
10. Какие особенности репликации у митохондрий?
11. Какие процессы участвуют в регуляции репликации?
12. Что собой представляют фрагильные сайты?
13. Каковы функции киназ ATR и ATM?
14. Каковы причины репликативного стресса?
15. Что препятствует росту репликационной вилки?

Регуляция транскрипции

1. Какие события происходят на этапе инициации транскрипции?
2. Чем различается структура транскриптона у про- и эукариот?

3. Что представляет собой промоторная область у эукариот?
4. Каковы функции транскрипционных факторов?
5. Какие ферменты осуществляют синтез РНК у про- и эукариот?
6. Какой транскрипционный фактор участвует в освобождении полимеразы с промотора?
7. Сколько ферментов участвует в транскрипции митохондриального генома?
8. Какие вещества могут ингибировать транскрипцию?
9. В чем заключается особенность транскрипции в митохондриальном геноме?
10. Какова роль обратной транскрипции?
11. Как осуществляется негативная регуляция работы лактозного оперона?
12. Какие функции выполняет ген-регулятор?
13. Что такое цистрон?
14. Какие основные модификации претерпевают белки-гистоны?
15. Какие ферменты являются ключевыми в метилировании?
16. Какова роль метилирования в организме?
17. Какие ядерные белки принимают участие в инактивации?
18. Какова роль энхансеров в регуляции транскрипции?
19. Какие факторы участвуют в регуляции транскрипции?
20. Какой процесс способен подавить экспрессию генов в посттранскрипционной регуляции?

Процессинг — модификация РНК

1. Что такое процессинг? Назовите его виды.
2. Какое значение имеет процессинг?
3. Каков механизм экпирования?
4. Какие ферменты принимают участие в формировании кэпа?
5. Какова функциональная значимость экпированного конца?
6. В чем состоит механизм полиаденилирования?
7. Какие ферменты и факторы осуществляют защиту 3'-конца?
8. Какое значение для транскрипта имеет полиаденилирование?
9. Что такое сплайсинг?
10. Расскажите о видах сплайсинга.
11. Что способствует сплайсингу?
12. Какова структура сплайсосомы?
13. Какие ферменты способствуют процессингу митохондриальной РНК?
14. Назовите существенные различия между процессингом геномного и митохондриального транскрипта?
15. В чем заключается процессинг тРНК и рРНК в клетках прокариот?

Трансляция — синтез первичной структуры белка

1. Какие существуют механизмы обнаружения старт-кодона у эукариот?
2. Какой основной фермент участвует в образовании аминокил-тРНК?

3. Какие функциональные центры имеет рибосома в процессе трансляции?
4. В чем основная функция последовательности Шайна—Дельгарно и анти-Шайна—Дельгарно при инициации трансляции у прокариот?
5. Какие функции в инициации трансляции несет последовательность Козак в клетках эукариот?
6. Какие факторы инициации трансляции функционируют в клетках про- и эукариот?
7. Каковы особенности стадии элонгации?
8. Какие факторы элонгации трансляции функционируют в клетках про- и эукариот?
9. Какие факторы задействованы на этапе терминации трансляции в клетках про- и эукариот?
10. Какое функциональное значение имеет освобождение рибосомы?
11. Какие вещества могут ингибировать трансляцию?
12. Какие виды молекул РНК принимают участие в трансляции?
13. В чем особенность трансляции в митохондриях?

Посттрансляционная модификация белка

1. Как осуществляется дискриминация РНК?
2. В чем состоит роль тотальной регуляции трансляции?
3. Какие факторы участвуют в регуляции трансляции?
4. Как происходит маскирование мРНК эукариот?
5. Какие ферменты участвуют в РНК-интерференции?
6. Какова роль белков из семейства RBP и ARE в жизни РНК?
7. Что такое фолдинг белка?
8. Какие органеллы участвуют в этом процессе?
9. Какую роль выполняют белки шапероны?
10. Какова функция убиквитин-лигаз?
11. Что представляет собой фолдинг?
12. Что такое эпигенетика?
13. Какие процессы относят к эпигенетическим изменениям?
14. Какие бывают уровни эпигенетической регуляции?
15. В каких случаях наблюдаются эпигенетические процессы? Приведите примеры.
16. Что такое метилирование ДНК?
17. Каков механизм метилирования ДНК?
18. Какие ферменты участвуют в метилировании ДНК?
19. Как изменяется активность гена после метилирования промоторного участка? Объясните почему.
20. Какими свойствами обладают CpG-островки?
21. Какие функции выполняют участки метилированной ДНК?
22. Какие участки ДНК подвергаются метилированию?
23. Какова роль метилированной ДНК в организме человека?

Задание 3. Заполните таблицу, перечислив ферменты и белки, участвующие в механизме синтеза молекул

Синтез	Прокариоты	Эукариоты
Репликация ДНК		
Транскрипция РНК		
Трансляция аминокислотной последовательности		

Задание 4. Заполните таблицу, перечислив виды регуляции синтеза молекул

Синтез	Прокариоты	Эукариоты
Репликация ДНК		
Транскрипция РНК		
Трансляция аминокислотной последовательности		

Глава 4. Изменчивость организма

1. Какие типы изменчивости существуют?
2. На какие основные периоды подразделяют онтогенетическое развитие человека?
3. Какие механизмы являются основой онтогенетической изменчивости?
4. Что такое модификационная изменчивость?
5. Что называют «нормой реакции»?
6. Каковы характерные особенности модификаций?
7. Что понимают под термином «комбинативная изменчивость»?
8. Каковы основные причины комбинативной изменчивости?
9. Что означает термин «цитоплазматическая изменчивость»?
10. Что является причиной мутационной изменчивости?
11. Каковы свойства мутаций?
12. Перечислите классификации мутаций.
13. Какие типы мутаций связаны с уровнем изменения наследственного материала?

Глава 5. Мутагены. Репарация ДНК. Мутации

1. Что такое мутагены?
2. Назовите типы мутагенов.
3. Каково воздействие на организм основных физических мутагенов среды?
4. В чем особенность воздействия α -излучения?
5. Почему воздействие β -частиц считается опасным?

6. Чем характеризуется вред от воздействия γ -излучения?
7. В чем разница химических мутагенов прямого и непрямого действия?
8. Перечислите основные группы химических соединений.
9. Каковы особенности воздействия на генетический механизм веществ, применяемых в сельском хозяйстве?
10. Какие лекарственные препараты являются мутагенами?
11. Почему табачный дым считают мутагеном?
12. Какие бывают биологические мутагены?
13. Какая классификация повреждений ДНК существует?
14. Какова молекулярная природа различных повреждений ДНК?
15. Назовите два основных типа репарации.
16. В каких основных случаях работает эксцизионная репарация?
17. Какой основной фермент фотореактивации? Какова его роль?
18. Какая репарация способна удалить объемные повреждения генома, в том числе и нетранскрибируемые области?
19. Какая репарация зависит от деятельности гистонацетилаз?
20. В чем разница между гомологичной и негомологичной рекомбинациями?
21. В чем особенности репарации короткими фрагментами?
22. Каковы функции белков семейства Mut в репарации?
23. Какие виды прямой репарации ДНК вам известны?
24. Какие мутации называют «спонтанными»?
25. Опишите причины возникновения геномных мутаций.
26. Почему хромосомные мутации подразделяют на «стабильные» и «нестабильные»?
27. Каковы молекулярные механизмы генных мутаций?
28. В чем отличие мутаций со сдвигом рамки считывания от мутаций без ее сдвига?
29. Что называют «полиморфизмом генов»?
30. Какие типы генетического груза существуют?
31. Какова возрастная динамика стабильных аббераций хромосом?
32. Что такое «мозаицизм клеток»?
33. Какие механизмы возникновения мозаицизма клеток вам известны?

Глава 6. Деление клеток

1. Что такое замещающая скорость клеток?
2. Какие существуют виды клеточной гибели?
3. Что такое апоптоз?
4. Какие факторы могут вызвать процесс апоптоза?
5. Какие морфологические изменения претерпевает клетка в процессе апоптоза?

6. Какова структура апоптосомы?
7. Что такое некроз?
8. К каким последствиям приводит некроз клеток?
9. Чем выражена морфология клеток при некрозе?
10. В чем отличие апоптотической гибели клетки от некротической?
11. Что такое аутофагия?
12. Какова роль аутофагосом?
13. Какие известны типы аутофагии?
14. Какую роль в жизни организма играет нарушение процесса аутофагии?
15. Что подразумевают под термином «клеточное старение»?
16. Что такое репликативное старение?
17. Какова характеристика стареющих в культуре клеток?
18. В чем заключается роль фермента теломеразы в клеточном старении?
19. Что такое клеточный цикл?
20. На какие периоды делится интерфаза?
21. Как изменяется структура ДНК в разных фазах клеточного цикла?
22. Какие белки и ферменты участвуют в регуляции клеточного цикла?
23. Какие факторы роста задействованы в регуляции клеточного цикла?
24. Что такое «сверочные точки»?
25. Что подразумевают под терминами «кариокинез» и «цитокинез»?
26. Раскройте биологическое значение митоза.
27. Какое деление не встречается в оплодотворенных яйцеклетках, клетках нормально развивающегося эмбриона?
28. Результатом какого деления являются полиплоидные клетки?
29. Какова роль белка APC C в регуляции митоза?
30. Назовите известные патологии митоза.
31. К каким событиям может приводить повреждение хромосом?
32. Каковы функции MPF в регуляции митотического цикла?
33. Что представляет собой мейотическое деление?
34. Для чего необходима конъюгация хромосом?
35. Что поддерживает и сохраняет бивалент?
36. Какова значимость последней стадии профазы?
37. Какое значение имеет бивалент?
38. Какую роль в мейозе играет синаптонемальный комплекс?
39. Какие белки регулируют работу синаптонемального комплекса?
40. К каким последствиям могут привести нарушения в процессе мейоза?
41. Какие фазы гаметогенеза характерны для сперматогенеза и оогенеза?
42. Как меняется мужская половая клетка в фазу формирования?
43. Какова структура женской половой клетки?
44. В чем различие сперматогенеза и оогенеза?

Задание 5. Заполните таблицу, вписав белки и ферменты, участвующие в регуляции клеточного цикла у эукариот

Этапы	Белки	Ферменты	Функции комплекса белков и ферментов
G1			
S			
G2			
Деление клетки			

Задание 6. Заполните таблицу, отметив сходство и различие этапов сперматогенеза и оогенеза

Фаза	Сперматогенез		Оогенез	
	Сходство	Различие	Сходство	Различие
Размножение				
Рост				
Созревание				
Формирование				

Глава 7. Конформационные изменения ДНК в клеточном цикле

1. Назовите причины конденсированного состояния ДНК.
2. Что представляет собой нуклеосомная нить?
3. Какие белки входят в состав нуклеосомы? Их значение.
4. Какова функция гистона H1?
5. Каковы свойства негистоновых белков?
6. Что такое соленид?
7. Какова структура хроматиды?
8. Что понимают под термином «хромосомные территории»?
9. Какова роль «доменов» в интерфазном ядре?
10. Что обозначают термином «эффект положения»?
11. Какова функция интерхроматиновых доменов в интерфазном ядре?
12. Что такое кариотип?
13. Сколько аутосом в нормальном кариотипе человека?
14. Чем отличаются мужской и женский кариотипы?
15. Какова общая характеристика всех хромосом?
16. Какие морфологические типы хромосом наблюдаются в кариотипе человека?
17. Каковы основные характеристики эухроматина?

18. Чем отличается факультативный гетерохроматин от конститутивного гетерохроматина?
19. Каковы основные функции центromеры?
20. В чем заключается функция гистона CENP-A в центromере?
21. Что такое кинетохор и какова его основная функция?
22. Какова структура теломер?
23. В чем заключаются функции теломер?
24. Какие ферменты и белки участвуют в достраивании теломер?
25. В структуре каких типов хромосом наблюдаются спутничные участки?
26. Какова структура спутничного района акроцентрической хромосомы?

Глава 8. Закономерности наследования и взаимодействия генов

1. Расположите (схематически) аллельные гены на интерфазных хромосомах.
2. Расположите (схематически) неаллельные гены на интерфазных хромосомах.
3. Запишите генотип женщины с IV группой крови и отрицательным резус-фактором. Напишите все возможные варианты гамет.
4. Запишите генотип страдающего гемофилией мужчины со II группой крови и положительным резус-фактором. Напишите все возможные варианты гамет.
5. Запишите генотип женщины, отец которой страдал дальтонизмом. У нее I группа крови и отрицательный резус-фактор. Перечислите все возможные варианты гамет.
6. Запишите генотип мужчины-правши с III группой крови и положительным резус-фактором. Перечислите все возможные варианты гамет.
7. Расположите гены на хромосоме, если расстояние между генами A и C — 8 сМ, A и B — 6 сМ, а между B и C — 14 сМ.
8. Расстояние между генами A и B равно 6 сМ. Каково возможное количество кроссоверных и некрроссоверных гамет при таком условии? Какова частота кроссинговера между генами?
9. Частота кроссинговера между генами A и B составляет 8 сМ. Сколько кроссоверных и некрроссоверных гамет может образоваться? Каково расстояние между генами A и B?

Раздел II

МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНЕТИКА

Глава 9. Медико-генетическое консультирование

1. Какова роль медико-генетического консультирования в диагностике заболеваний?
2. Назовите основные задачи медико-генетического консультирования.

3. Каковы показания для обращения в медико-генетическую консультацию?
4. Почему при постановке диагноза необходимо учитывать родственные связи?
5. Почему проспективное медико-генетическое консультирование более эффективно для профилактики наследственного заболевания?
6. Что такое ретроспективное медико-генетическое консультирование?
7. Перечислите основные этапы медико-генетического консультирования.
8. Что понимается под генетическим риском наследственной патологии?
9. Какие характеристики необходимо учитывать при расчете генетического риска наследственной патологии?
10. Перечислите методы медицинской генетики для установления наследственной патологии у пациента.

Глава 10. Генетико-эпидемиологические методы

1. Что изучают с помощью клинко-генеалогического метода?
2. В каком случае применяют клинко-генеалогический метод?
3. Из каких этапов состоит клинко-генеалогический метод?
4. Как проводится сбор семейного анамнеза?
5. Как составляют генеалогическое древо (родословную) пациента?
6. Что позволяет установить генеалогический анализ?
7. Заболевания с каким типом наследования можно определять клинко-генеалогическим методом?
8. Охарактеризуйте моногенный аутосомно-доминантный тип наследования заболевания.
9. Охарактеризуйте моногенный аутосомно-рецессивного типа наследования заболевания.
10. В чем особенность X-сцепленного доминантного типа наследования заболевания?
11. В чем особенность X-сцепленного рецессивного типа наследования заболевания?
12. Что изучают с помощью классического близнецового метода?
13. В чем разница между моно- и дизиготными близнецами?
14. Что можно рассчитать с помощью формулы Хольцингера?
15. Каковы трудности применения близнецового метода?
16. Что можно определить с помощью популяционно-генетического метода?
17. Что такое популяция?
18. Какие особенности необходимо учитывать при изучении популяций человека?
19. В чем характеристика закона генетического равновесия Харди—Вайнберга?
20. Что называют менделевской популяцией?
21. В чем заключается следствие закона Харди—Вайнберга?
22. Каковы трудности применения популяционно-генетического метода?

Задание 7. Заполните таблицу, охарактеризовав генетико-эпидемиологические методы медицинской генетики

Характеристика	Метод		
	Клинико-генеалогический	Близнецовый	Популяционно-статистический
Описание			
Преимущества			
Недостатки			

Глава 11. Методы лабораторной генетики

11.1. Цитогенетические методы

1. Какие ткани организма необходимо использовать при классическом цитогенетическом методе? Почему?
2. Назовите антикоагулянт для предотвращения свертываемости крови.
3. Какие клетки периферической крови изучают при классическом цитогенетическом методе? Почему?
4. Каковы основные достоинства культуры лимфоцитов периферической крови?
5. Что подразумевается под термином «культивирование клеток»?
6. Каковы основные условия для культивирования клеток?
7. Почему при культивировании клеток любых тканей добавляют фитогемагглютинин?
8. Какова функция бромдезоксипуридина при культивировании клеток?
9. Что такое инкубация клеток?
10. Какие условия необходимы при инкубации разных тканей?
11. Почему после инкубации обязательно нужно добавить в культуральную смесь колхицин?
12. Что такое гипотонизация?
13. Как проводят фиксацию клеток?
14. Назовите основные способы окрашивания метафазных клеток.
15. Из каких частей состоит оптическая часть микроскопа?
16. Что представляет собой механическая часть микроскопа?
17. Как проводят анализ метафазных пластинок?
18. Что такое кариотип?
19. Что такое кариограмма?
20. Какие существуют классификации хромосом человека?
21. Какова характеристика Денверской классификации хромосом?
22. На какие группы делятся хромосомы в Денверской классификации? Почему?
23. Какие хромосомы относятся к метацентрическим? Опишите их.

24. Какие хромосомы относятся к субметацентрическим? Опишите их.
25. Какие хромосомы относятся к акроцентрическим? Опишите их.
26. Какие aberrации хромосом можно определить при монохромно окрашенных хромосомах?
27. Что подразумевают под дифференциальным окрашиванием хромосом?
28. Какие типы дифференциально окрашенных хромосом существуют?
29. Какова молекулярная структура G- и R-сегментов?
30. Чем характеризуется Парижская классификация хромосом?
31. Как обозначаются участки хромосомы?
32. Что понимают под термином «локус»?
33. Что позволила изучать Парижская классификация хромосом?
34. Что такое центромерный индекс?
35. Какие мутации можно выявлять при дифференциальном окрашивании хромосом?
36. Что является ограничением для применения классического цитогенетического метода?
37. Какие трудности возможны при культивировании клеток?
38. Почему не всегда можно точно определить некоторые aberrации?

Задание 8. Заполните таблицу, описав способы окрашивания хромосом методами классической цитогенетики

Способ окрашивания	Описание
Монохромно окрашенные хромосомы	
G-окрашивание (GTG)	
R-окрашивание (RHG)	
C-окрашивание (CBG)	
NOR-окрашивание	
Сестринские хроматидные обмены (CXO)	

11.2. Молекулярно-цитогенетические методы

1. Какие возможности появились в цитогенетике с развитием молекулярных технологий?
2. Какие новые исследования позволила проводить молекулярная цитогенетика?
3. Какие методы молекулярной цитогенетики известны?
4. Какие ткани организма можно использовать при молекулярно-цитогенетических методах?
5. Для чего применяют метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH-метод)?
6. Какие этапы характерны для FISH-метода?

7. Что такое реакция гибридизации при FISH-методе?
8. Что представляют собой флуорохромы? Назовите их.
9. Каков главный принцип подбора флуорохромов?
10. Что такое «зонд» для FISH-метода?
11. Какие типы зондов существуют?
12. Как анализируют препараты при FISH-методе?
13. Какие бывают разновидности FISH-метода?
14. Какие мутации можно выявить FISH-методом?
15. В чем недостаток FISH-метода?
16. В чем особенность сравнительной геномной гибридизации (CGH-метод)?
17. В чем преимущества CGH-метода?
18. Какие разновидности CGH-метода существуют?
19. В чем заключается основной принцип метафазной сравнительной геномной гибридизации? В чем недостаток этого метода?
20. В чем состоит основной принцип сравнительной геномной гибридизации высокого разрешения? Есть ли недостатки у этого метода?
21. Какой анализ позволяет проводить микроматричная сравнительная геномная гибридизация? В чем недостаток этого метода?
22. Какие мутации можно выявлять CGH-методом?
23. В чем основной недостаток CGH-метода?
24. Что такое цифровая микроскопия?
25. Каковы преимущества автоматических станций?
26. Какая номенклатура хромосом человека используется программным обеспечением автоматических станций?
27. Как детектируются сигналы флуорохромов в цветном микроскопе?
28. Из каких основных модулей состоит автоматическая станция?
29. В чем преимущества методов классической и молекулярной цитогенетики?
30. Каковы основные различия методов классической и молекулярной цитогенетики?
31. Почему в некоторых случаях диагностики используют несколько методов классической и молекулярной цитогенетики?
32. Почему методы молекулярной цитогенетики позволяют выявить только определенные мутации?

Задание 9. Заполните таблицу, дав характеристику методам молекулярной цитогенетики

Методы	Разновидности	Описание	Выявляемые мутации	Недостатки метода
FISH				
CGH				

Молекулярно-генетические методы

1. Какие методы лабораторной генетики используют в диагностике наследственных заболеваний?
2. Что изучают с помощью методов молекулярной генетики?
3. Какие основные методы молекулярной генетики применяют в клинической практике?
4. Какие основные этапы выделения нуклеиновых кислот используются?
5. Каковы возможности метода полимеразной цепной реакции?
6. Каковы основные этапы метода полимеразной цепной реакции?
7. Без каких компонентов реакционной смеси невозможно проведение полимеразной цепной реакции?
8. Что представляет собой реакция амплификации?
9. Сколько этапов в каждом цикле амплификации?
10. Какие основные способы детекции результатов амплификации ДНК существуют?
11. В чем недостаток детекции результатов ПЦР методом гель-электрофореза?
12. Каковы особенности полимеразной цепной реакции в реальном времени?
13. В чем преимущество детекции результатов ПЦР в реальном времени?
14. Что такое секвенирование ДНК?
15. Какие виды секвенирования ДНК существуют?
16. В чем заключается механизм секвенирования ДНК по Сэнгеру?
17. Что подразумевается под термином «секвенирование нового поколения»?
18. Каков основной механизм секвенирования нового поколения?
19. Какие возможности открываются в практической медицине при использовании секвенирования нового поколения?
20. Что позволяет изучать секвенирование третьего поколения?

Задание 10. Заполните таблицу, описав молекулярно-генетические методы медицинской генетики, используемые в клинической практике

Метод	Описание	Преимущества	Недостатки
Полимеразная цепная реакция с детекцией результатов методом гель-электрофореза			
Полимеразная цепная реакция с детекцией результатов в реальном времени			
Секвенирование по Сэнгеру			
Секвенирование нового поколения (NGS)			

Раздел III ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ГЕНЕТИКИ

Глава 12. Картирование генома человека

1. Что такое картирование генома?
2. Когда стали составлять карты генов и хромосом?
3. Какой метод позволил создать первую генетическую карту?
4. Как определяют расстояние между генами при составлении генетической карты?
5. Что такое частота кроссинговера? В каких единицах она измеряется?
6. Как схематически располагаются гены на генетических картах?
7. Какая единица принята за расстояние между генами при составлении генетических карт?
8. В чем недостаток генетических карт?
9. Почему физические карты наиболее точные?
10. Чем отличаются генетические карты от физических?
11. Какие методы исследования используют при составлении физических карт?
12. Как обозначают расстояние между генами в физических картах?
13. Чем различаются разные типы физических карт?
14. Что входило в первую физическую карту хромосом человека?
15. Какие уровни разрешения имеют современные цитогенетические карты хромосом человека?
16. Каков механизм построения карт, основанных на контигах?
17. В чем недостаток метода построения карты контигов?
18. Что такое рестрикционные карты?
19. Каков механизм построения рестрикционных карт?
20. Что такое транскрипционные карты?
21. Каков механизм построения транскрипционных карт?
22. Что такое карта генома?
23. Что обозначает понятие «анатомия генома человека»?
24. Почему картирование генов человека важно для медицины?

Глава 13. Применение методов медицинской генетики

13.1. Пренатальная диагностика

1. Какова цель пренатальной диагностики?
2. Что представляют собой прямые методы пренатальной диагностики?
3. Что представляют собой неинвазивные методы пренатальной диагностики?
4. Что представляют собой инвазивные методы пренатальной диагностики?
5. Каковы основные критерии проведения скрининга?

6. Каковы основания для проведения цитогенетического, молекулярно-цитогенетического и молекулярно-генетического анализа плода?
7. Что такое амниоцентез?
8. В каком случае проводят биопсию хориона?
9. На каких сроках беременности применяют кордоцентез?
10. Какие ограничения существуют для проведения пренатальной цитогенетической диагностики?

13.2. Преимплантационная диагностика

1. Что подразумевается под термином «преимплантационная диагностика»?
2. Что является основой для проведения преимплантационной диагностики?
3. Что относят к вспомогательным репродуктивным технологиям?
4. Какие существуют способы экстракорпорального оплодотворения?

13.3. Постнатальная диагностика

1. Какие цитогенетические методы используют в постнатальной диагностике при подтверждении клинического диагноза у новорожденных?
2. При каких наследственных заболеваниях скрининг новорожденных в первые десять суток после рождения является обязательным?
3. Почему цитогенетическое обследование детей — необходимое условие для подтверждения клинического диагноза?
4. Какие методы классической и молекулярной цитогенетики необходимо применять для точной диагностики заболевания? Приведите примеры.

13.4. Диагностика и ведение больных с онкологическими заболеваниями

1. Какая первая абберация хромосом была выявлена при хроническом миелолейкозе?
2. Почему при диагностике патологий лимфатической системы обязательно используют методы классической и молекулярной цитогенетики?
3. Какой биоматериал необходим при цитогенетической диагностике патологий лимфатической системы?
4. Какая абберация встречается наиболее часто, а следовательно, является клинически значимой при остром лимфобластном лейкозе?
5. Какой главный цитогенетический маркер при хронической лимфоцитарной лейкемии влияет на выбор терапии?
6. Какую роль играет выявление статуса рецептора Her2/neu FISH-методом при раке молочной железы?
7. Почему при немелкоклеточном раке легкого определяют транслокацию в гене ALK методом FISH?

13.5. Биологическая дозиметрия

1. Почему методы классической и молекулярной цитогенетики необходимы при определении факта воздействия мутагенов?

2. Почему аберрации хромосом, выявляемые в лимфоцитах периферической крови, служат биологическим маркером оценки полученной дозы мутагена?
3. Почему при радиационных авариях важно оценить полученную дозу облучения?
4. Какие четыре возможных цитогенетических метода рекомендуется использовать в биодозиметрии?
5. Для чего нужен анализ нестабильных хромосомных аберраций?
6. Анализ каких аберраций используют при ретроспективной оценке доз?
7. Что такое микроядра?
8. В каких случаях рекомендуется применять микроядерный тест в биодозиметрии?
9. Что такое метод преждевременной конденсации хромосом и для чего он используется?

РЕКОМЕНДУЕМАЯ УЧЕБНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Алтухов Ю. П.* Генетические процессы в популяциях. 3-е изд. М.: Академкнига, 2003.
- Альбертс Б., Джонсон А., Льюис Д.* и др. Молекулярная биология клетки: в 3 т. М.: Ижевск: ИКИ, 2013.
- Асанов А. Ю., Демикова Н. С., Голимбет В. Е.* Основы генетики: учеб. пособие. М.: Академия, 2012.
- Асланян М. М., Солдатова О. П.* Генетика и происхождение пола: учеб. пособие. М.: Авторская академия; КМК, 2010.
- Баранов В. С., Кузнецова Т. В.* Цитогенетика эмбрионального развития человека. СПб.: Н-Л, 2007.
- Баранов В. С., Кузнецова Т. В., Кащеева Т. К., Иващенко Т. Э.* Пренатальная диагностика наследственных болезней. Состояние и перспективы. СПб.: Н-Л, 2017.
- Биология в рисунках, схемах и таблицах / Г. И. Мяндина, Е. В. Тарасенко. М.: Практическая медицина, 2018.
- Бочков Н. П., Пузырев В. П., Смирнихина С. А.* Клиническая генетика. М.: ГЭОТАР-Мед, 2013.
- Ворсанова С. Г., Чернышов В. Н., Юров Ю. Б.* Медицинская цитогенетика: учеб. пособие. М.: Медпрактика-М, 2006.
- Генетика / Под ред. В. И. Иванова. 2006. М.: Академкнига, 2006.
- Геномика — медицине / Под ред. В. И. Иванова, Л. Л. Киселева. М.: Академкнига, 2005.
- Гинтер Е. К.* Медицинская генетика: учебн. М.: Медицина, 2003.
- Горбунов В. Н., Баранов В. С.* Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. СПб.: Специальная литература, 1997.
- Жимухев И. Ф.* Общая и молекулярная генетика. Новосибирск: Сибирское университетское изд-во, 2007.
- Захаров А. Ф., Бенюш В. А., Кулешов Н. П., Барановская Л. И.* Хромосомы человека: атлас / АМН СССР. М.: Медицина, 1982.

- Иллариошкин С.Н. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование. М.: Медицинское информационное агентство, 2004.
- Инге-Вечтомов С.Г. Ретроспектива генетики. Genetics in retrospect (курс лекций + CD). СПб.: Н-Л, 2015.
- Джонс К.Л. Наследственные синдромы по Дэвиду Смиту: атлас-справочник / пер. с англ. А.Г. Азова [и др.]. М.: Практика, 2011.
- Льюин Б. Гены / Пер. с англ. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2012.
- Льюин Б. Клетки. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011.
- Биология: руководство к практическим занятиям: учеб. пособие / под ред. В.В. Маркиной. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015.
- Миронова Л., Падкина М., Самбук Е. РНК: синтез и функции: учеб. пособие. СПб.: Эко-Вектор, 2017.
- Мустафин А.Г., Волков И.Н., Козлова И.И. Биология: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015.
- Мутовин Г.Н. Клиническая генетика: Геномика и протеомика наследственной патологии: учеб. пособие. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010.
- Мушкамбаров Н.Н., Кузнецов С.Л. Молекулярная биология. М.: Медицинское информационное агентство, 2007.
- Пехов А.П. Биология с основами экологии. СПб.: Лань, 2000.
- Причард Д.Д. Наглядная медицинская генетика / Дориан Дж. Причард, Брюс Р. Корфф; пер. с англ. под ред. Н.П. Бочкова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009.
- Пузырев В.П., Степанов В.А. Патологическая анатомия генома человека. Новосибирск: Наука, 1997.
- Разин С.В., Быстрицкий А.А. Хроматин: упакованный геном. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2009.
- Рубан Э.Д. Генетика человека с основами медицинской генетики. Ростов н/Д: Феникс, 2017.
- Сингер М., Берг П. Гены и геномы: в 2 т. / Пер. с англ. М.: Мир, 1998.
- Сулимова Г.Е., Салменкова Е.А., Политов Д.В. и др. Практикум по полиморфизму ДНК и белков: методическое пособие к Большому практикуму по генетике на кафедре генетики Биологического факультета МГУ. М.: Ойкос, 2002.
- Тарасов В.А. Молекулярные механизмы репарации и мутагенеза. М.: Наука, 1982.
- Фогель Ф., Мотульски А. Генетика человека: в 3 т. М.: Мир, 1990.
- Чебышев Н.В., Гринева Г.Г., Козарь М.В., Гуленков С.И. Биология: учебник. М.: ВУНМЦ, 2000.
- Щипков В.П., Азова М.М., Гигани О.Б. и др. Генетика человека с основами медицинской генетики. М.: Кнорус, 2018.
- Щипков В.П., Кривошеина Г.Н. Общая и медицинская генетика. М.: Академия, 2003.
- Ярмоненко С.П. Радиобиология человека и животных. М.: Высшая школа, 1977.
- Ярыгин В.Н., Васильева В.И., Волков И.Н., Синельщикова В.В. Биология: в 2 кн. 5-е изд., испр. и доп. М.: Высшая школа, 2003.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

Раздел I

БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ, МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ОБЩАЯ ГЕНЕТИКА

Глава 1. Клетка — структурно-функциональная единица организма

- Akiyama S.K.* Integrins in Cell Adhesion and Signaling. *Hum Cell.* 1996; 9(3): 181–6.
- Baum D.A., Baum B.* An inside-out origin for the eukaryotic cell. *BMC Biol.* 2014; 12: 76.
- Feijoo-Siota L., Rama J.L.R., Sánchez-Pérez A., Villa T.G.* Considerations on bacterial nucleoids. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2017; 101(14): 5591–602.
- Ram S., Rodriguez J.J.* Size-Invariant Detection of Cell Nuclei in Microscopy Images. *IEEE Trans Med Imaging.* 2016; 35(7): 1753–64.
- Zajiczek L., Shaw M., Faruqi N. et al.* Nano-mechanical single-cell sensing of cell-matrix contacts. *Nanoscale.* 2016; 8(42): 18105–12.

Глава 2. Химический состав клетки

- Акифьев А.П., Гришанин А.К.* Некоторые заключения о роли избыточной ДНК и механизмах эволюции эукариот, которые можно сделать на основании изучения диминуции хроматина у *Cycloroida*. *Генетика.* 2005; 41(4): 466–79.
- Avcı-Adalı M., Behring A., Steinle H. et al.* In vitro synthesis of modified mRNA for induction of protein expression in human cells. *J Vis Exp.* 2014; 93: e51943.
- Breaker R.R., Joyce G.F.* The expanding view of RNA and DNA function. *Chem Biol.* 2014; 21(9): 1059–65.
- Chen C.Y., Ezzeddine N., Shyu A.B.* Messenger RNA Half-Life Measurements in Mammalian Cells. *Methods Enzymol.* 2008; 448: 335–57.
- Danlybaeva G., Isabekova A., Akhmedeyeva Z.* Effects of Antioxidants and Vitamins on the Proliferation of Human Diploid Cells. *Cent Asian J Glob Health.* 2014; 2(Suppl): 112.
- Fallah A., Mohammad-Hasani A., Colagar A.H.* Zinc is an Essential Element for Male Fertility: A Review of Zn Roles in Men's Health, Germination, Sperm Quality, and Fertilization. *J Reprod Infertil.* 2018; 19(2): 69–81.
- Fuchs T.A., Brill A., Duerschmied D. et al.* Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107(36): 15880–5.
- Gestland R.F., Cech T.R., Atkins J.F.* *The RNA World.* 3rd ed. NY: Cold Spring Harbor, 2006.

- Hughes S. H.* Reverse Transcription of Retroviruses and LTR Retrotransposons. *Microbiol Spectr.* 2015; 3(2): MDNA3-0027-2014.
- Lorch Y., Maier-Davis B., Kornberg R.D.* Chromatin remodeling by nucleosome disassembly in vitro. *Proc Natl Acad Sci.* 2006; 103: 3090–3.
- Russo I., Carrizzo A., Bochicchio S. et al.* siRNA Delivery for Control of Cyclin D1 and E2F1 Expression in Crohn's Disease. *Transl Med Uni Sa.* 2018; 17: 22–30.
- Szczepanowska K., Trifunovic A.* Different faces of mitochondrial DNA mutators. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1847(11): 1362–72.
- Watson J.D.* The Double Helix: A Personal Account of the Discovery of the Structure of DNA. Touchstone: Scribner classics, 2001.

Глава 3. Реализация наследственной информации

- Александрюшкина Н.И., Ванюшин Б.Ф.* Эндонуклеазы и апоптоз у животных. *Успехи биологической химии.* 2012; 52: 63–96.
- Зверева М.Э., Щербакова Д.М., Донцов О.А.* Теломераза: структура, функции, и пути регуляции активности. *Успехи биологической химии.* 2010; 50: 155–202.
- Спирин А.С.* Биосинтез белка: регуляция на уровне трансляции. *Соросовский образовательный журнал.* 2000; 5: 2–7.
- Тарантул В.З.* Толковый словарь по молекулярной и клеточной биотехнологии: русско-английский. Т. 2. М.: Языки славянской культуры, 2016.
- Akamatsu Y., Kobayashi T.* The Human RNA Polymerase I Transcription Terminator Complex Acts as a Replication Fork Barrier That Coordinates the Progress of Replication with rRNA Transcription Activity. *Mol Cell Biol.* 2015; 35(10): 1871–81.
- Arava Y., Boas F.E., Brown P.O., Herschlag D.* Dissecting eukaryotic translation and its control by ribosome density mapping. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33(8): 2421–32.
- Arias E.E., Walter J.C.* Strength in numbers: preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells. *Genes. Dev.* 2007; 21: 497–518.
- Arndt K.M., Reines D.* Termination of Transcription of Short Noncoding RNAs by RNA Polymerase II. *Annu Rev Biochem.* 2015; 84: 381–404.
- Ashburner M., Ball C.A., Blake J.A. et al.* Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet.* 2000; 25: 25–9.
- Asin-Cayuela J., Gustafsson C.M.* Mitochondrial transcription and its regulation in mammalian cells. *Trends Biochem Sci.* 2007; 32(3): 111–7.
- Barshad G., Marom S., Cohen T., Mishmar D.* Mitochondrial DNA Transcription and Its Regulation: An Evolutionary Perspective. *Trends Genet.* 2018; 682–92.
- Beissinger M., Buchner J.* How chaperones fold proteins. *Biol Chem.* 1998; 379(3): 245–59.

- Bell S.P., Dutta A.* DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem.* 2002; 71: 333–74.
- Bidnenko V., Nicolas P., Grylak-Mielnicka A.* et al. Termination factor Rho: From the control of pervasive transcription to cell fate determination in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet.* 2017; 13(7).
- Bleichert F., Botchan M.R., Berger J.M.* Mechanisms for initiating cellular DNA replication. *Science.* 2017; 355(6327).
- Blencowe B.J.* Alternative splicing; new insights from global analyses. *Cell.* 2006; 126: 37–47.
- Browning D.F., Busby S.J.* Local and global regulation of transcription initiation in bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2016; 14(10): 638–50.
- Ciesla M., Skowronek E., Boguta M.* Function of TFIIC, RNA polymerase III initiation factor, in activation and repression of tRNA gene transcription. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(18): 9444–55.
- Copeland W.C.* Defects of Mitochondrial DNA Replication. *J Child Neurol.* 2014; 29(9): 1216–24.
- Dever T.E., Green R.* The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012; 4(7): a013706.
- Edmonds M.* A history of poly A sequences: from formation to factors to function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2002; 71: 285–389.
- Fisher R.P., Clayton D.A.* A transcription factor required for promoter recognition by human mitochondrial RNA polymerase. Accurate initiation at the heavy- and light-strand promoters dissected and reconstituted in vitro. *J Biol Chem.* 1985; 260(20): 11330–8.
- Galloway A., Cowling V.H.* mRNA cap regulation in mammalian cell function and fate. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* 2018; 1862(3): 270–9.
- Garrido-Ramos M.A.* Satellite DNA: An Evolving Topic. *Genes (Basel).* 2017; 8(9): 230.
- Gaspari M., Falkenberg M., Larsson N.G., Gustafsson C.M.* The mitochondrial RNA polymerase contributes critically to promoter specificity in mammalian cells. *EMBO J.* 2004; 23(23): 4606–14.
- Gaur R., Grasso D., Datta P.P.* et al. A single mammalian mitochondrial translation initiation factor functionally replaces two bacterial factors. *Mol. Cell.* 2008; 29: 180–90.
- Gualerzi C.O., Pon C.L.* Initiation of mRNA translation in bacteria: structural and dynamic aspects. *Cell Mol Life Sci.* 2015; 72(22): 4341–67.
- Hammarstrand M., Wilson W., Corcoran M.* et al. Identification and characterization of two novel human mitochondrial elongation factor genes, hEFG2 and hEFG1, phylogenetically conserved through evolution. *Hum Genet.* 2001; 109(5): 542–50.
- Hartwell L.H., Goldberg M.L., Fisher J.A., Hood L.* *Genetics; from Genes to Genomes.* Boston: 2006.
- Hershey J.W.B., Sonenberg N., Mathews M.B.* Principles of Translational Control: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012; 4(12).
- Hershko A., Ciechanover A., Varshavsky A.* Basic Medical Research Award. The ubiquitin system. *Nat Med.* 2000; 6(10): 1073–81.

- Hinnebusch A.G., Lorsch J.R.* The mechanism of eukaryotic translation initiation: new insights and challenges. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012; 4(10): a011544.
- Human Genome Sequencing Consortium. *Nature.* 2001; 409: 860–921.
- Huynen M.A., Duarte I., Chrzanowska-Lightowlers Z.M., Nabuurs S.B.* Structure based hypothesis of a mitochondrial ribosome rescue mechanism. *Biol Direct.* 2012; 7: 14.
- Kaiser C.M., Goldman D.H., Chodera J.D.* et al. The ribosome modulates nascent protein folding. *Science.* 2011; 334: 1723–7.
- Kleizen B., Braakman I.* Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Bio.* 2004; 16: 343–9.
- Klose R.J., Bird A.P.* Genomic DNA methylation; the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.* 2006; 31: 89–97.
- Koonin E.V., Novozhilov A.S.* Origin and evolution of the genetic code: the universal enigma. *IUBMB Life.* 2009; 61(2): 99–111.
- Korostelev A.A.* Structural aspects of translation termination on the ribosome. *RNA.* 2011; 17(8): 1409–21.
- Kozak M.* Regulation of translation in eukaryotic systems. *Annu Rev Cell Biol.* 1992; 8: 197–225.
- Kubelka J., Hofrichter J., Eaton W.A.* The protein folding ‘speed limit’. *Curr Opin Struct Biol.* 2004; 14: 76–88.
- Lee W.T., St John J.* The control of mitochondrial DNA replication during development and tumorigenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2015; 1350: 95–106.
- Magnan D., Bates D.* Regulation of DNA Replication Initiation by Chromosome Structure. *J Bacteriol.* 2015; 197(21): 3370–7.
- Mauro V.P., Matsuda D.* Translation regulation by ribosomes: Increased complexity and expanded scope. *RNA Biol.* 2016; 13(9): 748–55.
- Mazouzi A., Velimezi G., Loizou J.I.* DNA replication stress: causes, resolution and disease. *Exp Cell Res.* 2014; 329(1): 85–93.
- Mikeska T., Craig J.M.* DNA Methylation Biomarkers: Cancer and Beyond. *Genes (Basel).* 2014; 5(3): 821–64.
- Mello C.C., Conte D.* Revealing the world of RNA interference. *Nature.* 2004; 431: 338–42.
- Moazed D.* Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature.* 2009; 457: 413–20.
- Moore L.D., Le T., Fan G.* DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology.* 2013; 38(1): 23–38.
- Munk S., Sigurðsson J.O., Xiao Z.* et al. Proteomics Reveals Global Regulation of Protein SUMOylation by ATM and ATR Kinases during Replication Stress. *Cell Rep.* 2017; 21(2): 546–58.
- Noller H.F.* RNA structure: reading the ribosome. *Science.* 2005; 309: 1508–14.
- Ogata H., Goto S., Sato K.* et al. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 1999; 27: 29–34.

- Posse V., Shahzad S., Falkenberg M.* TEFM is a potent stimulator of mitochondrial transcription elongation in vitro. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43(5): 2615–24.
- Robichaud N., Sonenberg N., Ruggiero D., Schneider R.J.* Translational Control in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2019; 11(7). pii: a032896.
- Robinson N.P., Bell S.D.* Origins of DNA replication in the three domains of life. *FEBS J.* 2005; 272: 3757–66.
- Sendy B., Lee D.J., Busby S.J., Bryant J.A.* RNA polymerase supply and flux through the lac operon in *Escherichia coli*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2016; 371(1707). pii: 20160080.
- Seshasayee A.S., Sivaraman K., Luscombe N.M.* An overview of prokaryotic transcription factors: a summary of function and occurrence in bacterial genomes. *Subcell Biochem.* 2011; 52: 7–23.
- Shuo Gu, Kay M.A.* How do miRNAs mediate translational repression? *Silence.* 2010; 1: 11.
- Smits P., Smeitink J., van den Heuvel L.* Mitochondrial Translation and Beyond: Processes Implicated in Combined Oxidative Phosphorylation Deficiencies. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 2010: 737385.
- Spilka R., Ernst C., Mehta A.K., Haybaeck J.* Eukaryotic translation initiation factors in cancer development and progression. *Cancer Lett.* 2013; 340(1): 9–21.
- Talavera A., Hendrix J., Versées W. et al.* Phosphorylation decelerates conformational dynamics in bacterial translation elongation factors. *Sci Adv.* 2018; 4(3): 9714.
- Trautinger B.W., Jaktaji R.P., Rusakova E., Lloyd R.G.* RNA polymerase modulators and DNA repair activities resolve conflicts between replication and transcription. *Mol Cell.* 2005; 19: 247–58.
- Tsuboi M., Morita H., Nozaki Y. et al.* EF-G2mt is an exclusive recycling factor in mammalian mitochondrial protein synthesis. *Mol Cell.* 2009; 35: 502–10.
- Vannini A., Cramer P.* Conservation between the RNA polymerase I, II, and III transcription initiation machineries. *Mol Cell.* 2012; 45(4): 439–46.
- Walsh E., Wang X., Lee M.Y., Eckert K.A.* Mechanism of replicative DNA polymerase Delta pausing and a potential role for DNA polymerase Kappa in common fragile site replication. *J Mol Biol.* 2013; 425: 232–43.
- Washburn R.S., Gottesman M.E.* Regulation of transcription elongation and termination. *Biomolecules.* 2015; 5(2): 1063–78.
- Watson J.D., Crick F.H.* Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature.* 1953; 171(4356): 737–8.
- Watson J.D., Baker T.A., Bell S.P. et al.* *Molecular Biology of the Gene.* Menlo Park: Benjamin Cummings, 2003.
- Woese C.R.* Translation: in retrospect and prospect. *RNA.* 2001; 7: 1055–67.
- Wolf D.H., Sommer T., Hilt W.* Death gives birth to life: the essential role of the ubiquitin-proteasome system in biology. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1695(1–3): 1–2.
- Wu L., Liu Y., Kong D.* Mechanism of chromosomal DNA replication initiation and replication fork stabilization in eukaryotes. *Sci China Life Sci.* 2014; 57(5): 482–7.

- Wu X., Bartel D.P.* Widespread Influence of 3'-End Structures on Mammalian mRNA Processing and Stability. *Cell*. 2017; 169(5): 905–17.
- Wu Z., Liu X., Liu L. et al.* Regulation of lncRNA expression. *Cell Mol Biol Lett*. 2014; 19(4): 561–75.
- Zeman M.K., Cimprich K.A.* Causes and consequences of replication stress. *Nat Cell Biol*. 2016; 16: 2–9.

Глава 4. Изменчивость организма

- Houle D., Morikawa B., Lynch M.* Comparing Mutational Variabilities. *Genetics*. 1996; 143(3): 1467–83.
- Kimura M.* Genetic variability maintained in a finite population due to mutational production of neutral and nearly neutral isoalleles. *Genet Res*. 2007; 89(5–6): 341–63.
- Yurov Y.B., Vorsanova S.G., Iourov I.Y.* Ontogenetic Variation of the Human Genome. *Current Genomics*, 2010; 11: 420–25.
- Zhang X.S., Hill W.G.* Genetic variability under mutation selection balance. *Trends Ecol Evol*. 2005; 20(9): 468–70.

Глава 5. Мутагены. Репарация ДНК. Мутации

- Абилев С. К., Глазер В. М., Аслаяни М. М.* Мутагенез с основами генотоксикологии. М.: СПб.: Нестор-История, 2015.
- Воробцова И.Е., Семенов А.В.* Частота хромосомных aberrаций в лимфоцитах человека как показатель риска заболеваемости. *Медицинский академический журнал*. 2008; 8(4): 44–9.
- Воробцова И.Е., Семенов А.В.* Возрастная динамика частоты спонтанных и индуцированных *in vitro* хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови человека при естественном и лучевом старении. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2010; 50(3): 253–8.
- Севаньякаев А.В., Хвостунов И.К., Снугирева Г.П. и др.* Сравнительный анализ результатов цитогенетических обследований контрольных групп лиц в различных отечественных лабораториях. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2013; 53(1): 5–24.
- Anderson R.M., Tsepenco V.V., Gasteva G.N. et al.* mFISH Analysis Reveals Complexity of Chromosome Aberrations in Individuals Occupationally Exposed to Internal Plutonium: A Pilot Study to Assess the Relevance of Complex Aberrations as Biomarkers of Exposure to High-LET α Particles. *Rad Res*. 2005; 163: 26–35.
- Andersson H.C.* The spontaneous frequency of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in cultured peripheral lymphocytes of a single blood donor sampled more than 200 times. *Mutat. Res*. 1993; 286(2): 281–92.

- Aseeva E.A., Snigireva G.P., Neverova A.L. et al. [The multiabberant cells in groups of people exposed to radiation due to different situations and their possible biological part]. *Radiats Biol Radioecol.* 2009; 49(5): 552–62.
- Awa A.A., Neel J.V. Cytogenetic “rogue” cells: what is their frequency, origin and evolutionary significance? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986; 83: 1021–5.
- Bochkov N.P., Katosova L.D. Analysis of multiaberrant cells in lymphocytes of persons living in different ecological regions. *Mutat. Res.* 1994; 323: 7–10.
- Bunnell B.E., Escobar J.F., Bair K.L. et al. Zinc blocks SOS-induced antibiotic resistance via inhibition of RecA in *Escherichia coli*. *PLoS One.* 2017; 12(5): e0178303.
- Chang H.H.Y., Pannunzio N.R., Adachi N., Lieber M.R. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017; 18(8): 495–506.
- Chatterjee N., Walker G.C. Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen.* 2017; 58(5): 235–63.
- Druzhinin V., Bakanova M., Fucic A. et al. Lymphocytes with multiple chromosomal damages in a large cohort of West Siberia residents: Results of long-term monitoring. *Mutat Res.* 2016; 1–7: 784–5.
- Hirsch D., Kemmerling R., Davis S. et al. Chromothripsis and focal copy number alterations determine poor outcome in malignant melanoma. *Cancer Res.* 2013; 73(5): 1454–60.
- Jacobs K.B., Yeager M., Zhou W. et al. Detectable clonal mosaicism and its relationship to aging and cancer. *Nat Genet.* 2012; 44(6): 651–8.
- Ju Y.S., Martincorena I., Gerstung M. et al. Somatic mutations reveal asymmetric cellular dynamics in the early human embryo. *Nature.* 2017; 543(7647): 714–8.
- Kelner A. Effect of Visible Light on the Recovery of *Streptomyces Griseus* Conidia from Ultraviolet Irradiation Injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1949 Feb; 35(2): 73–9.
- Korbel J.O., Campbell P.J. Criteria for inference of chromothripsis in cancer genomes. *Cell.* 2013; 152(6): 1226–36.
- Kowalczykowski S.C. An Overview of the Molecular Mechanisms of Recombinational DNA Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015; 7(11).
- Kunkel T.A., Erie D.A. Eukaryotic Mismatch Repair in Relation to DNA Replication. *Annu Rev Genet.* 2015; 49: 291–313.
- Leandro G.S., Sykora P., Bohr V.A. The impact of base excision DNA repair in age-related neurodegenerative diseases. *Mutat Res.* 2015; 776: 31–9.
- Lee J.B., Cho W.K., Park J. et al. Single-molecule views of MutS on mismatched DNA. *DNA Repair.* 2014; 20: 82–93.
- Liu B., Xue T.Q., Cao Y.J. et al. Mechanisms of mutagenesis: DNA replication in the presence of DNA damage. *Mutat Res Rev.* 2016; 768: 53–67.
- Luijten M.N.H., Lee J.X.T., Crasta K.C. Mutational game changer: Chromothripsis and its emerging relevance to cancer. *Mutat Res.* 2018; 777: 29–51.

- Ly P., Cleveland D.W. Rebuilding Chromosomes After Catastrophe: Emerging Mechanisms of Chromothripsis. *Trends Cell Biol.* 2017; 27(12): 917–30.
- Morishita M., Muramatsu T., Suto Y. et al. Chromothripsis-like chromosomal rearrangements induced by ionizing radiation using proton microbeam irradiation system. *Oncotarget.* 2016; 7(9): 10182–92.
- Nersesyan A., Fenech M., Bolognesi C. et al. Use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay in occupational biomonitoring of genome damage caused by in vivo exposure to chemical genotoxins: Past, present and future. *Mutat Res.* 2016; 770(Pt A): 1–11.
- Obe G., Johannes I., Johannes C. et al. Chromosomal aberrations in blood lymphocytes of astronauts after long-term space flights. *Int J Radiat. Biol.* 1997; 72: 727–34.
- Oliveira P.A., Colaco A., Chaves R., et al. Chemical carcinogenesis *An Acad Bras Cienc.* 2007; 79(4): 593–616.
- Rastogi R.P., Kumar R.A., Tyagi M.B., Sinha R.P. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *J Nucleic Acids.* 2010. 592980.
- Redwood A.B., Gonzalez-Suarez I, Gonzalo S. Regulating the levels of key factors in cell cycle and DNA repair: New pathways revealed by lamins. *Cell Cycle.* 2011; 10(21): 3652–7.
- Ryabchenko N.I., Nasonova V.A., Fesenko E. V et al. Aberrant and multiaberrant (rogue) cells in peripheral lymphocytes of Hodgkin's lymphoma patients after chemotherapy. *Mutat Res.* 2006; 601; 61–70.
- Sankaranarayanan K. Ionizing radiation and genetic risks IX. Estimates of the frequencies of mendelian diseases and spontaneous mutation rates in human populations: a 1998 perspective. *Mutat Res.* 1998; 411: 129–78.
- Sigurdson A.J., Ha M., Hauptmann M. et al. International study of factors affecting human chromosome translocations. *Mutat. Res.* 2008; 652(2): 112–21.
- Stephens P.J., Greenman C.D., Fu B. et al. Massive Genomic Rearrangement Acquired in a Single Catastrophic Event during Cancer Development. *Cell.* 2011; 144(1): 27–40.
- UNSCEAR: 1986 Report. Genetic and somatic effects of ionizing radiation: Report to the General Assembly with Scientific annexes United Nations // United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. New-York, 1986.
- Wakasugi M., Sasaki T., Matsumoto M., Nagaoka M. Nucleotide excision repair-dependent DNA double-strand break formation and ATM signaling activation in mammalian quiescent cells. *J Biol Chem.* 2014; 289(41): 28730–7.
- Whitehouse C.A., Edwards A.A., Tawn E.J. et al. Translocation yields in peripheral blood lymphocytes from control populations. *Int. J. Radiat. Biol.* 2005; 81(2): 139–45.
- Wright W.D., Shah S.S., Heyer W.D. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem.* 2018; 293(27): 10524–35.

Глава 6. Деление клеток

- Archana M., Bastian, Yogesh T.L., Kumaraswamy K.L.* Various methods available for detection of apoptotic cells — a review. *Indian J Cancer.* 2013; 50: 274–83.
- Babu R., Van Dyke D.L., Bhattacharya S. et al.* A rapid and reliable chromosome analysis method for products of conception using interphase nuclei. *Mol Genet Genomic Med.* 2018; 6(3): 370–81.
- Barnum K.J., O'Connell M.J.* Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods Mol Biol.* 2014; 1170: 29–40.
- Chen Q., Xia X., Wu S. et al.* Apoptosis, necrosis, and autophagy in mouse intestinal damage after 15-Gy whole body irradiation. *Cell Biochem Funct.* 2014; 32(8): 647–56.
- Cheng L.Q., Zhang Z.Q., Chen H.Z., Liu D.P.* Epigenetic regulation in cell senescence. *J Mol Med (Berl).* 2017; 95(12): 1257–68.
- Cowley S.A., Groopman J.E., Avraham H.* Effects of transforming growth factor beta on megakaryocytic cell fusion and endomitosis. *Int J Cell Cloning.* 1992; 10(4): 223–31.
- Ding D.Q., Haraguchi T., Hiraoka Y.* From meiosis to postmeiotic events: alignment and recognition of homologous chromosomes in meiosis. *FEBS J.* 2010; 277(3): 565–70.
- Fukagawa T., Earnshaw W.C.* The Centromere: Chromatin Foundation for the Kinetochore Machinery. *Dev Cell.* 2014; 30(5): 496–508.
- Garzon-Coral C., Fantana H.A., Howard J.* A force-generating machinery maintains the spindle at the cell center during mitosis. *Science.* 2016; 352(6289): 1124–7.
- Gerton J.L., Hawley R.S.* Homologous chromosome interactions in meiosis: diversity amidst conservation. *Nature Rev Genet.* 2005; 6: 477–87.
- Gewies A.* Introduction to apoptosis. *Review, Apo Review.* 2003; 3(1): 1–26.
- Ishiguro K., Kim J., Shibuya H. et al.* Meiosis-specific cohesin mediates homolog recognition in mouse spermatocytes. *Genes Dev.* 2014; 28(6): 594–607.
- Kam P.C.A., Ferch N.I.* Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia.* 2000; 55: 1081–93.
- Ketan K. Vaghasia, Nidhi D. Shah, Parth S. Shah et al.* Karyotypic analysis of chromosomal polymorphism in relation to reproductive failure. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2017; 9(4): 140–3. [Url: https://journals.indexcopernicus.com/search/article?articleId=2139910.](https://journals.indexcopernicus.com/search/article?articleId=2139910)
- Kishimoto T.* Entry into mitosis: a solution to the decades-long enigma of MPF. *Chromosoma.* 2015; 124(4): 417–28.
- Kung G., Dai P., Deng L., Kitsis R.N.* A novel role for the apoptosis inhibitor ARC in suppressing TNF α -induced regulated necrosis. *Cell Death Differ.* 2014; 21(4): 634–44.
- Larose H., Shami A.N., Abbott H. et al.* Gametogenesis: A journey from inception to conception. *Review Curr Top Dev Biol.* 2019; 132: 257–310.
- Lomiento M., Mammoli F., Mazza E.M.C. et al.* Chromosome positioning in interphase nuclei of hematopoietic stem cell and myeloid precursor. *Hematol Rep.* 2018; 10(1): 7515.

- Maier P., Hartmann L., Wenz F., Herskind C.* Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(1): 102.
- McKinley K.L., Cheeseman I.M.* The molecular basis for centromere identity and function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016; 17(1): 16–29.
- Meng F.W., Biteau B.* There and back again: amitosis to repopulate a stem cell pool. *Stem Cell Investig.* 2017; 4: 82.
- Muller S., Almouzni G.* Chromatin dynamics during the cell cycle at centromeres. *Nat Rev Genet.* 2017; 18(3): 192–208.
- Page S.L., Hawley R.S.* The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004; 20: 525–58.
- Ravanan P., Srikumar I.F., Talwar P.* Autophagy: The spotlight for cellular stress responses. *Life Sci.* 2017; 188: 53–67.
- Slijepcevic P.* Mechanisms of the Evolutionary Chromosome Plasticity: Integrating the Centromere from Telomere Hypothesis with Telomere Length Regulation. *Cytogenet Genome Res.* 2016; 148(4): 268–78.
- Sorokina I.V., Denisenko T.V., Imreh G.* et al. Involvement of autophagy in the outcome of mitotic catastrophe. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 14571.
- Sullivan K.F.* Mitosis. *Encyclopedia of Genetics.* 2001.
- Swaffer M.P., Jones A.W., Flynn H.R.* et al. CDK Substrate Phosphorylation and Ordering the Cell Cycle. *Cell.* 2016; 167(7): 1750–61.
- Thiru P., Kern D.M., McKinley K.L.* et al. Kinetochore genes are coordinately up-regulated in human tumors as part of a FoxM1-related cell division program. *Mol Biol Cell.* 2014; 25(13): 1983–94.
- Vaux D.L., Korsmeyer S.J.* Cell death in development. *Cell.* 1999; 96(2): 245–54.
- Victorelli S., Passos J.F.* Telomeres and Cell Senescence—Size Matters Not. *EBioMedicine.* 2017; 21: 14–20.
- Wiman K.G., Zhivotovsky B.* Understanding cell cycle and cell death regulation provides novel weapons against human diseases. *J Intern Med.* 2017; 281: 483–95.

Глава 7. Конформационные изменения ДНК в клеточном цикле

- Арифудин Е.Е., Брагина В.А., Замятина Е.Г.* и др. Компактизация ДНК в сперматогенезе человека и динамика компактизации нуклеогистонного и нуклеопротеоминного хроматина в дифференцирующихся сперматидях. *Онтогенез.* 2012; 43(2): 143–53.
- Рубцов Н.Б.* Пространственная организация генома млекопитающих. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2014; 18(1): 61.
- Bolzer A., Kreth G., Solovei I.* et al. Three-Dimensional Maps of All Chromosomes in Human Male Fibroblast Nuclei and Prometaphase Rosettes. *PLoS Biol* 2005; 3(5): e157. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030157>.

Lue N.F., Jiang S. Reverse transcriptase at bacterial telomeres. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101(40): 14307–8.

Weaver B.A.A., Bonday Z.Q., Putkey F.R., Kops G.J.P.L., Silk A.D., Cleveland D.W. Centromere-associated protein-E is essential for the mammalian mitotic checkpoint to prevent aneuploidy due to single chromosome loss. *J Cell Biol.* 2003; 162(4): 551–63.

Zinchenko A. DNA conformational behavior and compaction in biomimetic systems: Toward better understanding of DNA packaging in cell. *Adv Colloid Interface Sci.* 2016; 232: 70–9.

Глава 8. Закономерности наследования и взаимодействия генов

Colaco S., Modi D. Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018; 16: 14. doi: 10.1186/s12958-018-0330-5

Ross M.T., Grafham D.V., Coffey A.J. et al. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature.* 2005; 434(7031): 325–37.

Раздел II

МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНЕТИКА

Глава 9. Медико-генетическое консультирование

Асанов А.Ю., Демикова Н.С., Голицыбет В.Е. Основы генетики: учеб. пособие. М.: Академия, 2012.

Бочков Н.П., Пузырев В.П., Смирнихина С.А. Клиническая генетика. М.: ГЭОТАР-Мед, 2013.

Гинтер Е.К. Медицинская генетика: учебн. М.: Медицина, 2003.

Шнайдер Н.А., Козулина Е.А., Дмитренко Д.В., Шаповалова Е.А. Клинико-генеалогический анализ: учеб. пособие для студентов. Красноярск: КрасГМУ, 2013.

Глава 10. Генетико-эпидемиологические методы

Акушерство. Клинические лекции: учеб. пособие / под ред. О.В. Макарова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007.

Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. 3-е изд. М.: Академкнига, 2003.

Гинтер Е.К., Зинченко Р.А. Наследственные болезни в российских популяциях. *Вестник ВОГиС.* 2006; 10(1): 106–25.

Тимофеев-Ресовский Н.В., Яблоков А.В., Глотов Н.В. Очерк учения о популяции. Институт биологии развития АН СССР. М.: Наука, 1973.

- Baird P.A., Anderson T.W., Newcombe H.B., Lowry R.B.* Genetic disorders in children and young adults: a population study. *Am J Hum Genet.* 1988; 42: 677–93.
- Castillo-Fernandez J.E., Spector T.D., Bell J.T.* Epigenetics of discordant monozygotic twins: implications for disease. *Genome Med.* 2014; 6(7): 60.
- de la Chapelle C.A.* Disease gene mapping in isolated human populations: the example of Finland. *J Med Genet.* 1993; 30: 857–65.
- Fraga M.F., Ballestar E., Paz M.F. et al.* Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci.* 2005; 102(30): 10604–9.
- Garfield E.* Twins. Part 2. The twin study method in behavioral and clinical research. *Essays of an Information Scientist.* 1984; 7: 397–404.
- Malécot G.* Isolation by distance. *Genetic Structure of Population.* Ed. N.E. Morton. Honolulu: Univ. of Hawaii Press, 1973.
- Sahu M., Prasuna J.G.* Twin Studies: A Unique Epidemiological Tool. *Indian J Community Med.* 2016; 41(3): 177–82.

Глава 11. Методы лабораторной генетики

- Колотий А.Д., Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б. и др.* Цитогенетические и молекулярно-цитогенетические (FISH и МСВ) исследования синдрома Шершевского—Тернера: ретроспективный анализ 96 случаев *Современные проблемы науки и образования.* 2016; 5. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=25121> (дата обращения: 08.07.2020).
- Ребриков Д.В., Коростин Д.О., Шубина Е.С., Ильинский В.В.* NGS высокопроизводительное секвенирование. М.: Бинوم. Лаборатория знаний, 2015.
- Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.* ПЦР в реальном времени. М.: Бинوم. Лаборатория знаний, 2019.
- Batovska J., Lynch S.E., Rodoni B.C. et al.* Metagenomic arbovirus detection using MinION nanopore sequencing. *J Virol Methods.* 2017; 249: 79–84.
- Buermans H.P.J., den Dunnen J.T.* Next generation sequencing technology: Advances and applications. Review. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1842: 1932–41.
- Amos B.* Lessons from the history of light microscopy. *Nat Cell Biol.* 2000; 2(8): E151–2.
- Baheti B., Ahuja G., Parode A.* Automatic Classification of M-FISH Human Chromosome Images using Fuzzy Classifier and Statistical Classifier. *Advances in Intelligent Systems Research.* 2017; 137: 557–64.
- Cui C., Shu W., Li P.* Fluorescence In situ Hybridization: Cell-Based Genetic Diagnostic and Research Applications. *Front Cell Dev Biol.* 2016; 4: 89.
- Cytogenetic dosimetry: applications in preparedness for and response to radiation emergencies.* Vienna: IAEA, 2011.

- Diaspro A.* Confocal and two-photon microscopy: foundations, applications, and advances. New York: Wiley-Liss, 2001.
- Dijk E. L., Auger H., Jaszczyszyn Y., Thermes C.* Ten years of next-generation sequencing technology. Review. Trends Genet. 2014; 30(9): 418–26.
- Garg S. K., Yung R.* Analysis of DNA Methylation by Pyrosequencing Methods. Mol Biol. 2015; 1343: 249–64.
- Grygalewicz B., Woroniecka R., Rygier J. et al.* Monoallelic and biallelic deletions of 13q14 in a group of CLL/SLL patients investigated by CGH Haematological Cancer and SNP array (8 × 60K). Mol Cytogenet. 2016; 9: 1.
- Hawkes P.W., Spence J.C.H.* Science of Microscopy. New York: Springer, 2006.
- Heather J. M., Chain B.* The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. Review. Genomics. 2016; 107: 1–8.
- Huber R., Kulka U., Lörch T. et al.* Automated metaphase finding: an assessment of the efficiency of the METAFER2 system in a routine mutagenicity assay. Mutat. Res. 1995; 334(1): 97–102.
- ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Eds: L.G. Shaffer, J. McGowan-Jordan, M. Schmid. Basel: Karger, 2013.
- Krutzke S.K., Engels H., Hofmann A. et al.* Array-based molecular karyotyping in fetal brain malformations: Identification of novel candidate genes and chromosomal regions. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2016; 106(1): 16–26.
- Lee K.Y., Shin E.* Application of array comparative genomic hybridization in Korean children under 6 years old with global developmental delay. Korean J Pediatr. 2017; 60(9): 282–9.
- M'kacher R., Maalouf E.E., Ricoul M. et al.* New tool for biological dosimetry: Reevaluation and automation of the gold standard method following telomere and centromere staining. Mutat. Res. 2014; 770(1): 45–53.
- M'kacher R., Maalouf E.E., Terzoudi G. et al.* Detection and automated scoring of dicentric chromosomes in nonstimulated lymphocyte prematurely condensed chromosomes after telomere and centromere staining. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2015; 91(3): 640–9.
- Masters B.R.* Confocal Microscopy and Multiphoton Excitation Microscopy: The Genesis of Live Cell Imaging, SPIE Press Monograph, 2006.
- Molecular cytogenetics: protocols and applications.* Ed. by Yao-Shan Fan. Methods in Molecular Biology. V. 204. Humana Press, 2002.
- Multicolor FISH in Human Cytogenetics / Ed.T. Liehr.* Basel: Karger, 2006.
- O'Connor C.* Fluorescence in situ hybridization (FISH). Nature Education. 2008; 1(1): 171.
- Pawley J.B.* Handbook of Biological Confocal Microscopy. New York: Plenum-Springer, 2006.
- Rogan P.K., Li Y., Wilkins R. et al.* Radiation dose estimation by automated cytogenetic biodosimetry. Radiat Prot Dosimetry. 2016; 172(1–3): 207–17.
- Soto J., Rodriguez-Antolin C., Vallespin E. et al.* The impact of next-generation sequencing on the DNA methylation-based translational cancer research. Transl Res. 2016; 169: 1–18.

- Stevens-Kroef M.J.P.L., Simons A., Rack K., Hastings R.J.* Cytogenetic Nomenclature and Reporting Methods Mol Biol. 2017; 1541: 303–9.
- Schumann M., Hofmann A., Krutzke S.K. et al.* Array-based molecular karyotyping in fetuses with isolated brain malformations identifies disease-causing CNVs. J Neurodev Disord. 2016; 8: 11.
- The principles of clinical cytogenetics / Eds: S.L. Gersen, M.B. Keagle.* New York: Springer, 2013.
- Urbankova H., Papajik T., Plachy R. et al.* Array-based karyotyping in chronic lymphocytic leukemia (CLL) detects new unbalanced abnormalities that escape conventional cytogenetics and CLL FISH panel. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2014; 158(1): 56–64.
- Wang K., Li X., Dong S. et al.* Q-RRBS: a quantitative reduced representation bisulfite sequencing-method for single-cell methylome analyses. Epigenetics. 2015; 10(9): 775–83.
- Webber C., Hehir-Kwa J.Y., Nguyen D.Q., et al.* Forging links between human mental retardation-associated CNVs and mouse gene knockout models. PLoS Genet. 2009; 5(6): e1000531.
- Yokoyama-Rebollar E., Ruiz-Herrera A., Lieberman-Hernández E. et al.* Angelman Syndrome due to familial translocation: unexpected additional results characterized by Microarray-based Comparative Genomic Hybridization. Mol Cytogenet. 2015; 8: 27.
- Zitzelsberger H., Lehmann L., Werner M., Bauchinger M.* Comparative genomic hybridisation for the analysis of chromosomal imbalances in solid tumours and haematological malignancies. Histochem Cell Biol. 1997; 108(4–5): 403–17.

Раздел III

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ГЕНЕТИКИ

Глава 12. Картирование генома человека

- Пузырев В.П., Степанов В.А.* Патологическая анатомия генома человека. Новосибирск: Наука, 1997.
- Cherniak C., Rodriguez-Esteban R.* Cell maps on the human genome. Mol Cytogenet. 2019; 12: 14.
- Naumenko F.M., Abnizova I.I., Beka N. et al.* Novel read density distribution score shows possible aligner artefacts, when mapping a single chromosome. BMC Genomics. 2018; 19(Suppl 3): 92.
- Su C.F., Liu Z.B., Li Y.G.* Influence of various quantitative trait loci (QTL) mapping methods on the mapping accuracy under varying heritability levels. Genet Mol Res. 2015; 14(4): 13003–12.

Глава 13. Применение методов медицинской генетики

Воробцова И.Е., Такер Дж.Д., Тимофеева Н.М. и др. Влияние возраста и облучения на частоту транслокаций и дицентриков, определяемых методом FISH, в лимфоцитах человека. Радиационная биология. Радиоэкология. 2000; 40(2): 142–8.

Ворсанова С.Г., Юров И.Ю., Куринная О.С. и др. Молекулярное кариотипирование: проблемы диагностики моногенных заболеваний без выявленных мутаций на примере синдромов аутистических расстройств (синдром Ретта). Фундаментальные исследования. 2014; 11(2): 324–8.

Захлязьминская Е.В., Козлова С.И., Поляков А.В. Генетическое разнообразие сердечно-сосудистых заболеваний и возможности молекулярной диагностики. Вестник аритмологии. 2004; 37: 69–76.

Имянитов Е.Н. Наследственный рак молочной железы. Практическая онкология. 2010; 11(4): 258–6.

Колотий А.Д., Ворсанова С.Г., Юров И.Ю. и др. Выявление микроаномалий хромосом у детей с недифференцированными формами умственной отсталости: оригинальный алгоритм анализа хромосом высокого разрешения методами молекулярной цитогенетики. Фундаментальные исследования. 2013; 6: 1411–19.

Кудряшов Ю.Б. Радиационная биофизика (ионизирующие излучения). М.: ФИЗМАТЛИТ, 2004.

Кузнецова Т.В., Шилова Н.В., Творогова М.Г. и др. Практические рекомендации по обеспечению качества и надежности цитогенетических исследований. Медицинская генетика. 2019; 18(5): 3–27.

Матвеева Е.А., Казакова А.Н., Калинина И.И. и др. Методы молекулярной цитогенетики для диагностики острого мегакариобластного лейкоза. Онкогематология. 2012; 2: 51–6.

Моисеенко В.М. «Естественная история» роста рака молочной железы. Практическая онкология. 2002; 3(1): 6–14.

Нугис В.Ю., Козлова М.Г., Никитина В.А. Современное состояние проблемы цитогенетической индикации дозы. Мед. радиол. и рад. безопасность. 2016; 5.

Снигирева Г.П., Хаймович Т.И., Шевченко В.А. Использование цитогенетических методов для биологической дозиметрии: Метод. рекомендации / Рос. федер. ядер. центр — ВНИИЭФ [и др.]. — Саров: РФЯЦ-ВНИИЭФ, 2003. Саров: РФЯЦ-ВНИИЭФ, 2003.

A common European framework for quality assessment for constitutional, acquired and molecular cytogenetic investigations: Specific Constitutional Cytogenetic Guidelines / R. Hastings, R. Howell, F.D. Bricarelli, U. Kristoffersson, S. Cavani. European Cytogeneticists Association Newsletter 2012; 30 July. Epub: https://www.e-c-a.eu/files/downloads/Guidelines/Specific_Constitutional_Guidelines_NL30.pdf.

- Apostolou P., Fostira F.* Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. *Biomed Res Int.* 2013; 2013: 747318.
- Association Clinical Cytogenetics.* URL: <http://www.cytogenetics.org.uk>; http://www.agnc.org.uk/media/986340/agreed_acc_council_minutes_02_june_2009.pdf
- Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 2006; 10 (2): 123–124. URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/t0922p24q11ID1331.html>
- Balmana J., Diez O., Castiglioni M.* ESMO guidelines working group. BRCA in breast cancer6 ESMO clinical recommendations. *Ann Oncol.* 2009; 4: 19–20.
- Bonassi S., Ugolini D., Kirsch-Volders M.* et al. Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future perspectives. *Environ Mol Mutagen.* 2005; 45(2–3): 258–70.
- Borley A., Mercer T., Morgan M.* et al. Impact of HER2 copy number in IHC2+/FISH-amplified breast cancer on outcome of adjuvant trastuzumab treatment in a large UK cancer network. *Br J Cancer.* 2014; 110(8): 2139–43.
- Cass I., Baldwin R.L., Varkey T.* et al. Improved survival in women with BRCA-associated ovarian carcinoma. *Cancer.* 2003; 97(9): 2187–95.
- Cytogenetic analysis for radiation dose assessment: a manual. Vienna: IAEA, 2001.
- Cytogenetic dosimetry: applications in preparedness for and response to radiation emergencies, International Atomic Energy Agency, Vienna: IAEA, 2011.
- Durante M., Furusawa Y., Gotoh E.* A simple method for simultaneous interphase-metaphase chromosomal analysis in biodosimetry. *Int J Radiat Biol.* 1998; 74(4): 457–62.
- Edwards A.A., Lindholm C., Darroudi F.* et al. Review of translocations detected by FISH for retrospective biological dosimetry applications. *Radiat Prot Dosimetry.* 2005; 113(4): 396–402.
- Friedenson B.* BRCA1 and BRCA2 pathways and the risk of cancers other than breast or ovarian. *MedGenMed.* 2005; 7(2): 60.
- Genetic and Somatic Effects of Ionizing Radiation: Report to the General Assembly, with annexes / United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. 1986. URL: https://www.unscear.org/docs/publications/1986/UNSCEAR_1986_GA-Report.pdf
- Hao D., Wang L., Di L.J.* Distinct mutation accumulation rates among tissues determine the variation in cancer risk. *Sci Rep.* 2016; 6: 19458.
- Hicks D.G., Kulkarni S.* HER2+ Breast Cancer: Review of Biologic Relevance and Optimal Use of Diagnostic Tools. *Am J Clin Pathol.* 2008; 129(2): 263–73.
- Hittelman W.N., Rao P.N.* Premature chromosome condensation. I. Visualization of x-ray-induced chromosome damage in interphase cells. *Mutat Res.* 1974; 23(2): 251–8.
- https://www.e-c-a.eu/files/downloads/Guidelines/Specific_Constitutional_Guidelines_NL30.pdf
- Lynch H.T., Casay M., Snyder C.J.* et al. Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management. *Mol Oncol.* 2009; 3(2): 97–137.

- Lloyd D.C. New developments in chromosomal analysis for biological dosimetry. *Radiat Protect. Dosim.* 1998; 77(1–2): 33–6.
- Merino A., Boldú L., Ermens A. Acute myeloid leukaemia: How to combine multiple tools. *Int J Lab Hematol.* 2018; 40(Suppl 1): 109–19.
- Mettler F.A., Sinclair W.K., Anspaugh L. et al. The 1986 and 1988 UNSCEAR (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation) reports: findings and implications. *Health Phys.* 1990; 58(3): 241–50.
- Mitelman F., Johansson B., Mertens F. Mitelman database of chromosome aberrations and gene fusions in cancer. National Cancer Institute. URL: <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>, 2018.
- Nielsen J., Wohler M. Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Hum Genet.* 1991; 87(1): 81–3.
- Priory S.G., Aliot E., Blomstrom-Lundqvist C. et al. Task Force on Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 2001; 22: 1374–450.
- Priory S.G., Schwartz P.J., Napolitano C. et al. Risk Stratification in the Long-QT Syndrome. *NEJM.* 2003; 348: 1866–74.
- Priory S.G.: Inherited Arrhythmogenic Diseases. The Complexity Beyond Monogenic Disorders. *Circ Res.* 2004; 94(2): 140–5.
- Reck M., Popat S., Reinmuth N. Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2014; 25(Suppl 3): 27–39.
- Riggins G.J. Genome and genetic resources from the Cancer Genome Anatomy Project. *Human Molecular Genetics.* 2001; 10 (7): 663–7.
- Senkus E., Kyriakides S., Ohno S. et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2015; 26(Suppl 5): v8–30.
- Sevan'kaev A.V., Khvostunov I.K., Mikhailova G.F. et al. Novel data set for retrospective biodosimetry using both conventional and FISH chromosome analysis after high accidental overexposure. *Appl Radiat Isot.* 2000; 52(5): 1149–52.
- Soverini S., Bassan R., Lion T. Treatment and Monitoring of Philadelphia Chromosome—Positive Leukemia Patients: Recent Advances and Remaining Challenges. *J Hematol Oncol.* 2019; 12(1): 39.
- Thompson D., Easton D.F. The breast linkage consortium. Cancer incidence in BRCA1 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst.* 2002; 94(18):1358–65.
- Tucker J.D. Sensitivity, specificity, and persistence of chromosome translocations for radiation biodosimetry. *Mil Med.* 2002; 167 (2 Suppl): 8–9.
- UNSCEAR: 1986 Report. Genetic and somatic effects of ionizing radiation: Report to the General Assembly with Scientific annexes United Nations // United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. New-York, 1986.

Раздел IV

НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ ЧЕЛОВЕКА

Бочков Н.П., Жученко Н.А., Асанов А.Ю. Медицинская генетика. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019.

Глава 14. Хромосомные болезни

Генетика / Под ред. В. И. Иванова. 2006. М.: Академкнига, 2006.

Гинтер Е. К. Медицинская генетика: учебн. М.: Медицина, 2003.

Васин К. С., Ворсанова С. Г., Коростелев С. А. и др. Мозаичная форма трисомии хромосомы 8: возможности метода молекулярного кариотипирования. *Современные проблемы науки и образования*. 2015; 2 (часть 1).

Мутовин Г. Клиническая генетика. Геномика и протеомика наследственной патологии: учеб. пособие. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010.

Alberman E., Mutton D., Morris J.K. Cytological and epidemiological findings in trisomies 13, 18, and 21: England and Wales 2004–2009. *Am J Med Genet A*. 2012; 2013: 1145–50.

Alfi O., Donnell G.N., Crandall B.F. et al. Deletion of the short arm of chromosome no. 9 (46,9p-): a new deletion syndrome. *Ann Genet*. 1973; 16: 17–22.

Barbaro M., Balsamo A., Anderlid B.M. et al. Characterization of deletions at 9p affecting the candidate regions for sex reversal and deletion 9p syndrome by MPLA. *Europ J Hum Genet*. 2009; 17: 1439–47.

Bardsley M.Z., Kowal K., Levy C. et al. 47, XYY Syndrome: Clinical Phenotype and Timing of Ascertainment. *J Pediatr*. 2013; 163(4): 1085–94.

Battaglia A., Carey J.C., South S.T. Wolf–Hirschhorn syndrome: A review and update. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2015; 169(3): 216–23.

Bouayed Abdelmoula N., Abdelmoula B., Smaoui W. et al. Left-sided congenital heart lesions in mosaic Turner syndrome. *Mol Genet Genomics*. 2018; 293(2): 495–501.

Brkanac Z., Cody J.D., Leach R.J., DuPont B.R. Identification of cryptic rearrangements in patients with 18q- deletion syndrome. *Am J Hum Genet*. 1998; 62: 1500–6.

Bruyere H., Speevak M.D., Winsor E.J.T. et al. Isodicentric Yp: prenatal diagnosis and outcome in 12 cases. *Prenat Diagn*. 2006; 26: 324–9.

Buhler E.M., Buhler U.K., Stalder G.R. Partial monosomy 18 and anomaly of thyroxine synthesis. *Lancet*. 1964; 283: 170–1.

Cassina M., Calò A., Salviati L. et al. Prenatal detection of trisomy 8 mosaicism: Pregnancy outcome and follow up of a series of 17 consecutive cases. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2018; 221: 23–7.

Cèreda A., Carey J.C. The trisomy 18 syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2012; 7: 81.

- Chen C.-P., Lin S.-P., Chern S.-R. et al. Direct transmission of the 18q- syndrome from mother to daughter. *Genet Counsel.* 2006; 17: 185–9.
- Chen C.P., Chern S.R., Wu P.S. et al. Prenatal diagnosis of low-level mosaicism for trisomy 13 at amniocentesis associated with a favorable outcome. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2017; 56(6): 840–2.
- Christ L.A., Crowe C.A., Micale M.A. et al. Chromosome breakage hotspots and delineation of the critical region for the 9p-deletion syndrome. *Am J Hum Genet.* 1999; 65: 1387–95.
- Cody J.D., Heard P.L., Crandall A. C. et al. Narrowing critical regions and determining penetrance for selected 18q-phenotypes. *Am J Med Genet.* 2009; 149A: 1421–30.
- Corrêa T., Mergener R., Leite J.C.L. et al. Cytogenomic Integrative Network Analysis of the Critical Region Associated with Wolf-Hirschhorn Syndrome. *Biomed Res Int.* 2018; 2018: 5436187.
- Edwards J.H., Harnden D.G., Cameron A.H. et al. A new trisomic syndrome. *Lancet.* 1960; 1: 787–9.
- Erickson J.D. Paternal age and Down syndrome. *Am J Hum Genet.* 1979; 31(4): 489–97.
- Feenstra I., Vissers L.E., Orsel M. et al. Genotype-phenotype mapping of chromosome 18q deletions by high-resolution array CGH: an update of the phenotypic map. *Am J Med Genet.* 2007; 143A: 1858–67.
- Feenstra I., Vissers L.E., Pennings R.J. et al. Disruption of teashirt zinc finger homeobox 1 is associated with congenital aural atresia in humans. *Am J Hum Genet.* 2011; 89: 813–9.
- Garcia-Heras J., Martin J. A rec(4) dup 4p inherited from a maternal inv(4)(p15q35): case report and review. *Am J Med Genet.* 2002; 109(3): 226–30.
- Giraldo G., Gómez A.M., Mora L. et al. Mosaic trisomy 8 detected by fibroblasts cultured of skin. *Colomb Med (Cali).* 2016; 47(2): 100–4.
- Gorduza V., Petrariu F. Outcome of spontaneous pregnancy in turner syndrome. *Acta Endocrinologica.* 2015; 11: 348–55.
- Gravholt C.H. Epidemiological, endocrine and metabolic features in Turner syndrome. *Eur J Endocrinol.* 2004; 151(6): 657–87.
- Hale D.E., Cody J.D., Baillargeon J. et al. The spectrum of growth abnormalities in children with 18q deletions. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85: 4450–4.
- Hook E.B. Rates of 47, + 13 and 46 translocation D/13 Patau syndrome in live births and comparison with rates in fetal deaths and at amniocentesis. *Am J Hum Genet.* 1980; 32(6): 849–58.
- Katz S.G., Schneider S.S., Bartuski A. et al. An 18q- syndrome breakpoint resides between the duplicated serpins SCCA1 and SCCA2 and arises via a cryptic rearrangement with satellite III DNA. *Hum Molec Genet.* 1999; 8: 87–92.
- Kawara H., Yamamoto T., Harada N. et al. Narrowing candidate region for monosomy 9p syndrome to a 4.7-Mb segment at 9p22.2-p23. *Am J Med Genet.* 2006; 140A: 373–7.
- Klinefelter H.F., Reifenstein E. C., Albright F. Syndrome characterized by gynecomastia, aspermatogenesis without aleydigism, and increased secretion of follicle-stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1942; 2: 615–27.

- Kruszka P., Porras A.R., Sobering A.K.* et al. Down syndrome in diverse populations. *Am J Med Genet A.* 2017; 173(1): 42–53.
- Kunwar F., Pandya V., Bakshi S.R.* Constitutional Mosaic Trisomy 13 in Two Germ Cell Layers Is Different From Patau Syndrome? A Case Report Case Reports. *J Clin Diagn Res.* 2016; 10(3): GD03–5. Epub 2016 Mar 1.
- Lejeune J., Lafourcade J., Berger R.* et al: Trois cas de deletion partielle du bras court d'un chromosome 5. *C R Acad Sci (Paris).* 1963; 257: 3098–102.
- Mačkić-Đurović M., Stomornjak-Vukadin M., Ibrulj S.* Turner Syndrome: A Unique Mosaic Case with 45, X/47, XX,+21/46, XX Cell Lines. *Iran J Med Sci.* 2018; 43(4): 436–9.
- Morris J.K., Alberman E., Mutton D., Jacobs P.* Cytogenetic and epidemiological findings in Down syndrome: England and Wales 1989–2009. *Am J Med Genet A.* 2012; 158A(5): 1151–7.
- Neas K.R., Yip M.-Y., James C.* et al. Patient with a non-mosaic isodicentric Yp and mild developmental delay. *Am J Med Genet.* 2005; 137A 223–4.
- Ohnuki Y., Torii C., Kosaki R.* et al. Cri-du-Chat Syndrome Cytogenetically Cryptic Recombination Aneusomy of Chromosome 5: Implications in Recurrence Risk Estimation. *Mol Syndromol.* 2010; 1(2): 95–8.
- Paradowska-Stolarz A.M.* Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS) — literature review on the features of the syndrome. *Adv Clin Exp Med.* 2014; 23(3): 485–9.
- Patau K., Smith D.W., Therman E.* et al. Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome. *Lancet.* 1960; 2013: 790–3.
- Roecker G.O., Huether C.A.* An analysis for paternal-age effect in Ohio's Down syndrome births, 1970–1980. *Am J Hum Genet.* 1983; 35(6): 1297–306.
- Ross J.L., Roeltgen D.P., Kushner H.* et al. Behavioral and Social Phenotypes in Boys With 47, XYY Syndrome or 47, XXY Klinefelter Syndrome. *Pediatrics.* 2012; 129(4): 769–78.
- Stankiewicz P., Helias-Rodzewicz Z., Jakubow-Durska K.* et al. Cytogenetic and molecular characterization of two isodicentric Y chromosomes. *Am J Med Genet.* 2001; 101: 20–5.
- Stochholm K., Bojesen A., Jensen A.S.* et al. Criminality in men with Klinefelter's syndrome and XYY syndrome: a cohort study. *BMJ Open.* 2012; 2(1): e000650.
- Tomomasa H., Ogawa K., Nagasawa J.* et al. A case of mosaic Klinefelter syndrome associated with isodicentric Yp. *Reprod Med Biol.* 2008; 7(4): 177–80.
- Tsukahara M., Imaizumi K., Fujita K.* et al. Familial del(18p) syndrome. *Am J Med Genet.* 2001; 99: 67–9.
- Tucker M.E., Garringer H.J., Weaver D.D.* Phenotypic spectrum of mosaic trisomy 18: two new patients, a literature review, and counseling issues. *Am J Med Genet A.* 2007; 143A(5): 505–17.
- Tuke M.A., Ruth K.S., Wood A.R.* et al. Mosaic Turner syndrome shows reduced penetrance in an adult population study. *Genet Med.* 2019; 21(4): 877–86.

- Turner H.H. A syndrome of infantilism, congenital webbed neck, and cubitus valgus. *Endocrinology*. 1938; 23: 566–74.
- Uchida I.A., Mcrae K.N., Ray M. Familial short arm deficiency of chromosome 18 concomitant with arhinencephaly and alopecia congenita. *Am J Hum Genet*. 1965; 17: 410–9.
- Velagaleti G.V.N., Harris S., Carpenter N.J. et al. Familial deletion of chromosome 18(p11.2). *Ann Genet*. 1996; 39: 201–4.
- Vissers L.E., Cox T.C., Maga A.M. et al. Heterozygous mutations of *FREMI* are associated with an increased risk of isolated metopic craniosynostosis in humans and mice. *PLoS Genet*. 2011; 7(9): e1002278.
- Wester U., Bondeson M.-L., Edeby C., Anneren G. Clinical and molecular characterization of individuals with 18p deletion: a genotype-phenotype correlation. *Am J Med Genet*. 2006; 140A: 1164–71.
- Wu H.-H., Lee T.-H., Chen C.-D. et al. Delineation of an isodicentric Y chromosome in a mosaic 45, X/46, X, idic(Y), (qter-p11.3::p11.3-qter), fetus by SRY sequencing, G-banding, FISH, SKY and study of distribution in different tissues. *J Formos Med Assoc*. 2007; 106: 403–10.
- Wu Q., Niebuhr E., Yang H., Hansen L. Determination of the ‘critical region’ for cat-like cry of Cri-du-chat syndrome and analysis of candidate genes by quantitative PCR. *Eur J Hum Genet*. 2005; 13(4): 475–85.
- Wu Y., Wang Y., Wen S.W. et al. Recombinant chromosome 4 in two fetuses — case report and literature review. *Mol Cytogenet*. 2018; 11: 48.
- Zhao W., Chen F., Wu M. et al. Postnatal Identification of Trisomy 21: An Overview of 7,133 Postnatal Trisomy 21 Cases Identified in a Diagnostic Reference Laboratory in China. *PLoS One* 2015; 10(7): e0133151.

Глава 15. Генные болезни

- Семячкина А.Н., Николаева Е.А., Захарова Е.Ю., Харабадзе М.Н. Болезнь Фабри у детей: анализ собственных наблюдений, возможности лечения. *Рос. вестн. перинатол. и педиатрии*. 2018; 63:(1): 71–7.
- Barthélémy F., Wein N. Personalized gene and cell therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 2018; 28(10): 803–24.
- Bell S., Kolobova I., Crapper L., Ernst C. Lesch-Nyhan Syndrome: Models, Theories, and Therapies. *Mol Syndromol*. 2016; 7(6): 302–11.
- Bendiak G.N., Ratjen F. The approach to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2009; 30(5): 587–95.
- Blau N. Genetics of Phenylketonuria: Then and Now. *Hum Mutat*. 2016; 37(6): 508–15.
- Carter C.O. Monogenic disorders. *J Med Genet*. 1977; 14: 316–20.

- Członkowska A., Litwin T., Dusek P. et al. Wilson disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2018; 4(1): 21.
- Demirbas D., Coelho A.I., Rubio-Gozalbo M.E., Berry G.T. Hereditary galactosemia. *Metabolism*. 2018; 83: 188–96.
- Dunning-Davies B.M., Parker A.P. Annual review of children with neurofibromatosis type 1. *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2016; 101(2): 102–11.
- Franchini M., Mannucci P.M. Hemophilia A in the third millennium. *Blood Rev*. 2013; 27(4): 179–84.
- Fuente R., Gil-Peña H., Claramunt-Taberner D. et al. X-linked hypophosphatemia and growth. *Rev Endocr Metab Disord*. 2017; 18(1): 107–15.
- George L.A. Hemophilia gene therapy comes of age. *Blood Adv*. 2017; 1(26): 2591–9.
- Hansen B., Jemec G.B. The mechanical properties of skin in osteogenesis imperfecta. *Arch Dermatol*. 2002; 138: 909–11.
- Hassall M.M., Barnard A.R., MacLaren R.E. Gene Therapy for Color Blindness. *Yale J Biol Med*. 2017; 90(4): 543–51.
- Jackson M., Marks L., May G.H.W., Wilson J.B. The genetic basis of disease. *Essays Biochem*. 2018; 62(5): 643–723.
- Kumar T., Sharma G.S., Singh L.R. Homocystinuria: Therapeutic approach. *Clin Chim Acta*. 2016; 458: 55–62.
- Lange J., Skaletsky H., van Daalen S.K.M. et al. Isodicentric Y chromosomes and sex disorders as by-products of homologous recombination that maintains palindromes. *Cell*. 2009; 138: 855–69.
- Mahlangu J.N. Updates in clinical trial data of extended half-life recombinant factor IX products for the treatment of haemophilia B. *Ther Adv Hematol*. 2018; 9(11): 335–34.
- Marini J.C., Forlino A., Bächinger H.P. et al. *Osteogenesis imperfecta*. *Nat Rev Dis Primers*. 2017; 3: 17052.
- Milano S., Carmosino M., Gerbino A. et al. Hereditary Nephrogenic Diabetes Insipidus: Pathophysiology and Possible Treatment. An Update. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(11).
- Noguchi S., Tsukahara T., Fujita M. et al. cDNA microarray analysis of individual Duchenne muscular dystrophy patients. *Hum Molec Genet*. 2003; 12: 595–600.
- Oji V., Traupe H. Ichthyosis: clinical manifestations and practical treatment options. *Am J Clin Dermatol*. 2009; 10(6): 351–64.
- Ornitz D.M., Legeai-Mallet L. Achondroplasia: Development, pathogenesis, and therapy. *Dev Dyn*. 2017; 246(4): 291–309.
- Pettifor J.M., Thandrayen K. Hypophosphatemic rickets: unraveling the role of FGF23. *Calcif Tissue Int*. 2012; 91(5): 297–306.
- Rodrigo-Nicolás B., Bueno-Martinez E., Martín-Santiago A. et al. Evidence of the high prevalence of neurological disorders in nonsyndromic X-linked recessive ichthyosis: a retrospective case series. *Br J Dermatol*. 2018; 179(4): 933–9.

- Sarnat H.B., Flores-Sarnat L.* Genetics of neural crest and neurocutaneous syndromes. *Handb Clin Neurol.* 2013; 111: 309–4.
- Scarpa M.* Mucopolysaccharidosis Type II. In: Adam M.P., Ardinger H.H., Pagon R.A. et al., eds. *GeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2018.2007.
- Schiffmann R.* Fabry disease. *Pharmacol Ther.* 2009; 122: 65–77.
- Smith C.E.L., Poulter J.A., Antanaviciute A.* et al. Amelogenesis Imperfecta; Genes, Proteins, and Pathways. *Front Physiol.* 2017; 8: 435.
- Stheneur C., Tubach F., Jouneaux M.* et al. Study of phenotype evolution during childhood in Marfan syndrome to improve clinical recognition. *Genet Med.* 2014; 16: 246–50.
- Testai F.D., Gorelick P.B.* Inherited metabolic disorders and stroke part 1: Fabry disease and mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *Arch Neurol.* 2010; 67: 19–24.
- Tiepolo L., Zuffardi O.* Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet.* 1976; 34: 119–24.
- Urzúa B., Ortega-Pinto A., Morales-Bozo I.* et al. Defining a new candidate gene for amelogenesis imperfecta: from molecular genetics to biochemistry. *Biochem Genet.* 2011; 49(1–2): 104–21.
- Voermans N.C., Timmermans J., van Alfen N.* et al. Neuromuscular features in Marfan syndrome. *Clin Genet.* 2009; 76: 25–37.
- Wraith J.E., Scarpa M., Beck M.* et al. Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy. *Eur J Pediatr.* 2008; 167: 267–77.
- Wynn J., King T.M., Gambello M.J.* et al. Mortality in achondroplasia study: a 42-year follow-up. *Am J Med Genet.* 2007; 143A: 2502–11.

Глава 16. Болезни с нетрадиционным типом наследования

- Ardern-Holmes S., Fisher G., North K.* Neurofibromatosis Type 2. *J Child Neurol.* 2017; 32(1): 9–22.
- Avagliano L., Grazioli P., Mariani M.* et al. Integrating molecular and structural findings: Wnt as a possible actor in shaping cognitive impairment in Cornelia de Lange syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2017; 12(1): 174.
- Balmer A., Zografos L., Munier F.* Diagnosis and current management of retinoblastoma. *Oncogene.* 2006; 25: 5341–9.
- Boyce A.M., Florenzano P., de Castro L.F., Collins M.T.* Fibrous Dysplasia/McCune-Albright Syndrome. In: Adam M.P., Ardinger H.H., Pagon R.A. et al., eds. *GeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2018.
- Chiesa N., De Crescenzo A., Mishra K.* et al. The KCNQ1OT1 imprinting control region and non-coding RNA: new properties derived from the study of Beckwith-Wiedemann syndrome and Silver—Russell syndrome cases. *Hum Molec Genet.* 2012; 21: 10–25.

- Chisholm C.A., Bray M.J., Karns L.B.* Successful pregnancy in a woman with Bloom syndrome. *Am J Med Genet.* 2001; 102: 136–8.
- David G., Abbas N., Stevanin G. et al.* Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nature Genet.* 1997; 17: 65–70.
- Dupont J.-M., Cuisset L., Cartigny M. et al.* Familial reciprocal translocation t(7;16) associated with maternal uniparental disomy 7 in a Silver-Russell patient. *Am J Med Genet.* 2002; 111: 405–8.
- Gatti R.A., Boder E., Vinters H.V. et al.* Ataxia-telangiectasia: an interdisciplinary approach to pathogenesis. *Medicine.* 1991; 70: 99–117.
- Giordano C., Sebastiani M., De Giorgio R. et al.* Gastrointestinal dysmotility in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy is caused by mitochondrial DNA depletion. *Am J Pathol.* 2008; 173: 1120–8.
- Gouw L.G., Kaplan C.D., Haines J.H. et al.* Retinal degeneration characterizes a spinocerebellar ataxia mapping to chromosome 3p. *Nature Genet.* 1995; 10: 89–93.
- Gronlund M.A., Dahlgren J., Aring E. et al.* Ophthalmological findings in children and adolescents with Silver—Russell syndrome. *Br J Ophthalmol.* 2011; 95: 637–41.
- Isohanni P., Hakonen A.H., Euro L. et al.* POLG1 manifestations in childhood. *Neurology.* 2011; 76: 811–5.
- Johnson R.T., Squires S.* The XPD complementation group: insights into xeroderma pigmentosum, Cockayne's syndrome and trichothiodystrophy. *Mutat Res.* 1992; 273: 97–118.
- Khan S.G., Metin A., Gozukara E. et al.* Two essential splice lariat branchpoint sequences in one intron in a xeroderma pigmentosum DNA repair gene: mutations result in reduced XPC mRNA levels that correlate with cancer risk. *Hum Molec Genet.* 2004; 13: 343–52.
- Kondo S., Fukuro S., Mamada A. et al.* Assignment of three patients with xeroderma pigmentosum to complementation group E and their characteristics. *J Invest Dermatol.* 1988; 90: 152–7.
- Mahmoud A.A., Yousef G.M., Al-Hifzi I., Diamandis E.P.* Cockayne syndrome in three sisters with varying clinical presentation. *Am J Med Genet.* 2002; 111: 81–5.
- Mehta P.A., Tolar J.* Fanconi Anemia. In: Adam M.P., Ardinger H.H., Pagon R.A. et al. *GeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2018.
- Michieletto P., Bonanni P., Pensiero S.* Ophthalmic findings in Angelman syndrome. *J AAPOS.* 2011; 15: 158–61.
- Oiglane-Shlik E., Zordania R., Varendi H. et al.* The neonatal phenotype of Prader—Willi syndrome. *Am J Med Genet.* 2006; 140A: 1241–4.
- Parc Y., Boisson C., Thomas G., Olschwang S.* Cancer risk in 348 French MSH2 or MLH1 gene carriers. *J Med Genet.* 2003; 40: 208–13.
- Passarge E.* Bloom's syndrome: the German experience. *Ann Genet.* 1991; 34: 179–97.
- Pollitt R.J., Jenner F.A., Davies M.* Sibs with mental and physical retardation and trichorrhexis nodosa with abnormal amino acid composition of the hair. *Arch Dis Child.* 1968; 43: 211–6.

- Price V.H., Odom R.B., Ward W.H., Jones F.T.* Trichothiodystrophy. Sulfur-deficient brittle hair as a marker for a neuroectodermal symptom complex. *Arch Dermatol.* 1980; 116: 1375–84.
- Rizzo R., Pavone L., Micali G.* et al. Trichothiodystrophy: report of a new case with severe nervous system impairment. *J. Child Neurol.* 1992; 7: 300–3.
- Soliman S.E., Racher H., Zhang C.* et al. Genetics and Molecular Diagnostics in Retinoblastoma—An Update. *Ophthalmol (Phila).* 2017; 6(2): 197–207.
- Taanman J.-W., Daras M., Albrecht J.* et al. Characterization of a novel TYMP splice site mutation associated with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *Neuromusc Disord.* 2009; 19: 151–4.
- Tay C.H.* Ichthyosiform erythroderma, hair shaft abnormalities, and mental and growth retardation: a new recessive disorder. *Arch Dermatol.* 1971; 104: 4–13.
- Weksberg R., Shuman C., Beckwith J.B.* Beckwith—Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2010; 18: 8–14.
- Wilson L.C., Trembath R.C.* Albright's hereditary osteodystrophy. *J Med Genet.* 1994; 31(10): 779–84.
- Wiltshire E., Davidzon G., DiMauro S.* et al. Juvenile Alpers disease. *Arch Neurol.* 2008; 65: 121–4.
- Woods C.G., Taylor A.M.* Ataxia telangiectasia in the British Isles: the clinical and laboratory features of 70 affected individuals. *Q J Med.* 1992; 82: 169–79.
- Zafeiriou D.I., Thorel F., Andreou A.* et al. Xeroderma pigmentosum group G with severe neurological involvement and features of Cockayne syndrome in infancy. *Pediatr Res.* 2001; 49: 407–12.

Учебное издание

**Агаджанян Анна Владимировна,
Фучич Александра Францевна,
Цховребова Лейла Вахтанговна,
Лазан-Турчич Ружица Иосифовна**

**МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНЕТИКА
в иллюстрациях и таблицах**

Учебное пособие

Главный редактор канд. мед. наук *Д.Д. Проценко*
Редактор канд. мед. наук *А.В. Дубровская*
Литературный редактор *Л.К. Мусатова*
Художник *Ю.Г. Нетишинская*
Корректор *И.Р. Балдано*

Подписано в печать 15.09.2021

Формат 60 × 90^{1/16}. Объем 28,68 авт. л. / 31,5 п. л.

Тираж 1000 экз.

Издательство «Практическая медицина».

115201, Москва, 1-й Котляковский пер., д. 3.

Тел. +7 (495) 324-93-29. E-mail: medprint@mail.ru (редакция).

Тел. +7 (495) 981-91-03. E-mail: opt@medprint.ru (отдел реализации)

WWW.MEDPRINT.RU



ISBN 978-5-98811-598-4



9 785988 115984