

МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНЕТИКА: ВЗГЛЯД В БУДУЩЕЕ (Лекция 6)

И.Ж. Семинский.

(Иркутский государственный медицинский университет, ректор – акад. МТА и АН ВШ д.м.н., проф. А.А. Майборода, курс медицинской генетики, зав. – проф. И.Ж. Семинский)

Резюме В лекции рассматриваются наиболее перспективные в практическом отношении методы и способы диагностики и лечения наследственных болезней человека. Описаны некоторые аспекты проблемы клонирования органов и тканей, показаны достижения молекулярной генетики в реализации международной программы “Геном человека”.

Генетика человека уже сегодня вносит огромный вклад в практику медицины. Однако это лишь малая часть ожидаемого. Перспектива применения достижений генетики в медицине превосходит самые смелые прогнозы оптимистов. Рассмотрим лишь те из них, которые уже начали давать ощутимые результаты.

ДНК-диагностика. Позволяет с абсолютной достоверностью выявлять генные мутации, определять их тип и локализацию. Цели ДНК-диагностики: подтверждение клинического диагноза, пресимптоматическая диагностика, пренатальная диагностика, диагностика гетерозиготного носительства, геномная дактилоскопия, диагностика инфекций. Области применения ДНК-диагностики: моногенные болезни, мультифакториальные заболевания (определение “главных” генов, гаплотипы, HLA-ассоциации и т.д.), онкологические заболевания, инфекционные болезни, судебная медицина, (идентификация личности, определение степени родства), санитария и гигиена, трансплантология, иммунология, патологическая физиология и др.

Этапы проведения ДНК-диагностики включают картирование гена (определение положения гена в хромосоме), секвенирование (клонирование) – расшифровка нуклеотидной последовательности ДНК гена и, наконец, изучение спектра мутаций гена.

Существуют два методических подхода диагностики ДНК: прямые методы – идентификация мутантного гена и косвенные – выявление мутантной хромосомы, сцепленных маркеров.

Алгоритм проведения ДНК-диагностики.

1. Получение ДНК из образцов (физические и химические методы)
2. Рестрикция (разрезание молекулы ДНК) и получение небольших фрагментов при помощи полимеразной цепной реакции или рестриктаз (эндонуклеаз).
3. Электрофорез фрагментов ДНК в геле на фракции в зависимости от молекулярной массы.

4. Гибридизация с маркерными зондами для визуализации и идентификации искомым фрагментов ДНК.

В настоящее время существует возможность диагностировать практически все возможные мутации ДНК. В России разработаны маркеры для 50 наиболее распространенных наследственных заболеваний человека.

Широкое применение в ДНК-диагностике вследствие простоты и экономичности получил метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).

В настоящее время ПЦР представляет процесс, протекающий в одной пробирке и состоящий из повторных циклов амплификации (размножения, копирования) специфической последовательности молекулы ДНК с целью получения достаточно большого количества копий, которые могут быть выявлены обычными методами детекции.

ПЦР протекает в программируемом термостате (амплификатор, термоциклер) в присутствии свободных нуклеотидов, ДНК-полимеразы и специфических зондов (праймеров), которые маркируют определенный участок ДНК, взятой для исследования.

Полимеразная цепная реакция позволяет в течение нескольких часов выделить и размножить определенную последовательность ДНК в количестве, превышающем исходную в 10^8 раз. При амплификации с помощью ПЦР используют два олигонуклеотидных праймера (затравки), фланкирующих участок ДНК, специфический для определяемого возбудителя. Амплификация заключается в повторяющихся циклах, представляющих собой трехступенчатый процесс, протекающий при различных температурах: I – денатурация ДНК при 95°C 1 мин.; II – отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ($40-60^{\circ}\text{C}$, 1-2 мин.); III – последующая достройка полинуклеотидных цепей от праймеров с помощью ДНК-полимеразы при температуре $70-75^{\circ}\text{C}$ 1-2 мин. Праймеры ориентированы таким образом, что синтез с помощью полимеразы протекает только

между ними, удваивая количество копий этого участка ДНК. Амплифицированный участок именуют "ампликоном". В результате происходит экспоненциальное увеличение количества специфического фрагмента приблизительно по формуле 2^n , где n – число прошедших циклов амплификации. Продолжительность одного цикла менее 3-5 минут. Таким образом, за 2 часа можно получить около миллиарда копий, определяемой последовательности ДНК. В качестве праймеров используют специально синтезированные специфические дезоксирибонуклеотиды длиной 20-30 оснований, комплиментарные участку ДНК данного возбудителя или гена (рис.1,2). Обычно используют 30-50 циклов ПЦР для того, чтобы образовать достаточное для регистрации количество копий участка ДНК.

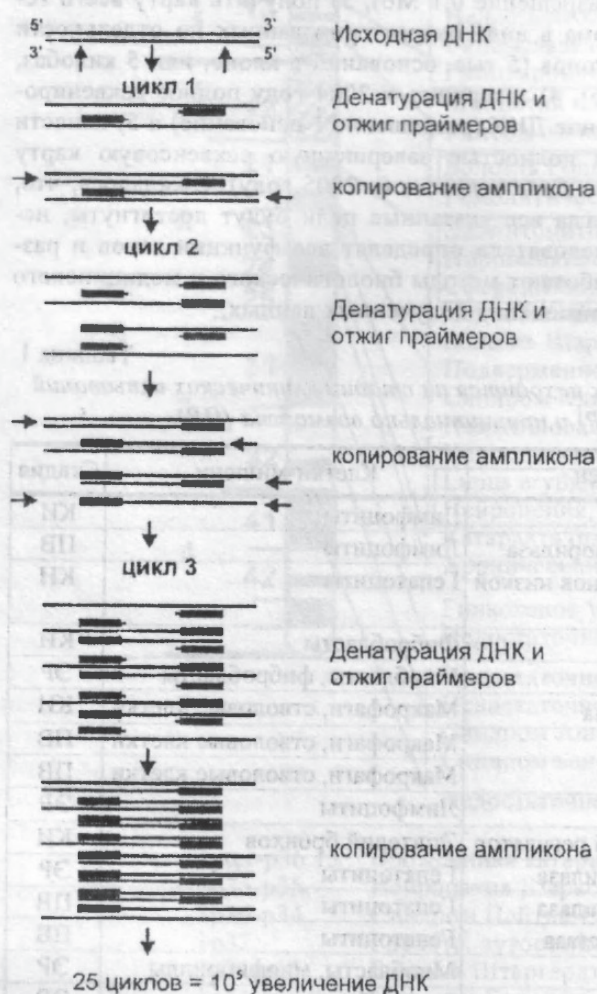


Рис.1. Цикл ПЦР.

В большинстве случаев в качестве метода детекции используется электрофорез, с помощью которого производится разделение амплифицированного материала по размеру ампликонов. Наиболее точным и перспективным является применение метода капиллярного электрофореза в сочетании с лазерной количественной регистрацией продуктов ПЦР.

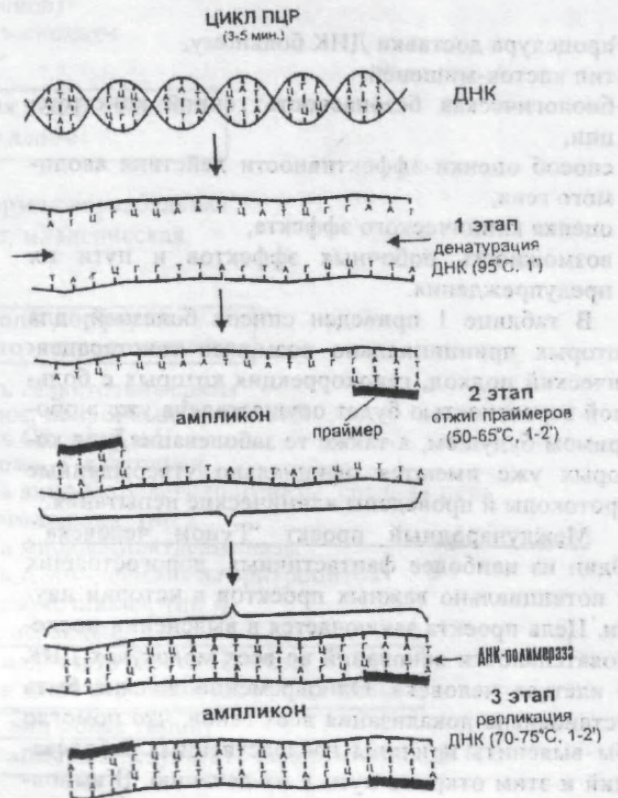


Рис.2. Динамика накопления продуктов ПЦР.

Генотерапия – способ лечения наследственных, мультифакториальных и ненаследственных болезней путем введения генов в клетки больных с целью направленного изменения генных дефектов или придания клеткам новых функций. В настоящее время проводится генотерапия только соматических клеток, т.к. она не передается по наследству и носит исключительно заместительный характер. Существуют два методических подхода при использовании генотерапии: введение генетического материала непосредственно в организм и перенос генетической конструкции в культуру клеток, взятых у больного с дальнейшей реинфузией.

Методы генетической трансфекции (доставки):

1. Химические (Са-фосфат преципитация).
2. Физические (электropорация, микроинъекция, бомбардировка частицами, простая инъекция)
3. Липосомы (рецептор-опосредованный эндоцитоз, ДНК-белковый комплекс, ДНК-комплекс-вирусная капсида)
4. Рескомбинантные векторные вирусы (аденовирусы, ретровирусы)

Последний метод наиболее эффективен, т.к. сочетает высокую тропность к клеткам-мишеням, безопасность (предварительно у вируса извлекают участок генома, отвечающего за репликацию) и хорошую экспрессию.

Стандартная схема генокоррекции (протокол) включает следующие пункты:

- клиническое обоснование генотерапии,
- схема конструирования ДНК,

- процедура доставки ДНК больному,
- тип клеток-мишеней,
- биологическая безопасность генной конструкции,
- способ оценки эффективности действия вводимого гена,
- оценка клинического эффекта,
- возможность побочных эффектов и пути их предупреждения.

В таблице 1 приведен список болезней, для которых принципиально возможен генотерапевтический подход, генокоррекция которых с большой вероятностью будет осуществлена уже в обозримом будущем, а также те заболевания, для которых уже имеются официально утвержденные протоколы и проведены клинические испытания.

Международный проект "Геном человека". Один из наиболее фантастичных, дорогостоящих и потенциально важных проектов в истории науки. Цель проекта заключается в выяснении последовательности оснований во всех молекулах ДНК в клетках человека. Одновременно должна быть установлена локализация всех генов, что помогло бы выяснить причины наследственных заболеваний и этим открыть пути к их лечению. В выполнении проекта задействовано несколько тысяч ученых, специализирующихся в биологии, химии, математике, физике и технике. Это один из самых

дорогостоящих научных проектов в истории цивилизации. В 1990 году на изучение геномов было потрачено 60 млн. долларов, в 1991 году – 135 млн., в 1992-1995 годах ежегодно выделялось от 165 до 187 млн. долларов, а в 1996-1998 годах только США расходовали 200, 225 и 253 млн. долларов ежегодно.

Чтобы последовательно приближаться к решению проблемы картирования генов человека, было сформулировано пять основных задач: 1) завершить составление детальной генетической карты, на которой были бы помечены гены, отстоящие друг от друга на расстоянии, не превышающем в среднем 2 млн. оснований (1 млн. оснований принято называть 1 мегабаза, сокращенно Мб, от англ. слова "base" – основание), 2) составить физические карты каждой хромосомы (разрешение 0,1 Мб), 3) получить карту всего генома в виде охарактеризованных по отдельности клонов (5 тыс. оснований в клоне, или 5 килобаз, Кб), 4) завершить к 2004 году полное секвенирование ДНК (разрешение 1 основание) и 5) нанести на полностью завершенную секвеновую карту все гены человека (к 2005 году). Ожидалось, что, когда все указанные цели будут достигнуты, исследователи определят все функции генов и разработают методы биологического и медицинского применения полученных данных.

Таблица 1.

Наследственные заболевания, генокоррекция которых находится на стадии клинических испытаний (КИ), экспериментальных разработок (ЭР) и принципиально возможна (ПВ)

Болезнь	Дефектный ген	Клетки-мишени	Стадия
Иммунодефицит	Аденозиндезаминаза	Лимфоциты	КИ
Иммунодефицит	Пуринуридиндезаминаза	Лимфоциты	ПВ
Семейная гиперхолестеринемия	Рецептор липопротеинов низкой плотности	Гепатоциты	КИ
Гемофилия В	Фактор IX	Фибробласты	КИ
Гемофилия А	Фактор VIII	Миобласты, фибробласты	ЭР
Болезнь Гоше (сфинголипидоз)	β -Глюкоцереброзидаза	Макрофаги, стволовые клетки	КИ
Болезнь Хантера	Идуронатсульфатаза	Макрофаги, стволовые клетки	ПВ
Синдром Гурлера	L-идуронидаза	Макрофаги, стволовые клетки	ПВ
Эмфизема легких	α -1-Антитрипсин	Лимфоциты	ЭР
Муковисцидоз	CF-трансмембранный регулятор	Эпителий бронхов	КИ
Фенилкетонурия	Фенилаланингидроксилаза	Гепатоциты	ЭР
Гипсраммонемия	Орнитинтранскарбамилаза	Гепатоциты	ПВ
Цитрулинемия	Аргининсукцинатсинтетаза	Гепатоциты	ПВ
Мышечная дистрофия Дюшенна	Дистрофии	Миобласты, миофибриллы	ЭР
Талассемия	β -Глобин	Эритроциты	ЭР
Серповидноклеточная анемия	β -Глобин	Эритроциты	ЭР
Респираторный дистресс-синдром	Сурфактант белок В	Эпителий бронхов	ЭР
Хронический грануломатоз	NADPH-оксидаза	Гранулоциты	ЭР
Болезнь Альцгеймера	Белок – предшественник β -амилоида (A β)	Нервные клетки	ЭР
Болезнь Паркинсона	Тирозингидроксилаза	Миобласты, фибробласты, нервные клетки	ЭР
Метахроматическая лейкодистрофия	Арилсульфатаза А	Стволовые клетки крови, нервные клетки	ПВ
Синдром Леш-Нихана	Гипоксантинфосфорибозил-трансфераза	Нервные клетки	ПВ

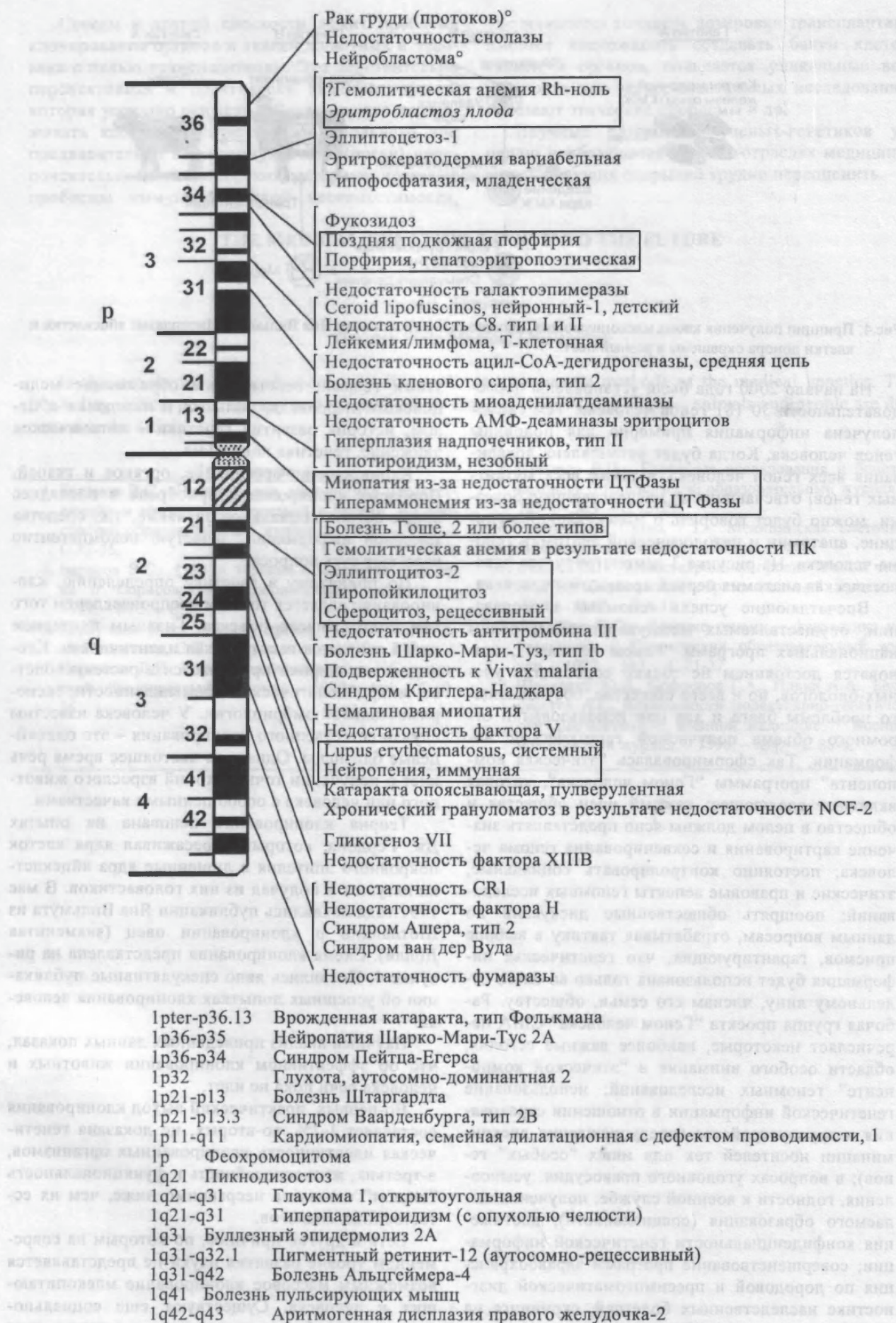


Рис.3. Хромосома 1

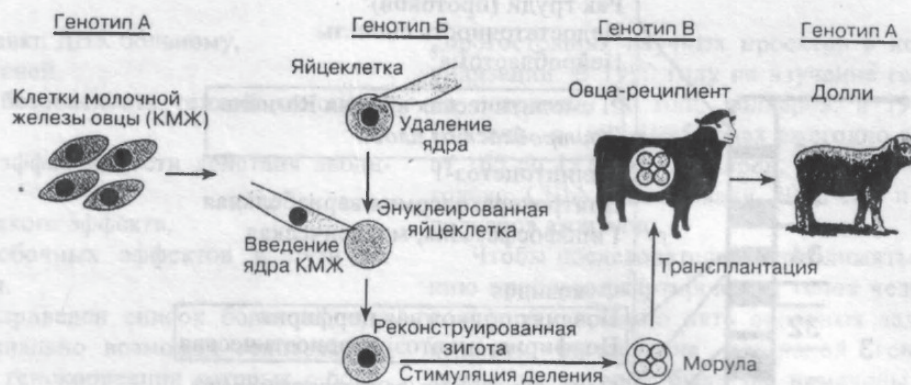


Рис.4. Принцип получения клона млекопитающих, использованный в опытах Яна Вильмута. Цитоплазма яйцеклетки и клетки донора окрашены в разный цвет.

На начало 2000 года были установлены последовательности 30 181 генов человека. Тем самым получена информация примерно для половины генов человека. Когда будет установлена локализация всех генов человека, а также всех мутантных генов, отвечающих за наследственные болезни, можно будет говорить о молекулярной медицине, анатомии и патологической анатомии генома человека. На рисунке 3 демонстрируется патологическая анатомия первой хромосомы человека.

Впечатляющие успехи геномных исследований, осуществляемых международной и рядом национальных программ "Геном человека", становятся достоянием не только сообщества ученых-биологов, но и всего общества, обсуждающего проблемы блага и зла при использовании огромного объема получаемой генетической информации. Так сформировалась "этическая компонента" программы "Геном человека", которая включает следующее: каждый член общества и общество в целом должны ясно представлять значение картирования и секвенирования генома человека; постоянно контролировать социальные, этические и правовые аспекты геномных исследований; поощрять общественные дискуссии по данным вопросам, отработывая тактику в выборе приемов, гарантирующих, что генетическая информация будет использована только во благо отдельному лицу, членам его семьи, обществу. Рабочая группа проекта "Геном человека" США перечисляет некоторые, наиболее важные сегодня, области особого внимания в "этической компоненте" геномных исследований: использование генетической информации в отношении страхования и трудоустройства (предупреждение дискриминации носителей тех или иных "особых" генов); в вопросах уголовного правосудия, усыновления, годности к военной службе; получения желаемого образования (специальности); достижения конфиденциальности генетической информации; совершенствование программ здравоохранения по дородовой и пресимптоматической диагностике наследственных болезней, скрининга на выявление носителей "больных" генов при отсутствии методов лечения болезней, вызываемых

этим геном; генетическое образование медицинского персонала, больных и населения в целом; история развития генетики – эвгеническое движение, генетика поведения.

Клонирование организмов, органов и тканей. Проблема клонирования приобрела в последнее время острый социальный звучание, т.к. средства массовой информации, зачастую некомпетентно излагают суть вопроса.

По принятому в генетике определению, клонирование является точным воспроизведением того или иного живого объекта. Главным критерием клона считается генетическая идентичность. Клонирование широко применяется в растениеводстве, микробиологической промышленности, экспериментальной эмбриологии. У человека известны случаи естественного клонирования – это однояйцевые близнецы. Однако, в настоящее время речь идет о получении точных копий взрослого животного или человека с особо ценными качествами.

Теория клонирования основана на опытах Дж. Гердона, который пересаживал ядра клеток кожного эпителия в лишённые ядра яйцеклетки лягушек и получал из них головастиков. В мае 1997 года появились публикации Яна Вильмута из Шотландии о клонировании овец (знаменитая Долли). Схема клонирования представлена на рисунке 4. Появились явно спекулятивные публикации об успешных попытках клонирования человека.

Научный анализ приведенных данных показал, что об эффективном клонировании животных и человека речи пока не идет.

Во-первых, практический выход клонирования составляет 1-2%, во-вторых, не доказана генетическая идентичность клонированных организмов, в-третьих, жизнеспособность и функциональность "клонят" оказалась несравнимо ниже, чем их естественных аналогов.

Есть и другие причины, по которым на современном уровне развития науки не представляется возможным массовое клонирование млекопитающих и человека. Существуют еще социально-этические проблемы клонирования, которые вряд ли будут решены в ближайшее время.

Совсем в другой плоскости лежит проблема клонирования органов и тканей животных и человека с целью трансплантации. Это действительно перспективная и практически значимая задача, которая успешно решается. Доказано, что пересаживать клон собственных клеток больного или предварительно выращенную ткань (орган) предпочтительнее, чем донорский материал: исчезают проблемы иммунологической несовместимости,

увеличивается точность дозировки трансплантата, имеется возможность создавать банки клеток, тканей и органов, появляются уникальные возможности для экспериментальных исследований, исчезают этические проблемы и др.

Научные разработки ученых-генетиков успешно используются во всех отраслях медицины, а роль будущих открытий трудно переоценить.

THE MEDICAL GENETICS: LOOK INTO THE FUTURE (Lecture 6)

I.J. Seminsky

(Irkutsk State Medical University)

In this article we can read about new diagnostic and therapeutic methods of the medical genetics. The DNA-diagnostics, genetic therapy and the problem of cloning cells, tissues, organs, animals and people are discussed in the article.

Литература

1. Баранов В.С. Пренатальная диагностика наследственных и врожденных болезней в России. – Соросовский образовательный журнал. – 1998. – №10. – С.32-36.
2. Баранов В.С. Генная терапия – медицина XXI века // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 3. – С.63-68.
3. Горбунова В.Н. Молекулярные основы медицинской генетики. С-П.:Интермедика. – 1999. – 212 с.
4. Корочкин Л.И. Клонирование животных // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – №4. – С.10-16.
5. Пузырев В.П. Геномные исследования и болезни человека // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – №5. – С.19-27.
6. Репин В.С., Сухих Г.Т. Медицинская клеточная биология. – М.:БЭБиМ. – 200 с.
7. Сойфер В.Н. Международный проект "Геном человека" // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – №12. – С.4-11.
8. Фаворова О.О. Лечение генами – фантастика или реальность // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – №2. – С.21-27.
9. Шевченко Ю.Л., Софронов Г.А., Новик А.А., Белохвостов А.С. Возможности молекулярно-генетической диагностики в военной медицине // Военно-медицинский журнал. – 1998. – №4. – С.25-33.