

ЭЛЕКТРОННОЕ ОГЛАВЛЕНИЕ

1

Ф. ФОГЕЛЬ, А.МОТУЛЬСКИ

ГЕНЕТИКА ЧЕЛОВЕКА

2

Действие генов

Мутации

Популяционная генетика

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»

2

F. Vogel, A. G. Motulsky

Human Genetics

Problems and Approaches

Second, Completely Revised Edition

With 447 Figures and 217 Tables

Ф. ФОГЕЛЬ
А.МОТУЛЬСКИ

Генетика человека

Проблемы и подходы

В 3-х томах

том 2

Перевод с английского
канд. биол. наук А. Г. Имашевой,
канд. биол. наук С.Л. Мехедова,
Е. Я. Тетушкина

под редакцией
д-ра биол. наук Ю. П. Алтухова
и д-ра биол. наук В. М. Гиндилиса



ББК 28.04

Ф74

УДК 575

Фогель Ф., Мотульски А.

74 Генетика человека: В 3-х т. Т. 2: Пер. с англ.-М.: Мир,
1990. - 378 с, ил.

ISBN 5-03-000286-3

Книга двух известных генетиков из ФРГ и США является фундаментальным учебником по генетике человека, охватывающим практически все основные направления этой области науки. Она может служить как учебным пособием для начинающих изучать генетику человека, так и справочным изданием для специалистов.

В т. 2 рассматриваются механизм действия гена, мутации, популяционная генетика человека.

Для генетиков, молекулярных биологов, антропологов, врачей, а также для студентов-медиков и биологов.

1908000000-015

Ф----- 106-89 ББК 28.04

041(01) 90

Редакция литературы по биологии

BN 5-03-000288-X (русск.)

BN 5-03-000286-3

BN 3-540-16411-1 (англ.)

© Springer- Verlag Berlin, Heidelberg 1979, 1982,
1986

All Rights Reserved.

Authorized translation from English language
edition published by Springer-Verlag Berlin
Heidelberg New York Tokyo

4. Действие генов

4.1. Развитие менделевской парадигмы

Разработка концепций, предложенных Гальтоном и Менделем, приблизила нас к пониманию механизма действия генов. Обсуждение близнецового метода выявило не только его возможности, но и ограничения, связанные с тем, что в этом случае анализ основан на сравнении фенотипов без изучения действия отдельных генов. Близнецовый метод по существу сводится к измерению и количественному сравнению варьирующих признаков у близких родственников. Важно помнить, что оценки наследуемости только указывают на присущую данной популяции генетическую изменчивость, но не позволяют делать выводы о ее причинах. Подобного рода оценки ставят вопросы, но ответа на них не дают.

Напротив, подход Менделя оказался плодотворным для выяснения того, какие генетические факторы и каким образом определяют конкретный фенотип. Шаг за шагом исследователи шли к разрешению этой загадки (разд. 3.6).

Можно сказать, что первый шаг в этом направлении сделал А. Гэррод. Он разработал концепцию врожденных нарушений метаболизма (разд. 3.6). Позже было показано, что гены определяют структуру белков и многие распространенные наследственные болезни связаны именно с дефектами ферментов. Введение в практику исследований методов анализа белков позволило выявлять изменчивость на уровне аминокислотных последовательностей, а после того как в 1953 г. Уотсон и Крик раскрыли структуру ДНК [1347], и был расшифрован генетический код, стало ясно, что различия в аминокислотных последовательностях объясняются заменами нуклеотидов в ДНК. Механизмы регуляции действия генов у высших организмов до сих пор не установлены, остается также открытым вопрос о том, каким образом активность различных генов регулируется и интегрируется в процессе развития и при функционировании организма как целого. Достаточно подробно разработаны и экспериментально обоснованы модели генной регуляции у бактерий. Оказалось однако, что эти модели гораздо хуже объясняют регуляцию генов у высших организмов. Известно, что эукариоты существенно отличаются от бактерий по сложности организации. Неудивительно поэтому, что сложившиеся в ходе эволюции механизмы, обеспечивающие генную регуляцию про- и эукариот, тоже различны.

Практические аспекты генетики человека. Многие наследственные болезни человека можно удовлетворительно объяснить различиями в действии отдельных генов. Другую группу явлений, так называемые мультифакториальные заболевания, тоже в какой-то степени можно понять в рамках действия отдельных генов (разд. 3.7). Еще один большой класс составляют синдромы, обусловленные численными или структурными хромосомными aberrациями. Их объяснить в терминах действия отдельных генов невозможно. Понять механизм этой группы заболеваний - наиболее сложная проблема генетики человека.

Изучение нормальных вариантов и аномалий, развитие которых контролируется отдельными генами, очень полезно для всестороннего анализа нормальных функций. С другой стороны, раскрытие механизма взаимосвязи генотипа и фенотипа при синдромах, обусловленных хромосомными aberrациями, позволит углубить наши представления о генетической регуляции нормального эмбрионального развития. Как уже упоминалось в разд.3.6.1, гене-

6 4. Действие генов

Таблица 4.1. Этиология и патогенез наследственных заболеваний по данным биохимических и молекулярно-биологических исследований (по [203] с изменениями)		
Уровень анализа	Тип нарушения	Пример
Нарушения структуры ДНК	1. Делеции	α -Талассемия, гемоглобины Лепоре, гемофилия (разд. 4.3.4.)
	2. Единичные нуклеотидные замены	Серповидноклеточная анемия (разд. 4.3.2)
	3. Мутации, нарушающие сплайсинг	Некоторые виды β -талассемии (разд. 4.3.4)
	4. Нонсенс-мутации	Некоторые виды β -талассемии (разд. 4.3.4, 4.3.5)
	5. Мутации сдвига рамки считывания	Гемоглобин Уэйна (разд. 4.3.3)
	6. Дупликации генов	Гемоглобин Грэди (разд. 4.3)
	7. Регуляторные мутации (см. разд. 5.1.4)	Некоторые виды ρ -талассемии
Нарушение функции ферментов	1. Полное отсутствие активности	
	а) белок обнаруживается иммунологически	Некоторые варианты синдрома Леша—Найхана (разд. 4.2.2.6)
	б) белок иммунологически не обнаруживается	Большинство вариантов синдрома Леша—Найхана, варианты гомоцистинурии (разд. 4.2.2.9)
	2. Уменьшение активности	
	а) уменьшено сродство к субстратам	Недостаточность по G6PD (Фрайбург) (разд. 4.2.2.2)
	б) уменьшено сродство к кофакторам	Гомоцистинурия (пиридоксин-зависимый тип) (разд. 4.2.2.9)
	в) нестабильные структуры	Некоторые варианты недостаточности по G6PD (разд. 4.2.2.2)
	3. Увеличение активности	Вариант G6PD Гектона (разд. 4.2.2.2)
	4. Нарушение белка, активирующего фермент	Вариант АВ ганглиозидоза G _{M2} [203]
	5. Уменьшение количества кофакторов	Пиридоксин(витамин B ₆)- зависимость (разд. 5.2.2.5)
Нарушения функции неферментных белков		
	1. Нарушение посттрансляционной модификации	Недостаточность α -1-антитрипсина, вариант ZZ (разд. 3.7.4)
	2. Усиление способности к агрегации	Серповидноклеточная анемия (разд. 4.3.2)
Нарушение функций клеток и органов	3. Нарушение связывания с рецептором	Семейная гиперхолестеринемия (разд. 4.6.4); тестикулярная феминизация (разд. 4.7.5)
	1. Изменение метаболических путей	
	а) накопление токсичного предшественника (катаболический путь)	Фенилкетонурия (разд. 4.2.2.7), мукополисахаридозы и другие лизосомные болезни (разд. 4.2.2.3)
	б) недостаток продукта (анаболический путь)	Различные виды гипотиреоза с образованием зоба (разд. 4.2.2.7)
	в) избыток продукта (анаболический путь)	Редкая форма подагры

Продолжение табл. 4.1		
Уровень анализа	Тип нарушения	Пример
	2. Нарушение регуляции путей биосинтеза по типу обратной связи	
	а) избыток конечного продукта вследствие уменьшения количества регулятора	Острая перемежающаяся порфирия (разд. 4.6.3), семейная гиперхолестеринемия (разд. 4.6.4)
	3. Нарушения функции мембран	
	а) недостаточность трансмембранного транспорта	Цистинурия (см. [203], глава 80), наследственный сфероцитоз (разд. 4.6.5)
	б) недостаточность рецептор-опосредованного эндоцитоза	Семейная гиперхолестеринемия, рецептор-негативный и рецептор-дефектный варианты (разд. 4.6.4)
	в) недостаточность образования вторичных мессенджеров	Псевдогипопаратиреоз (см. [203], гл. 69)
	4. Ненормальная внутриклеточная компартментализация	
	а) накопление непротесированного белка	Недостаточность по α -1-антитрипсину, вариант ZZ (разд. 3.7.4)
	б) ненормальная локализация белка	I-клеточная болезнь (разд. 4.2.2.3), семейная гиперхолестеринемия (вариант с нарушением интернализации (разд. 4.6.4)
	5. Нарушение клеточной организации тканей	
	а) изменение формы клеток	Серповидноклеточная анемия (разд. 4.3.2), наследственный сфероцитоз (разд. 4.6.5)
	б) изменение структуры органелл	Синдром неподвижности ресничек, в частности синдром Картагенера (см. [203], гл. 91)
	в) изменение внеклеточного матрикса	Буллезный эпидермолиз типа Пасини (разд. 4.6.7), недостаточность лизилгидроксилаз (синдром Элерса—Данлоса, тип VI)

тический анализ можно проводить на разных уровнях. Для изучения наследственных дефектов использовали методы биохимии и молекулярной биологии. Подобные исследования помогли установить биологические механизмы, действующие на трех разных уровнях: на собственно геном (на уровне последовательности нуклеотидов), на уровне белкового продукта гена и отчасти на качественном фенотипическом уровне. В ходе этих исследований выявлены разнообразные функциональные нарушения и, кроме того, получено много фактов,

расширяющих наше представление о норме. В табл. 4.1 приводятся типы генетических дефектов и примеры наследственных заболеваний, при которых эти дефекты изучались. Некоторые заболевания [например, гемоглобинопатии (30670) и гемофилии (30690)] изучены на всех трех уровнях. Однако в большинстве других случаев механизмы, лежащие в основе патологических состояний, удалось установить только на уровне белкового продукта гена (второй уровень) или на уровне нарушения функции клетки или органа (третий уровень).

Дальнейшее изложение будет главным образом посвящено анализу действия гена на уровне белкового продукта, что позволяет идентифицировать нарушения на уровне транскрипции ДНК. Мы обсудим различные механизмы доминантного действия генов и вопросы генной регуляции. На всех уровнях будут рассмотрены области практического применения и теоретические аспекты медицинской диагностики.

4.2. Гены и ферменты

4.2.1. Гипотеза «один ген – один фермент»

Первые исследования. После того как в 1902 г. Гэррод указал на связь генетического дефекта при алкаптонурии с неспособностью организма расщеплять гомогентизиновую кислоту, важно было выяснить специфический механизм, лежащий в основе этого нарушения. Поскольку тогда уже было известно, что метаболические реакции катализируются ферментами, можно было предположить, что именно нарушение какого-то фермента приводит к алкаптонурии. Такая гипотеза обсуждалась Дришем (в 1896 г.). Ее высказывали также Холдейн (1920 г., см. [1117]) и Гэррод (1923 г. [1091]). Важными этапами в развитии биохимической генетики стали работы Кюхна и Бутенандта [1178; 1027] по изучению окраски глаз у мельничной огневки *Ephesia kuhniella* и аналогичные исследования Бидла и Эфрусси на *Drosophila* (1936) [987]. В этих пионерских работах для выяснения механизмов действия генов были выбраны мутанты насекомых, изученные ранее генетическими методами. Однако такой подход не привел к успеху. Проблема оказалась слишком сложной, и чтобы решить ее, необходимо было:

- 1) подобрать простой модельный организм, удобный для экспериментального изучения;
- 2) искать генетическую основу биохимических признаков, а не биохимическую основу генетически детерминированных признаков. Оба условия были выполнены в работе Бидла и Татума в 1941 году [988] (см. также Бидл, 1945 [986]).

Модель Бидла и Татума. Статья этих исследователей начиналась так:

«С точки зрения физиологической генетики - развитие и функционирование организма может быть сведено к сложной системе химических реакций, которые каким-то образом контролируются генами. Вполне логично предположить, что эти гены... либо сами выступают в роли ферментов, либо определяют их специфичность. Известно, что генетики-физиологи обычно пытаются исследовать физиологические и биохимические основы уже известных наследственных признаков. Этот подход позволил установить, что многие биохимические реакции контролируются специфическими генами. Такие исследования показали, что ферменты и гены обладают специфичностью одного порядка. Однако возможности этого подхода ограничены. Наиболее серьезное ограничение заключается в том, что при этом в поле зрения исследователей попадают наследственные признаки, не имеющие летального эффекта и, следовательно, связанные с реакциями, которые не очень существенны для жизнедеятельности организма. Второе затруднение ... заключается в том, что традиционный подход к проблеме подразумевает использование внешне проявляющихся признаков. Многие из них представляют собой морфологические вариации, основанные на системах биохимических реакций, настолько сложных, что их анализ необычайно затруднен.

Подобные соображения привели нас к следующему выводу. Изучение общей проблемы генетического контроля биохимических реакций, определяющих развитие и метаболизм, должно проводиться с помощью *процедуры, противоположной общепринятой*: вместо того чтобы пытаться выяснить химические основы известных наследственных признаков, необходимо установить, *обеспечивают ли гены контроль известных биохимических реакций и как они это делают*. Нейроспора, относящаяся к аскомицетам, обладает свойствами, позволяющими реализовать такой подход и одновременно служит удобным объектом для генетических исследований. Вот почему наша программа была построена на использовании именно этого организма. Мы исходили из того, что облучение рентгеном вызывает мутации в генах, контролирующих определенные химические реакции. Пусть для выживания в данной среде организм должен осуществлять какую-то химическую реакцию, тогда мутант, лишенный такой способности, в этих условиях окажется нежизнеспособным. Однако его можно поддерживать и изучать, если выращивать в среде, к которой добавлен жизненно необходимый продукт генетически блокированной реакции».

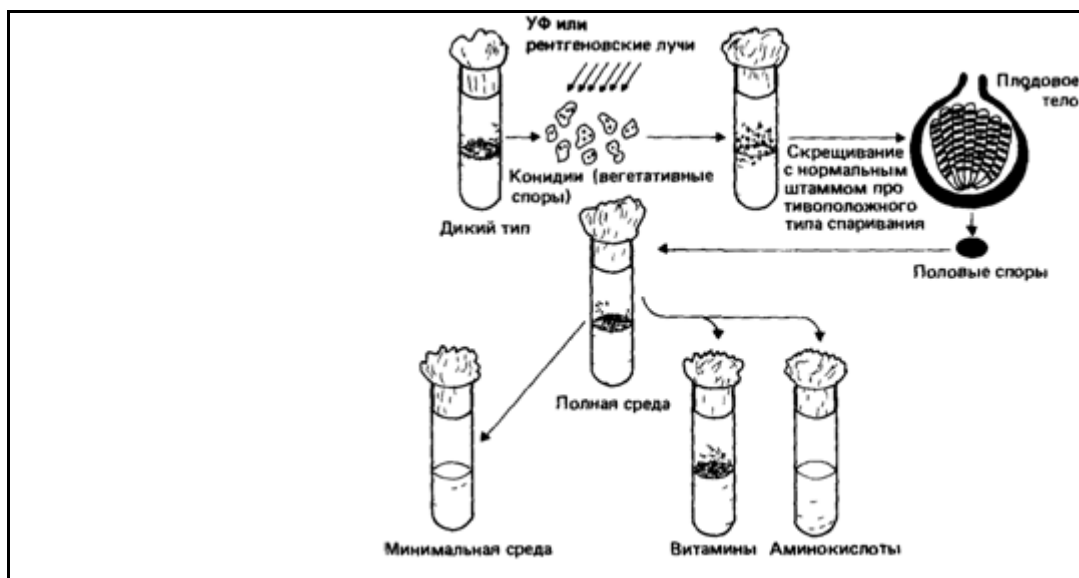


Рис. 4.1. Схема эксперимента по обнаружению биохимических мутантов нейроспоры. На полноценной среде мутации, индуцированные рентгеновскими лучами или ультрафиолетом, не нарушают роста гриба. Однако на минимальной среде мутант не растет. При добавлении к минимальной среде витаминов способность к росту восстанавливается. При внесении аминокислот роста нет. На основании этих данных можно предположить, что мутация произошла в гене, который контролирует метаболизм витамина. Следующий шаг заключается в идентификации витамина, способного восстановить нормальную функцию. Генетический блок обнаружен среди реакций биосинтеза витамина [1303].

Далее Бидл и Татум приводят описание схемы эксперимента (рис. 4.1). В состав полной среды входил агар, неорганические соли, солодовый экстракт, дрожжевой экстракт и глюкоза. Минимальная среда содержала только агар, соли, биотин и источник углерода. Наиболее подробно были исследованы мутанты, которые росли на полной среде и не росли на минимальной. Чтобы установить соединение, синтез которого нарушен у каждого из мутантов, в минимальный агар вносили отдельные компоненты полной среды.

Таким способом были выделены штаммы, неспособные синтезировать определенные факторы роста: пиридоксин, тиамин и парааминобензойную кислоту. Было показано, что эти дефекты обусловлены мутациями в специфических локусах. Работа положила начало многочисленным исследованиям на нейроспоре, бактериях и дрожжах, в которых было установлено соответствие «генетических блоков», ответственных за отдельные метаболические этапы, и специфических нарушений ферментов. Этот подход очень быстро превратился в инструмент, позволяющий исследователям раскрывать метаболические пути.

Гипотеза «один ген - один фермент» получила прочное экспериментальное подтверждение. Как показали работы последующих десятилетий, она оказалась удивительно плодотворной. Анализ дефектных ферментов и их нормальных вариантов позволил вскоре выявить такой класс генетических нарушений, которые приводили к изменению функции фермента, хотя сам белок по-прежнему обнаруживался и сохранял иммунологические свойства. В других случаях менялся температурный оптимум активности фермента. Некоторые варианты можно было объяснить мутацией, влияющей на общий регуляторный механизм и изменяющей в результате активность целой группы ферментов. Подобные исследования привели к созданию концепции регуляции активности генов у бактерий, которая включала и концепцию оперона.

Первые примеры ферментативных нарушений у человека. Первым наследственным заболеванием человека, для которого удалось показать ферментативное нарушение, была метгемоглобинемия с рецессивным типом наследования (Гибсон и Харрисон, 1947 [1100]; Гибсон, 1948 [1099]) (25080). В этом случае поврежденным ферментом является NADH - зависимая метгемоглобин-редуктаза. Первая попытка систематического изучения группы заболеваний человека, связанных с дефектами метаболизма, была предпринята в 1951 году. При исследовании болезни накопления гликогена [1044] супруги Кори показали, что в восьми из десяти случаев патологического состояния, которое диагностировалось как болезнь Гирке (23220), структура гликогена печени представляла собой нормальный вариант, а в двух случаях была явно нарушена. Было также очевидно, что гликоген печени, накапливаясь в избытке, не может быть непосредственно превращен в сахар, поскольку у больных проявляется тенденция к гипогликемии. Для расщепления гликогена с образованием глюкозы в печени необходимы многие ферменты. Два из них-амило-1,6-глюкозидаза и глюкозо-6-фосфатаза-были выбраны для изучения как возможные дефектные элементы ферментной системы. В гомогенатах печени при различных значениях pH было измерено освобождение фосфата из глюкозо-6-фосфата. Результаты представлены на рис. 4.2. В нормальной печени обнаруживалась высокая активность с оптимумом при pH 6-7. Сильное нарушение функции печени при циррозе коррелировало с незначительным уменьшением активности. С другой стороны, в случае болезни Гирке с летальным исходом, активность фермента обнаружить вообще не удалось; такой же результат был получен при обследовании второго подобного больного. У двух пациентов с менее выраженными симптомами наблюдалось значительное уменьшение активности.

Было сделано заключение, что в указанных случаях болезни Гирке с летальным исходом имел место дефект глюкозо-6-фосфатазы. Однако в большинстве более легких случаев активность этого фермента оказалась не ниже, чем при циррозе печени, и только у двух больных она была несколько меньшей (рис. 4.2).

По мнению супругов Кори, аномальное накопление гликогена в мышечной ткани нельзя связывать с недостатком глюкозо-6-фосфатазы, поскольку в мышцах этот фермент отсутствует и в норме. В качестве возможного объяснения гликогеноза мышц они предположили нарушение активности амило-1,6-глюкозидазы. Это предсказание вскоре подтвердилось: Форбс [1081] обнаружил такой дефект при одном из клинически выраженных случаев болезни накопления гликогена с вовлечением сердечной и скелетных мышц. Сейчас нам

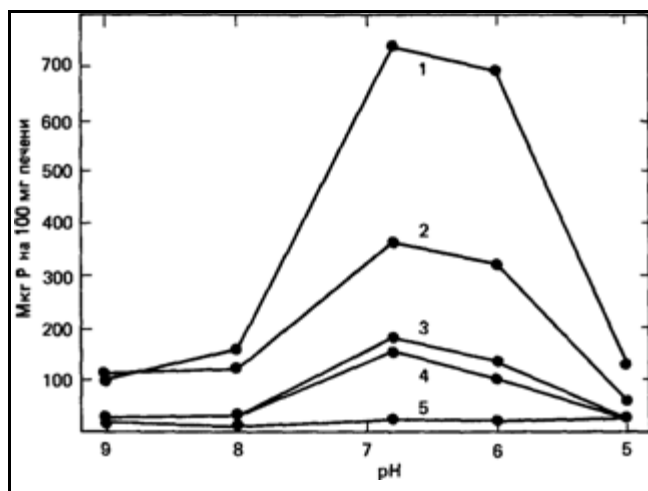


Рис. 4.2. Освобождение фосфата из глюкозо-6-фосфата в гомогенатах печени различных больных служит мерой активности глюкозо-6-фосфатазы. 1. Значительное освобождение фосфата у больного с нормальной функцией печени. 2. Умеренное снижение при циррозе печени. 3, 4. Значительное снижение у двух пациентов с легкой формой болезни накопления гликогена. 5. Полное отсутствие ферментативной активности у пациента с тяжелой формой болезни Гирке [1044].

известно большое число ферментативных дефектов при болезни накопления гликогена [1133, 1244].

Хотя по степени проявления различные формы этого заболевания несколько различаются, в клиническом отношении между ними много общего. За одним исключением, все они наследуются по аутосомнорецессивному типу. Если бы ферментативные дефекты не были раскрыты, патология накопления гликогена рассматривалась бы как одно заболевание с характерными внутрисемейными корреляциями по тяжести течения, деталям симптоматики и срокам летального исхода. Таким образом, перед нами пример, когда генетическая гетерогенность, которую можно было лишь предполагать на основании изучения фенотипа (разд. 3.3.5), подтвердилась при анализе на биохимическом уровне: исследование ферментативной активности позволило идентифицировать специфические гены.

В последующие годы темп исследований в области ферментативных дефектов нарастал, и для 588 идентифицированных рецессивных аутосомных генов, которые Мак-Кьюсик описывает в шестом издании своей книги «Менделевское наследование у человека» (1983) [133], более чем в 170 случаях обнаружены специфические ферментативные нарушения. Наши успехи в этой области непосредственно связаны с развитием концепций и методов молекулярной генетики.

Некоторые этапы изучения ферментативных нарушений у человека. Мы приводим лишь наиболее важные вехи этого продолжающегося процесса: 1934 Фэ́ллинг открыл фенилкетонурию

[1080]

1941 Бидл и Татум сформулировали гипотезу «один ген - один фермент» [988] 1948 Гибсон описал первый случай ферментативного нарушения при заболевании у человека (рецессивная метгемоглобинемия) [1099]

1952 Супруги Кори обнаружили недостаточность глюкозо-6-фосфатазы при болезни Гирке [1044]

1953 Джервис продемонстрировал отсутствие фенилаланингидроксилазы при фенилкетонурии [1144]. Бикель сообщил о первой попытке смягчить ферментативное нарушение, применив диету с низким содержанием фенилаланина [1004]

1955 Смитс разработал методику электрофореза в крахмальном геле [1307, 1308]

1956 Карсон и др. обнаружили дефект глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы (G6PD) в случае индуцированной гемолитической анемии [1030]

1957 Калькар и др. описали ферментативную недостаточность при галактоземии, показав, что у человека и бактерий наблюдается идентичное нарушение ферментативной активности [1150]

1961 Крут и Вайнберг продемонстрировали дефект фермента при галактоземии *in vitro* в культуре фибробластов [1177]

1967 Сигмиллер и др. обнаружили дефект гипоксантин-гуанин—фосфорибозилтрансферазы (HPRТ) при синдроме Леша—Найхана [1295]

1968 Кливер описал нарушение эксцизионной репарации при пигментной ксеродерме [1035]

1970 Нейфельд выявил ферментативные дефекты при мукополисахаридозах, что позволило идентифицировать пути расщепления мукополисахаридов [1240]

1974 Браун и Голдстейн доказали, что генетически детерминированная суперпродукция гидроксиметилглутарилСоА-редуктазы при семейной гиперхолестеринемии обусловлена дефектом локализованного в мембране рецептора липопротеинов низкой плотности, который модулирует активность этого фермента (HMG) [1023]

1977 Слай и др. продемонстрировали, что маннозо-6-фосфат (как компонент лизосомальных ферментов) узнается рецепторами фибробластов. Генетический дефект процессинга препятствует связыванию лизосомных ферментов, в результате нарушается их выход в цитоплазму и последующая секреция в плазму (I-клеточная болезнь)

1980 При псевдогипопаратиреозе обнаружен дефект белка, обеспечивающего сопряжение рецептора и циклазы.

4.2.2. Гены и ферменты у человека: современный уровень знаний

Круг рассматриваемых вопросов. В каждом случае ферментативного дефекта необходим особый подход в методологии исследований и интерпретации результатов. Ограниченный объем настоящего обзора заставляет нас обсуждать эти проблемы кратко и весьма избирательно. Основное внимание будет уделено вопросам 1) важным для понимания общих принципов генетической детерминации и генетического контроля у человека; 2) важным для диагностики ферментативных дефектов и для понимания связи нарушения с этиологией заболевания. Читателям, желающим ознакомиться с группами заболеваний, не рассмотренными в этой главе, мы рекомендуем обратиться к специальным монографиям [203; 182].

4.2.2.1. Обнаружение и анализ ферментативных нарушений

Различия в подходах к исследованию человека и нейроспоры. Успехи в изучении ферментативных нарушений у бактерий и нейроспоры были достигнуты благодаря новому направлению исследований. Авторы при этом не пытались выявить биохимическую природу уже известных мутаций, они индуцировали новые мутации и отбирали среди них те, которые затрагивали известные биохимические реакции. Такой подход дает возможность обнаружить лишь те мутации, которые действительно приводят к появлению дефектов ферментативных систем независимо от того, какую долю в общем числе мутаций они составляют.

В генетических исследованиях человека невозможно ни индуцировать новые мутации, ни выявлять их с помощью системы отбора ауксотрофов, разработанной для нейроспоры. Поэтому изучение нарушений известных путей метаболизма совершенно бесперспективно. Приходится, отталкиваясь от изменений фенотипа, пытаться исследовать лежащие в их основе повреждения ферментных систем. Очевидный недостаток такого подхода заключается в том, что вероятность обнаружить больного с редким заболеванием сравнительно мала. Однако нет худа без добра. Ни одно экспериментальное животное так часто не подвергается медицинскому обследованию, как человек, причем разнообразие методов диагностики огромно: от изучения клинических проявлений, до анализа ферментов. В результате удается наблюдать широкий спектр разнообразных фенотипов. *Клинические симптомы, позволяющие распознавать повреждения ферментов.* Как обнаружить ферментативные нарушения? Самый простой пример - отсутствие глюкозо-6-фосфатазы при болезни Гирке. Заболевание известно уже давно, клинические проявления позволяют предполагать нарушение специфического метаболического пути. Когда эти реакции будут достаточно изучены и разработаны методы определения активности ферментов, исследователи подойдут вплотную к задаче выявления больных, у которых какой-то один из ограниченного круга ферментов, катализирующих эти реакции, является дефектным. Однако на этом пути возможны затруднения технического характера. Часто мутации обуславливают снижение сродства к субстрату. Однако в большинстве экспериментов *in vitro* используются настолько высокие концентрации субстрата, что даже измененный мутацией фермент обладает активностью, близкой к норме [1166]. Таким образом, эксперименты *in vitro* не всегда адекватно отражают активность фермента *in vivo*. Иногда клинические проявления могут направлять исследователей по ложному пути. Например, при болезни Помпе (гликогеноз II типа) все ферменты основного пути расщепления гликогена совершенно нормальны. Несмотря на это, гликоген накапливается в большинстве тканей, в особенности в сердечной мышце. Выяснилось, что в этом случае изменена α -1,4-глюкозидаза, которая в норме, как и другие гидролазы, находится в лизосомах (разд. 4.2.2.3) и участие которой в метаболизме гликогена не было до сих пор показано<

В других случаях симптомы настолько

неопределенны, что трудно предположить, какими именно нарушениями метаболизма они вызваны. Так, например, задержки развития у детей могут быть связаны с самыми разнообразными врожденными дефектами метаболизма, возникающими из-за генетически обусловленных повреждений ферментов.

Среди умственно отсталых детей, которые содержатся в больницах, около 1% страдают фенилкетонурией. Впервые это патологическое состояние было обнаружено Феллингом в 1934 г. при исследовании двух sibсов, моча которых отличалась характерным мышиным запахом и повышенным содержанием фенилпирувата [1080]. Это открытие навело на мысль, что и другие случаи умственной отсталости связаны с врожденными нарушениями метаболизма. Однако многочисленные исследования мочи умственно отсталых больных почти не дали результатов. Хотя и были открыты некоторые другие заболевания, например гомоцистинурия (см. ниже), в большинстве случаев умственной отсталости врожденных нарушений метаболизма, которые можно было бы обнаружить подобным способом, не было.

Заболевания соединительной ткани и костной системы, как правило, не связаны с врожденными дефектами метаболизма, однако есть исключения. Гомоцистинурия – заболевание, обусловленное нарушением метаболизма серусодержащей аминокислоты метионина вследствие недостаточности цистатионсинтазы печени. Симптомы можно объединить в три основные группы: 1) аномалии соединительной ткани и органов зрения-остеопороз, паучьи пальцы, воспаление коленных суставов, деформация хрусталика; 2) нарушения функций центральной нервной системы – в 50% случаев умственная отсталость; 3) тромбозы артерий и вен. Часть перечисленных симптомов совпадает с описанными при синдроме Марфана, который наследуется доминантно, но иногда встречается как спорадический случай вследствие вновь возникающей мутации. Вот почему синдром Марфана легко может быть принят за гомоцистинурию. Но даже отвлекаясь от этого обстоятельства, просто зная общую симптоматику рецессивных ферментативных дефектов, трудно предположить, что все столь разные симптомы обусловлены дефектом одного конкретного фермента.

Клиническая диагностика нарушений метаболизма. Болезни, вызванные наследственными нарушениями метаболизма, встречаются довольно редко. Это значит, что даже активно работающий педиатр за все время своей практики встретится лишь с несколькими случаями, поэтому трудно ожидать от каждого врача постановки правильного исчерпывающего диагноза и, тем более, правильного лечения. В США и Европе существует несколько педиатрических центров, специализирующихся в области диагностики (в том числе пренатальной) и лечения отдельных заболеваний или небольших групп болезней, обусловленных наследственными повреждениями ферментов. Такая узкая специализация позволяет обеспечить высочайший на сегодня уровень медицинского обслуживания.

Однако долг каждого врача независимо от области его специализации (будь то общая терапия, педиатрия или медицинская генетика) – правильно диагностировать заболевания, вызванные наследственными нарушениями метаболизма. Ранняя диагностика важна не только в отношении болезней, для которых существует специальное лечение (разд. 4.2.2.9), но и в тех случаях, когда необходимо предотвратить рождение больных детей (пренатальная диагностика).

Методы изучения ферментативных нарушений. При изучении ферментативных нарушений пользуются методами энзимологии. Для выяснения генетической природы того или иного дефекта важны не только количественные изменения активности фермента, но и качественные различия в характеристиках нормального и измененного фермента.

Так, например, у больных детей с синдромом Леша—Найхана (30800) [1163] была обнаружена повышенная термоллабильность гипоксантин-гуанин—фосфорибозилтрансферазы, а у детей с болезнью Фабри (сопряженной с дефектами фермен-

Таблица 4.2. Биохимические дефекты у человека, при которых обнаруживается перекрестно-реагирующий материал, что указывает на мутационное изменение фермента или белка [121]

Недостаточность псевдохолинэстеразы ¹⁾ («молчащий» фенотип)
Метахроматическая лейкодистрофия
Гликогеноз Мак-Ардила ¹⁾
Ганглиозидоз Зандхоффа
Синдром Леша—Найхана
Неусвоение фруктозы I типа
Фенилкетонурия
Галактоземия
Недостаточность фибриногена
Мукополисахаридоз III В
Недостаточность протромбина
Недостаточность проконвертина ¹⁾
Гемофилия А ¹⁾
Гемофилия В ¹⁾
Недостаточность фактора Стьюарта—Правера
Недостаточность фермента, стабилизирующего фибрин
Недостаточность фактора С4
Недостаточность сахарозоизомальтазы
Болезнь Тея—Сакса
¹⁾ Описаны также случаи без перекрестно-реагирующего материала.

тов лизосом) - необычная термостабильность β -галактозидазы.

Часто разница между нормальным и дефектным ферментом выявляется на уровне белков, например по изменению электрофоретической подвижности. В таких случаях у измененного белка потеря или снижение каталитических свойств далеко не всегда сопровождаются изменением его иммунологических характеристик, т. е. белок сохраняет способность связываться с антителами против нормального фермента. Впервые такой перекрестно-реагирующий материал (PRM, англ. CRM) описан у бактерий (триптофансинтаза у *E. coli*). Подобные перекрестно-реагирующие белки часто обнаруживают при наследственных нарушениях ферментов у человека (табл. 4.2): они играют важную роль в выявлении гетерозигот - носителей гемофилии А (разд. 4.2.2.8). У человека в отличие от бактерий чаще встречаются качественные изменения фермента, чем случаи полной или почти полной его утраты. Это означает, что большинство известных в настоящее время ферментативных дефектов у человека вызвано мутациями в структурных генах, а не в регуляторных участках, как у бактерий. Эти факты весьма важны для понимания принципов регуляции генов высших организмов, в том числе и у человека (разд. 4.7).

Приведенный ниже метод имеет особое значение для анализа повреждений ферментных систем.

Изучение ферментативных нарушений в культуре фибробластов человека. В 1940-1950 гг., когда удалось получить ответы на ключевые вопросы генетики бактерий, многим ученым казалось, что изучение индивидуальных клеток высших организмов позволит увеличить разрешающую способность генетического анализа эукариот на несколько порядков [162]. Условия культивирования клеточных линий были разработаны несколькими годами раньше. Однако все линии клеток, способные размножаться в культуре неопределенно долгое время, либо получены из злокачественных опухолей, как одна из наиболее распространенных линий – HeLa, либо при культивировании утрачивают способность к контактному торможению, т.е. «трансформируются». Генетически такие клетки отличаются от нормальных: они почти всегда анеуплоидны, причем число хромосом в наборе колеблется внутри одной клеточной линии и даже внутри конкретной культуры. Трансформированные клетки непригодны для генетического анализа, необходимо разработать методы, позволяющие культивировать нормальные, эуплоидные клетки.

Количественные биохимические эксперименты, например измерение активности ферментов, имеют смысл, только если рост клеток можно тщательно контролировать. Полезно рассмотреть принципы этих методов, поскольку они применимы и для анализа клеток из амниотической жидкости.

Возможные трудности. Метод культивирования фибробластов сопряжен с рядом трудностей. Эти клетки плохо растут или вовсе не растут на химически определенных средах. Приходится добавлять сыворотку, содержащую полный набор необходимых питательных веществ. Как правило, для этого

кой среде, они растут только в виде монослоя клеток, прикрепленных к твердой поверхности. Вот почему отбирать пробы, как это делается при работе с суспензионными культурами, в данном случае нельзя. Приходится вести параллельно много культур небольшого объема. Это приводит к дополнительным вариациям, которые с трудом поддаются контролю. Следует помнить также, что для фибробластов в отличие от стабилизированных опухолевых линий число клеточных делений ограничено и, следовательно, ограничены возможности наращивания биомассы.

Рост фибробластов в культуре. Материал, полученный при биопсии кожи и предназначенный для хромосомного анализа, измельчают, помещают в чашки Петри с питательной средой. Чашки содержат в инкубаторе с 5%-ным CO_2 . Это позволяет поддерживать постоянный pH. Приблизительно через 15 дней фибробласты начинают расти на поверхности среды и в конечном итоге формируют монослой. Клетки отделяют от поверхности обработкой трипсином и после центрифугирования переносят в свежую среду.

Развитие культуры происходит циклично. Цикл состоит из начальной лаг-фазы, за которой следует фаза логарифмического роста, продолжающаяся до тех пор, пока количество клеток в культуре не достигает стационарного значения («лаг-лог стационарный цикл»). В течение цикла активность ферментов и внутриклеточная концентрация метаболитов меняются. Поэтому сравнивать биохимические характеристики можно только с учетом изменений этих параметров на протяжении всех стадий цикла.

Итак, использование фибробластов человека в энзимологических экспериментах требует огромной и кропотливой технической работы [1208]. Затраченный труд, однако, как правило вознаграждается. Именно в культуре фибробластов у больного галактоземией удалось показать нарушение функций галактозо-1-фосфат—уридилтрансферазы [1177]. Благодаря этому методу были обнаружены многие нарушения функций ферментов. Он лежит и в основе пренатальной диагностики, которая в настоящее время с успехом используется для изучения генетически обусловленных повреждений ферментов.

Однако не все повреждения ферментов проявляются в фибробластах. В таких случаях можно использовать для анализа линии других клеток, например линии лимфоцитов или эритроцитов. Заметим, что, как правило, повреждения ферментов, не поддающиеся исследованию в фибробластах, нельзя изучать и в культуре клеток из амниотической жидкости.

4.2.2.2. Типичные нарушения функций ферментов: ферменты эритроцитов

К настоящему времени подробно изучена группа наследственных заболеваний, связанных с недостаточностью ферментативных систем эритроцитов [933, 1345]. Эритроциты человека – безъядерные клетки, неспособные синтезировать мРНК. Синтез белка происходит в клетках-предшественниках, еще содержащих ядро. В результате в зрелых эритроцитах имеется набор ферментативных систем, которые могут активно функционировать лишь некоторое время. «Отмирание» клеток сопровождается постепенной потерей активности ферментов и происходит после циркуляции в кровотоке в течение 120 суток. Описан ряд синдромов, обусловленных наследственными повреждениями ферментативных систем эритроцитов. Один из них – несфероцитарная гемолитическая анемия.

Генетически обусловленные повреждения ферментов гликолиза. Один из наиболее важных путей катаболизма в зрелых эритроцитах, необходимый для образования богатых энергией фосфатов (АТР), анаэробный гликолиз, или путь Эмбдена—Мейергофа (рис. 4.3). Эта цепь анаэробных реакций приводит к образованию на один моль глюкозы двух молей молочной кислоты и четырех молей АТР, из которых один затрачивается в ходе гликолиза на фосфорилирование глюкозо-6-фосфата и превращение его в фруктозо-1,6-дифосфат и еще один – на превращение глюкозы в глюкозо-6-фосфат. Итого, в полной цепи реакций на моль глюкозы образуется 2 моля АТР, необходимого для разнообразных клеточных функций эритроцитов, таких как поддержание формы (эритроциты представляют собой двояковогнутый диск), работы катионного насоса, а также синтеза разных метаболитов, например глутатиона (GSH) или АМР. Гликолиз катализируется 13 ферментами. Приблизительно 5-10% глюкозо-6-фосфата окисляется на пути так называемого гексозомонофосфатного шунта: в результате последовательности реакций пентозофосфат превращается в фруктозофосфат или глицеральдегид-3-фосфат, которые

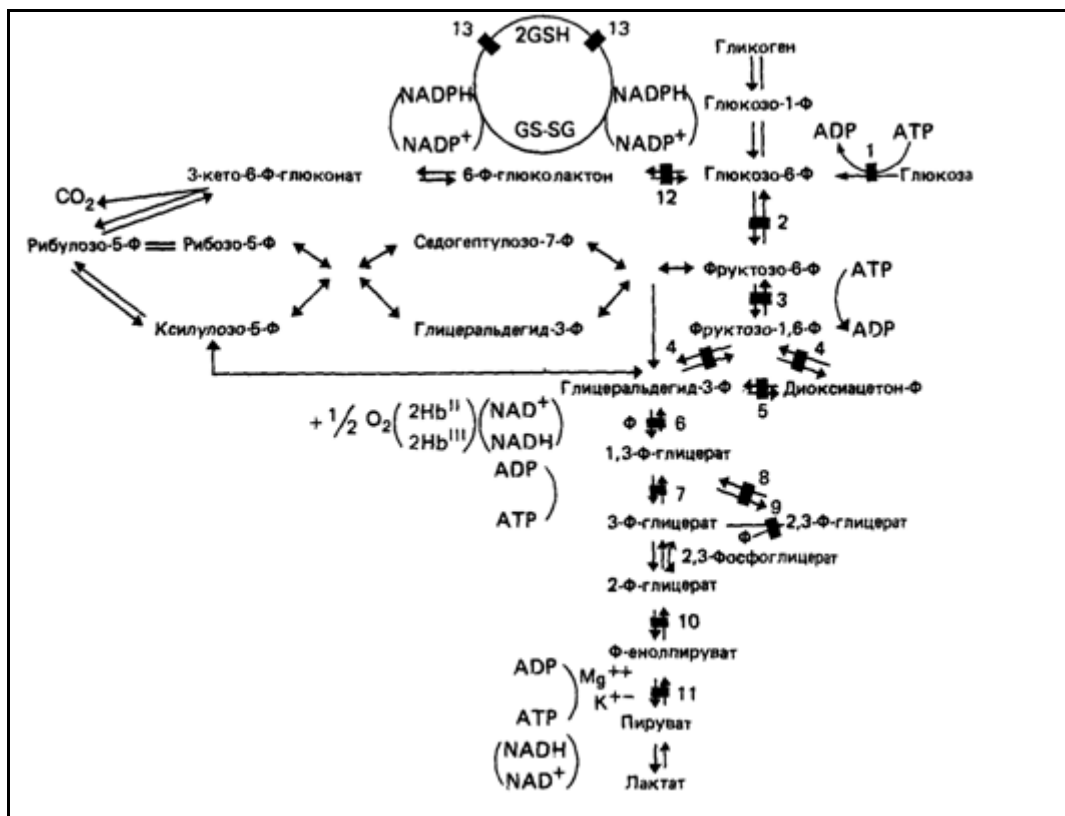


Рис. 4.3. Гликолиз в эритроцитах. В процессе участвует 11 ферментов. Общая скорость реакции лимитируется гексокиназой, которая катализирует превращение глюкозы в глюкозо-6-фосфат. Из него в результате цепи превращений образуется 1,3-дифосфоглицерат. Дифосфоглицерат может либо непосредственно расщепляться с образованием 3-фосфоглицерата и АТФ (реакция осуществляется фосфоглицерокиназой), либо через 2,3-дифосфоглицерат превращаться в неорганический фосфат и 3-фосфоглицерат, который затем вновь поступает в систему реакций гликолиза (цикл Рапопорта-Люберинга). В цикле Рапопорта-Люберинга АТФ не образуется. Следовательно, расщепление глюкозы может приводить к разному выходу АТФ. Однако поддержание постоянной концентрации 2,3-дифосфоглицерата в эритроцитах необходимо для нормальной диссоциации оксигемоглобина. Другое условие нормального функционирования гемоглобина – достаточная концентрация свободного NADH, образующегося в реакции, катализируемой глицеральдегид-фосфатдегидрогеназой. NADH необходим как для превращения пирувата в лактат, так и для восстановления метгемоглобина. Около 5-10% глюкозо-6-фосфата расщепляется в реакциях гексозомонофосфатного шунта. В результате ряда последовательных превращений из пентозофосфата образуется фруктозофосфат или глицеральдегид-3-фосфат, который снова используется в цепи реакций гликолиза. Гексозомонофосфатный цикл в эритроцитах – источник NADH, необходимого для восстановления окисленного глутатиона. Эта реакция осуществляется глутатионредуктазой. Гликолиз контролируется сложной «многоступенчатой» системой, в которой ключевую роль играют гексокиназа, фосфофруктокиназа и концентрация неорганического фосфата и ионов магния. На рисунке показаны также изученные у человека этапы блокирования метаболизма. Нумерация этапов блокирования соответствует нумерации в таблице 4.3, блоки этапов 6 (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа) и 10 (енолаза) не внесены в таблицу 4.3, поскольку нет прямых доказательств связи между блокированием метаболизма и недостаточностью этих ферментов. (На этом и других рисунках буквой Ф обозначены фосфатные группы химических соединений.)

снова утилизируются в цепи реакций гликолиза. Гексозомонофосфатный шунт – важный источник NADPH, необходимого для восстановления окисленного глутатиона. Эта реакция катализируется глутатионредуктазой.

Несфероцитарные гемолитические анемии. В 1953 г. Даше с соавторами описали группу заболеваний, родственных гемолитической анемии, которые назвали несфероцитарными в отличие от наследственного сфероцитоза [1049]. Больные страдали повышенным гемолизом, сопровождавшимся желтухой разной степени тяжести, небольшим увеличением селезенки и образованием камней в желчном пузыре. Эти признаки отличали описанное ими заболевание от наследственного сфероцитоза (18290). Устойчивость эритроцитов к осмотическому давлению у больных несфероцитарной анемией оказалась нормальной, не было обнаружено и структурных изменений гемоглобина. С помощью тонких методов гематологического анализа установлено, что заболевание гетерогенно по своей природе, хотя наблюдается заметное перекрытие параметров для различных форм болезни. Для детального изучения этой группы нарушений необходимо дальнейшее развитие методов энзимологии.

Повреждения ферментов гликолиза. В период между 1961-1975 гг. были описаны генетически обусловленные нарушения 11 из 13 ферментов гликолиза. По меньшей мере для 8 из описанных дефектов удалось показать связь с несфероцитарной гемолитической анемией. В ряде случаев наблюдали сопутствующие нарушения центральной нервной системы и мышц. В общем случае уменьшение активности фермента ниже критического значения приводит к накоплению метаболита, предшествующего данному блоку, и к падению концентрации метаболита, образующегося в данной реакции. Недостаточность некоторых из этих ферментов сопровождается побочными эффектами, например снижением уровня АТФ. Однако системе присуща способность к регуляции, которая увеличивает ее стабильность, поэтому на основании данных только клинического и гематологического анализа нельзя судить о природе и степени повреждения фермента. Кроме того, обычно подобный анализ проводят на популяции в основном молодых эритроцитов, в которых активность ферментов, как правило, выше, чем в старых клетках, и поэтому недостаточность по отдельным ферментам может остаться незамеченной.

Некоторые ферментативные нарушения описаны в таблице 4.3. Нумерация использована та же, что и на рисунке 4.3. Приведенные примеры позволяют сформулировать ряд замечаний более общего характера, касающихся дефектов ферментативных систем человека.

Доступность материала для исследования ферментов гликолиза. В настоящее время наследственные повреждения известны почти для всех ферментов гликолиза. Этим гликолиз выделяется среди прочих путей метаболизма, для которых далеко не всегда известно, существуют ли наследуемые дефекты, затрагивающие хотя бы некоторые из ферментов. Проще всего можно объяснить этот факт тем, что необходимую для исследований кровь больных сравнительно легко получить: анализ венозной крови больных, находящихся в стационаре, вполне доступен в отличие, например, от соскоба кожи, не говоря уже о биопсии мозга. Кроме того, эритроциты – это высокоспециализированные клетки, поэтому в них функционируют далеко не все ферментативные системы, имеющиеся в других клетках. Таким образом, количество реакций, которые могут быть нарушены, относительно невелико. Это значительно облегчает анализ.

Перечисленные преимущества клеток крови как объекта исследований широко использовались, например, при изучении глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы и особенно в исследованиях гемоглобина. В результате этих работ сложились основополагающие представления о взаимоотношениях генов и белков, которые они кодируют (разд. 4.3), а также о естественном отборе в человеческих популяциях (разд. 6.2.1.6).

Таблица 4.3. Случаи несфероцитарной гемолитической анемии (НСГА), обусловленные недостаточностью различных ферментов гликолиза (нумерация та же, что и на рис. 4.4)

№	Дефектный фермент	Активность фермента у больного	Гематологические симптомы	Симптомы, проявляющиеся в других системах органов, в особенности в центральной нервной системе	Тип наследования	Примечания
1	Гексокиназа	30-60%	НСГА, часто в тяжелой форме	(У одного больного наблюдались скелетные аномалии)	Аутосомнорецессивный	В некоторых случаях изменены только эритроциты, в других - эритроциты и лейкоциты
2	Глюкозофосфатизомераза (GPI)	15-25%	НСГА, часто в тяжелой форме, иногда желтуха новорожденных	Других симптомов нет	->-	Уменьшена термостабильность фермента. Обнаружен ряд форм фермента, отличающихся от нормального по электрофоретической подвижности. Активность фермента снижена во всех тканях (т.е. тканеспецифичного фермента не существует)
3	Фосфофруктокиназа (PFK)	8-80%	Легкая форма НСГА	В некоторых семьях встречается тяжелая миопатия и миоглобинемия; в некоторых случаях гликогеноз (без НСГА), тип VII	->-	Органоспецифические ферменты; возможно даже в эритроцитах имеются два фермента; клиническая и биохимическая гетерогенность
4	Альдолаза		НСГА		—>—	Известно лишь несколько случаев
5	Триозофосфатизомераза (TPI)	≈ 10%	НСГА	Нейромышечные аномалии, слабоумие, ранняя смертность, желтуха новорожденных	—>—	Нарушения активности ферментов проявляются также в лейкоцитах, скелетных мышцах и сыворотке крови. Связь мышечных симптомов с дефектом TPI точно не установлена
7	Фосфоглицеркиназа (PGK)	5-30%	Тяжелая НСГА	Иногда наблюдается олигофрения, атаксия и афазия	Х-сцепленное наследование	В некоторых случаях активность PGK снижается в лейкоцитах
9	Дифосфоглицеромутаза/фосфатаза	~3%	НСГА средней тяжести	Другие симптомы отсутствуют	Аутосомнорецессивный	
11	Пируваткиназа (PK)	5-20%	Сильно различаются (от тяжелой НСГА до нормы)	Симптомы, общие для различных случаев, отсутствуют	—>—	Вариабельность свойств фермента

В таблице отсутствуют некоторые ферменты гликолиза (№ 6, 8, 10), для которых связь с НСГА точно не показана. Подробнее об этих ферментативных дефектах см. [1148].

Энзимологические исследования позволяют выявить генетическую неоднородность. В разд. 3.3 уже говорилось о том, что все попытки выявить генетическую неоднородность популяции на основе изучения фенотипа наталкиваются на непреодолимые препятствия. Если два фенотипа очень сильно перекрываются и характеризуются аутосомно-рецессивным типом наследования, то единственным доказательством их генетической неоднородности может быть рождение у пары гомозиготных родителей только здоровых детей (разд. 3.1.3). Но, если проведен энзимологический анализ, генетическая неоднородность может быть однозначно установлена по следующим признакам.

1. Все наследуемые дефекты ферментов гликолиза в эритроцитах, приведенные в табл. 4.3 и на рис. 4.3, вызывают практически неразличимые по клиническим проявлениям варианты гемолитической анемии. Один из источников генетической неоднородности - сходство или даже совпадение фенотипических проявлений мутаций в генах, кодирующих разные ферменты данного пути метаболизма. Тот же вывод можно сделать, анализируя информацию, полученную при сравнении изученных случаев болезни накопления гликогена.

2. Второй источник неоднородности – разнообразие изменений одного и того же конкретного фермента, вызываемых различными мутациями в его гене. Чем больше методов используют для анализа, тем больше удастся обнаружить различий. Вероятность генетической гетерогенности очень велика, поскольку очень велико число мутаций, вызывающих аминокислотные замены.

При большинстве наследуемых дефектов ферментных систем у гомозигот сохраняется остаточная активность фермента. Во втором столбце табл. 4.3 представлены значения активности ферментов гликолиза в эритроцитах больных, гомозиготных по наследственным дефектам гликолиза. Во всех случаях, когда удавалось провести измерения, наблюдалась остаточная активность, иногда довольно значительная. В некоторых случаях причиной этого могла быть и активность другого фермента, способного катализировать ту же реакцию. Однако, как правило, повреждения фермента в результате отдельной мутации не столь значительны, чтобы полностью его инактивировать. По мнению Киркмана [1866], такая остаточная активность характерна для большинства наследственных повреждений ферментов у человека. Между тем в клетках бактерий мутации, как правило, вызывают полный блок того или иного пути метаболизма. Это обстоятельство можно объяснить отчасти тем, что в человеческой популяции происходит жесткий отбор на жизнеспособность: полный блок ключевых реакций метаболизма с большой вероятностью оказывается летальным. С другой стороны, у бактерий мутации удается обнаружить главным образом в тех случаях, когда активность того или иного фермента утрачена практически полностью. Мутанты с неполным блоком (leaky) нередко выживают даже на минимальной среде. Существует принципиальная разница между характером проявления мутаций у бактерий и человека. Мутантные штаммы бактерий наиболее часто обнаруживают по утрате способности расти на среде, стандартной для конкретной культуры, в то время как большинство мутаций, затрагивающих ферменты человека, обнаружены у больных наследственными заболеваниями. С появлением методов, позволяющих изучать все типы мутаций у бактерий, у них был идентифицирован полный набор мутаций, сходных со структурными мутациями, затрагивающими ферментные системы человека.

Клинические проявления наследственного дефекта фермента тесно связаны с нормальной активностью фермента в различных тканях. В одном организме и даже в отдельной клетке может существовать несколько форм данного фермента [120]. Это так называемые изоферменты. Их существование можно объяснить как негенетическими причинами (вторичные изменения фермента в тканях), так и генетическими (наличием разных генетических локусов, кодирующих полипептиды с более или ме-

нее значительными структурными различиями). Возможно, для таких пептидов существовал некогда общий предок, и различия между ними – результат дивергенции (разд. 7.2.3). Термин «изоферменты» применяется также к аллельным вариантам одного генетического локуса, различающимся по электрофоретической подвижности. Для многих ферментов показано существование таких множественных форм. Изоферменты катализируют одну и ту же метаболическую реакцию, однако, как правило, они тонко адаптированы к условиям, варьирующим в различных тканях.

Наследственные повреждения ферментов - результат мутаций в отдельных генах. Именно поэтому обычно повреждается только один из имеющихся в организме изоферментов данной группы. Если изменения затрагивают более чем один изофермент, то скорее всего имеется общая для них полипептидная цепь или происходят какие-то вторичные изменения структуры фермента.

Если поврежденный мутацией фермент активен лишь в одной, но не во многих тканях, фенотипическое проявление такой недостаточности имеет характерные особенности. Действие мутаций может быть плеiotропным, т. е. одна мутация может вызывать целый ряд последствий. Естественно предполагать, что недостаточность ферментов, активных в нескольких типах тканей, будет обладать плеiotропным эффектом. Это один из вероятных, но, конечно, далеко не единственный механизм возникновения плеiotропии. Даже если фермент функционален только в одной ткани, его отсутствие может вызвать изменения в других тканях за счет сдвигов метаболизма, вызванных первичной мутацией. С другой стороны, в некоторых случаях, наследственные дефекты ферментных систем, которые можно обнаружить во всех тканях, выражаются в четких изменениях фенотипа только за счет соответствующих нарушений в одной из них. Вероятно, в других тканях дефект каким-то образом компенсируется.

Примеры, перечисленные в табл. 4.3, наглядно иллюстрируют все случаи плеiotропного действия мутаций. Например, недостаточность фосфофруктокиназы (ПФК) вызывает симптомы умеренной несфероцитарной гемолитической анемии средней тяжести, такие как небольшая анемия, умеренная желтуха, а также некоторое увеличение селезенки: эти изменения фенотипа можно объяснить сокращением времени жизни эритроцитов. Для таких больных характерна нормальная активность ПФК в лейкоцитах, тромбоцитах и скелетных мышцах. Проявление этого дефекта, по всей вероятности, ограничено только эритроцитами [1147].

Больные из других семей страдают слабой формой гемолитической анемии, но в сочетании с выраженной миопатией [1191]: как те, так и другие симптомы, являются следствием болезни накопления гликогена [1327]. ПФК из мышечных клеток и эритроцитов различаются по электрофоретической подвижности, хроматографическим и иммунологическим характеристикам. Спектр изоферментов, по-видимому, чрезвычайно многообразен: только в эритроцитах обнаружено по меньшей мере два варианта [1148]. Различия в проявлениях плеiotропного эффекта в разных семьях могут объясняться тем, что в них наследуются разные мутации, затрагивающие разные полипептидные цепи, которые могут входить или не входить в состав изофермента, адаптированного к конкретной ткани.

Однако в ряде случаев ферментативная недостаточность наблюдается во всех исследованных тканях, а изменения фенотипа обнаруживаются только в одной из них. Примером может служить наследственная недостаточность глюкозофосфатизомеразы (GPI). У обследованных больных с пониженной активностью этого фермента в эритроцитах снижение активности имело место также в лейкоцитах, тромбоцитах, фибробластах, мышцах и в печени. Во всех перечисленных тканях биохимические характеристики фермента оказались идентичными. Несмотря на тщательный анализ, обнаружить даже намек на какие-либо тканеспецифические формы не удалось. Тем не менее среди наблюдаемых клинических симптомов

доминируют те, которые определяются нарушениями функций эритроцитов.

Больные страдают тяжелой формой гемолитической анемии, которая проявляется у новорожденных как сильная желтуха. В настоящее время известно довольно много структурных мутаций глюкозофосфатизомеразы: нередко встречаются составные гетерозиготы (компаунды) по таким мутациям. Заметим, однако, что далеко не все случаи недостаточности приводят к возникновению заболевания или сколько-нибудь заметным изменениям фенотипа [1003].

Недостаточность пируваткиназы (PK) (26620). Недостаточность пируваткиназы – один из наиболее часто встречающихся дефектов гликолиза эритроцитов. У больных, гомозиготных по этому нарушению, можно наблюдать самые разнообразные гематологические симптомы. У некоторых из них гемолитическая анемия может быть полностью компенсирована, другие страдают тяжелыми повторяющимися приступами несфероцитарной анемии. Приведем обязательные признаки этого наследственного заболевания:

1) наличие остаточной активности фермента – 5-20% для гомозигот и около 50% для гетерозигот по данному признаку. Клинических признаков заболевания гетерозиготы не обнаруживают;

2) количественные характеристики фермента, такие как кинетика реакции, специфичность связывания с ADP и UDP, термостабильность, оптимальные значения pH и изоэлектрическая точка, указывают на существование целого ряда вариантов с различными свойствами. Вероятно, большинство из них возникло в результате структурных мутаций [1149; 1148]. По результатам анализа на белковом уровне трудно с достоверностью определить, действительно ли больной гомозиготен по данному варианту или является носителем двух дефектных аллелей (компаунд-гетерозигота) (разд. 3.1.3, рис. 3.12).

Активность ферментов и клинические проявления у гетерозигот. Для большинства случаев нарушений гликолиза, приведенных в табл. 4.3, уровень активности фермента определяли у больных, гетерозиготных по наследственному дефекту. Как правило, их активность ниже нормальной, но выше, чем у гомозиготных больных. Этот факт отражает общее правило: у гетерозигот по дефектному ферменту сохраняется до 50% нормальной активности. Обычно такое снижение активности не приводит к патологическим симптомам: половины активности вполне достаточно, чтобы поддерживать нормальные функции организма.

Тот факт, что гетерозиготы сохраняют не более 50% нормальной активности, очевидным образом подтверждает, что количество фермента жестко контролируется соответствующим локусом. У здоровых гомозигот, несущих два нормальных структурных гена, активность фермента составляет 100%, а у гетерозигот – только 50%. В гетерозиготном организме единственный полноценный структурный ген не в состоянии компенсировать функции мутантного гена, продукт которого неактивен. Это обстоятельство чрезвычайно важно для понимания механизмов генной регуляции у млекопитающих, отличающихся от аналогичных механизмов у бактерий.

Аэробное образование энергии в эритроцитах: гексозомонофосфатный путь [994]. В левой части рис. 4.3 представлена цепь аэробных реакций, так называемый гексозомонофосфатный цикл, известный также, как пентозофосфатный цикл, или шунт. Основное его назначение – формирование восстановительного потенциала клетки в виде NADPH. В ходе реакции, катализируемой глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназой, происходит окисление глюкозо-6-фосфата с образованием 6-фосфоглюконата [1030], который в результате ряда последовательных этапов превращается в О-рибозо-5-фосфат.

Ферментативное восстановление окисленного глутатиона сопровождается окислением NADP. Восстановленный глутатион несет SH-группы и может предохранять клетку от действия свободных радикалов таких соединений, как H_2O_2 .

Обнаружено наследственное заболевание, при котором почти полностью отсутствует восстановленный глутатион. Оно вызвано нарушением синтеза глутатионсинтетазы. В некоторых случаях недостаточность этого фермента сопровождается оксипролинемией [1148]. Недостаток восстановленного глутатиона приводит к развитию несфероцитарной гемолитической анемии, связанной с повышенной чувствительностью к медикаментам - сильным окислителям. Многие лекарства обладают окислительной способностью и снижают восстановительный потенциал клетки [1009; 1269].

Недостаточность глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы (G6PD) (30690) [1079; 999; 1002; 1225; 1224; 1146] (рис. 4.3). Генетически детерминированные нарушения гексозомонофосфатного пути обуславливают повышенную чувствительность к некоторым лекарствам. Это наблюдение лежит в основе одного из ключевых принципов фармакогенетики (см. разд. 4.5.1). Во время войны в Корее 1950-1952 гг. все американские солдаты проходили профилактический курс лечения противомаларийным препаратом «примахин» [8-(4,амино1-метилбутиламино)-6-метоксихинолин]. Примерно у 10% чернокожих солдат и у 1-2 из 1000 белых (в основном выходцев из Средиземноморских стран) в ответ на прием примахина развивалась сосудистая гемолитическая реакция. Ранее сходные реакции иногда наблюдали при лечении сульфаниламидами и памахином больных негров. Было известно также, что гемолитические реакции могут иметь место у некоторых жителей Сардинии после употребления в пищу бобов *Vicia faba*.

Тщательные исследования «примахин-чувствительных» эритроцитов у негров показали, что чем больше возраст эритроцитов, тем выше их чувствительность к гемолизу. Именно это объясняет малую продолжительность гемолитической реакции (рис. 4.4). После гибели всех

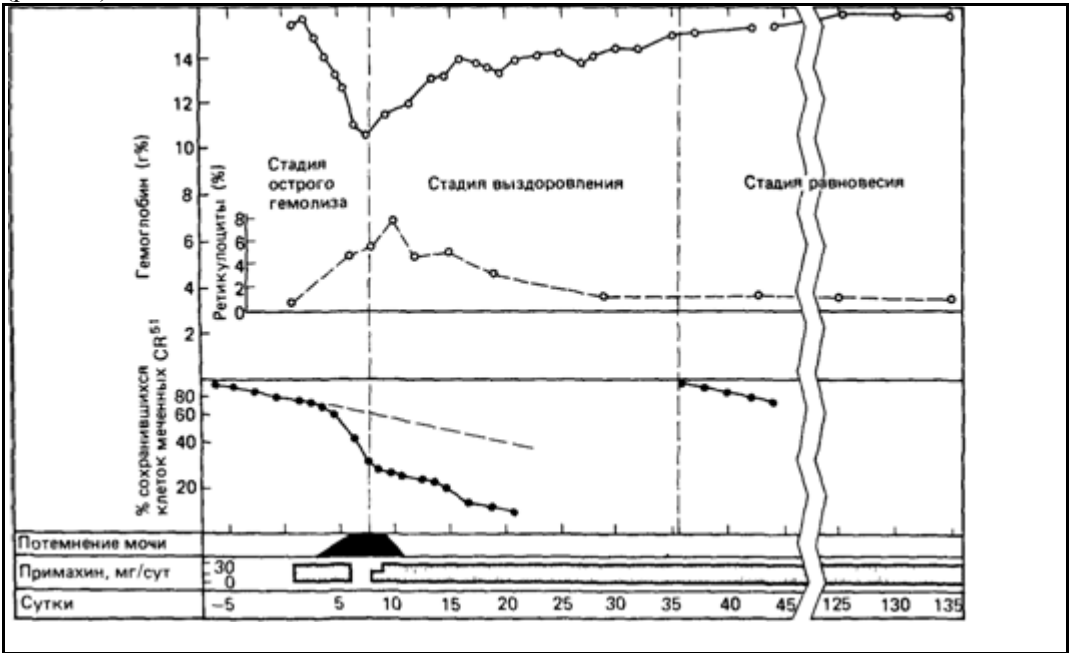


Рис. 4.4. Гемолитическая реакция после введения примахина. В течение первых дней курса лечения многие эритроциты разрушаются в результате гемолиза. Это приводит к усиленному образованию новых эритроцитов; увеличению количества ретикулоцитов и повышению гемоглобина. Гемолизу подвергаются только те эритроциты, возраст которых превышает 60 дней; в ходе лечения в популяции эритроцитов увеличивается количество более молодых клеток [1030].

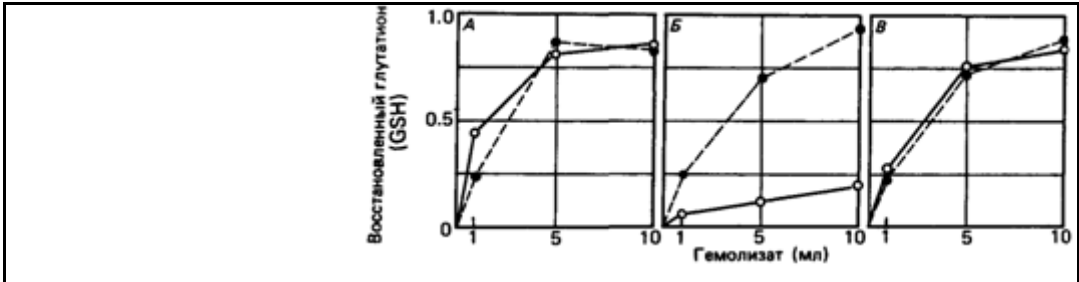
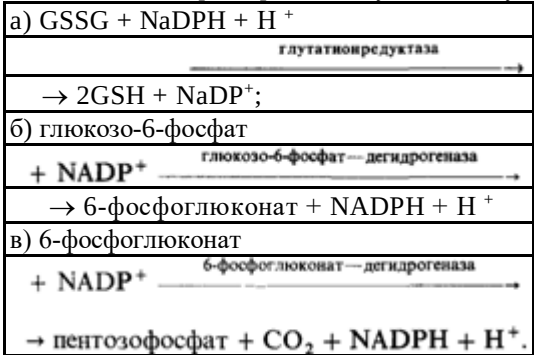


Рис. 4.5. Образование восстановленного глутатиона (GSH) из окисленного глутатиона (GSSG) как функция объема (мл) диализованного гемолизата. Сплошная линия характеризует чувствительность к примахину больного, пунктирная – чувствительность здорового человека. *А.* Активность глутатионредуктазы. *Б.* Активность G6PD. *В.* Активность 6-фосфоглюконат-дегидрогеназы. Нарушена только реакция, обозначенная номером 12 на рис. 4.3 (*Б*) [1030].

старых клеток популяции гемолиз прекращается, несмотря на продолжение приема примахина.

Этот факт вначале пытались объяснить действием иммунных механизмов. Позже была обнаружена нестабильность глутатиона в эритроцитах больных, чувствительных к примахину, при инкубации с ацетилфенилгидразином. В 1956 г. Карсон с сотрудниками обнаружили наследственное повреждение фермента, вызывающее эту нестабильность [1030]. Были изучены следующие реакции (см. также рис. 4.5):



Оказалось, что лимитирующим фактором является недостаточность G6PD, и гемолитические реакции у больных, чувствительных к примахину, связаны с недостаточностью именно этого фермента.

Довольно скоро выяснилось, что гемолитические реакции такого типа встречаются чаще у мужчин, чем у женщин. Было проведено количественное определение стабильности глутатиона, основанное на измерении его концентрации до и после инкубации эритроцитов с ацетилфенилгидразином ¹⁾. Кривые распределения, построенные для 144 обследованных американских негров, имели ярко выраженный бимодальный характер, причем в значительной части популяции уровень содержания глутатиона был крайне низким. В группе из 184 негритянок кривая смещена влево, а доля больных с низким содержанием глутатиона гораздо меньше, чем в группе мужчин. Отсюда следует, что данный признак сцеплен с X-хромосомой; низкое содержание глутатиона после инкубации с ацетилфенилгидразином характерно для гомозиготных женщин и гемизиготных мужчин, а промежуточное – для гетерозиготных женщин. Это предположение вскоре получило подтверждение в работах по анализу родословных [1034]. Сходные картины распределения были получены и при использовании методов прямого анализа ферментов в популяции. Заметим, что величины, полученные для гетерозигот, оказались средними между нормой и значением, характерным для гомозиготных больных (рис. 4.6).

¹⁾ Этот тест использовали для выявления чувствительности к примахину до обнаружения наследственных дефектов G6PD.

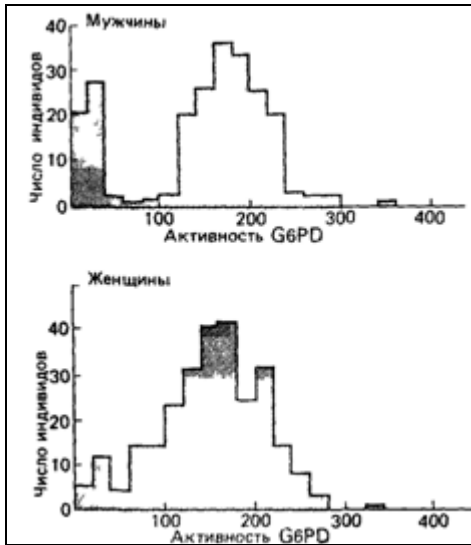


Рис. 4.6. Распределение активности **G6PD** у мужчин и женщин негритянского происхождения. Обратите внимание на практически полное разделение групп здоровых и больных мужчин [93]



Рис. 4.7. Электрофоретические формы **G6PD** у негритянского населения Мужчины гемизиготны и могут иметь генотип **A**, **A⁻** или **B**, женщины могут быть гомозиготными по любому из этих аллелей и гетерозиготными (возможны любые комбинации аллелей) Полосы, соответствующие аллелю **A⁻**, показаны тонкими линиями вследствие низкой активности фермента они слабо окрашиваются Генотип **BB** трудно отличить от **BA⁻**, как и **AA** – от **AA⁻** [93]

Различия между африканским и средиземноморским вариантами. Спустя несколько лет после открытия недостаточности глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы было обнаружено, что африканский и средиземноморский варианты различаются по степени тяжести детерминированной ими патологии у мужчин. Активность фермента в эритроцитах негров составляет 10-20% от нормы, тогда как у представителей средиземноморской популяции она никогда не бывает выше 5%. Изучение активности **G6PD** в лейкоцитах показало, что у негров она практически не отличается от нормы, а у жителей Средиземноморья в некоторых случаях существенно снижена.

Для выявления различных форм **G6PD** использовали метод электрофореза. Подвижность нормального фермента дикого типа обозначили как **B**. Среди негров с нормальной активностью **G6PD** у 20% был обнаружен более быстрый компонент: его обозначили как **A**. У негров с недостаточностью глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы этот фермент обладал подвижностью **A**-типа, а его активность была сильно снижена (фенотип **A⁻**). При недостаточности **G6PD**, характерной для средиземноморской популяции, электрофоретическая подвижность фермента близка к нормальной (фенотип **B⁻**). В популяции здоровых белых глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназа практически во всех случаях мигрирует в геле как нормальный компонент **B** (рис. 4.7).

Характеристика различных вариантов G6PD. В популяциях человека выявлен целый ряд редких типов **G6PD**. В связи с этим встал вопрос о необходимости стандартизации приемов их классификации Рекомендации группы специалистов в этой области были опубликованы Всемирной организацией здравоохранения в 1967 г. [996]. В соответствии с ними характеристика **G6PD** включает следующие аспекты:

- активность фермента;
- электрофоретическая подвижность в различных буферных системах;
- субстратная специфичность (константа Михаэлиса—Ментен) к глюкозо-6-фосфату, **NADP** и **NAD**;
- использование аналогов субстрата: 2-дезоксиглюкозо-6-фосфат, галактозо-6-фосфат и деамино-**NADP**. Аналоги субстрата обычно применяют для выявления тонких качественных различий в свойствах ферментов;
- термостабильность;
- зависимость активности фермента от

Таблица 4.4,А. Варианты аномалий глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы (см. также [133])	
Вариант	Примеры
Активность фермента увеличена	G6PD Hektoen
Активность фермента близка к нормальной	G6PD A ⁺ (распространена в тропической Африке)
Активность фермента несколько снижена (10-60% от нормы у гемизиготных мужчин); повышена чувствительность к окисляющим агентам; фавизм не наблюдается	G6PD A ⁻ (распространена в тропической Африке), G6PD Anant (Таиланд), G6PD Canton (Южный Китай)
Сильное нарушение активности фермента; гемолиз	G6PD (средиземноморский тип), G6PD
скомпенсирован, чувствительность к окисляющим агентам резко повышена, может наблюдаться фавизм	El Fayoum (Египет), G6PD Zahringen (Германия)
Сильное нарушение активности фермента и хронический гемолиз даже в отсутствие окисляющих агентов; несфероцитарная анемия	G6PD Albuquerque , G6PD Beanjon, G6PD Freiburg

Таблица 4.4,Б. Некоторые обычные варианты глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы				
Варианты	A ⁻	Med	Canton	Mahidol
Область распространения	Африка	Греция, Италия, Средиземноморье	Китай	Таиланд
Активность G6PD (%)	10-20%	0-5%	4-25%	5-16%
Гемолиз при инфекциях и при лечении лекарственными препаратами	+	+	+	+
Фавизм	?	+	+	?
Врожденная желтуха	редка	+	+	+
Падение гемоглобина при гемолизе (г/100 мл)	2-10	4-10	4-10	2-8
Увеличение активности G6PD в эритроцитах после гемолиза	+	минимальное	+[?]	+

Варианты фермента, характерные для разных популяций человека. На основании перечисленных выше параметров в настоящее время различают более 200 вариантов G6PD [1001] (см. также разд. 7.5.8). Их можно разделить на следующие группы (табл. ААА, ААБ):

- а) варианты с повышенной активностью фермента. Известно всего два G6PD Hektoen и G6PD Hartford;
- б) варианты с активностью, близкой к норме Один из них – упоминавшийся ранее вариант A⁺ – обнаруживается у 20-25% мужчин-негров в тропической Африке и у их американских потомков;
- в) варианты с умеренно сниженной активностью. Активность фермента у гемизиготных мужчин составляет от 10 до 50% от нормальной. Иногда обнаруживается чувствительность к лекарствам, вызывающим гемолитические реакции; кожных реакций нет;
- г) варианты с резко выраженной недостаточностью G6PD и умеренным компенсированием гемолитических реакций. Типичный представитель этой группы – средиземноморский вариант;
- д) варианты с резко выраженной недостаточностью фермента, сопровождаются хроническим гемолизом даже в

отсутствие окисляющих агентов. Такие варианты вызывают врожденную несфероцитарную гемолитическую анемию.

Приведенная здесь классификация учитывает не все важные особенности глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы, однако она весьма полезна как отправная точка для дальнейших исследований.

Углубленный биохимический и молекулярный анализ [1167; 1001; 1002]. Все исследованные случаи недостаточности по G6PD, для которых проводили анализ родословных, подтверждают сцепление гена, детерминирующего этот признак, с X-хромосомой. Весьма вероятно поэтому, что мутации, обуславливающие все изученные варианты, действительно принадлежат одному локусу и что по крайней мере для эритроцитов не существует другого локуса, кодирующего глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназу. Все известные на сегодняшний день варианты, по-видимому, обусловлены различными мутациями в одном структурном гене.

Активный фермент имеет молекулярную массу 120 кДа и представляет собой димер. Полипептидные цепи субъединиц состоят из 450 аминокислот: определена их последовательность [1368]. В результате построения пептидных карт после обработки трипсином (метод «отпечатков пальцев») выяснилось, что молекулярные нарушения по меньшей мере двух вариантов заключаются в замене всего одной аминокислоты: G6PD A⁺ отличается от G6PD B⁺ единственной заменой аспарагиновой кислоты на аспарагин, а в варианте G6PD Hektoen гистидин замещен на тирозин. Согласно генетическому коду, эти замены вполне могут быть связаны с точковыми заменами оснований в кодирующей цепи ДНК. Таким образом, генетический анализ был перенесен на уровень ДНК (разд. 3.6).

Ферментативная активность G6PD обнаружена в клетках большинства (возможно, и всех) тканей; оказалось, что тканеспецифичных форм изоферментов нет, и если имеется мутантная форма глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы, то обнаруживается она во всех тканях.

Важность изучения вариантов G6PD для понимания механизмов недостаточности ферментативных систем у человека. Система G6PD служит замечательной моделью, поскольку у мужчин с мутацией в X-хромосоме имеется продукт только мутантного гена. Напротив, у гетерозигот по аутосомным мутациям нормальный и измененный продукт представлены в соотношении 1:1, и, следовательно, обнаружить незначительные изменения физико-химических свойств продуктов мутантного гена достаточно сложно. G6PD обладает и некоторыми другими особенностями, позволяющими проводить генетический анализ гораздо более подробно, чем это возможно для большинства наследственных дефектов ферментативных систем человека.

С помощью этой модельной системы были установлены закономерности, общие для многих наследственных дефектов ферментов человека.

1. Использование широкого набора методов позволяет обнаружить большое количество мутантов, различающихся по ряду параметров. По-видимому, почти каждое вызванное мутацией изменение в структуре фермента влияет на его физиологические особенности.

2. Изменения фенотипа, вызванные мутациями, образуют непрерывный ряд от вариантов с практически неизменными биологическими функциями (их можно обнаружить лишь с помощью специальных методов) к тем, которые проявляются только в неблагоприятных условиях, и вплоть до вариантов, вызывающих развитие заболевания даже в отсутствие неблагоприятных факторов. Большинство мутаций безразлично для организма и не приводит к развитию болезни. Естественно, что мутации, вызывающие патологические симптомы, обнаруживаются с большей вероятностью, так как больных, страдающих гемолитической анемией, обследуют на предмет недостаточности какого-либо фермента гораздо чаще, чем здоровых людей.

3. Большинство вариантов наследственных нарушений ферментов встречается сравнительно редко. Однако в отдельных популяциях какой-то аллель может

оказаться распространенным (табл. 4.4); причины этого явления обсуждаются в разд. 6.2.1.6.

4. Практически все мутационные варианты обеспечивают остаточную активность фермента, и, если принять во внимание качественные различия в свойствах ферментов, все типы нарушений можно объяснить структурными мутациями в гене, который удалось точно локализовать в Х-хромосоме (разд. 3.4.3).

Перечисленные выводы вполне справедливы для большинства или даже для всех наследственных дефектов ферментативных систем человека. Последний вывод связан с локализацией гена G6PD в Х-хромосоме. Известно, что в большинстве клеток гетерозиготных женщин у Х-сцепленных генов функционально активен только один из двух аллелей. Это обстоятельство может оказаться полезным для решения проблем, связанных с ростом опухолей и клеточной дифференцировкой. Так, например, было обнаружено, что в клетках лейомиомы матки у женщин, гетерозиготных по двум электрофоретическим вариантам G6PD, присутствует только один тип фермента [1002]. Это можно объяснить происхождением всех клеток опухоли от одной клетки. Подобные наблюдения, позволяющие предполагать моноклональное происхождение опухолей, имеются для большинства неопластических процессов (см. разд. 5.1.6).

Другая проблема связана с количеством стволовых кроветворных клеток, которые дают начало популяции эритроцитов. Если женщина гетерозиготна и имеет, например, аллели G6PD A^+ и B^+ , а инактивация Х-хромосомы происходит случайным образом, то относительное количество стволовых клеток с функционирующими генами A^+ и B^+ описывается биномиальным распределением: $(1/2A^+ + 1/2B^+)^n$, где n — количество стволовых клеток. Следовательно, вероятность того, что у гетерозиготы все эритроциты будут A^+ (или все B^+), составляет $(1/2)^n$. На практике для использования этого принципа требуется количественная оценка соотношения А- и В-форм фермента в исследуемой ткани. Предварительные данные свидетельствуют о том, что количество стволовых кроветворных клеток в момент инактивации Х-хромосомы, по-видимому, невелико (на 12-16-й день развития эмбриона всего около 5000 клеток; разд. 2.2.3.3). Затем их количество возрастает, но не более чем в 3-5 раз.

Этот метод основывается на том допущении, что отбора клеток с одной из форм G6PD не происходит. Однако имеются некоторые данные, указывающие на наличие селективного преимущества клеток с нормальным вариантом фермента у гетерозигот по гену G6PD. В такой ситуации оценка пула эмбриональных или стволовых клеток становится менее надежной.

Фенокопия наследственного дефекта фермента: недостаточность глутатионредуктазы [1077; 1078]. С гексозомонофосфатным циклом тесно связана реакция восстановления GSSG до GSH, которая катализируется глутатионредуктазой (рис. 4.3). В литературе прежних лет описан ряд родословных с мнимыми дефектами этого фермента; в таких семьях были обнаружены разнообразные гематологические отклонения. Однако результаты анализа родословных в действительности не согласуются с предположением об обычном дефекте глутатионредуктазы. Позже было показано, что недостаточность этого фермента почти всегда связана с отсутствием его кофермента — флавинадениндинуклеотида, что в свою очередь объясняется низким содержанием в пищевых продуктах рибофлавина (витамина B_2) [997]. После введения рибофлавина активность глутатионредуктазы нормализуется в течение нескольких дней.

Установлено, что это патологическое состояние часто встречается на севере Таиланда, что обусловлено низким содержанием рибофлавина в традиционной диете. Таким образом, не всякое отклонение в работе фермента является наследственным, даже если оно распространено в определенной популяции.

В литературе описаны истинные генетически обусловленные дефекты глутатионредуктазы. У человека известны и другие наследственные отклонения, связанные с ненормально высокой потребностью в

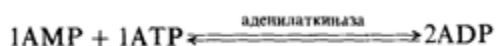
определенных коферментах, которые необходимо в таких случаях добавлять к пище в виде витаминов. В качестве примера можно привести наследуемый сцепленно с X-хромосомой рахит, устойчивый к витамину D [958], и зависимость от пиридоксала, сопровождающаяся эпилептическими припадками (см. также разд. 3.1.4). Возможно, в будущем будет обнаружена недостаточность по глутатионредуктазе, обусловленная наследственной недостаточностью по рибофлавинову.

Имитация генетического дефекта воздействием извне называется *фенокопией*. Этот термин был предложен в 1935 г. Гольдшмидтом [1106]. Согласно определению, фенокопия - это воспроизведение генетически детерминированного признака под действием внешних факторов. Вызывая тепловой шок у дрозофилы дикого типа на разных стадиях ее развития, Гольдшмидту удалось получить многочисленные фенотипические отклонения, подобные вариантам, возникающим обычно в результате мутаций.

Эксперименты с фенокопиями были выполнены на многих видах, они сыграли важную роль в развитии представлений о механизмах нормального эмбрионального развития и возникновения уродств. Однако их значение было переоценено. Тем не менее при нарушениях метаболизма у человека возможность фенокопии всегда следует проверить, поскольку в таких случаях бывает возможна эффективная терапия.

Среди метаболических нарушений человека частой фенокопией является гипотиреоз, обусловленный недостатком неорганического йодида, – патологическое состояние, распространенное в альпийских областях Европы и в некоторых других районах мира. В этом случае недостаточность жизненно необходимого неорганического иона приводит к тем же последствиям, что и нарушение синтеза тиреоидного гормона, которое наблюдается в некоторых семьях (рис. 4.24). Тем не менее, хотя клинически эти случаи близки, с точки зрения патофизиологии, между ними нет ничего общего.

Нарушения метаболизма нуклеотидов. В эритроцитах необходимый уровень АТР поддерживается благодаря реакциям гликолиза (рис. 4.3). Известна и другая реакция, ведущая к образованию АТР:



Затем ADP в ходе гликолиза превращается в АТР. Одна из энергоемких функций клетки, для которой необходим АТР, это транспорт катионов. Он непосредственно связан с ферментативной активностью АТРаза. Этот фермент локализован в клеточной мембране и присутствует в двух фракциях, которые могут активироваться ионами K^+ и Na^+ или Mg^{++} . Он гидролизует АТР до АМР. Недостаточность АТРаза также может вызывать несфероцитарную гемолитическую анемию (НСГА). Описан ряд случаев, несколько различающихся по симптомам и гематологическим характеристикам [1046; 1118; 1120; 1203]. Недостаточность по аденилаткиназе (АК) (20160) зафиксирована у тринадцатилетнего мальчика, страдающего НСГА. Активность АК в эритроцитах составляла 1-13% нормальной. Уровень АТР и ADP в эритроцитах оказался нормальным, а уровень АМР повышен. Дефект наследовался как аутосомно-рецессивный признак. Недостаточность по пиримидин^{5'}-нуклеотидазе была впервые обнаружена у больного, страдающего хроническим гемолизом средней тяжести [1333], а несколько позже у ряда других больных [1148].

Зрелые эритроциты обладают способностью синтезировать NAD в больших количествах из никотиновой кислоты, АТР и 5-фосфо-D-рибозо-1-пирофосфата. Для этой реакции требуется нормальная работа гликолитических ферментов. Гексозомонофосфатный цикл, по-видимому, не является существенным источником рибозофосфата, поскольку в клетках, дефектных по G6PD, содержание NAD соответствует норме. Для синтеза NADP из NAD нужна киназа. Возможно, сравнительно небольшое число установленных нарушений метаболизма нуклеотидов не отражает действительной ситуа-

ции, оно может объясняться сложностью методов определения активности ферментов.

Изучение ферментов, не функционирующих в клетках крови, а также соответствующих дефектов связано с серьезными трудностями. Многие такие ферменты удается обнаружить в фибробластах, выращенных в культуре после биопсии кожи. В отличие от эритроцитов фибробласты содержат ядра. Они способны делиться и осуществлять все стадии синтеза белков и потому значительно полнее, чем эритроциты, обеспечены ферментами. Фибробласты лишены лишь некоторых ферментов, характерных для специализированных групп клеток, например клеток печени (в частности, в фибробластах нет фенилаланингидроксилазы, которая является дефектной при фенилкетонурии). В фибробластах выявляются нарушения ферментов, катализирующих многие различные метаболические пути. Именно поэтому изучение активности ферментов в фибробластах внесло существенный вклад в наши знания о дефектах ферментов.

Ниже мы остановимся на одной группе заболеваний, которая также позволяет сформулировать ряд более общих выводов о дефектах ферментов у человека. Это мукополисахаридозы, которые относят к обширной группе патологических состояний, обусловленных нарушением различных ферментов лизосом, а также - сфинголипидозы и муколипидозы.

4.2.2.3 Мукополисахаридозы

Недостаточность ферментов лизосом. Ферменты или ферментные системы обычно локализируются в одном определенном районе клетки. Например, ферменты системы транспорта электронов и окислительного фосфорилирования ADP, как и другие ферменты, окисляющие пируват, жирные кислоты и некоторые аминокислоты, локализируются в митохондриях. Многие гидролитические ферменты сконцентрированы в лизосомах [1128]. Если в результате разрушения мембраны лизосомы эти ферменты выходят в цитоплазму, вся клетка подвергается самоперевариванию и гибнет. В норме процесс переваривания осуществляется внутри лизосом, в которых расщепляются не только дефектные компоненты клетки и материал межклеточной соединительной ткани, но и внешний материал, поглощаемый клеткой. К клеточным элементам, которые подвергаются деградации в лизосомах, относятся мукополисахариды, муколипиды и сфинголипиды (рис. 4.8). В настоящее время описаны дефекты многих ферментов, участвующих в деградации [1029, 1240, 1241].

Метаболические пути, нарушения которых вызывают дефект эритроцитов и, следовательно, гемолитическую анемию, уже известны биохимикам, и анализ недостаточности ферментов заключался в изучении отдельных этапов этих реакций. В случае мукополисахаридозов ситуация была совершенно иной. Вначале были изучены наследственные заболевания, и только потом анализ дефектов позволил установить последовательность ферментативных реакций. Вот почему мы начнем с описания этих заболеваний, а затем перейдем к биохимическим нарушениям, дефектам ферментов и реконструкции нормального метаболического пути. Этот пример показывает, каким образом наследственные заболевания (фактически эксперименты, поставленные самой природой) помогают понять нормальную физиологию и биохимию.

Мукополисахаридозы: клиническая картина. Мукополисахаридозы - группа редких заболеваний, для которых характерно сочетание многих, зачастую тяжелых симптомов, от нарушений скелета или системы кровообращения до расстройств умственной деятельности. Клинические симптомы являются результатом накопления в разных тканях избыточных сульфатированных полисахаридов.

В табл. 4.5 приведена классификация, а также главные результаты клинических исследований. За исключением мукополисахаридоза II типа (синдром Хантера), все эти дефекты наследуются как аутосомнорецессивные признаки. Клинические симптомы варьируют от сравнительно легких до крайне тяжелых. Описаны две формы

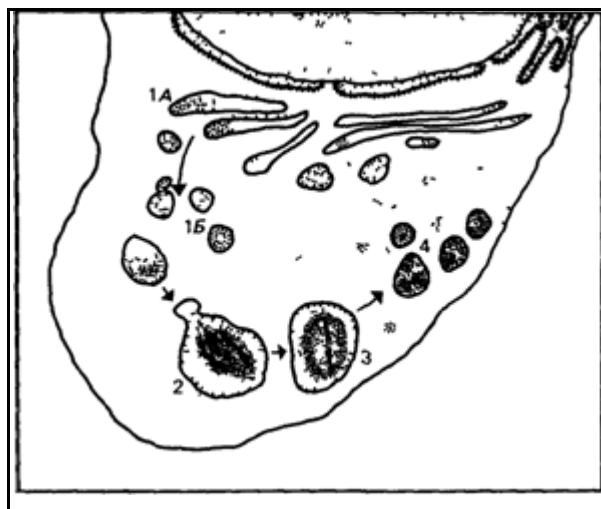


Рис. 4.8. Схематическое изображение функционального цикла нормальной лизосомы. 1А Аппарат Гольджи, 1Б Первичная лизосома, 2 Фаголизосома, 3 Вторичная лизосома, 4 Остаточное тело (Courtesy of Dr Buselmaier)

синдрома Хантера (30990), которые удается различить у детей старше четырех лет тяжелая «ювенильная» форма, при которой смерть наступает до половой зрелости, и легкая «поздняя» форма, при которой умственная отсталость почти или полностью отсутствует, а прогноз является гораздо более благоприятным. Заболевание VI типа (синдром Марото—Лами) (25320) отличается от заболевания I типа (синдром Хурлера) тем, что умственные способности пациентов нормальные и менее выражены аномалии лица. В этом случае также наблюдаются два различных подтипа – один с характерным достаточно быстрым течением и тяжелой клинической картиной и другой, прогрессирующий относительно медленно. При обоих типах заболевания возможна смерть в возрасте 10-30 лет от нарушений в работе сердца. Обнаружены два подтипа IV типа заболевания (синдром Моркио) IVA с тяжелой клинической картиной и IVB, который протекает легче.

Отложение запасных веществ в лизосомах и выделение с мочой. Гистохимические исследования показали, что эти патологические состояния вызваны нарушениями отложения запасных веществ. Во многих клетках, в том числе в фибробластах, клетках печени, клетках Купфера, ретикулярных клетках селезенки и лимфатических узлов, лейкоцитах, эпителиальных клетках почечных клубочков и нервных клетках наблюдаются вакуолизация и увеличение размеров в результате отложения больших количеств запасного материала. Установлено, что главными запасными веществами являются сульфатированные гликозаминогликаны.

Электронно-микроскопические исследования позволили прояснить ситуацию. Было установлено, что запасные соединения откладываются в вакуолях округлой формы, напоминающих лизосомы, которые можно визуализировать у экспериментальных животных после введения им неметаболизируемых соединений. Поэтому был сделан вывод, что эти вакуоли представляют собой лизосомы, наполненные неперевавшими или лишь частично расщепленными гликозаминогликанами [1129]. Это подтвердилось и для других тканей. Хотя дефекты метаболизма оставались неисследованными, нарушения отнесли к лизосомным болезням, так как они сопровождались явной перегрузкой системы лизосом. Важнейшая функция лизосом заключается в гидролитическом расщеплении макромолекул, поэтому представлялось вероятным, что отложение избыточных запасных веществ связано с недостаточностью гидролитических ферментов лизосом. Другим доказательством нарушения метаболизма гликозаминогликанов было избыточное выделение этих соединений с мочой. Табл. 4.6 дает некоторое

Таблица 4.5. Основные клинические признаки мукополисахаридозов [1029; 1312]

Мукополисахаридоз	Тип ¹⁾	Название	Умственная или двигательная отсталость	Задержка роста	Грубые складки на лице	Дисплазия костей	Общие контрактуры	Гепатоспленомегалия	Помутнение хрусталика	Характер наследования
ИH		Синдром Хурлера (1)	+++	++	+++	+++	++	++	+	Аутосомнорецессивный
IS		Синдром Шайе (1)	—	—	±	+	+	+	+	
ИH/S		Компаунд по синдромам Хурлера и Шайе O)	+	+	++	++	++	+	+	
IIA		Тяжелый синдром Хантера (2)	+	+	+	++	+	+	+	X-сцепленный, рецессивный
IIB		Легкий синдром Хантера (2)	+	+	+	++	+	+		
IIIA		Синдром Санфилиппо А (3A)	+++		+	+	±	++	—	Аутосомнорецессивный
IIIB		Синдром Санфилиппо В(3B)	+++	—	+	+	+	++	—	
IIIC		Синдром Санфилиппо С (3C)	+++	—	+	+	+	++	—	
IID		Синдром Санфилиппо D (3D)	+++	—	+	+	±	++	—	
IVA		Синдром Моркио А (4)	—	+++	+	+++	+	+	+	Аутосомнорецессивный
IVB		Синдром Моркио В (4)	—	++	+	++	+	+	+	
V			резервный номер							
IVA		Классическая форма синдрома Марото — Лами (6)	—	++	++	++	+	+	+	Аутосомнорецессивный
VIB		Легкая форма синдрома Марото — Лами (6)	—	+	+	+	+	+	+	
VII		Скрытый мукополисахаридоз (7)	+	±	±	+	—	++	+	Аутосомнорецессивный

" Классификация Мак-Кьюсика (1972) с дополнениями. - отсутствует; + иногда наблюдается; + в легкой форме; ++ средней тяжести; +++ в тяжелой форме. В скобках приведены обозначения генетических блоков, соответствующие рис. 4.11 и 4.12.

Таблица 4.6. Выделение сульфатированных гликозаминогликанов с мочой при мукополисахаридозах [1029]	
Мукополисахаридоз	Выделяющийся гликозаминогликан
IH и IS	Дерматансульфат и гепарансульфат в соотношении 3:1
II	Дерматансульфат и гепарансульфат в соотношении 1:1
IIIA, IIIB, IIIC, IIID	Гепарансульфат
IVA, IVB	Кератансульфат и хондроитин6-сульфат
VI	Дерматансульфат, иногда также некоторое количество гепарансульфата (?)
VII	Дерматансульфат и, возможно, гепарансульфат

представление о выделении разнообразных гликозаминогликанов при различных синдромах. Природа выделяющихся веществ отражает характер метаболических нарушений (табл. 4.7).

Биохимия сульфатированных гликозаминогликанов. Сульфатированные гликозаминогликаны представляют собой сложные гетеросахариды, состоящие из длинных полисахаридных цепей, ковалентно связанных с белковым кором. Полисахаридные цепи дерматансульфата, гепарансульфата, хондроитин-4- и хондроитин-6-сульфата построены из чередующихся остатков глюкуроновой кислоты и сульфатированного гексозамина. Кератансульфат отличается от других гликозаминогликанов тем, что вместо глюкуроновой кислоты содержит остатки галактозы. Полимерные цепи насчитывают до 100 остатков. Они связаны с особым участком в молекуле специфического белка. К одной молекуле полипептида могут быть присоединены несколько полисахаридных цепей. Такие протеогликаны

Таблица 4.7. Дефекты метаболизма при мукополисахаридозах [1029]			
Мукополисахаридоз ¹⁾		Главное накапливающееся вещество	Дефектный фермент
IH	Синдром Хурлера	Дерматансульфат и гепарансульфат	α-L-идурунидаза
IS	Синдром Шайе		— »—
IH/S	Компаунд по синдромам Хурлера и Шайе		-»-
IIA	Тяжелая форма синдрома Хантера	Дерматансульфат и гепарансульфат	Идуонатсульфатаза
IIB	Легкая форма синдрома Хантера	-»-	— » —
IIIA	Синдром Санфилиппо А	Гепарансульфат	Гепаран-N-сульфатаза
IIIB	Синдром Санфилиппо В		α-N-ацетилглюкозаминидаза
IIIC	Синдром Санфилиппо С		α-глюкозаминидаза (?)
IIID	Синдром Санфилиппо D		N-ацетилглюкозамин-6-сульфатаза
	Синдром Моркио А	Кератансульфат	N-ацетилгалактозамин-6-сульфатаза
IVB	Синдром Моркио В		Р-галактозидаза
VIA	Классическая форма синдрома Марото—Лами	Дерматансульфат	M-ацетилгалактозамин-4-сульфатаза (арилсульфатаза В)
VIB	Легкая форма синдрома Марото—Лами		— » —
VII	Скрытый мукополисахаридоз	Дерматансульфат и гепарансульфат	β-глюкуронидаза

¹⁾ Классификация Мак-Кьюсика (1972) с дополнениями.

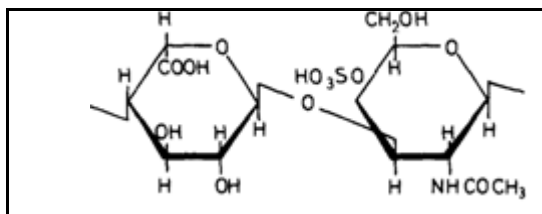


Рис. 4.9. Димер L-идурановой кислоты и N-ацетилгалактозамин-4-сульфата в дерматансульфате.

способны образовывать и более крупные комплексы благодаря нековалентным связям. Содержание различных Сахаров в полисахаридных цепях и степень их сульфатирования могут значительно варьировать.

Например, большая часть полисахаридной цепи дерматансульфата построена из повторяющихся димеров Лидурановой кислоты и N-ацетил-галактозамин-4-сульфата (рис. 4.9). Другие гликозаминогликаны имеют сходное строение. Они являются компонентами соединительной ткани и основного вещества, заполняющего пространство между клетками.

У больных мукополисахаридозами основу структуры гликозаминогликанов соединительной ткани составляют те же крупные протеогликановые образования, которые обнаруживаются и в норме. Отсюда следует, что их синтез не нарушается в результате дефекта фермента. В тканях, где наблюдается аномальное отложение гликозаминогликанов, а также в моче эти молекулы варьируют по длине и имеют меньшие размеры. Это позволяет предполагать, что в клетках происходит расщепление максимально возможного числа связей перед тем, как процесс блокируется из-за дефекта специфического фермента, необходимого для отщепления очередного остатка.

Ферментативные дефекты. Наиболее прямым подходом к исследованию нарушений метаболизма служит поиск соединений, метаболизм которых осуществляется неправильно, и измерение активности ферментов, участвующих в его превращении. Именно таким способом были изучены уже рассмотренные дефекты эритроцитов. Исследования же мукополисахаридозов были затруднены, поскольку не были известны ни детали химической структуры соответствующих гликозаминогликанов, ни ферменты, осуществляющие в норме их катаболизм. Систематическое изучение стало возможным лишь тогда, когда выяснилось, что в культурах фибробластов из кожи больных с синдромами Хантера или Хурлера накапливаются гликозаминогликаны. Важнейшим этапом следует считать доказательство того, что *in vitro* (в культуре) накопление может быть уменьшено до нормы под действием корректирующего фактора из тканевой жидкости. Впервые это было показано в 1968 г. Неуфельдом и др. [1240]. На основании различий в типе наследования – синдром Хурлера передается потомкам как аутосомнорецессивный признак, а синдром Хантера сцеплен с X-хромосомой - можно было предположить, что эти заболевания генетически различны, т. е. мутации затрагивают разные реакции расщепления мукополисахаридов. Если бы можно было осуществить слияние ядер клеток, взятых у больного с синдромом Хурлера и у больного с синдромом Хантера (как это было сделано для многих различных типов клеток в работах по генетике соматических клеток), это должно было бы привести к взаимной комплементации дефектов. В ходе решения этой задачи выяснилось, что проблема значительно проще и в слиянии клеток нет необходимости. Для компенсации дефектов, присущих синдромам Хурлера и Хантера, достаточно смешать соответствующие клетки в культуре или даже к клеткам одного генотипа добавив культуральную жидкость, в которой росли клетки другого генотипа. Накопление мукополисахаридов измеряли по включению $^{35}\text{SO}_4$. На рис. 4.10 показаны результаты этих опытов. Компенсация одного из дефектов (синдрома Хурлера) достигалась с использованием как нормальных клеток, так и клеток с другим дефектом (синдромом Хантера) [1086].

В последующие годы подобные эксперименты были выполнены и для других клинических типов, а обнаруженные кор-

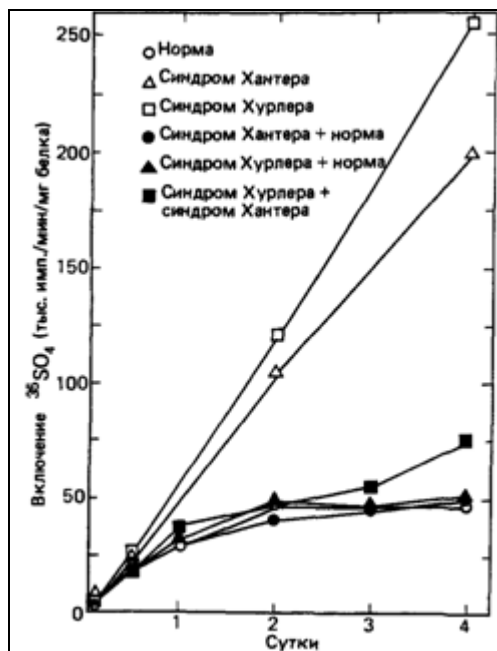


Рис. 4.50. Аномальное включение $^{35}\text{SO}_4$ в клетки больных с синдромами Хурлера и Хантера. При смешивании нормальных клеток с клетками больных одним из синдромов включение $^{35}\text{SO}_4$ уменьшается. Такой же результат можно наблюдать при смешивании клеток пациентов, страдающих разными синдромами. Уровень включения при этом близок к норме [1086].

ректирующие факторы охарактеризованы биохимически. Оказалось, что фибробласты больных с синдромом Санфилиппо образуют по меньшей мере две группы, А и В, в которых дефектными являются различные факторы, поэтому клетки групп А и В способны к взаимной коррекции. Таким образом, синдром Санфилиппо генетически неоднороден. С другой стороны, несмотря на глубокие различия в клинической картине синдромов Хурлера и Шайе, фибробласты, взятые у соответствующих больных, дефектны по одному и тому же фактору.

Вскоре было показано, что все корректирующие факторы представляют собой специфические белки. Более подробный анализ показал, что это лизосомные ферменты, участвующие в расщеплении сульфатированных гликозаминогликанов. Важную роль в выяснении механизмов подобных дефектов сыграли и современные представления о структуре этих соединений, и анализ функций корректирующих факторов, и прямые эксперименты по идентификации поврежденных ферментов.

Предполагалось, что при этих нарушениях дефектными являются ферменты, специфически расщепляющие различные типы связей в молекулах гликозаминогликанов. Предсказания на основе этой гипотезы подтверждались экспериментально. Например, при инкубации корректирующего фактора Санфилиппо А (25290) *in vitro* с гепарансульфатом, выделенным из фибробластов больного с синдромом Санфилиппо и меченным $^{35}\text{SO}_4$, наблюдалось освобождение неорганического сульфата. Дальнейшие исследования показали, что фактор действует на N-сульфатную связь гепарансульфата [1175]. При инкубации *in vitro* с гепарансульфатом или дерматансульфатом, полученными из фибробластов больного с синдромом Хантера и меченными $^{35}\text{SO}_4$, корректирующий фактор Хантера также катализирует выделение неорганического сульфата. Ген, детерминирующий мукополисахаридоз формы Хантера, сцеплен с X-хромосомой, поэтому соответствующий дефект фермента должен отличаться от дефекта при синдроме Санфилиппо А. Поскольку общим свойством обоих гликозаминогликанов является случайное распределение сульфатированных остатков идуроновой кислоты, было выдвинуто предположение, что корректирующий фактор Хантера может быть сульфатазой. Это предположение подтвердилось в опытах с искусственным субстратом.

Другой подход к изучению природы ферментативного блока заключается в определении концевых остатков полисахаридных цепей, которые накапливаются при заболевании. Например, было показано, что при синдроме Хантера концевой остаток накапливающегося дерматансульфата представляет собой сульфатированный остаток идуроновой кислоты. Это хорошо согласовывалось с предположением о дефекте сульфатазы, на что указывали опыты с искусственным субстратом. Был сделан вывод, что в норме гликозаминогликаны расщепляются поэтапно и этот процесс

останавливается, если отсутствует фермент, ответственный за очередной этап. Последовательность моносахаридных остатков в цепи варьирует; такой характер расщепления делает объяснимым тот факт, что накапливающиеся при этих заболеваниях полисахаридные цепи имеют разную длину.

Эти же методы использовали для изучения дефектов других ферментов. Во всех случаях концевые остатки содержали связь, для которой не было соответствующего фермента. Природа ферментативных дефектов позволила объяснить и другое свойство накапливающегося материала: единичное нарушение приводит к накоплению химически неидентичных молекул. Например, у больных с синдромом Хурлера накапливается как дерматансульфат, так и гепарансульфат. Оба соединения содержат остатки α-L-идуроновой кислоты. Поэтому дефект фермента, который строго специфичен в отношении этого остатка, вызывает накопление обоих типов содержащих его полисахаридов.

Обобщенные результаты ряда исследований представлены для хондроитина и дерматансульфата на рис. 4.11, а для гепарансульфата и кератансульфата на рис. 4.12. Указаны ферменты, для которых установлены генетические дефекты, перечисленные в табл. 4.7.

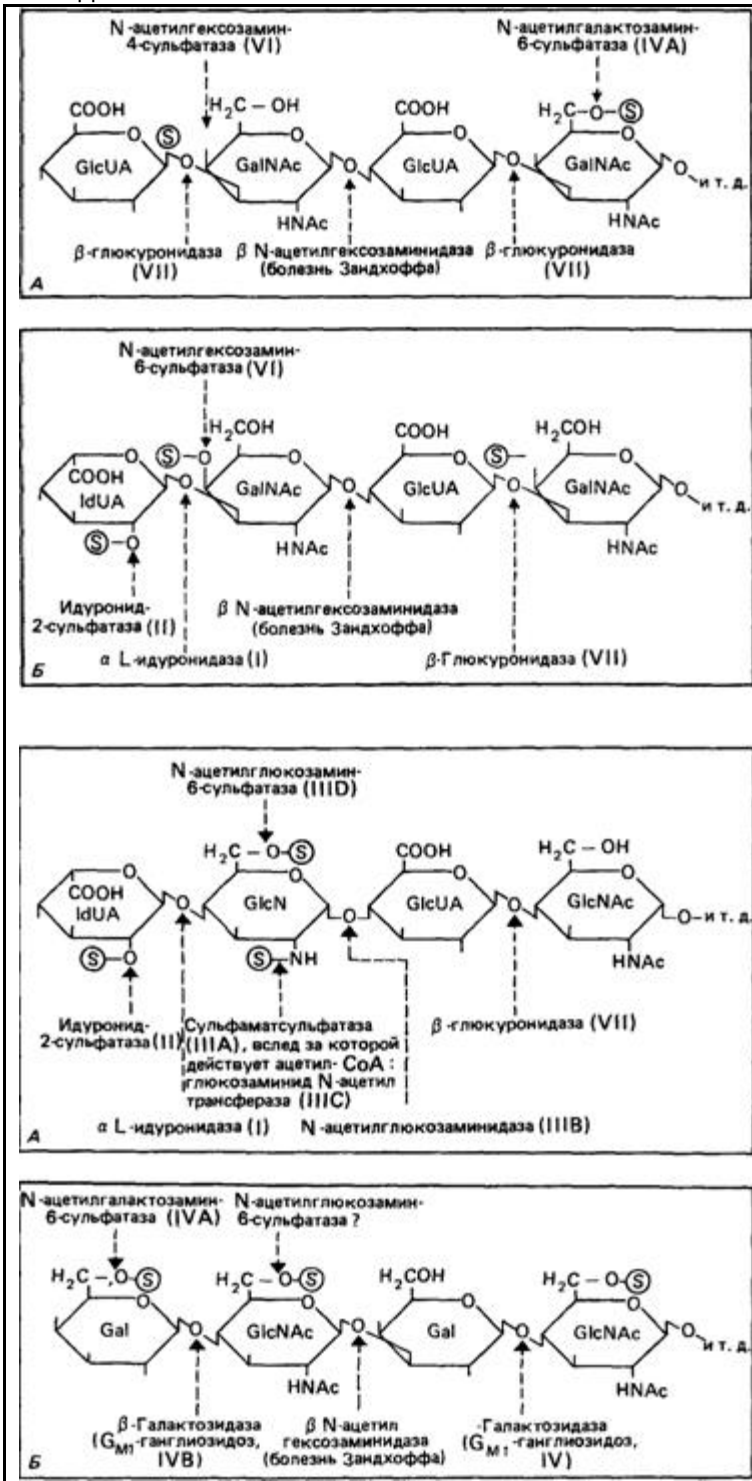
Нарушения ферментов и генетическая гетерогенность. В разд. 3.3.5 на примере мышечной дистрофии продемонстрирован анализ генетической гетерогенности с использованием генетических данных (различных типов наследования), а также клинических данных (возраст начала заболевания, характер проявления, тяжесть симптомов и др.). При изучении мукополисахаридозов такой анализ продемонстрировал выраженную межсемейную вариабельность всех этих показателей, между тем внутри каждой семьи проявления были обычно сходными. Поэтому казалось логичным выделить различные генетические типы, что и было сделано еще до исследования ферментативных нарушений. Интересно, как эта классификация, основанная на косвенных данных по изучению фенотипа, согласуется с прямыми данными, полученными при анализе ферментативных нарушений?

В целом соответствие оказалось вполне удовлетворительным (табл. 4.5 и 4.7). Однако имеются два исключения.

1. Согласно клиническим данным, синдром Санфилиппо следует рассматривать как единое заболевание. Было показано, однако, что он может быть обусловлен четырьмя различными ферментативными дефектами. Такая ситуация характерна для многих дефектов метаболизма. Нарушения различных реакций одного и того же пути часто приводят к одинаковой клинической картине. Например, различные дефекты гликолиза вызывают несфероцитарную гемолитическую анемию (разд. 4.2.2.2).

2. С другой стороны, синдромы Хурлера и Шайе сильно различаются: последний протекает значительно легче. Тем не менее оказалось, что в основе обоих заболеваний нарушение одного и того же фермента. Как объяснить этот факт? Весьма возможно, что данный фермент состоит из нескольких полипептидных цепей. Мутации, вызывающие синдромы Хурлера и Шайе, могут затрагивать различные цепи и детерминировать разный уровень остаточной активности фермента. До сих пор, однако, не найдено никаких различий в остаточной активности α-L-идуронидазы в фибробластах больных с синдромами Хурлера и Шайе. Можно предположить и другие механизмы, исходя, например, из результатов генетического анализа гемоглобинов (разд. 4.3).

Изучение генетической гетерогенности мукополисахаридозов еще не проводилось. Однако нет оснований предполагать, что в этом случае различия между мутациями окажутся менее явными, чем те, которые обнаружены для G6PD. Мутантные аллели, которые несет данный, конкретный больной, страдающий аутосомно-рецессивным заболеванием, могут оказаться идентичными. Так бывает, если родители являются родственниками, например двоюродными, или в генетически изолированных популяциях (разд. 6.4.1). Однако в большинстве других случаев мутации, обнаруживаемые у больного,



имеют различное происхождение, и поэтому маловероятно, что они идентичны. Если термин «гомозигота» использовать строго для обозначения индивидов с абсолютно идентичными мутациями, многих или даже большинство больных рецессивными заболеваниями следует признать негомозиготными. Их можно назвать «составными гетерозиготами» (рис. 3.12). Описан ряд случаев, по клиническим проявлениям промежуточных между синдромами Хурлера и Шайе [1312]. Было показано, что в фибробластах отсутствует корректирующий фактор Хурлера. Некоторые из таких больных действительно могли быть составными гетерозиготами с аллелями Хурлера и Шайе. Однако по меньшей мере в четырех случаях родители больных были родственниками. Возможно существование и третьего аллеля с промежуточным фенотипическим проявлением, поскольку в семьях, где происходит сегрегация двух различных аллелей, заболевание нельзя объяснить последствиями близкородственных браков.

Дифференциальная диагностика и лечение мукополисахаридозов. Если на основании клинических данных подозревается мукополисахаридоз, предполагаемый диагноз должен быть подтвержден обнаружением в моче избыточных сульфатированных гликозаминогликанов. Для этого в настоящее время разработаны соответствующие методы [1312]. Окончательный диагноз, однако, требует выявления дефектного фермента в культуре фибробластов, в лейкоцитах или, в случае некоторых ферментов, в сыворотке [1029]. Если ген экспрессируется в клетках амниотической жидкости, возможна и пренатальная диагностика (разд. 9.1.1). В этом случае либо измеряют накопление радиоактивных гликозаминогликанов, либо определяют природу дефекта фермента. Однако, поскольку количество амниотических клеток, которые удается культивировать, ограничено, оказывается возможным определить активность лишь нескольких ферментов. Вот почему пренатальной диагностике должно предшествовать скрупулезное энзимологическое исследование больного sibsa. Такой предварительный анализ позволяет измерять в клетках амниотической жидкости активность только того фермента, который оказывается дефектным у этого sibsa.

Известно, что при определенных обстоятельствах ферменты могут поглощаться дефектными клетками, что приводит к коррекции дефекта. Этот факт свидетельствует о возможности ферментной терапии. Однако до сих пор не удавалось получить достаточно очищенных ферментов, а переливания больших количеств лейкоцитов или сыворотки приводили лишь к незначительному улучшению, в большинстве же случаев результаты были сомнительными. Поглощение клеткой лизосомного фермента является высокоспецифичным процессом, в котором участвует определенный маркерный участок, распознаваемый в полипептидной молекуле фермента; он может быть разным для разных тканей [1240]. Тем не менее этот подход представляется многообещающим.

Дефект маркера для распознавания лизосомных гидролаз [1242]. В 1967 г. Де Марс и Лерой обнаружили «странные» клетки в культуре фибробластов кожи, взятых у

больного с предполагаемым синдромом Хурлера. Эти клетки имели плотные включения, выявляемые с помощью фазово-контрастной микроскопии и содержащие кислую фосфатазу. Заболевание назвали I-клеточной болезнью (от английского inclusion-включение). По клиническому проявлению она напоминает синдром Хурлера, но протекает тяжелее и наследуется как аутосомно-рецессивный признак. Оказалось, что фибробласты таких больных дефектны по Р-гексозаминидазе, арилсульфатазе А, β -глюкуронидазе, в то же время в культуральной жидкости перечисленные ферменты присутствуют в повышенной концентрации. Чтобы объяснить этот факт, было высказано предположение, что фибробласты больных имеют дефектную клеточную мембрану, однако впоследствии оказалось, что *in vitro* лизосомы клеток больных поглощают и накапливают нормальные ферменты с нормальной скоростью. В то же время гидролазы из I-клеток не поглощаются нормальными клетками. Следовательно, изменены сами молекулы этих ферментов. Было установлено, что они лишены маркера, необходимого для распознавания при эндоцитозе, т. е. маннозо-6-фосфата. В норме остатки маннозо-6-фосфата присоединяются к ферменту после завершения его синтеза. Они служат сигналом, позволяющим ферменту связываться с рецептором маннозо-6-фосфата, который обеспечивает транспорт лизосомных ферментов в лизосомы, где происходит их активация. В результате нарушения какого-то фермента, участвующего в процессинге лизосомных ферментов, большинство их при I-клеточной болезни лишены маннозо-6-фосфата. Это приводит к тому, что ферменты из клеток секретируются в плазму, а не транспортируются по рецептор-зависимому пути в лизосомы (рис 4 13). Множественные клинические симптомы I-клеточной болезни можно объяснить одним дефектом процессинга, при котором нарушается присоединение к ферментам маркера - маннозо-6-фосфата.

Поскольку участок узнавания является общим для ряда ферментов, I-клеточная болезнь служит примером патологического состояния, при котором дефект одного гена приводит к недостаточности нескольких ферментов. Подобные множественные эффекты могут иметь и другие причины.

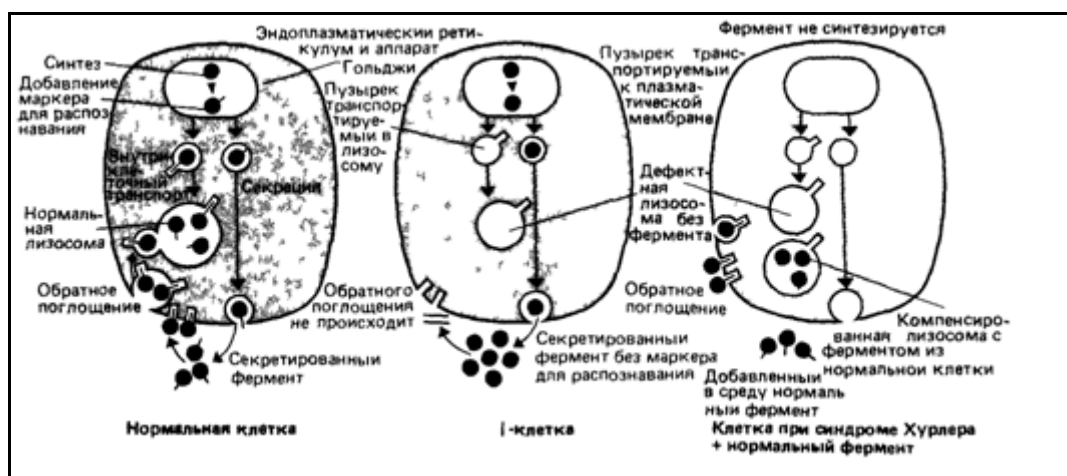
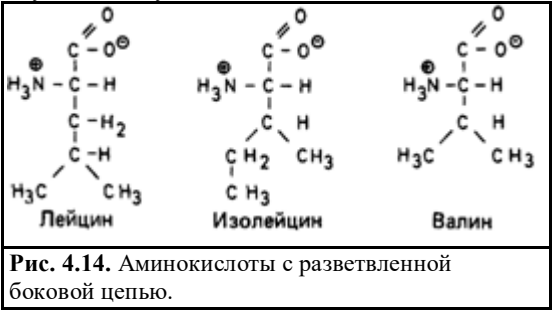


Рис. 4.13. Схематическое изображение цикла секреции и обратного поглощения гидролитических ферментов лизосом нормальными и мутантными клетками, растущими в культуре. Специфические рецепторные белки, расположенные на поверхности плазматической мембраны всех трех клеток, позволяют им поглощать и транспортировать в лизосомы гидролитические ферменты. Клетки при синдроме Хурлера не способны синтезировать α -L-идуронидазу, однако этот дефект можно компенсировать добавлением фермента к среде. В случае I-клеточной болезни присутствуют все ферменты, однако они лишены маркера, необходимого для их распознавания при поглощении и транспорте в лизосомы.

4.2.2.4 Одновременные нарушения нескольких ферментов

До сих пор во всех случаях - будь то механизм выработки энергии в эритроцитах или катаболизм гликозаминогликанов - рассматривались примеры, при которых одна мутация приводила к изменению или недостаточности единственного фермента. Все это согласуется с гипотезой «один ген - один фермент». Однако известны случаи, когда одна мутация приводит к изменению двух ферментов. Например, активность одного фермента может нарушаться в результате дефекта другого. Так, активность глюкозо-6-фосфатазы при болезни накопления гликогена III типа (23240) уменьшается в результате нарушения аминокислоты - фермента, который расщепляет гликоген в точках ветвления молекулы. Изменение структуры фермента представляется маловероятным, поскольку стероиды, обладающие кортизоно-подобным эффектом, вызывают в таких случаях нормализацию активности глюкозо-6-фосфатазы [1199].

Другие случаи, при которых два фермента изменены структурными мутациями, а у гетерозигот их активность примерно в два раза ниже нормы, не удастся объяснить таким способом. Вполне возможно, что указанные ферменты имеют общую субъединицу.



Кетоацидурия, обусловленная дефектом метаболизма аминокислот с разветвленной боковой цепью (болезнь «кленового сиропа») [196]. Известно рецессивное нарушение, которое затрагивает не менее трех функционально родственных ферментов,- болезнь «кленового сиропа». Она вызвана дефектом расщепления аминокислот с разветвленной боковой цепью: лейцина, изолейцина и валина (рис. 4.14). Генетический блок показан на рис. 4.15. При наиболее частой классической форме болезни в течение первой недели после рождения наблю-

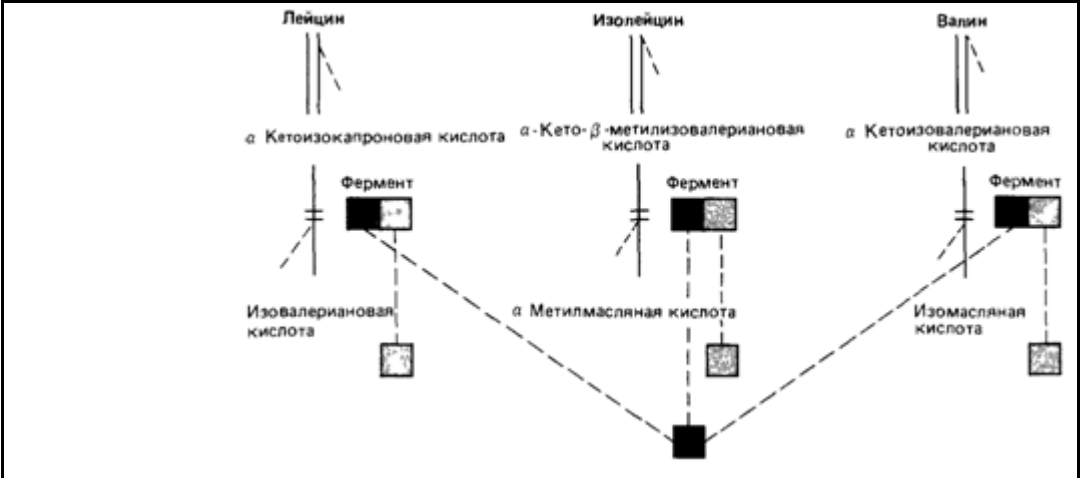


Рис. 4.15. Предполагаемая ферментативная система метаболизма аминокислот с разветвленной боковой цепью содержит общий компонент (А). Эта полипептидная цепь может объединяться с тремя различными полипептидами (В, С, D), образуя три фермента (АВ, АС и АД). Мутационное изменение общей субъединицы приводит к генетическому блоку метаболизма сразу трех аминокислот и вызывает кетоацидурию. Известны редкие случаи дефектов полипептидов В и D.

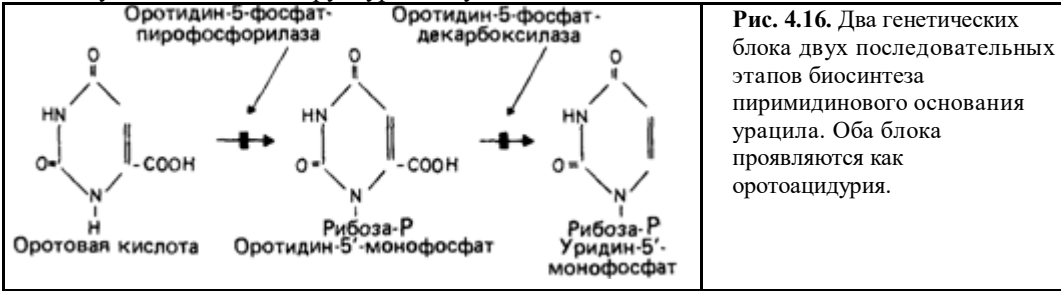
даются затруднение с сосанием, рвота, гипертонус мышц и пронзительные крики. Иногда имеют место потеря тонуса и задержка дыхания (возможно, вследствие гипогликемии). Позже утрачиваются рефлексы, появляются частые припадки, возможна смерть в раннем возрасте. Дети, которые не получали лечения и тем не менее выжили, страдают тяжелой умственной отсталостью [182]. Помимо этого классического типа, описаны «промежуточная», «легкая» и тиамин-зависимая формы болезни.

Анализ генетического блока показал, что активность трансаминаз, которые превращают эти аминокислоты в соответствующие кетокислоты, не изменена (рис. 4.15). Оказалось, что нарушена следующая стадия - окислительное декарбоксилирование. По-видимому, она обеспечивается тремя различными мультиферментными комплексами. Установлено, что эти комплексы имеют один идентичный компонент, который и затрагивает мутация, вызывающая заболевание. При промежуточной форме заболевания наблюдаются периоды атаксии и повышения концентрации аминокислот с разветвленной боковой цепью и соответствующих кетокислот, в особенности при инфекционных заболеваниях. В остальное время показатели крови находятся в пределах нормы, но у больных наблюдаются неврологические отклонения. У одного ребенка при этом заболевании описана остаточная активность фермента, составляющая около 210% нормы. Сходные дефекты описаны в работе [1287].

Другие дефекты метаболизма, при которых нарушена активность нескольких ферментов [196]. Другим примером дефекта метаболизма, при котором один генетический блок затрагивает два фермента в одной и той же цепи реакций, служит оротоацидурия (25890), при которой нарушено образование одного из предшественников РНК, уридина, из оротовой кислоты. На рис. 4.16 показаны два генетических блока. У гетерозигот активность обоих ферментов снижена приблизительно вдвое. Это исключает зависимость активности одного фермента от другого и свидетельствует в пользу участия продукта одного и того же гена в обеих реакциях. По меньшей мере в одном случае было установлено, что у гомозиготы второй фермент - декарбоксилаза - имеет измененную электрофоретическую подвижность, а значит, и структуру. Оказалось, что каждая реакция осуществляется одним из двух независимых доменов макромолекулы, которая представляет собой единую полипептидную цепь [1145]. С другой стороны, показано, что при ганглиозидозе Зандхоффа одновременное нарушение активности гексозаминидаз А и В обусловлено мутацией, изменяющей общую для этих ферментов (3-субъединицу [1286].

Описан ряд случаев одновременной недостаточности факторов свертывания крови II, VII, IX и X, зависящих от витамина К. Они вызваны дефектом посттрансляционной модификации [1111b].

Новый взгляд на гипотезу «один ген - один фермент» (или «один ген - одна полипептидная цепь») [1088]. Как уже отмечалось, дефекты единичных генов человека могут нарушать активность сразу нескольких ферментов, что объясняется наличием у этих ферментов общих субъединиц. Это структурные мутации.



Другой важный аспект синтеза ферментов связан с посттрансляционным процессингом. Например, сахарозоизомальтаза построена из двух полипептидных цепей, каждая из которых обладает ферментативной активностью. Эти полипептиды образуются из единого предшественника в результате протеолитического расщепления [1297]. Для образования активного инсулина также необходим процессинг проинсулина.

Весьма убедительные доказательства процессинга пептидов получены для ряда мелких пептидов, синтезирующихся в мозге, - энкефалинов и эндорфинов. В этом случае одна и та же молекула предшественника в результате процессинга может расщепляться на различные пептиды в зависимости от типа клеток или стадии их развития, что может служить одним из механизмов дифференцировки при эмбриональном развитии. На рис. 4.17 показана молекула препродинарфина и ее процессинг с образованием различных типов энкефалинов, эндорфинов и динарфинов. Функции этих белков будут кратко рассмотрены в гл. 8. Подобный посттрансляционный процессинг описан для других гормонов и нейропептидов, синтезирующихся главным образом в гипофизе и гипоталамусе.

Модификации, важные для функционирования молекул, происходят не только на посттрансляционном уровне, но и на уровне экспрессии гена; они могут изменить даже сам ген. Подобная модификация установлена для генов иммуноглобулинов (разд. 4.4). Однако эти факты не умаляют эвристической ценности гипотезы «один ген - один фермент», которая в большинстве случаев верна.

Нарушение работы сразу нескольких ферментов в результате одной мутации может наблюдаться в особых случаях, например если нарушено поглощение, транспорт или связывание кофакторов.

4.2.2.5. Влияние кофакторов на активность ферментов [182]

Кофакторы ферментов. Активность многих ферментов зависит от присутствия молекул небелковой природы - *кофакторов*. В их роли могут выступать простые ионы, например Mg^{2+} , или органические соединения. Если кофактор представляет собой сложное соединение, его называют коферментом. Предшественники коферментов (витамины) потребляются с пищей. Как правило, витамины участвуют во многих ферментативных реакциях, и их недостаток в пище вызывает в организме состояние, называемое авитаминозом.

Ослабление функции кофермента может быть связано и с генетическими дефектами

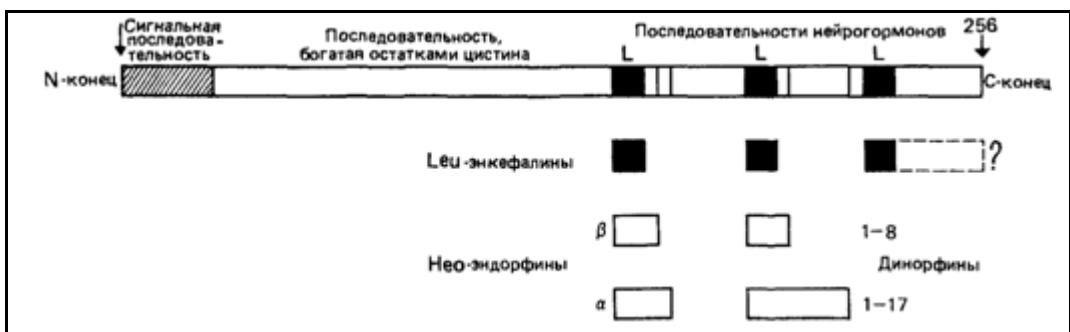


Рис. 4.17. Препродинарфин (белок). Leu-энкефалин: L = Туг, Gly, Gly, Phe, Leu; нео-эндорфин: L + Arg, Lys, Туг, Pro; нео-эндорфин; L + Arg, Lys, Туг, Pro + Lys; динарфин 1-8: L + Arg, Arg, He; динарфин 1-17: L + Arg, Arg, Ile + Arg, Pro, Lys, Leu, Lys, Трг, Asp, Asn, Gln. За сигнальной последовательностью, расположенной на N-конце, следует последовательность, обогащенная остатками цистина. Последовательности нейрогормонов расположены вблизи С-конца; они вырезаются из молекулы препродинарфина. Поскольку молекулы эндорфинов и динарфинов крупнее, чем Leu-энкефалинов, логично предположить, что сплайсинг осуществляется в две (по крайней мере) стадии. На первой стадии образуются более длинные молекулы. Затем они подвергаются процессингу с образованием Leuэнкефалинов. (По Frezal et al., 1983.)

42 4. Действие генов

Клетка Кофермент Апофермент Холофермент ① Нарушен транспорт витамина в клетку ③ Нарушено превращение витамина в кофермент ② Нарушен транспорт витамина внутри клетки ● Нарушено образование холофермента	Рис. 4.18. Мутации могут нарушать витамин-зависимые реакции на разных этапах, от транспорта витамина в клетку до образования активного фермента [182].
	Рис. 4.19. Фолиевая кислота. Ее молекула состоит (слева направо) из птеринового кольца, β-аминобензойной кислоты и глутаминовой кислоты.

поглощения и утилизации витаминов (рис. 4.18). Известно, что витамины всасываются в кишечнике, транспортируются в клетки, где попадают в специфические органеллы. Именно там происходит превращение в кофермент, который в свою очередь должен соединиться с апоферментом с образованием холофермента. Любой из этих этапов может быть нарушен в результате мутации. Механизм поглощения детально изучен для витамина В₁₂ (кобаламина) и фолиевой кислоты; для обоих описаны нарушения транспорта и синтеза кофермента.

Зависимость от фолиевой кислоты (22903, 24930, 22905): *нарушение транспорта и синтеза кофермента*. Молекула фолиевой кислоты построена из трех компонентов - птеринового кольца, парааминобензойной кислоты и глутаминовой кислоты (рис. 4.19). Фолиевая кислота обычно присутствует в различных продуктах питания в достаточных количествах. Известно пять коферментных форм фолата. Все они участвуют в переносе группировок с одним атомом углерода при синтезе нуклеотидов, метионина, глутаминовой кислоты и серина. Основные этапы поглощения и синтеза витамина следующие

Этап	Фермент
1. Превращение полиглутаминовой кислоты в глутаминовую кислоту	Конъюгирующий фермент (слизистая кишечника, желудок, поджелудочная железа)
2. Поглощение посредством активного транспорта	Двенадцатиперстная кишка и тощая кишка (механизм в точности не известен)
3. Транспорт в ткани	
4. Превращение фолата в коферменты: а) восстановление птеринового кольца - образование тетрагидрофолата;	
б) образование пяти различных коферментов	Пять различных ферментативных реакций

Тетрагидрофолат (ТГФ) выполняет две различные функции:

1. Он служит акцептором β-углеродного атома серина при его расщеплении до глицина. Этот атом углерода формирует

Таблица 4.8. Врожденные нарушения метаболизма фолиевой кислоты [182]					
Локализация нарушения	Природа дефекта	Проявление дефекта			Потребность в фолате in vivo
		концентрация фолата в сыворотке	мегалобластная анемия	нарушение функций ЦНС ¹⁾	
Всасывание в кишечнике	Не установлена	Низкая	Наблюдается	Наблюдается	Нормальная
Утилизация в тканях	Недостаточность формиминотрансферазы	Высокая	Не наблюдается	»	Повышена
	Недостаточность циклогидролазы	»	»	»	— ²⁾
	Недостаточность дигидрофолатредуктазы	Нормальная	Наблюдается	Не наблюдается	Повышена
	Недостаточность N ⁵ , N ¹⁰ -метилтетрагидрофолатредуктазы	От низкой до нормальной	Не наблюдается	Наблюдается	Повышена
¹⁾ Включает умственную отсталость, психозы, припадки, отклонения в ЭЭГ, атрофию коры головного мозга.					
²⁾ Не определялась					

метиленовый мостик между 5-м и 10-м атомами азота ТГФ с образованием N⁵,N¹⁰-метил-ТГФ, который восстанавливается до N⁵-метил-ТГФ. 2. ТГФ может превращаться также в N⁵,N¹⁰-метил-ТГФ – предшественник формильной формы кофермента. Формильная и метильная формы кофермента необходимы для ряда реакций переноса группировок с одним атомом углерода при синтезе пуринов, пиримидинов и метионина, а также для циклических превращений производных самой фолиевой кислоты.

Описано по меньшей мере пять наследственных патологических состояний, связанных с недостаточностью транспортных механизмов или механизмов образования коферментов (табл. 4.8). Часть из них характеризуются грубым нарушением функций центральной нервной системы, в том числе умственной отсталостью, в двух случаях наблюдается мегалобластная анемия. Общее их свойство заключается в возможности успешного лечения при своевременной постановке диагноза. Например, при нарушении всасывания в кишечнике потребность в фолиевой кислоте не повышена, этот дефект корректируется внутримышечными инъекциями витамина. В трех из четырех известных случаев дефектов ферментов при увеличении количества потребляемой фолиевой кислоты болезнь протекала легче. Однако диагноз был поставлен слишком поздно, поэтому неясно, можно ли предотвратить нарушения центральной нервной системы, если начать лечение достаточно рано.

Вероятно, аномально низкое поглощение или снижение синтеза кофермента оказывают влияние одновременно на многие ферменты, именно на те, для работы которых необходим этот кофермент. С другой стороны, недостаточность на последнем этапе, когда нарушена способность апофермента, связываясь с коферментом, образовывать холофермент, должна приводить к дефекту только одного фермента. Такие нарушения подобны обычным случаям ферментативной недостаточности, рассмотренным ранее.

Зависимость от пиридоксина (витамина В₆) (26610). Молекула витамина В₆ представляет собой замещенное пиридиновое кольцо. Известно несколько природных

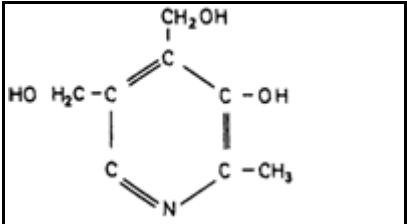


Рис. 4.20. Витамин В₆ (пиридоксин).

форм витамина В₆, которые содержатся в самых различных пищевых продуктах (рис. 4.20). Попадая в клетки, предшественники фосфорилируются специфической киназой до пиридоксаль-5'-фосфата или пиридоксамин-5'-фосфата. Эти фосфорилированные производные играют роль коферментов в многочисленных реакциях биосинтеза аминокислот, гликогена, а также жирных кислот с малой длиной цепи. В табл. 4.9 перечислено шесть наследственных патологий, связанных с генетически обусловленной недостаточностью витамина В₆. Во всех этих случаях для биохимического и (или) клинического эффекта требуются дозы витамина В₆, которые превышают физиологические в 5-50 раз.

В первой строке табл. 4.9 описывается патология, впервые обнаруженная у двух sibсов. Они страдали от припадков, которые не удавалось снять противоэпилептическими препаратами. Судороги, однако, проходили при парентеральном введении высоких доз пиридоксина, которые необходимо было поддерживать у таких больных для предупреждения припадков [182].

В настоящее время обнаружено большое число подобных случаев. Установлено, что заболевание обусловлено нарушением глутаматдекарбоксилазы.

Аналогичные результаты получены при цистатининурии и ксантуроацидурии. С другой стороны, в многочисленных случаях гомоцистинурии (23620), вследствие недостаточности цистатинин-синтазы чувствительность к витамину В₆ не удается объяснить мутацией, изменяющей сродство к коферменту. Точный механизм взаимодействия при этом заболевании остается неизвестным [182].

Помимо упомянутых выше, описан ряд случаев, при которых высокие дозы витамина вызвали улучшение клинического и биохимического состояния больных. Дальнейший анализ этой группы заболеваний должен прояснить механизмы связывания коферментов и их действия и представляет поэтому теоретический интерес. Важен он и для медицинской практики, поскольку подобные патологические состояния поддаются лечению высокими дозами витаминов.

Существует мнение, что эта концепция, обоснованная на примере немногочисленных редких врожденных нарушений метаболизма, применима и к ряду широко распространенных заболеваний, в частности к шизофрении. Так, согласно новому направлению в психиатрии, известному под названием «ортомолекулярная психиатрия», шизофрения обусловлена витаминной недостаточностью и положитель-

Таблица 4.9. Врожденные аминокислотопатии с выраженной недостаточностью витамина В ₆ [182]		
Нарушение	Главные клинические симптомы	Поврежденный апофермент
Младенческие судороги	Припадки	Глутаматдекарбоксилаза
Анемия, зависящая от пиридоксина	Мелкоклеточная гипохромная анемия	Не установлен
Цистатининурия	Вероятно, нет	Цистатиназа
Ксантуроацидурия	Умственная отсталость (?)	Кинурениназа
Гомоцистинурия	Эктопия хрусталика, тромбоз кровеносных сосудов; нарушение функций ЦНС	Цистатинин-синтаза
Гипероксалурия	Отложение в почках кристаллов оксалата кальция; почечная недостаточность	Глиоксилат: а-кетоглутараткарбоксилаза

ного эффекта при лечении можно достичь, вводя высокие дозы никотиновой кислоты. Научное обоснование этого утверждения, в настоящее время практически отсутствует.

4.2.2.6. Сцепленная с X-хромосомой недостаточность гипоксантин-гуанин—фосфорибозилтрансферазы (30800) [7055]

Дефекты ферментов и их роль в изучении механизмов действия генов. Некоторые дефекты ферментов сыграли заметную роль в изучении самых общих вопросов, касающихся действия генов и возникновения мутаций. Особенно важные результаты были получены при исследовании нарушений метаболизма пуринов, обусловленных недостаточностью гипоксантин-гуанин—фосфорибозилтрансферазы (HPRТ) (рис. 4.21) [1294].

Синдром Леша-Найхана [1293]. В 1964 г. Леш и Найхан описали специфический синдром [1198], характеризующийся

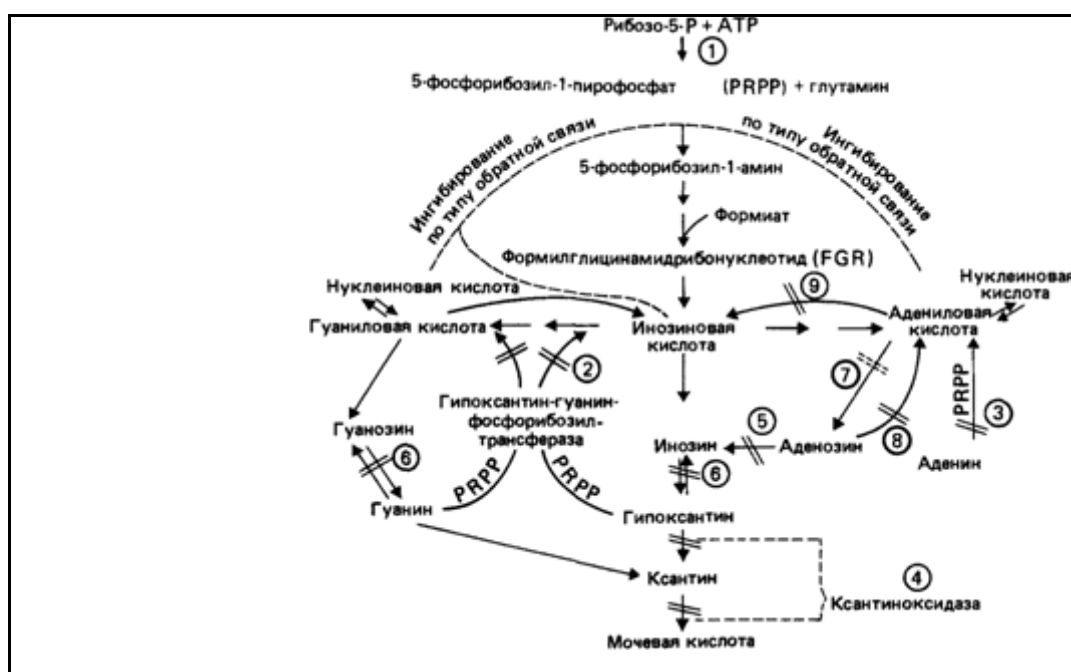


Рис. 4.21. Известные дефекты метаболизма пуринов у человека. (1) Повышенная активность фосфорибозилпирофосфат —синтетазы у больных с избыточным синтезом мочевой кислоты и подагрой. (2) Почти полная недостаточность гипоксантин-гуанин — фосфорибозилтрансферазы (HPRT) у детей с синдромом Леша—Найхана и частичная недостаточность этого фермента у больных с избыточным синтезом мочевой кислоты при подагре. (3) Недостаточность аденинфосфорибозилтрансферазы (**APRT**) у больных с камнями в почках. В этом случае камни состоят из 2,8-диоксиаденина (не путать с мочекислыми камнями). (4) Недостаточность ксантиноксидазы у больных ксантоурией, для которых повышен риск образования камней в мочевыводящих путях и, в некоторых случаях, риск миалгии, обусловленной присутствием кристаллов ксантина в мышцах. (5) Недостаточность аденозиндезаминазы, связанная с общей тяжелой иммунной недостаточностью. (6) Недостаточность пуриинуклеозидфосфорилазы, связанная с дефектом Т-лимфоцитов. (7) Активность пури-5-нуклеозидазы снижена в лимфоцитах больных агаммаглобулинемией, которая может быть вторичной при утрате В-клеток. (8) Недостаточность аденозинкиназы до сих пор наблюдалась только в культурах лимфобластов человека. Соответствующее заболевание еще предстоит идентифицировать. (9) Недостаточность миоаденилатдезаминазы у некоторых больных связана с явлениями слабости и судорогами в мышцах после сильных нагрузок, а также с отсутствием повышения концентрации ионов аммония в венозной крови в ответ на мышечные нагрузки [1294]. Эти дефекты ферментов служат замечательными примерами более, а часто менее характерных фенотипических последствий различных генетических блоков в единой цепи реакций.

атетозом, гиперрефлексией и непременным самодеструктивным поведением, которое может выражаться даже в откусывании губ и пальцев [1164]. У всех пациентов (болеют только мальчики) наблюдается гиперурикемия и повышенная концентрация мочевой кислоты в моче, что приводит к образованию камней в почках и закупорке мочевых путей. Признак сцеплен с полом (разд. 3.1.4). Гетерозиготы клинически здоровы, однако поддаются выявлению.

В 1967 г. Сигмиллер и др. [1295] при обследовании больных с синдромом Леша - Найхана обнаружили практически полную недостаточность одного из ферментов метаболизма пуринов - гипоксантин-гуанин—фосфорибозилтрансферазы (HPRT) (у трех больных - в лизатах эритроцитов, у одного больного - в культуре фибробластов). Впоследствии дефект фермента был выявлен во многих тканях: печени, лейкоцитах и в мозге. Инозин-5'-монофосфат образуется в нескольких реакциях, принадлежащих к разным метаболическим путям. Однако клетки могут использовать также готовые пуриновые основания и нуклеозиды, образующиеся при расщеплении нуклеиновых кислот. В этом пути «использования вторичного сырья» свободные пуриновые основания превращаются в соответствующие 5'-мононуклеотиды. Имеются два фермента, один специфичен для гипоксантина, второй для аденина (рис. 4.21). Если первый фермент дефектен, то вторичного использования гипоксантина и гуанина не происходит, вместо этого они превращаются в мочевую кислоту. В результате развивается гиперурикемия с образованием камней в почках; однако остается неясным, чем обусловлены симптомы со стороны ЦНС. Дефекты HPRT удобно изучать в культуре фибробластов, вот почему этот фермент использовали в качестве модели при решении ряда проблем.

Гетерогенность на молекулярном уровне. В разных семьях обычно встречаются различные мутации. Об этом свидетельствуют результаты изучения таких характеристик фермента, как остаточная активность, константа Михаэлиса—Ментен, термолабильность, ингибирование конечными продуктами - GMP и IMP и других. Иногда выраженная недостаточность HPRT имела место и в отсутствие признаков синдрома Леша-Найхана. Дефектная гипоксантингуанин—фосфорибозилтрансфераза была выявлена у некоторых взрослых больных подагрой [1162; 1294]. Однако подавляющее большинство людей, страдающих этим заболеванием, обладают нормальной HPRT. У тех немногих больных подагрой, которые имеют дефектный фермент, этот признак наследуется сцепленно с X-хромосомой. Это еще раз указывает, что мутации действительно затрагивают один и тот же locus.

Доказательства инактивации X-хромосомы. Одно из наиболее убедительных доказательств гипотезы Лайон (разд. 2.2.3.3) было получено при изучении активности фермента на уровне отдельных клеток у гетерозигот с мутациями по HPRT [1164]. Более того, эти исследования позволили по-новому взглянуть на метаболические взаимоотношения между клетками.

Метаболическая кооперация. Изучение культуры фибробластов кожи дает возможность идентифицировать гетерозиготных носителей мутации. Если получить клоны из отдельных фибробластов и определить активность фермента, измерив с помощью радиоавтографии количество поглощаемого клетками гипоксантина, меченного тритием, то оказывается, что примерно у половины клонов активность HPRT нормальная, а у половины фермент дефектен. Однако в культурах фибробластов, которые получены без клонирования, подавляющее большинство гетерозиготных клеток обладали активностью. Очевидно, при контакте клеток, дефектных по HPRT, с нормальными клетками их метаболический дефект подвергается коррекции [1090]. Этот вывод подтверждается опытами, в которых нормальные и дефектные клетки смешивали в одной культуре. Феномен назвали «метаболической кооперацией».

Рассмотрим три возможных механизма такой кооперации (рис. 4.22).

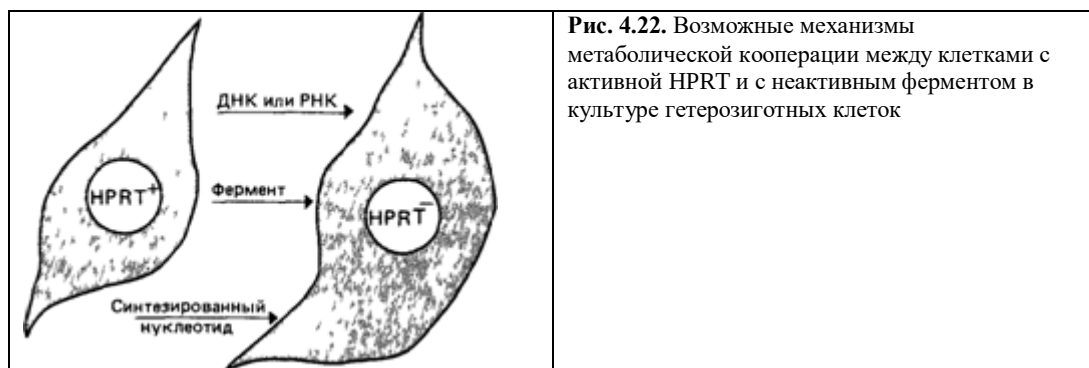


Рис. 4.22. Возможные механизмы метаболической кооперации между клетками с активной HPRT и с неактивным ферментом в культуре гетерозиготных клеток

1 Нормальные клетки снабжают дефектные клетки ДНК или мРНК, в результате последние приобретают способность синтезировать функционально активный фермент

2 Дефектные клетки получают от нормальных готовый фермент. В основе этого предположения аналогия с коррекцией дефектов при мукополисахаридозах (разд. 4 2 2 3). Инкубация культуры фибробластов, дефектных по HPRT, с нормальными клетками, разрушенными ультразвуком, приводила к частичному восстановлению функции фермента.

3. Нормальные клетки синтезируют нуклеотид (конечный продукт), который переносится в дефектные клетки. Большинство экспериментальных данных свидетельствует в пользу этого механизма. Если дефектные фибробласты отделить от нормальных клеток, их мутантный фенотип быстро восстанавливается, несмотря на то что нормальная гипоксантин-гуанин—фосфорибозилтрансфераза стабильна в этих условиях в течение многих часов. В другом эксперименте лимфоциты нормальной женщины инкубировали в среде, содержащей меченный тритием гипоксантин. Затем такие клетки смешивали в обычной среде с лимфоцитами мужчины, страдающего синдромом Леша—Найхана. Спустя некоторое время Y-хромосомы мужских клеток с дефектным ферментом, окрашивали акрихинипритом, после чего проводили радиоавтографию. В мужских клетках обнаруживалась метка, что указывало на перенос нуклеотидов из нормальных клеток в дефектные. В подобных опытах метаболическая кооперация была продемонстрирована также между преинкубированными нормальными эритроцитами и мутантными лимфоцитами или фибробластами. Оказалось, что в дефектные клетки переносится инозимонофосфат или одно из его производных; по-видимому, активную роль в этом процессе играет мембрана клетки [1053].

Другие проблемы, связанные с недостаточностью HPRT. Дефектная **HPRT** стала важной модельной системой для изучения мутационного процесса. 1. Эта система дает возможность идентифицировать гемизигот и гетерозигот, измеряя активность фермента в фибробластах, и таким образом сравнивать частоты спонтанных мутаций у мужчин и женщин (разд. 5.15). 2. Ген *HPRT* экспрессируется в клетках амниотической жидкости, поэтому недостаточность гипоксантин-гуанин—фосфорибозилтрансферазы удается диагностировать с помощью амниоцентеза. Этим дефект **HPRT** в корне отличается от других патологических состояний, наследуемых сцепленно с X-хромосомой, например гемофилии или мышечной дистрофии Дюшенна, при которых биохимический дефект не проявляется в клетках амниотической жидкости. 3. Разработана система отбора точковых мутаций в культурах фибробластов, основанная на использовании необычного субстрата, 8-азагуанина. Она позволяет изучать на клеточном уровне возникновение спонтанных и индуцированных мутаций. В нормальных клетках 8-азагуанин утилизируется HPRT, что приводит к гибели клеток. Клетки, дефектные по HPRT, не способны метаболизировать это соединение и выживают.

Иммунная недостаточность, связанная с дефектами аденозиндезаминазы и нуклеозидфосфорилазы (рис 4 21) Дефект другого фермента, участ-

вующего в метаболизме нуклеозидов, приводит к иному фенотипу. Этот случай тем более интересен, что дефектной является редкая форма полиморфного фермента. Дефекты одного или нескольких компонентов иммунной системы могут обуславливать повышенную восприимчивость к бактериальным инфекциям. Классическим примером такой патологии является гипогаммаглобулинемия, которая наследуется сцепленно с полом и обусловлена дефектом созревания В-лимфоцитов [1092; 1261]. В-лимфоциты служат местом образования гуморальных антител, и их отсутствие приводит к нарушению синтеза γ -глобулинов. Т-лимфоциты обеспечивают клеточный иммунитет и при этом заболевании остаются интактными.

Различают несколько форм иммунной недостаточности. Одна из них, называемая острой комбинированной обуславливает повышенную восприимчивость к заражению самыми разнообразными бактериями, вирусами и грибами. При этой форме нарушены функции как В-, так и Т-лимфоцитов. Иногда оказываются дефектными только Т-лимфоциты. Оказалось, что в основе таких дефектов лежит нарушение дифференцировки стволовых клеток в зрелые лимфоидные клетки [1274; 1267]. Эта группа заболеваний гетерогенна по этиологии, поскольку известны как случаи с аутосомно-рецессивным наследованием, так и варианты, которые наследуются сцепленно с X-хромосомой. Среди вариантов с аутосомно-рецессивным наследованием обнаружена дополнительная гетерогенность. Так, комбинированная иммунная недостаточность может быть вызвана дефектом аденозиндезаминазы (24275) или нуклеозидфосфорилазы (16405) [1294].

Аденозиндезаминаза (ADA) катализирует необратимое дезаминирование и гидролиз аденозина до инозина и иона аммония. Нуклеозидфосфорилаза катализирует превращение инозина в гипоксантин и гуанозина в гуанин. Она обладает также небольшой активностью, обеспечивающей превращение аденозина в аденин. Эти ферменты играют ключевую роль в метаболизме РНК и ДНК.

Аденозиндезаминаза кодируется геном, локализованным в 20-й хромосоме (разд. 3.4). Электрофорез в крахмальном геле продемонстрировал полиморфизм этого фермента. Наиболее распространенный аллель обозначается ADA^1 часто встречающийся полиморфный вариант ADA^2 . В западных популяциях аллель ADA^2 встречается с частотой около 0,05 [1309]. Описаны и другие варианты ADA [1294]. Недостаточность ADA является аутосомно-рецессивным признаком. У больных детей в эритроцитах и других тканях активность аденозиндезаминазы полностью отсутствует [1098]. У их родителей, как правило, обнаруживаются промежуточные количества фермента, при этом клинически они вполне нормальны. У больных родителей выявляется остаточная активность ADA [1294]. Оказалось, что дефекты обусловлены структурными мутациями в гене ADA, которые приводят к почти полной потере функциональной активности фермента у больных гомозигот. Разработана пренатальная диагностика недостаточности аденозиндезаминазы [1126].

Нуклеозидфосфорилаза кодируется локусом в 14-й хромосоме [1096]. Обнаружено несколько редких вариантов фермента [1064]. У больных активность нуклеозидфосфорилазы полностью отсутствует, у родителей активность фермента промежуточная [1294]; заболевание наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Иммунологическими методами показано, что по меньшей мере две мутации вызывают недостаточность нуклеозидфосфорилазы [1256]. При одной из них имеется перекрестно реагирующий материал (ПРМ), при другой его нет (см. разд. 4.2.2.2). Предполагается, что это мутации в структурном гене фермента. Вполне возможно, что больные являются не истинными гомозиготами, а составными гетерозиготами с двумя различными мутациями.

Обычно у больных с недостаточностью аденозиндезаминазы сильно нарушена функция В- и Т-лимфоцитов [1294], в то же время при нарушении нуклеозидфосфорилазы функция В-клеток интактна и синтез иммуноглобулинов происходит нормально. При дефекте обоих ферментов наблюдается поразительная дисфункция Т-лимфоцитов. Это проявляется в лимфопении, неспособности лимфоцитов реагировать на митогены и ненормальных кожных реакциях на различные антигены.

Точный биохимический механизм, который приводит к иммунологическим нарушениям в этих случаях, не установлен. Высказывались предположения о том, что недостаточность аденозиндезаминазы обуславливает накопление дезокси-АТР, который ингибирует образование пиримидиновых дезоксирибонуклеотидов, что влечет за собой нарушение синтеза ДНК, пролиферации лимфоцитов и, наконец, иммунного ответа. Недостаточность нуклеозидфосфорилазы может иметь сходный механизм [1294].

Наиболее эффективный метод исправления этих нарушений - пересадка костного мозга. В ряде случаев ослабления клинических симптомов, вызванных недостаточностью аденозиндезаминазы, удавалось добиться переливанием нормальных эритроцитов, которые служили источником недостающего фермента [1266].

4.2.2.7. Фенилкетонурия: пример успешного лечения метаболического заболевания [182; 203]

Метаболическая олигофрения. Фенилкетонурия (ФКУ) (26160) была впервые описана в 1934 г. Фёллингом [1080] у умственно отсталых больных со специфическим «мышинным» запахом. Название этой болезни в 1935 г. дал Пенроуз [1262]. В настоящее время фенилкетонурия - один из наиболее известных примеров врожденных дефектов метаболизма у человека; различным ее аспектам посвящен ряд обзоров [203; 1290; 1287]. Здесь мы обсудим только три основные проблемы: лечение диетой с низким содержанием фенилаланина как первый случай успешного исправления генетического дефекта фермента; генетическую гетерогенность, обнаруженную при массовом обследовании новорожденных, а также проблемы, связанные с выявлением гетерозигот и их возможными фенотипическими аномалиями.

Дефект фермента при ФКУ. L-фенилаланин принадлежит к числу незаменимых аминокислот. Однако только часть L-фенилаланина, поступающего в клетку, может быть использована для белкового синтеза; основная фракция окисляется прежде всего до тирозина и в значительно меньшей степени - до других соединений, главным образом до фенилпировиноградной кислоты. Парагидроксилирование фенилаланина с образованием тирозина осуществляется в ходе сложной реакции. Гидроксилаза состоит из двух белковых компонентов, один из которых лабилен и обнаруживается только в печени (и, возможно, с меньшей активностью в почках), другой стабилен и присутствует во многих других тканях. Этот стабильный компонент содержит птеридин в качестве кофактора.

Было показано, что ФКУ обусловлена полным отсутствием печеночной фенилаланин—4-гидроксилазы (рис. 4.23) (Юденфред и Купер, 1952 [1331]; Джервис, 1953, [1144]). При этом поражается лабильный компонент ферментной системы. Проведенный позже анализ ферментов при биопсии



Рис. 4.23. Генетический дефект при фенилкетонурии: введение с пищей 5 г d-L-фенилаланина приводит к увеличению концентрации тирозина в сыворотке здорового человека, тогда как в сыворотке больного фенилкетонурией этого не происходит. (По Harris, 1959.)

печени показал наличие остаточной активности (до 6% от нормальной) примерно в половине случаев классической ФКУ. Другие типы гиперфенилаланинемии, для которых характерен более высокий уровень активности фермента, будут обсуждены ниже. Гидроксилазная реакция - один из этапов метаболизма фенилаланина и тирозина, для которого известны различные генетические дефекты, блокирующие метаболизм на различных стадиях (рис. 4.24). Ген, контролирующий эту реакцию, локализован в 12-й хромосоме [1363a].

Диетическое лечение ФКУ. Фенотипические нарушения, возникающие в результате генетического блока метаболизма, могут быть вызваны либо отсутствием метаболита, который синтезируется в результате нормальной реакции, либо накоплением метаболита, который в норме перерабатывается в такой реакции. Примером нарушения первого типа могут служить альбинизм и кретинизм с образованием зоба (рис. 4.24). Скоро выяснилось, что при ФКУ нарушения вряд ли могут быть вызваны недостатком тирозина: обычно тирозин присутствует в пище в достаточных количествах. С другой стороны, появление многочисленных метаболитов, которые обнаруживаются в моче больных ФКУ наряду с возрастанием уровня фенилаланина

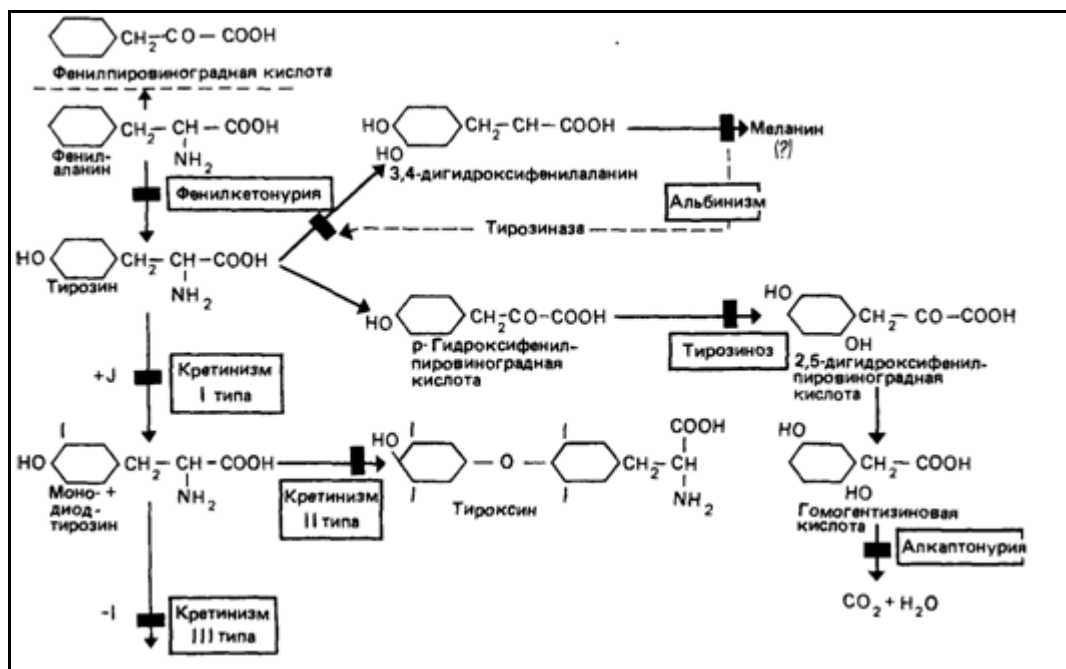


Рис. 4.24. Наследственные нарушения метаболических путей некоторых ароматических аминокислот. Диаграмма несколько упрощена. В ней указаны генетические дефекты, вызывающие фенилкетонурию, альбинизм, алкаптонурию, тирозиноз и три типа наследственного кретинизма.

в сыворотке, указывает на использование дополнительных путей снижения избыточного количества фенилаланина. Возникло предположение, что уменьшение потребления фенилаланина может оказаться эффективным методом лечения. Впервые попытка такого лечения была предпринята в 1953 г. Бикелем и др. [1004]:

«Исходя из предположения, что избыточное количество фенилаланина или, возможно, каких-либо продуктов его расщепления вызывает задержку умственного развития, мы решили держать двухлетнюю девочку, больную фенилкетонурией, на диете с пониженным содержанием фенилаланина. Она была умственно отсталой, не могла стоять, ходить, разговаривать, не проявляла интереса к пище, была равнодушна к своему окружению, непрерывно плакала, постанывала или била себя по голове. Пищу для этого ребенка готовили специально, поскольку для достаточного снижения уровня фенилаланина весь содержащийся в продуктах азот пришлось заменить (кислотным) гидролизатом казеина... Для удаления фенилаланина и тирозина его обрабатывали активированным углем, промытым кислотой. Затем добавляли соответствующие количества тирозина, триптофана и цистина.»

Лечение ребенка начали в стационаре, что позволило вести тщательное наблюдение. После четырехнедельной диеты, полностью исключавшей фенилаланин, серьезных клинических изменений, кроме потери веса, отмечено не было. Уровень этой аминокислоты в плазме и моче снизился до нормального, уменьшилось выделение фенилпировиноградной кислоты, а железохлористая реакция, служащая для определения количества фенилпировиноградной кислоты в моче, стала отрицательной (рис. 4.25).

Впоследствии, вероятно, в результате распада тканей возникла общая аминокислотурия. Поэтому в пищу стали добавлять фенилаланин (в диету включили молоко); потребления 0,3-0,5 г оказалось вполне достаточно для нормальной прибавки веса и улучшения биохимических показателей.

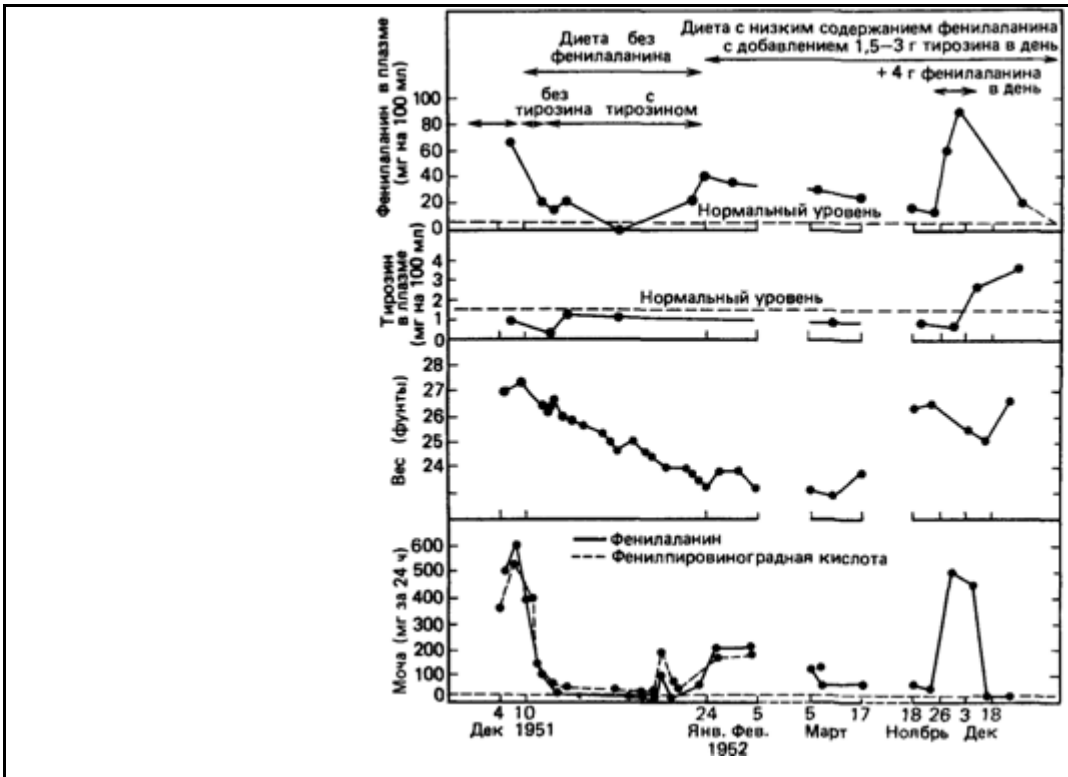


Рис. 4.25. Исследование метаболизма ребенка, больного фенилкетонурией, сразу после лечения с помощью диеты, лишенной фенилаланина. Содержание фенилаланина в сыворотке и моче быстро снизилось до нормального уровня. Добавление в пищу 4 г фенилаланина в день приводило к быстрому возрастанию содержания фенилаланина (Bickel, 1954, Exp Med. Surg, 12, 114-118).

При дальнейшем амбулаторном лечении на протяжении нескольких следующих месяцев показатели умственного развития девочки улучшились: она научилась ползать, глаза ее стали ярче, волосы темнее, она не плакала и не била себя по голове.

Чтобы ответить на вопрос, не было ли наблюдавшееся улучшение случайным, в пищу стали добавлять 4 г фенилаланина в день. Вскоре мать сообщила о явном ухудшении в состоянии ребенка. При госпитализации у девочки были вновь обнаружены биохимические и клинические изменения (рис. 4.25). Этот случай продемонстрировал благотворное действие диеты с низким содержанием фенилаланина на больных ФКУ. В той же статье авторы писали, что «... проводятся дальнейшие контрольные испытания, причем особое внимание уделяется очень маленьким детям, которым можно помочь в большей степени, чем остальным категориям больных.»

Успех диетического лечения был подтвержден другими группами исследователей. Некоторые сомнения связаны с тем, что, с одной стороны, какая-то часть больных ФКУ, не подвергавшихся никакому лечению, имела нормальное умственное развитие, с другой стороны, иногда лечение не помогало. Несмотря на указанные противоречия, в настоящее время твердо установлено, что диета приводит к существенному улучшению развития больных ФКУ. Важно, однако, выполнять два условия.

1. Для предотвращения повреждений мозга необходимо начинать лечение буквально с первых недель жизни.

2. Необходимо тщательно следить за

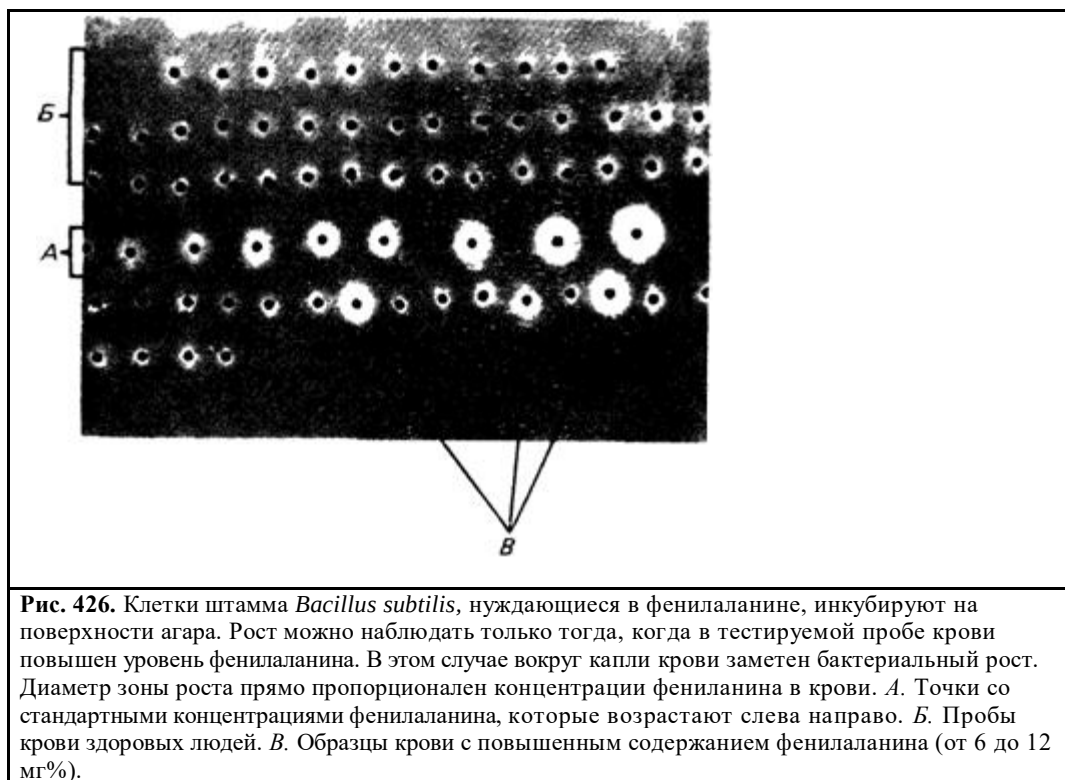


Рис. 4.26. Клетки штамма *Bacillus subtilis*, нуждающиеся в фенилаланине, инкубируют на поверхности агара. Рост можно наблюдать только тогда, когда в тестируемой пробе крови повышен уровень фенилаланина. В этом случае вокруг капли крови замечен бактериальный рост. Диаметр зоны роста прямо пропорционален концентрации фенилаланина в крови. *А.* Точки со стандартными концентрациями фенилаланина, которые возрастают слева направо. *Б.* Пробы крови здоровых людей. *В.* Образцы крови с повышенным содержанием фенилаланина (от 6 до 12 мг%).

метаболическим статусом ребенка, в особенности за уровнем фенилаланина.

Лечение не обязательно проводить в течение всей жизни, поскольку мозг взрослого человека, судя по всему, устойчив к аномальным концентрациям метаболитов, характерным для ФКУ.

У многих женщин, излеченных от ФКУ, родились дети. И хотя эти дети были гетерозиготами, примерно у 90% из них наблюдались признаки выраженной умственной отсталости [1196]. Следовательно, внутриматочная гиперфенилаланинемия вредна для развития плода. Чтобы предотвратить это осложнение, для всех больных ФКУ необходимо с самого начала беременности соблюдение тщательно контролируемой диеты с низким содержанием фенилаланина. Подобные проблемы могут возникать и для других врожденных излечимых нарушений метаболизма.

Генетическая гетерогенность ФКУ. Возможность успешного лечения этого заболевания в раннем детстве, до появления клинических симптомов, привела к мысли о необходимости обследования новорожденных. В большинстве высокоразвитых западных стран такое обследование уже проводится. Установлено, что частота ФКУ варьирует от 1:6000 до 1:20 000. Метод обследования должен быть простым и недорогим. Как правило, для этого используется так называемый тест Гатри, основанный на том, что бактерии, нуждающиеся в фенилаланине, растут на капле крови только в том случае, если она содержит фенилаланин в достаточно высокой концентрации [1116] (рис. 4.26). Таким образом, только кровь младенцев с высоким уровнем фенилаланина сможет обеспечить рост этих бактерий.

Вскоре после того, как началось систематическое обследование новорожденных, Стало ясно, что не каждый ребенок, имеющий необычно высокий уровень фенилаланина в крови, болен ФКУ. У многих была острая гиперфенилаланинемия, не приводящая к возникновению клинических симптомов. У другой группы детей высокий

уровень фенилаланина в крови поддерживался очень недолго и спонтанно нормализовался. Обнаружился полный спектр биохимической и генетической гетерогенности. Неизвестно, сколько существует типов мутаций с различным фенотипическим проявлением. Однако нет причин а priori предполагать, что вариабельность в данном случае будет меньше, чем для глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы (см. 4.2.2.2). Обнаружено, что при редко встречающемся варианте дефектна не фенилаланин—4-гидроксилаза, а дигидроптеридинредуктаза - фермент, необходимый для поддержания активности гидроксилазы.

Многие из обнаруживаемых фенотипов могут возникать в результате сложной гетерозиготности по мутациям с различными молекулярными характеристиками. С практической точки зрения важно отметить, что остаточная активность гидроксилазы, составляющая 10% нормальной, обеспечивает нормальное соматическое и умственное развитие без специальной диеты.

Чтобы знать возможные фенотипические последствия двойной гетерозиготности по различным вариантам фенилаланингидроксилазы, необходимо изучение фермента у отдельных гетерозигот. Для глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы этот вопрос решить сравнительно просто, так как она содержится в эритроцитах и для анализа достаточно взять у человека кровь. Совсем иная ситуация с фенилаланингидроксилазой. Её можно обнаружить только в клетках печени, поэтому для анализа этого фермента необходим материал биопсии. Но данная процедура не безопасна и обычно не используется в исследовательских целях. Возможно в будущем удастся «включать» ген, ответственный за фенилкетонурию в фибробластах или лимфоцитах, тогда необходимые для изучения фермента массовые обследования (скрининг) станут реальными.

Программы скрининга позволили получить важную информацию об общей частоте генов ФКУ и других гиперфенилаланинемий в человеческих популяциях (разд. 6.1). В настоящее время разрабатываются программы, предназначенные для выявления ряда других метаболических заболеваний, для которых терапевтическое лечение является перспективным.

4.2.2.8. Выявление гетерозигот

Выявление гетерозигот по ФКУ и гиперфенилаланинемии. Для заболеваний, связанных с нарушением метаболизма (в частности, ФКУ), выявление гетерозигот имеет не только теоретическое, но и практическое значение, поскольку может быть использовано для генетических рекомендаций близким родственникам, например сибсам, родители которых страдали ФКУ. Сибсы, не имеющие признаков заболевания, с вероятностью 2/3 являются гетерозиготами. Идеальный метод выявления гетерозигот—прямой анализ фермента, для которого в настоящее время необходима биопсия печени. Другие методы основаны на целенаправленной перегрузке этого метаболического пути: даже имеющейся у гетерозиготы активности фермента достаточно для переработки фенилаланина, в норме потребляемого с пищей, ее может не хватить для переработки избытка фенилаланина. Первую попытку тестирования гетерозигот с помощью избытка фенилаланина предпринял в 1967 г. Хсиа [1134]; он вводил фенилаланин гетерозиготам и следил за его исчезновением в крови. Оказалось, что гетерозиготы довольно четко отличаются от нормальных индивидов. Позднее этот метод удалось усовершенствовать, измеряя в крови не только уровень фенилаланина, но и тирозина, который, как установлено, у гетерозигот несколько ниже.

Состояние здоровья у гетерозигот. На первый взгляд гетерозиготные родители больных ФКУ, а также их братья и сестры абсолютно здоровы. Пенроуз [1262], однако, обнаружил в семье больных ФКУ у шести родственников особый вид психического заболевания депрессивного типа, которое проявлялось после 50 лет. Он предположил, что для гетерозигот характерен повышенный риск заболевания психическими расстройствами. Однако в течение последних 50 лет проблеме возможных аномалий и подверженности заболеваниям у гетерозигот по ФКУ уделялось пора-

зительно мало внимания, и немногие исследования, посвященные этой проблеме, часто не адекватны с точки зрения эпидемиологии. Этот вопрос рассматривается в недавнем обзоре [1340].

Особенности, выявляемые у гетерозигот по ФКУ, подразделяются на 4 основных типа: отклонения по IQ и другим психологическим тестам; повышенный риск психических заболеваний; отклонения от нормы в электроэнцефалограмме (ЭЭГ), нарушение процессов размножения. Первые три аспекта будут подробно рассмотрены в разд. 8.2.3.2, посвященном генетике поведения; здесь отметим лишь, что большинство гетерозигот психически здоровы, однако для них высок риск заболеть шизофренией определенного типа, развивающейся в позднем возрасте. Описано небольшое снижение IQ (особенно в отношении устной речи), довольно часто выявляются отклонения в ЭЭГ. Согласно некоторым данным (вызывающим сомнение), для гетерозиготных по ФКУ женщин повышен риск спонтанных аборт и мертворождений.

Заслуживают внимания отдельные сообщения об аномально высоком уровне фенилаланина крови у гетерозигот в стрессовых ситуациях, таких как грипп с высокой температурой [1008] или беременность. Специалистами в области экогенетики было выдвинуто интересное предположение, что аспартам, подслащающее вещество с высоким содержанием фенилаланина, может наносить вред развивающимся эмбрионам у гетерозиготных женщин. (См. обсуждение материнской гиперфенилаланинемии в разд. 9.1.) Приведенные здесь данные, касающиеся гетерозигот по ФКУ, пока нельзя считать доказанными. Обследование нескольких сотен детей с небольшим умственным отставанием и отклонениями в поведении показало наличие среди них индивидов с повышенным уровнем фенилаланина в крови [1125]. Для проверки этих данных необходимы дополнительные исследования. Если факты подтвердятся, можно будет с уверенностью сказать, что уменьшенная активность фермента у гетерозигот делает их более подверженными определенным стрессовым ситуациям: этот феномен необходимо изучать.

Общие проблемы выявления гетерозигот. Впервые важность выявления и изучения гетерозигот для медицинской генетики отметил в 1949 г. Нил [1236]. Им были систематизированы имевшиеся в то время разрозненные данные. Позже (в 1953 г.) появились более полные работы Нила [1237] и (в 1954 г.) Франческетти и Клайна [1084]. Быстрое развитие биохимической генетики сделало возможным выявление гетерозиготных носителей многих болезней, особенно тех, которые обусловлены дефектами ферментов, выявляемых в фибробластах или клетках крови (табл. 4.10). Как правило, активность ферментов у гетерозигот снижена приблизительно вдвое по сравнению с нормальными гомозиготами, однако во многих случаях четкую грань между этими двумя группами провести невозможно. Некоторые индивиды демонстрируют промежуточные характеристики даже при прямом измерении активности фермента. Это неудивительно, если принять во внимание, что разные мутации в составе одного и того же локуса вызывают изменения активности фермента различных типов. Выявление гетерозигот важно не только для изучения механизма действия ферментов, оно имеет очень большое практическое значение. Установление факта гетерозиготности очень существенно для людей, у которых близкие родственники страдают болезнями, детерминированными X-хромосомой или аутосомно-рецессивными болезнями. Например, сыновья женщин, гетерозиготных по X-сцепленному заболеванию, с вероятностью 50% наследуют эту болезнь. Для большинства аутосомно-рецессивных болезней выявление гетерозигот не играет столь важной роли, если только потенциальные гетерозиготы братья или сестры больного гомозиготного индивида - не собираются жениться на двоюродных родственниках. Риск появления гомозиготных детей имеется только в том случае, когда будущие родители оба гетерозиготны, а для большинства рецессивных заболеваний вероятность случайной встречи таких гетерозигот чрезвычайно мала (см. закон Харди-Вайнберга, разд. 3.2). Выявление гетерозигот - необходимый этап при обследовании популяций. Уста-

Таблица 4.10. Некоторые способы выявления гетерозигот	
Способы	Примеры
Нестандартная полоса при белковом электрофорезе	Гемоглобинопатии
Пониженная активность фермента или белка в эритроцитах	Галактоземия (уменьшение активности галактозо-1-фосфат—уридилтрансферазы)
лейкоцитах	Нарушение процесса запасаения гликогена II типа (Помпе) (уменьшение активности α -глюкозидазы)
фибробластах и клетках амниона	Синдром Леша-Найхана (мозаичность по дефекту HPRT) и другие многочисленные ферментативные нарушения (обнаруживаются всё новые)
факторах свертываемости крови	Гемофилия, недостаточность протромбина и недостаточность стабильного фактора (фактор VII)
клетках печени, взятых путем биопсии	Фенилкетонурия (уменьшение активности фенилаланингидроксилазы)
Ненормальная концентрация метаболитов в крови	Фенилкетонурия (аномальная концентрация фенилаланина после его введения)
Функциональные нарушения	
энзиматических реакций	Варианты псевдохолинэстеразы с нарушенным ингибированием
структурных элементов	Сцепленная с X-хромосомой мышечная дистрофия Дюшенна (возрастание содержания креатинфосфокиназы в сыворотке)
Морфологические нарушения	Сцепленный с X-хромосомой глазной альбинизм (аномальный тип пигментации сетчатки)

новлено, например, что около 8% негритянского населения Америки - гетерозиготны по гену серповидноклеточной анемии и около 3-4% евреев-ашкенази являются гетерозиготами по гену болезни Тея-Сакса. Наиболее распространенным (1:2000) рецессивным заболеванием в Северной и Центральной Европе следует считать муковисцидоз. Гетерозиготы по нему составляют 4-5% всей популяции. Их выявление в этом случае очень желательно, поскольку велика вероятность обнаружения пар, в которых оба партнера несут ген муковисцидоза в гетерозиготном состоянии (не зная об этом). Потомство таких пар необходимо подвергать внутриутробному обследованию. К сожалению, основной биохимический дефект при этом заболевании неизвестен. Поиск гетерозигот и пренатальная диагностика значительно упростилась после того, как ген, ответственный за это заболевание, с помощью тесно сцепленного маркерного фрагмента ДНК был локализован в 7-й хромосоме [1167; 1344a; 1357a].

Подверженность заболеваниям у гетерозигот по рецессивным состояниям. Отсутствие простого надежного способа выявления гетерозигот по муковисцидозу достойно сожаления еще и потому, что с его помощью можно было бы решить и другую серьезную проблему. В начале 60-х годов появилось сообщение, согласно которому гетерозиготные носители муковисцидоза имеют повышенный риск заболеть язвой желудка или двенадцатиперстной кишки, а также хроническим бронхитом [1170]. Последующие исследования как будто не подтвердили эти данные. Окончательно вопрос можно будет решить только после того, как в возрастной группе, особенно подверженной названным заболеваниям, будут учтены все гетерозиготы. Подобные исследования возможны только при наличии надежного теста на гетерозиготность. В разд. 3.7.4 обсуждалась недостаточность α_1 -антитрипсина как пример гомозиготного состояния, которое во многих случаях обуславливает подверженность хроническим обструктивным болезням лег-

ких. Опасность заболеть увеличивается при соприкосновении с определенными агентами окружающей среды, такими как табачный дым. Известно также, что гетерозиготы по серповидноклеточной анемии здоровы в нормальных условиях, но при умеренной гипоксии, например на высоте свыше 2500 м над уровнем моря, у них может возникнуть серповидноклеточная анемия и развиться инфаркт селезенки.

Имеется много разрозненных данных [2340], касающихся других заболеваний. Например, у гетерозигот по различным липидозам наблюдается незначительное снижение IQ в сочетании с личностными расстройствами. У гетерозигот по цистинурии часто образуются камни в почках; гетерозиготы по галактокиназной недостаточности подвержены преждевременной катаракте; при некоторых разновидностях болезни Вильсона описаны нарушения функционирования почечных канальцев и незначительные неврологические изменения. Возможный риск развития рака был тщательно изучен для гетерозигот по пигментной ксеродерме, которая обусловлена нарушением эксцизионной репарации ДНК (разд. 5.1 6.3). Повышенный риск рака в сравнительно молодом возрасте был характерен для синдрома Блума и для атаксии-телеангиэктазии (но не для анемии Фанкони). Интересно отметить, что вероятность заболеть раком кожи для гетерозигот по пигментной ксеродерме повышена только на юге США, но не в других районах страны. В данном случае налицо экогенетическая проблема: увеличение интенсивности УФ-излучения вызывает перегрузку эксцизионной системы репарации, которая вполне может справиться с низким уровнем УФ-излучения.

Для того чтобы сделать обоснованный вывод о подверженности обычным болезням и о наличии небольших физиологических отклонений, требуются сложные статистические исследования и тщательный подбор контролей. Прежде всего необходимо обследовать большое количество гетерозигот, выявленных надежными биохимическими и генетическими методами. Изучение гетерозигот позволит глубже понять генетические условия, вызывающие обычные заболевания, и подойти к решению многих других проблем. Например, вариабельность, выявляемая при измерении IQ, в значительной степени может быть вызвана в популяции просто высокой частотой гетерозигот по рецессивным болезням (см. разд. 8.2.3.2). Если окажется, что повышенная чувствительность к заболеванию у гетерозигот является правилом, а не исключением, наши предсказания об увеличении мутационного груза, обусловленного ионизирующей радиацией и химическими мутагенами, придется в значительной степени пересмотреть. Таким образом, необходимы дальнейшие исследования в этом направлении. Особенно важно разрабатывать качественные тесты, позволяющие отличать гетерозигот от нормальных индивидов.

Тестирование гетерозигот при гемофилии А(30670). Особое значение в генетической консультации имеет выявление гетерозиготных носителей в случае заболеваний, сцепленных с полом. Гемофилия А – одно из наиболее часто встречающихся заболеваний, детерминируемых X-хромосомой (разд. 3.1.4). Она возникает в результате нарушения гуморального фактора, необходимого для первой стадии свертывания крови (рис. 4.27) - антигемофилического глобулина (фактор VIII). У нормальных индивидов активность этого белка в плазме варьирует от 40 до 300% относительно среднего значения в популяции, принятого за 100% [1277]. У больных гемофилией активность фактора VIII резко снижена или даже полностью отсутствует. Однако плазма большинства больных содержит вещество, которое реагирует с антисывороткой к фактору VIII. Судя по всему, в крови таких гемофиликов содержится антигемофилический глобулин, потерявший свою активность, но сохранивший иммунологические свойства в качестве перекрестно-реагирующего материала (ПРМ, англ. CRM разд. 4.2.2.2); концентрация такого белка - нормальная. У гетерозигот благодаря инаktivации X-хромосомы половина клеток продуцирует активный фактор VIII, способный обеспечить свертывание крови и проявлять специфические иммунологические свойства. Остальные клетки продуцируют ПРМ, сохраняющий иммунологические свойства, но утративший способность участвовать в свертывании крови. Таким образом, активность свертывания крови у

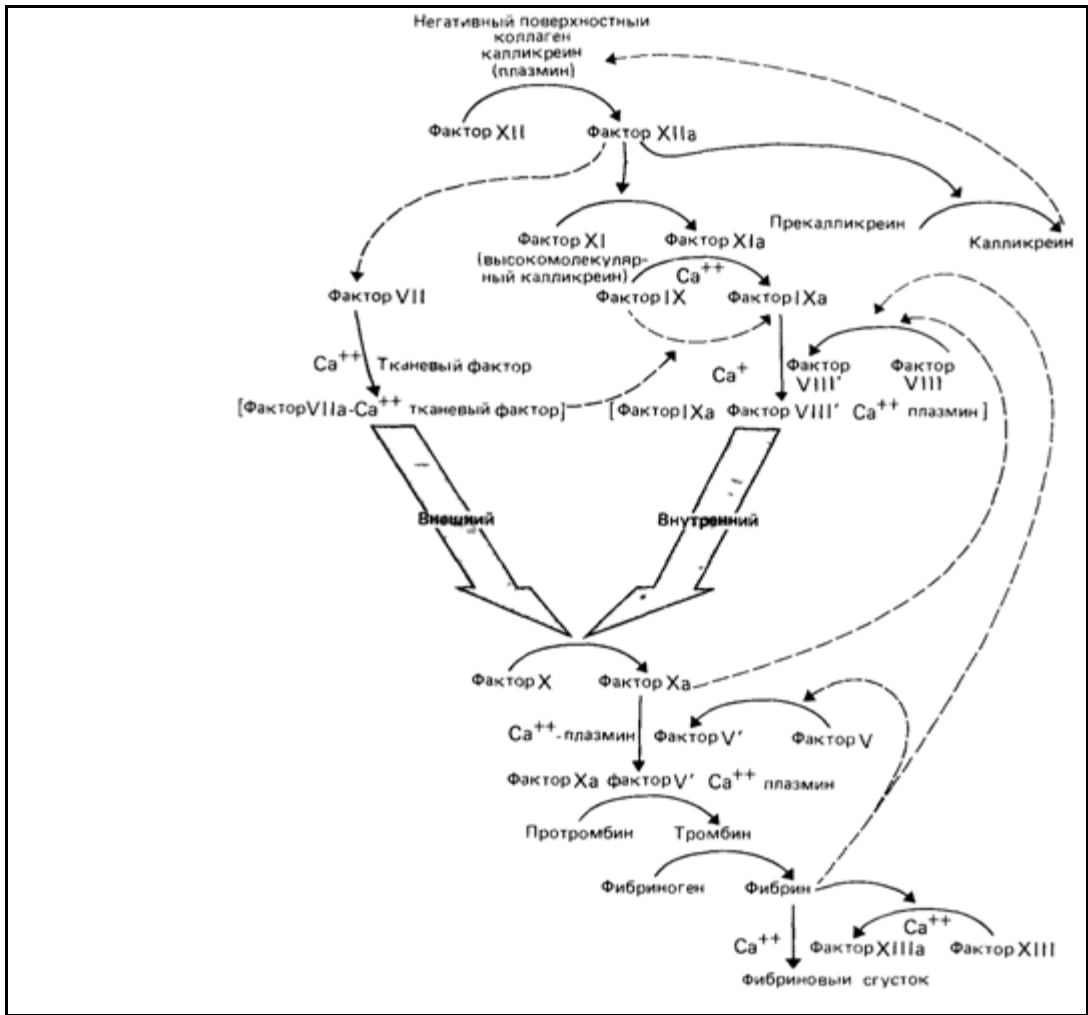


Рис. 4.27. Стадии свертывания крови Почти для всех этих стадий известны наследственные нарушения. Недостаточность фактора VIII вызывает гемофилию А, фактора IX гемофилию В [207].

гетерозигот должна быть снижена приблизительно вдвое по сравнению с нормой. При иммунологическом определении, однако, будет выявляться нормальное количество антигемофилического Iлобулина, поскольку с антителами будут одновременно реагировать и активный белок, и ПРМ.

До разработки иммунологического теста идентификация гетерозигот основывалась только на определении активности фактора **VIII**. Хотя средняя активность у гетерозигот действительно была низкой и составляла около 50%, сохранялось большое перекрытие между гетерозиготами и нормальными индивидами, сильно затруднявшее генетическую консультацию. Этот результат не удивителен, поскольку у здоровых людей способность к свертыванию крови варьирует в огромной степени. Серьезный прогресс стал возможен после введения в практику количественного иммунологического теста. Однако, прежде чем использовать этот метод, необходимо доказать наличие **ПРМ** в крови хотя бы одного больного гемофилией в обследуемой семье, поскольку существует разновид-

ность гемофилии А (острая), при которой ПРМ в крови отсутствует. А priori ясно, что не всякую гетерозиготную женщину можно выявить таким способом, поскольку вследствие случайной инактивации X-хромосомы некоторые индивиды будут абсолютно нормальными по обоим тестам (иммунологическому и свертываемости). Совсем недавно для идентификации носителей гена гемофилии стали применяться усовершенствованные биохимические методы, в особенности определение компонентов молекулы фактора VIII; кроме того, стали более адекватными статистические методы, объединившие вероятностные оценки на основе изучения родословных и результаты лабораторных исследований [1111 а, б]. Обнаружение полиморфизма ДНК в гене фактора VIII открыло новые перспективы не только для выявления гетерозигот, но и для пренатальной диагностики.

Здесь будет уместно заметить, что последние годы характеризовались впечатляющим прогрессом в исследованиях свертывания крови и его нарушений. Совместная работа различных белков, подчиненных сложному генетическому контролю, в процессе свертывания крови и растворения тромбов - это пример взаимодействия многих генетических факторов в выполнении сложной физиологической функции. Этот клубок удалось распутать в основном благодаря изучению крови больных с различными генетическими нарушениями свертываемости. Свертывание крови - это не простая и даже не просто разветвленная цепная реакция; в нее входят циклы обратной связи. Некоторое представление о системе свертывания крови дает рис. 4.27. Эта тема детально обсуждается в литературе [1111а, б; 1214].

Выявление гетерозигот по мышечной дистрофии Дюшенна [1119; 1221]. Определение носителей дефектного гена особенно важно с практической точки зрения при X-сцепленной мышечной дистрофии Дюшенна (31020). Это тяжелое неизлечимое заболевание, которое неизбежно ведет к ранней смерти. Вот почему у женщин с высоким риском рождения больного мальчика беременность разумнее прекратить, если установлено, что эмбрион мужского пола. Из этого следует, что риск рождения больного и статус носителя должны быть определены с максимальной точностью. Для этого необходимо сочетание статистических и биологических методов (см. приложение 8). Среди биологических методов наиболее информативен метод измерения активности сывороточного фермента - креатинфосфокиназы. В норме этот фермент обнаруживается только в мышцах, и уровень его в сыворотке низок. Однако при нарушении мышечной ткани большое количество фермента попадает в кровь и активность его возрастает. У гетерозиготных больных мужчин регистрируется очень высокий уровень креатинфосфокиназы. Лишь на последних стадиях болезни, когда разрушена уже большая часть мышечной ткани, он снижается. Около 70% женщин, достоверно являющихся гетерозиготными носителями (у которых по крайней мере один сын пораженный), имеют отчетливо повышенный уровень фермента в крови. Проблема диагностики осложняется тем обстоятельством, что нормальные индивиды и носители наиболее четко различаются лишь в детстве, а с возрастом уровень креатинкиназы падает и у здоровых, и в еще большей степени у гетерозигот. Падает он также и в ходе беременности.

Помимо определения активности креатинкиназы было предложено много других способов выявления гетерозигот. Недавно с помощью методов ультразвукографии или компьютерного ультразвукового сканирования у носителей обнаружены значительные изменения в строении бедренных и икроножных мышц [1283]. В будущем значительную роль в более точной оценке риска, несомненно, будет играть анализ сцепления с ДНК-маркерами на основе технологии рекомбинантных ДНК [1358] (разд. 3.4.3). Заметим, однако, что дистрофия Дюшенна нередко проявляется в семье спорадически, т. е. возникает вследствие новых мутаций в половых клетках матери (разд. 5.1.3.4), что во многих случаях затрудняет анализ сцепления. Вот почему совершенно необходимо улучшать методы выявления носителей по их фенотипу. Мозео [1221] и Харпер [1119] выдвинули ряд полезных предположений для генетической консультации.

Трудности в выявлении гетерозигот. Если о гетерозиготности судят по уровню ферментативной активности или на основании какого-либо количественного анализа крови, часто возникают осложнения, связанные с перекрытием значений. Методы поиска гетерозигот могут заметно различаться для носителей аутосомно-рецессивных или сцепленных с X-хромосомой мутаций, с одной стороны, и для носителей гена аутосомно-доминантного заболевания, с другой. В большинстве случаев средние уровни анализируемого вещества у гетерозигот и у нормальных индивидов достоверно различаются. Однако при этом, как правило, имеет место значительное перекрытие выборочных распределений, так что многие здоровые люди по уровню анализируемого вещества могут быть ошибочно приняты за гетерозигот. Причины этого явления не вполне ясны, возможно, оно связано с существованием невыявленных «изоаллелей», каждый из которых определяет свой диапазон уровней ферментативной активности (разд. 3.6). При использовании количественных тестов для правильной интерпретации результатов важно оценить априорную (или байесовскую) вероятность гетерозиготности.

В таблице 4.11, *A* в качестве примера показаны результаты ферментного анализа для острой перемежающейся порфирии. Это заболевание может проявляться у гетерозигот, но при скрининге популяции большую часть случаев повышения активности порфобилиноген-дезаминазы следует отнести к ложным гетерозиготам, поскольку реальная популяционная частота истинных гетерозигот составляет всего лишь 1:10 000. Для больного, среди родственников которого нет пораженных порфирией, но у которого некоторые клинические симптомы позволяют заподозрить это заболевание, априорную вероятность можно оценить только грубо. У брата или сестры достоверно больного априорная вероятность гетерозиготности составляет 50%. Вероятность того, что в таких случаях результаты обследования действительно свидетельствуют в пользу гетерозиготности, можно вычислить, исходя из априорного ожидания и степени перекрытия между здоровыми и гетерозиготами, которая должна быть определена по возможности точно (табл. 4.11, *A, B*).

Из этого вытекает необходимость организации централизованных лабораторий, где должно проводиться сравнительное обследование большого числа здоровых и гетерозигот и где можно было бы получить генетическую консультацию.

Изучение уровня порфобилиноген-дезаминазы при острой перемежающейся порфирии показало, что значения активности этого фермента, характерные для 30% контрольной (т. е. нормальной) популяции, перекрываются со значениями, полученными на выборке несомненных гетерозигот, страдающих острой перемежающейся порфирией (1) (табл. 4.11). Только у 20% гетерозигот уровень фермента был ниже, чем у всех представителей контрольной популяции. Рассмотрим модельный случай, когда у людей различных групп установлена одна и та же активность фермента-95 единиц (табл. 4.11). В соответствии с априорными оценками вероятности (табл. 4.11, *A*) общая оценка вероятности носительства гена порфирии составит: а) 0,07% для человека из общей популяции без каких-либо симптомов; б) 7% для человека с 1%-ным риском; в) 44% для лиц с 10%-ным априорным риском и г) 87% для близкого родственника больного с 50%-ным риском. Эти данные показывают значительную неопределенность диагноза в том случае, когда не может быть получена надежная априорная оценка вероятности заболевания. Надо отметить, что повторные измерения не всегда делают окончательную оценку более точной. При очень низких и очень высоких уровнях фермента интерпретация отличается, если, как в нашем примере, для большого числа нормальных и гетерозиготных особей известны уровни активности фермента.

В отличие от количественных оценок, которые, как правило, неоднозначны, качественная аномалия по закону «все или ничего», выявленная биохимически или с помощью рекомбинантных ДНК, позволяет поставить четкий диагноз независимо от априорных вероятностных оценок.

Таблица 4.11, А. Уровень активности порфобилиноген-деаминазы у 217 здоровых людей и 105 больных острой перемежающейся порфирией. (По Bonalti-Pellie et al., 1984.)

Активность фермента (единицы)	Больные порфирией и облигатные гетерозиготы, % (х)	Здоровые люди контроль, % (у)	Лабораторные оценки вероятности обнаружения гетерозигот (х:у)
<70 ¹⁾	20	0	Очень высокая ¹⁾
70-79	23,8	0,5	48:1
80-89	22,9	0,9	25:1
90-99	16,2	2,3	7:1
100-109	9,5	3,7	2,6:1
110-119	5,7	8,3	0,7:1
120-129	1,9	14,3	0,13:1
>129 ²⁾	0	70	Очень низкая (практически отсутствует) ²⁾

Необходимо отметить, что оценки в каждой лаборатории должны быть получены независимо на основе достаточно большой выборки.

¹⁾ Поскольку такой уровень активности фермента был обнаружен у 20% гетерозигот и не был обнаружен ни у одного здорового человека, вероятность того, что человек с такой ферментативной активностью является гетерозиготой, очень высока. Чем ниже уровень активности фермента, тем вероятность этого выше.

²⁾ Значения активности, превышающие 129 единиц, не были зарегистрированы ни у одного больного порфирией, в то же время такой уровень активности фермента наблюдался у 70% здоровых людей. При более высоких значениях активности фермента вероятность гетерозиготности по гену порфирии снижается.

Таблица 4.11, Б. Оценки априорной вероятности гетерозиготности по гену острой перемежающейся порфирии при одном и том же показателе активности фермента (95 единиц) у больных с различными значениями априорной вероятности. (Лабораторные оценки взяты из работы Bonalti-Pellie et al., 1984.)

Лабораторная оценка (единицы)	Априорная	вероятность	Лабораторные оценки вероятности гетерозиготности (см. табл. 4.11, А)	Объединенные оценки вероятности гетерозиготности	Итоговая оценка риска гетерозиготности ²⁾
	Оценка ¹⁾				
95	1/9999 (по результатам обследования популяции)	1/10000	7:1	7:9999	0,0007 = 1/1500
95	1/99 (при наличии слабых клинических симптомов)	1/100	7:1	7:99	0,07
95	1/9 (при наличии четких клинических симптомов)	1/10	7:1	7:9	0,44
95	1:1 (для сибсов и детей больного)	1/2	7:1	7:1	0,87

¹⁾ Оценка = P:(1 — p), где p- вероятность.

²⁾ Получено перемножением априорных вероятностей и лабораторных оценок, определенных для лиц, несущих и не несущих ген порфирии; для определения итоговой оценки риска гетерозиготности как $x/x + z$, где x - объединенная оценка, определенная для человека, несущего ген порфирии, а z —объединенная оценка, определенная для здорового человека. Пример: априорная оценка - 1:9, лабораторная оценка - 7:1, объединенная оценка отношения вероятности наличия и отсутствия в генотипе гена порфирии 7:9, определенная как $[(1 \times 7):(9 \times 1)]$. Итоговая оценка $7/(7 + 9) = 7/16 = 44\%$.

4.2.2.9. Лечение наследственных метаболических заболеваний [1289; 1057; 1058]

Общие принципы. В прошлом констатация наследственного характера признака подразумевала, что такой признак нельзя изменить путем внешних воздействий. Поэтому считалось, что наследственные болезни невозможно лечить. Многие врачи и психиатры полагали, что роль генетики в развитии медицины незначительна. Ошибочность подобной точки зрения становится ясной при изучении врожденных дефектов метаболизма. Наши возможности повлиять на заболевание или на аномалию поведения зависят часто не от того, наследуются они или нет, а от глубины наших знаний о механизмах развития патологии.

Повлиять на наследуемые признаки можно в принципе на всех уровнях действия гена. Теоретически, наиболее полным было бы воздействие на уровне генетического материала - ДНК. Впервые перенос ДНК неполовым путем с помощью бактериофага (или другими способами) был продемонстрирован для бактерий. В настоящее время такой перенос становится возможным для высших организмов, включая клетки человека. Методы генной инженерии привлекли внимание широкой общественности, однако без достаточных оснований акцент в публикациях делался на клонировании и создании искусственных людей. В результате многие были напуганы последствиями генетических исследований человека вообще. В действительности же генная терапия некоторых менделирующих заболеваний в будущем может стать очень эффективной. В таком случае она займет достойное место в ряду различных терапевтических средств. Эту тему мы более подробно обсудим дальше, в разделе 9.2, посвященном генетическому будущему человечества.

В некоторых случаях, вероятно, проще заменить не сами гены, а их непосредственные продукты, мРНК. В настоящее время примеры удачного применения такого подхода неизвестны. Значительно дальше исследователи продвинулись в попытках заместительной терапии с использованием ферментов или других белков. Часто метаболические последствия генетического блока удается преодолеть путем соответствующего воздействия извне. Классический пример такого подхода - лечение фенилкетонурии диетой с ограниченным содержанием фенилаланина - обсуждался в разд. 4.2.2.7. В других случаях клинические последствия связаны не с накоплением метаболитов, предшествующих блокированному этапу, а с отсутствием метаболита, следующего после него. В такой ситуации может оказаться полезным добавление к пище отсутствующего метаболита.

Наконец, возможно успешное лечение многочисленных вторичных последствий генетических заболеваний от исправления нарушений эндокринной регуляции, вызванных блоком синтеза гормонов, до переливания крови при наследственной анемии. Краткая сводка существующих терапевтических возможностей приведена на рис. 4.28. Ниже будут рассмотрены многочисленные примеры. Более полный обзор дан в [1058].

Заместительная белковая или ферментная терапия. Классический пример лечение гемофилии А. Фактор VIII при активности в 30-40% от средней для нормы останавливает кровотечение. Такой уровень активности может быть достигнут инъекциями этого фактора. Его концентрат готовят из крови человека. Доступность концентрата сделала возможным лечение кровотечений в домашних условиях; больные гемофилией могут вести почти нормальную жизнь. Проблемы возникают в связи с тем, что для приготовления достаточных количеств требуемого препарата необходимо большое количество донорской крови [428]. В настоящее время уже сделаны первые и решающие шаги, направленные на получение чистых препаратов фактора VIII методами генетической инженерии: соответствующий ген уже клонирован, достигнута его экспрессия (в составе плазмиды) в культуре трансформированных клеток.

Другим примером может служить лечение препаратами псевдохолинэстеразы больных с нарушенной активностью этого фермента [1105]. Отметим два благоприят-

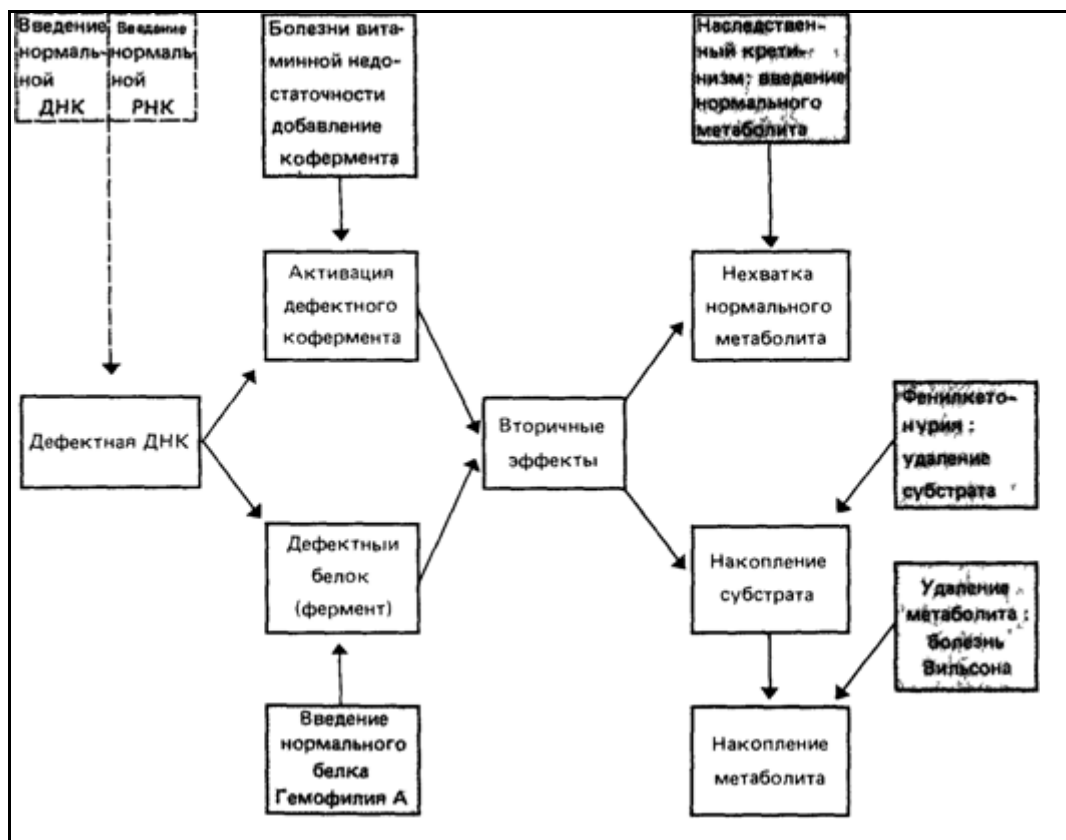


Рис. 4.28. Возможные пути исправления наследственных нарушений метаболизма. Введение в организм ДНК или РНК не дает положительного результата. Эффективна заместительная ферментная терапия. Вторичные эффекты нарушения работы ферментов можно преодолеть добавлением нормального метаболита или удалением избытка субстрата или метаболита.

ных фактора, облегчающих коррекцию данной патологии.

1 Недостаточность псевдохолинэстеразы не оказывает вредного воздействия в нормальных условиях, профилактическое лечение требуется только тогда, когда больному вводят мышечные релаксанты, т.е. при серьезных операциях.

2 После инъекции нормальной плазмы активность фермента уменьшается в два раза в течение 12 часов. Таким образом, для проведения операции достаточно одной инъекции.

При первых попытках лечения в качестве источника фермента использовали плазму здорового человека, но вскоре стало очевидно, что очищенные препараты фермента обладают явными преимуществами. Как показано на рис. 4.29, необходимый уровень фермента поддерживается достаточно долго после инъекции и нормализует длительность релаксации мышц.

Ферментная терапия других наследственных заболеваний пока не вошла в каждодневную врачебную практику, хотя предварительные исследования оказались довольно успешными, например в случае болезни Гоше, при которой внутривенно вводили недостающую глюкоцереброзидазу (23080, [1056]). Как правило, заместительная терапия при заболеваниях, вызванных ферментной недостаточностью, требуется в течение всей жизни. В связи с этим возникают следующие проблемы:

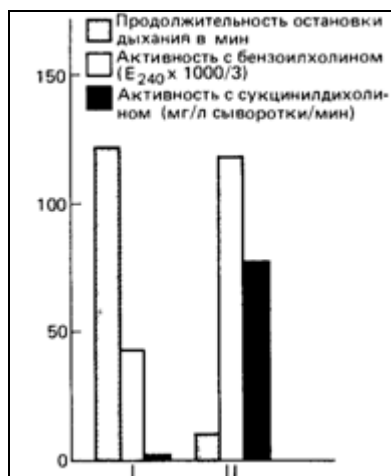


Рис. 4.29. Влияние инъекций псевдохолинэстеразы (препарат обогащен в 1300 раз) на продолжительность остановки дыхания и активность этого фермента по отношению к двум субстратам: бензилхолину и сукцинилдихолину. На рисунке представлены результаты обследования трех индивидов с атипичными ферментами до лечения (I) и через десять минут после инъекции (II). После инъекции активность фермента возрастает. Это ведет к уменьшению времени остановки дыхания [196]. Высота белых и черных столбиков отражает изменения в активности.

а) фермент удаляется из организма довольно быстро, необходимо постоянное поддержание его уровня;

б) если вводимый фермент будет воспринят иммунной системой как чужеродный белок, антитела сделают инъекцируемый материал биологически неэффективным.

Существуют различные способы преодоления подобных препятствий. Для получения ферментов, которые синтезируются в клетках человека и потому являются наиболее предпочтительными для терапии, необходимы очень большие объемы клеточных культур. Источником ферментов может служить также плацентарный материал. Ферментативный дефект при мукополисахаридозе типа Хурлера (разд. 4.2.2.3) удается временно компенсировать переливанием лейкоцитов [1168], а при болезни Хантера пациентам имплантируют культивированные *in vitro* фибробласты близких родственников [1052]. В обоих случаях достигается временное снижение количества накопленного метаболита. Недавние достижения в этой области подробно обсуждаются в других обзорах [1057; 1058]. Если фермент вводить в составе полупроницаемых микрокапсул, доступ к нему возможных антител будет затруднен, в то время как субстрат, молекулы которого обладают обычно гораздо меньшей молекулярной массой, сможет проникнуть внутрь капсулы [983].

Для ферментов, поглощаемых клетками, таких, как ферменты лизосом, которые участвуют в катаболизме гликозаминогликана (разд. 4.2.2.3), можно применять внутривенное введение без использования капсул. В заключение отметим, что заместительная терапия при заболеваниях, вызванных дефектами ферментов, не всегда возможна и эффективна. Более плодотворным нам представляется подход, который подразумевает воздействие на метаболические последствия ферментативных дефектов.

Изменение факторов внешней среды удаление метаболита перед блокированным этапом. Метаболит, являющийся субстратом дефектного фермента и накапливающийся перед блокированным этапом метаболического пути, достаточно просто удалить, если он не синтезируется в организме, а поступает с пищей. Мы уже говорили об этом в случае фенилкетонурии. В качестве другого примера можно привести галактоземию, которая возникает из-за недостаточности одного из трех ферментов, превращающих галактозу в глюкозу. При этом заболевании удалить накапливающийся субстрат проще, поскольку галактоза содержится почти исключительно в молоке. Проблема усложняется, если вредный метаболит нельзя удалить, не нарушив тем самым нормальной функции организма.

В некоторых случаях субстрат дефектного фермента в норме образуется непосредственно в организме. В качестве примера можно опять привести мукополисахариды: они постоянно синтезируются и нужны для многих структурных элементов организма. В такой ситуации небольшое снижение синтеза может замедлить развитие заболевания, а иногда даже помочь

организму справиться с ним благодаря использованию остаточной активности фермента или альтернативного метаболического пути. Описаны случаи, когда нарушение ферментативной активности фенотипически проявляется не в накоплении метаболита перед блокированным этапом, а в отсутствии метаболита после него.

Изменение факторов внешней среды: замещение метаболита после блокированного этапа. Терапия такого типа широко применяется при нарушениях синтеза гормонов. Этой теме посвящено несколько недавних обзоров [171; 1288; 1243]. Упомянем также болезни накопления гликогена (типы I и III).

В этом случае большая часть клинических симптомов обусловлена не собственно накоплением гликогена, а невозможностью его расщепления до глюкозы, что ведет к хронической гипогликемии. Лечение внутривенными инъекциями глюкозы столкнулось бы с непреодолимыми трудностями и, кроме того, привело бы к еще большему накоплению гликогена. Поэтому было предложено хирургическое вмешательство с целью формирования пути, позволяющего крови миновать печень; в результате поступающая из кишечника кровь содержит глюкозу в достаточной концентрации. Создание шунта между портальной и нижней поллой венами позволяет большей части крови миновать печень и транспортировать глюкозу непосредственно к сердечной мышце и к другим органам. После этой операции в состоянии больных наблюдается явное улучшение [1131].

Другим примером может служить оротовая ацидурия, описанная в разд. 4.2.2.4. Избыток оротовой кислоты сам по себе не вызывает заметных вредных последствий, однако, недостаток уридинсодержащих соединений приводит к нарушению синтеза нуклеиновых кислот, что влечет за собой мегалобластную анемию и, кроме того, серьезную задержку роста. Добавлением уридина к пище удастся восполнить недостаток метаболита и предотвратить проявление клинических симптомов заболевания.

Удаление метаболита, предшествующего блокированному этапу, и добавление метаболита, следующего за блоком. При заболеваниях, связанных с накоплением гликогена, повышение концентрации глюкозы (которая образуется в блокированной реакции благодаря тому, что кровь частично минует печень) приводит одновременно к уменьшению накопления гликогена. При других болезнях клинические симптомы обусловлены обоими механизмами, что приводит к усложнению терапии. Примером может служить гомоцистинурия [23620], причиной которой является нарушение цистатионин - синтазы (рис. 4.30). Гомоцистеин образуется из метионина, поступающего с пищей. Поэтому необходимо уменьшить количество потребляемого метионина. Но поскольку метионин, как и фенилаланин, принадлежит к числу незаменимых аминокислот, его нельзя полностью исключить. Важно также, что в нормальных условиях из метионина образуется цистеин (рис. 4.30). Для гомоцистинурии характерно большое число симптомов. Многие из них вызваны недостатком цистеина; поэтому диета включает повышенное количество цистеина. При другом типе гомоцистинурии помогают терапевтические дозы витамина В₆, который является коферментом цистатионин - синтазы.

Лечение путем устранения побочных эффектов метаболических заболеваний. В настоящее время большинство наследственных болезней, поддающихся лечению, лечат именно этим способом. При таком подходе не требуется точного знания патофизиологических и генетических механизмов. Например, мы почти ничего не знаем о биохимических причинах полидактилии, «заячьей губы» или «волчьей пасти». Но это не мешает успешно оперировать таких больных. Очень мало известно о биохимических основах психических болезней (разд. 8.2.3.6). Тем не менее для лечения больных, страдающих шизофренией или эмоциональными расстройствами, оказалось возможным подобрать чисто эмпирическим путем вполне адекватный способ медикаментозного лечения. Во всех областях медицины большая часть методов

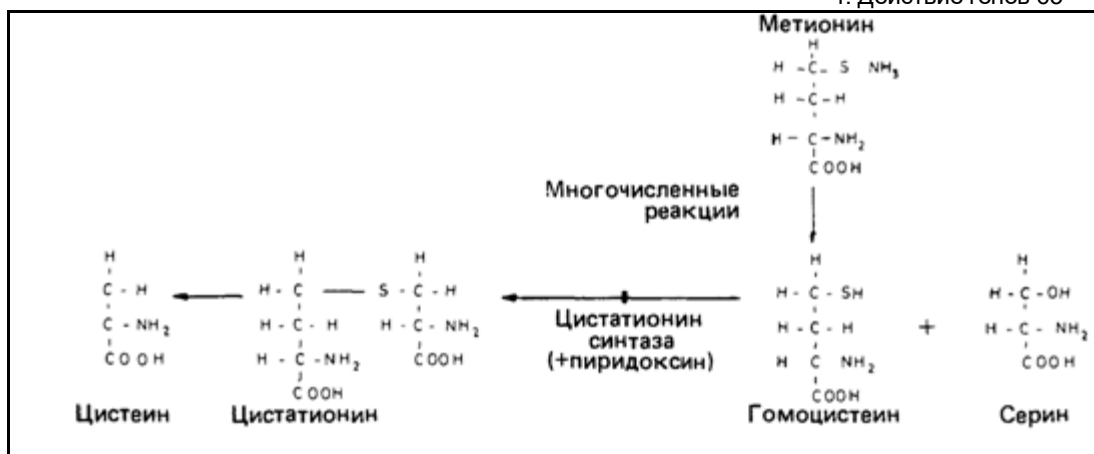


Рис. 4.30. Образование цистеина из метионина. При гомоцистинурии цистатионин-синтаза неактивна. Это ведет к увеличению количества гомоцистеина и гомоцистина с одной стороны, и к недостатку цистеина с другой.

лечения (включая успешные) основана на эмпирических выводах независимо от того, каким в действительности является вклад генетической компоненты в развитие заболевания. В настоящее время наши возможности лечения наследственных болезней не очень велики [1045]. Впрочем, этот вывод можно отнести к большинству заболеваний.

Главная цель медико-биологических исследований - терапевтическое вмешательство, основанное на детальном знании патофизиологических механизмов. В качестве примера приведем группу адреногенитальных синдромов, обусловленных дефектами ферментов, участвующих в синтезе стероидных гормонов надпочечников. Установлено, что при нарушении синтеза кортизола (17-оксикортикостерона) блокирована нормальная обратная связь, подавляющая образование АКТГ в гипофизе, который стимулирует образование в большом количестве 17-кетостероидов из 17-оксипрогестерона. Кетостероиды в свою очередь стимулируют развитие половых признаков и ведут к маскулинизации больных женщин. Добавление кортизола восстанавливает цикл обратной связи, снижается образование АКТГ и, вследствие этого 17-кетостероидов, что предотвращает маскулинизацию (рис. 4.31). *Диета при болезнях метаболизма и общий гентрофический принцип.* При многих болезнях метаболизма фенотипических последствий ферментативного дефекта можно избежать, если соответствующим образом изменить диету. Только в силу редкости подобных состояний их относят к патологии: если бы подобные ферментативные нарушения обнаруживались у большей части населения, мы изменили бы соответственно свои привычки в еде, и то, что сейчас считается дефектом, рассматривалось бы как норма. Примером может служить сниженное всасывание лактозы, содержащейся в молоке, характерное для большинства лиц восточного происхождения, негров и многих европейцев. Потребление больших количеств молока и молочных продуктов вызывает у таких дефектных по лактазе больных метеоризм и чрезмерно повышенную перистальтику. У большинства людей, происходящих с северо-запада Европы, такие проблемы не возникают, поскольку уровень лактазы у них достаточно высок (разд. 7.3.1; [1924; 1922]).

В разд. 4.2.2.5 были описаны патологические состояния, вызванные нарушениями всасывания, переработки и утилизации предшественников коферментов (витаминов). Эти болезни можно лечить необычно высокими дозами конкретных витаминов. Однако с эволюционной точки зрения даже нормальная потребность в витаминах может рассматриваться как множественная

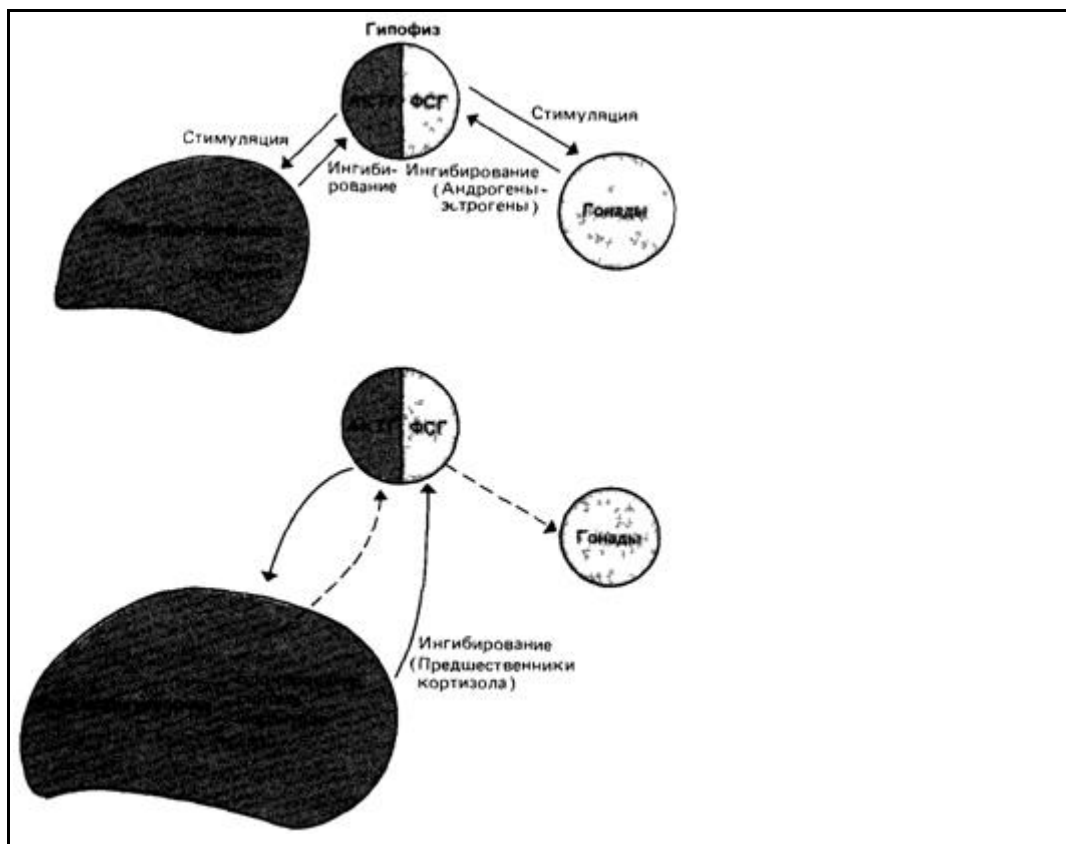


Рис. 4.31. А. Механизм отрицательной обратной связи между гипофизом и корой надпочечников. Кора надпочечников стимулируется гипофизарным гормоном АКТГ (АСТН), конечный продукт синтеза кортикостероидов - кортизол - ингибирует образование АКТГ, в то же время гонады стимулируются гормоном ФСГ (FSH) до тех пор, пока продуцируемые ими андрогены (или эстрогены) не ингибируют образование ФСГ. Б. При адреногенитальном синдроме образование кортизола ингибируется вследствие генетического дефекта. Это оказывает двойное воздействие на гипофиз. Образование АКТГ не ингибируется. Аномально высокое содержание АКТГ ведет к образованию избытка предшественников кортизола, которые подавляют образование ФСГ из-за их химического сходства с андрогенами. В результате происходит маскулинизация женщин. Введение кортизола восстанавливает нормальную обратную связь.

генетически обусловленная недостаточность, поскольку и *Neurospora crassa*, и *E coli* способны синтезировать практически все витамины. L-аскорбиновая кислота (витамин С) играет роль мощного восстановителя в метаболизме млекопитающих и синтезируется почти всеми видами, за исключением человека, высших приматов и морских свинок. Люди нуждаются в постоянном «лечении с помощью замещения», которое, к счастью, обеспечивается нормальным питанием. Однако в исключительных ситуациях, например, в дальних плаваниях прошлых столетий, когда пища не содержала достаточного количества витамина С, развивалась цинга.

Другие метаболические пути, утраченные в ходе эволюции, - это пути синтеза так называемых, незаменимых аминокислот. Для некоторых бактерий и грибов эти незаменимые для нас аминокислоты таковыми вовсе не являются, а могут синтезироваться из простых источников азота, таких как аммиак.

До сих пор мы рассматривали диетическое лечение в основном редких, наслед-

ственных вариантов с ярко выраженными эффектами. Однако даже при простом измерении концентрации фенилаланина в сыворотке, кроме крайних, классических случаев ФКУ, обнаруживаются случаи легкой гиперфенилаланинемии. Для поддержания «нормального» в обычном понимании этого слова развития таким людям не нужно придерживаться специальной диеты. Однако имеются данные, указывающие на несколько повышенную подверженность болезням гетерозигот, у которых снижена активность фенилаланингидроксилазы. Если это подтвердится, можно будет сказать, что такая чувствительность зависит от количества избыточного фенилаланина, остающегося после удовлетворения нужд синтеза белка.

В разд. 6.1.2 мы обсудим генетический полиморфизм. Установлено, что треть всех находящихся в крови человека ферментов встречается в различных молекулярных формах, часто с неодинаковой активностью. Это означает, что метаболические пути слегка отличаются у разных индивидов (за исключением однояйцевых близнецов), т.е. человек «биохимически индивидуален» [225]. Одна из особенностей такой индивидуальности заключается в том, что для оптимального развития пищевые потребности разных людей могут слегка отличаться. Этот «генотрофический принцип» является частью взаимной адаптации индивида, его конкретной генетической конституции и окружающей его среды.

4.2.2.10. Необнаруженные дефекты ферментов

Сколько ферментов у человека и какие дефекты ферментов известны? Некоторые метаболические пути пока еще не выяснены. Поэтому никто не знает точного числа ферментов у человека. Согласно приблизительным оценкам, оно достигает по меньшей мере 10 000. Примерно для 200 ферментов, или для 2%, известны дефекты. Как быть с остальными 98%?

Во-первых, очевидно, что имеется большое количество наследственных заболеваний, которые, судя по всему, вызваны именно дефектами ферментов, но это пока не подтверждено с помощью соответствующих методик. Большинство аутосомнорецессивных заболеваний, перечисленных в каталоге Мак-Кьюсика, могут принадлежать к этой группе [133].

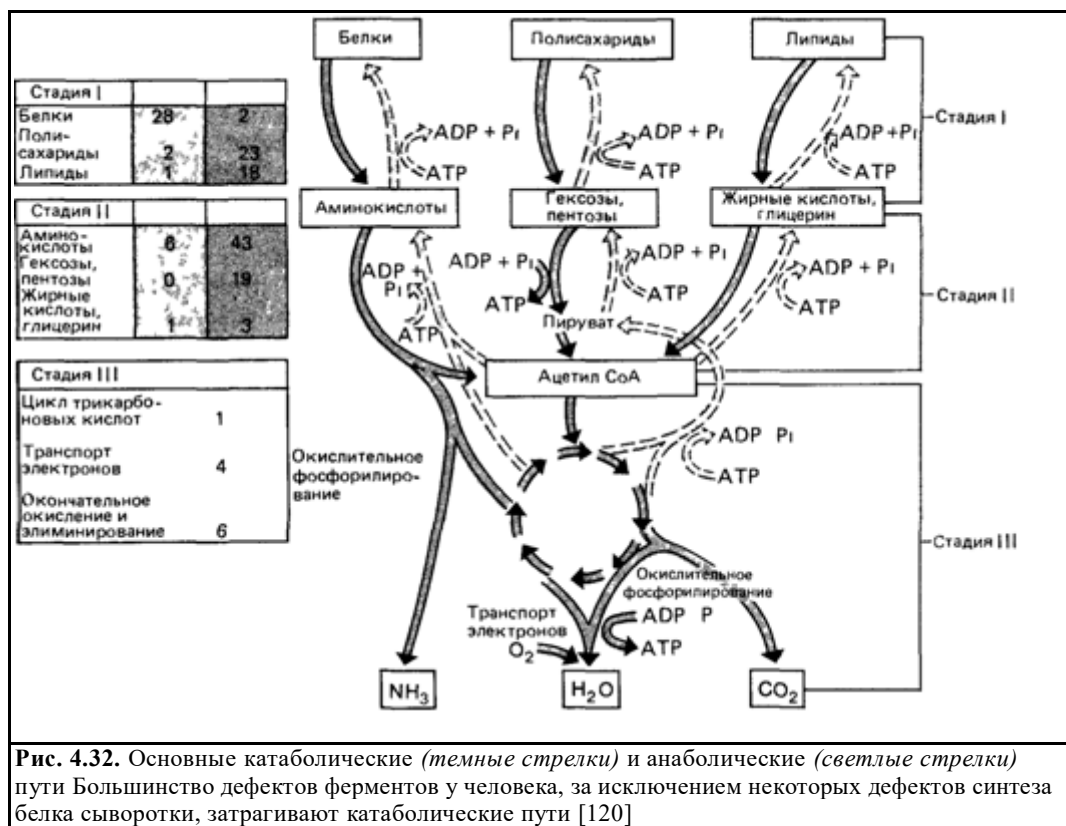
Какие дефекты ферментов неизвестны! Рис. 4.32 иллюстрирует нашу попытку сравнить основную группу метаболических путей [120], для которой известны многие дефекты ферментов, с другими группами, для которых известны лишь отдельные нарушения. Хорошо изучены дефекты ферментов:

- а) катаболических путей углеводов (например, нарушения гликолиза при наследственной гемолитической анемии);
- б) катаболических путей некоторых аминокислот (например, фенилкетонурия);
- в) катаболических путей деградации строительного материала клеток и внутриклеточного материала в лизосомах (или, например, мукополисахаридозы);
- г) катаболических путей детоксификации и выделения внутренних метаболитов (например, аргининемия);
- д) некоторые конечные реакции на вспомогательных ответвлениях пути метаболизма нуклеиновых кислот (например, недостаточность по гипоксантин-гуанин—фосфорибозилтрансферазе);
- е) анаболических путей синтеза биомолекул, необходимых для специальных регуляторных функций (например, дефекты образования тиреоидных гормонов);
- ж) некоторых путей трансмембранного транспорта (например, цистинурия);
- з) некоторых ферментов репарации ДНК (например, пигментная ксеродерма; разд. 5.1.6.3);

и) некоторых метаболических путей, связанных с потреблением и утилизацией предшественников коферментов (например, рахит, резистентный к витамину D).

Мы практически ничего не знаем о дефектах:

- а) ферментов, связанных с процессами митоза и мейоза;
- б) ферментов, необходимых для синтеза ДНК или РНК, за исключением нескольких ферментов, участвующих в репарации;



- в) ферментов, участвующих в биосинтезе белков;
- г) систем запасаения энергии, в особенности системы цитохромов;
- д) ферментов, участвующих в синтезе веществ, используемых как нейромедиаторы в центральной и периферической нервных системах;
- е) анаболических путей синтеза многих аминокислот, жиров и липидов;
- ж) анаболических ферментов синтеза компонентов тканей, таких как сфинголипиды, муколипиды и мукополисахариды;
- з) цикла трикарбоновых кислот, ферменты которого выполняют как кatabолические, так и анаболические функции.

Короче говоря, наши знания ферментных дефектов у человека не только не полны, но и крайне односторонни. Чаще всего такие нарушения затрагивают собственные, так называемые «домашние» функции клетки. При этом для большинства главных анаболических функций никаких дефектов ферментов до сих пор не найдено. Картина выглядит более полной для кatabолических путей и для биосинтеза некоторых специализированных молекул, таких как гормоны.

Почему нам так мало известно о дефектах ферментов, участвующих в основных процессах образования структуры клеток? Действительно, почему? Отчасти это объясняется методическими трудностями. Легко получить клетки крови, но не печени и тем более мозга. Проблема доступности материала актуальна и для анализа генетического полиморфизма. Большинство известных в настоящее время примеров полиморфизма касается именно различных компонентов крови. Если бы нашим органом мышления и чувств была кровь, а не мозг, наше невежество в области генетики поведения было бы давно преодолено (разд 6 2)

И все-таки вряд ли односторонность знаний в этой области можно полностью объяснить методическими трудностями

Скорее всего нарушения ферментов, которые участвуют в построении главных структур клетки, приводят к летальным эффектам. Например, трудно представить себе, что можно жить почти при полном отсутствии активности ДНК-полимеразы. Ведь такое нарушение вызвало бы снижение скорости или полное подавление репликации ДНК, а следовательно, и деления клетки. Это верно также для цикла трикарбоновых кислот или для синтеза жизненно важных метаболитов.

В большинстве случаев для сохранения нормальной функции достаточно 50% нормальной активности фермента. Об этом свидетельствуют данные, полученные для гетерозигот с ферментативными нарушениями. Для выявления таких гетерозигот необходимы крупномасштабные популяционные исследования. Следует учесть, однако, что для многих ферментов характерна выраженная межиндивидуальная вариабельность активности, которая затрудняет, а иногда просто сводит на нет попытку обнаружения гетерозигот. Эта вариабельность и в особенности тот факт, что 50%-ная активность у гетерозигот обеспечивает выживание в обычных условиях, показывают, что метаболизм обладает замечательным запасом прочности, позволяющим организму противостоять отклонениям. Важно и то, что многие функции в организме обеспечиваются различными метаболическими путями. Поэтому некоторые мутации, даже в гомозиготном состоянии, могут не приводить к врожденным нарушениям [820].

Вывод о том, что рецессивные летальные мутации, действующие на основные метаболические пути, возможны, имеет для популяционной генетики большое значение. Более того, нет никаких причин полагать, что мутации по таким генам, более редки, чем мутации, которые приводят к известным ферментативным дефектам. Логично предположить, что все такие мутации возникают. Иногда они оказываются в гомозиготном состоянии, что обуславливает гибель зиготы. Можно было бы ожидать, что в условиях, которые вообще способствуют возникновению гомозигот, т.е. при близкородственных браках, число выкидышей должно возрастать (разд. 6.3.1). Однако это предположение не подтверждается экспериментально. Возможно, большинство таких зигот погибает на столь ранней стадии развития, что это проходит незамеченным.

4.2.2.11. Некоторые общие выводы по анализу ферментативных нарушений у человека

Обнаружение дефектов ферментов. Анализ ферментативных нарушений у человека позволяет сделать несколько выводов. Чтобы дефект фермента можно было обнаружить, он должен проявляться в клетках крови или в культуре фибробластов. Более того, этот дефект должен приводить к четким клиническим симптомам или к изменениям, выявляемым при обычном обследовании (например, выделение необычных метаболитов с мочой). Врожденное нарушение с неспецифическими симптомами, которое не сопровождается легко регистрируемыми биохимическими отклонениями, не может быть обнаружено.

Значение ферментативных дефектов для прояснения метаболических путей. Не сложно обнаружить ферментативное нарушение, если уже известен тот метаболический путь, в котором этот фермент принимает участие. В некоторых случаях, наоборот, анализ ферментативных дефектов проливает свет на неизвестный еще метаболический путь, который трудно исследовать другим способом. Ярким примером могут служить мукополисахаридозы.

Характеристика мутаций, обуславливающих ферментативные нарушения у человека. Известно, что во многих случаях дефектные ферменты у человека сохраняют некоторую остаточную активность. Как правило, мутантный белок бывает изменен качественно. Например, он может превратиться в перекрестно-реагирующий материал (ПРМ), могут измениться его кинетические и другие характеристики. Эти данные свидетельствуют о том, что изменения белков происходят в результате мутаций в структурных генах, поскольку регуляторные мутации приводили бы только к коли-

чественным изменениям ферментной активности. Внутри каждого генного локуса существует высокая степень генетической гетерогенности, которая дополняет гетерогенность локусов, контролирующих один и тот же метаболический путь.

Тип наследования: гетерозиготы. Дефекты ферментов, как правило, наследуются рецессивно. Гены, детерминирующие эти нарушения, могут быть сцеплены с аутосомами или в некоторых случаях с X-хромосомой. Активность ферментов у здоровых гетерозигот-носителей обычно вдвое меньше средней для популяции. Отсюда следует, что организм человека может прекрасно функционировать при наличии фермента, работающего в «полсилы». Этот факт указывает на существующие в принципе значительные возможности регуляции метаболических путей. Однако, если метаболический путь перегружен веществом, для утилизации которого требуется дефектный фермент, способность организма перерабатывать избыточный метаболит может быть снижена по сравнению с гомозиготами. Есть данные, свидетельствующие о том, что подобные нарушения не безразличны и для гетерозигот. Возможно, именно они причина большей предрасположенности гетерозигот к обычным соматическим и психическим заболеваниям. В настоящее время систематические широкомасштабные обследования гетерозигот по рецессивным генам, особенно в среднем и пожилом возрасте, почти не проводятся. Причина состоит в том, что с врожденными дефектами обычно имеют дело педиатры или медицинские генетики с педиатрическим образованием, т.е. специалисты, не заинтересованные в эпидемиологических или популяционных исследованиях. С другой стороны, популяционные генетики, как правило, не вникают в биохимические тонкости.

Тот факт, что почти все дефекты ферментов наследуются как рецессивные признаки, неизбежно заставляет задуматься о биохимической основе доминантных нарушений. Мы обсудим эту проблему в разд. 4.6. Теперь же перейдем к изложению данных о строении и генетике гемоглобинов. Именно эти данные помогли ответить на многие вопросы, связанные с дефектами ферментов, и в какой-то степени прояснили возможные механизмы менделевской доминантности.

4.3. Гемоглобин человека [119; 31; 97a]

Молекулу гемоглобина изучать легче, чем молекулу любого другого белка человека. Гемоглобин – основной белок эритроцитов, и для его выделения не требуется сложных биохимических методов. Неудивительно поэтому, что именно об этом белке мы знаем больше, чем обо всех остальных. Исследования по генетике гемоглобина человека, изучение аминокислотной последовательности и структуры его молекулы продвигались очень быстро. В молекулярной генетике человека они сыграли такую же роль, как изучение дрозофилы и бактериофагов в общей генетике. Большинство концепций, разработанных для этой системы, являются общими для других белков. Действительно, многие концептуальные принципы генетики человека можно иллюстрировать примерами из генетики гемоглобина.

4.3.1. История изучения гемоглобина

Серповидноклеточная анемия – «молекулярное» заболевание. Изучение гемоглобина человека началось с открытия наследственного заболевания – серповидноклеточной анемии. В 1910 г. Херрик [1121] обнаружил у студента-негра, страдающего анемией, особую аномалию эритроцитов: они были серповидной формы. Вскоре выяснилось, что такая патология довольно часто встречается у американских негров. Больные страдали от гемолитической анемии и частых болей в кишечнике и скелетных мышцах. Было показано, что больные серповидноклеточной анемией гомозиготны по гену, который в гетерозиготном состоянии (примерно у 8% американских негров) вызывает гораздо менее выраженное отклонение: присутствие в крови некоторого количества серповидных эритроцитов [1226].

Решающую роль в биохимическом и генетическом анализе этой болезни сыграла работа выдающегося химика Полинга,

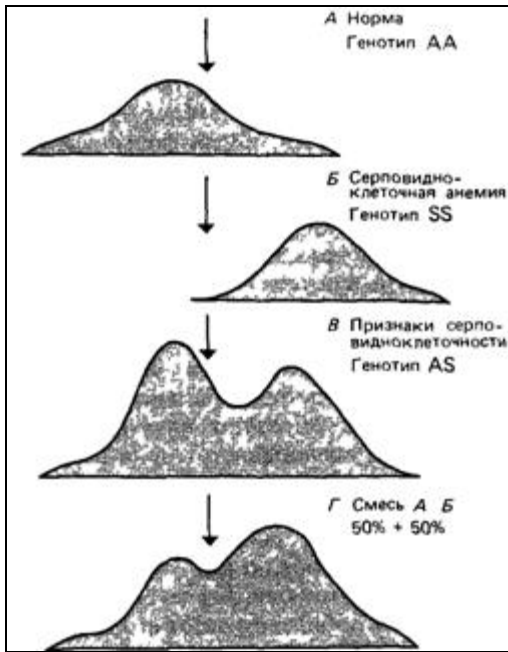


Рис. 4.33. Диаграмма зонального электрофореза гемоглобинов при pH = 6,9. А Нормальная гомозигота (AA) Б Больной с серповидноклеточной анемией (SS) В Признак серповидноклеточности (AS) Г Смесь равных количеств гемоглобина А и гемоглобина S [1260] Стрелка указывает на стартовую точку электрофореза

опубликованная под программным заголовком «Серповидноклеточная анемия, молекулярное заболевание» [1260] (Полинг узнал об этой болезни от Кастла, известного гематолога и сына одного из пионеров генетики млекопитающих, и предположил, что ее причиной может быть дефект гемоглобина) Он писал

«Данные, имевшиеся к началу нашей работы, указывали, что процесс образования серповидных эритроцитов может быть тесно связан с состоянием и природой гемоглобина в эритроцитах»

Авторы исследовали гемоглобин людей, в крови которых обнаруживались серповидные эритроциты, гемоглобин больных серповидноклеточной анемией и гемоглобин здоровых людей В работе использовали самый совершенный в то время метод анализа белков – зональный электрофорез по Тизелиусу (рис 4 33) Пики на рисунке соответствуют градиентам концентрации гемоглобина в определенном буфере, расположение этих пиков зависит от соотношения положительных и отрицательных зарядов в молекуле белка

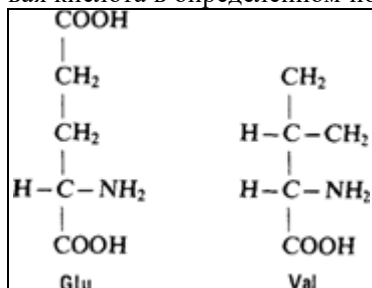
«Результаты указывают на существование значительных различий в электрофоретической подвижности гемоглобина, выделенного из эритроцитов здоровых людей, и гемоглобина, выделенного из эритроцитов больных серповидноклеточной анемией»

У людей, в крови которых наряду с нормальными имеются и серповидные эритроциты, обнаружено 25-40% аномального гемоглобина, такого же как у больных серповидноклеточной анемией, остальной гемоглобин был неотличим от гемоглобина нормальных индивидов Эти данные подтверждали предположение о том, что больные серповидноклеточной анемией гомозиготны по гену, который находится в гетерозиготном состоянии у людей с признаком серповидноклеточности

«Эта работа показала, что молекула белка меняется при аллельном изменении единственного гена, контролирующего его синтез»

Замена одной аминокислоты В 1956 г Ингрэм работал в Кэмбридже, в той лаборатории, где до этого Перутц исследовал кристаллографию белков, Сэнгер определил аминокислотную последовательность инсулина, а Крик и Уотсон предложили свою модель структуры ДНК Ингрэму удалось точно определить, чем нормальный гемоглобин отличается от серповидноклеточного [1138] При гидролизе молекулы глобина трипсином, расщепляющим белки, образуется около 60 пептидов, которые были разделены в двумерной системе на бумаге в одном направлении с помощью электрофореза, а в другом – с помощью хроматографии Этим методом (его называют методом «отпечатков пальцев») удалось показать, что гемоглобин серповидных эритроцитов отличается от нормального по подвижности единственного пептида При дальнейшем анализе этого пептида выяснилось, что гемоглобин серповидных эритроцитов отличается от нормального только по одной аминокислоте, глутамино-

вая кислота в определенном положении заменена валином.



В молекуле глутаминовой кислоты по сравнению с молекулой валина имеется дополнительная карбоксильная группа. Эта разница в зарядах и обуславливает различия в электрофоретической подвижности нормального и серповидноклеточного гемоглобина.

Впоследствии, по мере совершенствования методов электрофореза, стали выявляться все новые и новые варианты гемоглобина. В настоящее время их известно более 400 [1194]. Следующими вехами в изучении гемоглобина следует считать установление его полной аминокислотной последовательности (Браунитцер и др., 1961) [1016] и трехмерной структуры [1165; 1265]. Позже стали понятны структурнофункциональные взаимоотношения, были обнаружены различные типы мутаций: делеции и сдвиг рамки считывания. Выделение мРНК гемоглобина позволило по-новому взглянуть на структуру и функционирование гена, открыло новые пути к пониманию механизма его действия.

Исследования гемоглобинов на молекулярном уровне продвигались очень быстро. В настоящее время известны полные нуклеотидные последовательности ряда генов гемоглобинов вместе с фланкирующими их последовательностями, мы хорошо понимаем организацию гемоглобиновых генов, изучена природа мутаций, затрагивающих гемоглобины, в особенности при талассемиях. Следующий раздел посвящен генетике гемоглобинов.

4.3.2. Генетика гемоглобина

Молекулы гемоглобина. Молекула человеческого гемоглобина состоит из четырех полипептидных цепей. Молекула гемоглобина обозначается общей формулой $\alpha_2\beta_2$, которая показывает, что в состав молекулы входят две пары сходных цепей глобина [1348]. Большинство разновидностей гемоглобина человека имеют идентичные α -цепи и различаются по другим цепям. К каждой цепи глобина в специфическом участке присоединяется молекула небелковой природы - гемогруппа, или гем (рис. 4.34). Четыре глобиновые цепи, каждая со своим гемом, образуют функциональную молекулу гемоглобина, которая переносит кислород из легких в ткани. Молекула глобина построена из 140 с небольшим аминокислот, которые расположены в строго определенном порядке (рис. 4.35). Последовательность аминокислот в белке (например, в гемоглобине) считают его первичной структурой. Пространственное расположение соседних остатков называется вторичной структурой, а трехмерное расположение белковых субъединиц - третичной структурой (рис. 4.34). Термин четвертичная структура относится к взаимной организации четырех субъединиц в составе функционирующей молекулы.

Преобладающим типом гемоглобина у детей и взрослых является HbA, или гемоглобин взрослых ($\alpha_2\beta_2$). Его отличительная черта - строение Р-цепи (рис. 4.35). α - и β -цепи различаются по многим аминокислотным остаткам. У всех взрослых есть небольшое количество (2-3%) гемоглобина HbA₂($\alpha_2\delta_2$). Характерная для него δ -цепь отличается от β -цепи только по десяти аминокислотным остаткам. После рождения у всех детей обнаруживается также небольшое количество (меньше 1%) фетального гемоглобина HbF: $\alpha_2\gamma_2$ (см. ниже), γ -цепь значительно отличается от α - и β -цепей. α -цепи HbA, HbA₂ и HbF идентичны.

Существует несколько типов гемоглобинов, характерных для эмбрионального и фетального развития, ζ -цепи напоминают по аминокислотному составу α -цепи [1155], а ϵ -цепи похожи на β -цепи [1232]. ζ -цепи, вероятно, появляются раньше других в эмбриональном развитии. ζ - и ϵ -цепи исче-

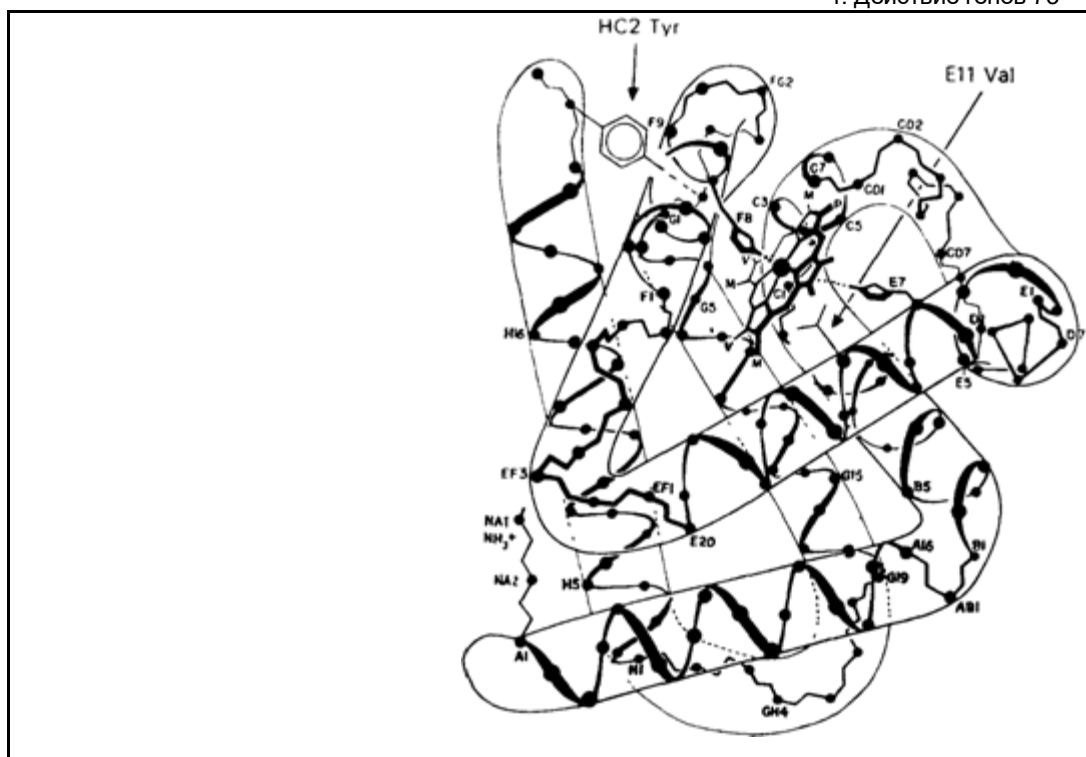


Рис. 4.3.1. Диаграмма показывает трехмерное строение (3° структура) типичной глобиновой цепи, состоящей из восьми спиральных и шести неспиральных участков. Чтобы упростить сравнение различных глобиновых цепей, их спиральные фрагменты обозначены буквами от А до Н, а неспиральные участки - двумя буквами, например CD, FG и т. д. Черной волнистой линией показано пространственное расположение различных аминокислот (2° структура). Аминокислоты пронумерованы с N-конца, начиная с А1. Номер относится к конкретной аминокислоте, расположенной в данном положении, это могут быть разные аминокислоты в различных глобиновых цепях. Структурно эквивалентные остатки одинаково обозначаются во всех гемоглобинах независимо от вставки или делеции аминокислот. Обратите внимание на вставку небелковой цепи гема между Е7 и Е8. Аминокислотные остатки в позициях Е7 (гистидин), Е11 (валин) и НS2 (тирозин) особенно важны для функционирования гемоглобинов млекопитающих. Буквы М, V и Р в молекуле гема обозначают соответственно метиловую, виниловую и пропионовую боковые цепи [1265].

зают через 8-10 недель внутриутробного развития (рис. 4.36) [1364]. Затем преобладающим становится гемоглобин HbF($\alpha_2\gamma_2$), который отличается от других присутствием γ -цепи. Известно два типа γ -цепей: с аланином ($^A\gamma$) или с глицином ($^G\gamma$) в 136-м положении. Существует и третий тип γ -цепи с треонином вместо изолейцина в 75-м положении [1281; 1319]. Он встречается у 10-15% эмбрионов и, судя по всему, не связан с каким-либо нарушением. Гемоглобин $\alpha_2\beta_2$ обнаруживается уже на 6-8 неделе развития плода [1319; 1364].

Синтез γ -цепей у эмбриона происходит в основном в печени и селезенке, но могут они синтезироваться и кроветворными клетками костного мозга. Наоборот, β -цепи, в детстве и в более зрелом возрасте синтезируются главным образом в костном мозге, однако синтез вне костного мозга также возможен [1364]. Различные типы гемоглобина перечислены в табл. 4.12.

Все нормальные гемоглобины человека, которые были исследованы, имеют идентичную трехмерную структуру (рис. 4.34), существенную для переноса кислорода. Все

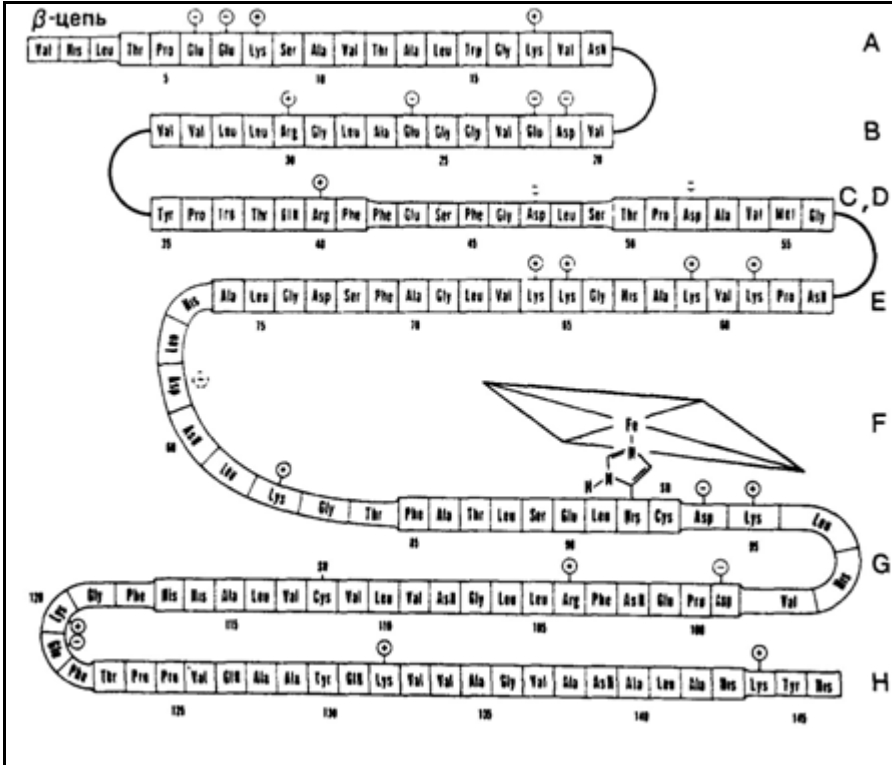


Рис. 4.35. Первичная структура аминокислотной последовательности β -цепи нормального гемоглобина взрослого человека (гемоглобина А). Аминокислоты, участвующие в образовании характерных участков α -спирали, заключены в квадраты. Остатки аминокислот, не участвующие в образовании спирали, заключены в вытянутые прямоугольники. Показано место прикрепления гема. Специфическую аминокислотную последовательность β -глобиновой цепи полезно сопоставить с трехмерным строением молекулы, показанным на рис. 4.34.

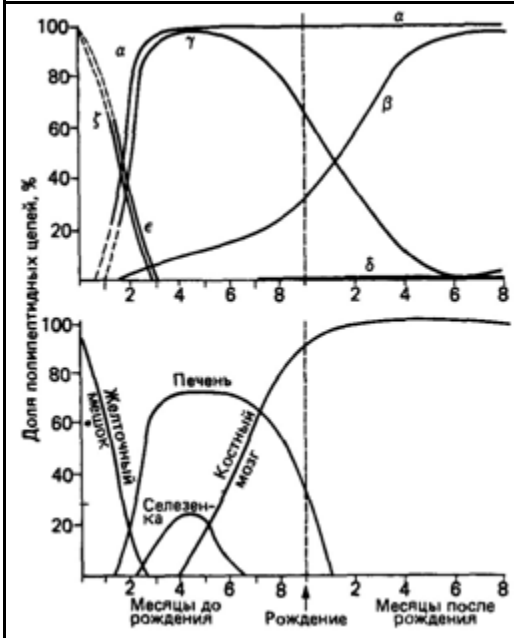


Рис. 4.36. Онтогенез цепей гемоглобина человека до рождения и в первые несколько месяцев после рождения. Верхняя диаграмма отражает изменения синтеза различных цепей гемоглобина в ходе развития. Нижняя диаграмма указывает на характерные места эритропоэза, меняющиеся в ходе развития. Наблюдается замечательное совпадение во времени синтеза ϵ - и ζ -цепей и эритропоэза в желточном мешке, синтеза γ -цепи и эритропоэза в печени и селезенке, синтеза β -цепи и эритропоэза в костном мозге [1230].

Таблица 4.12. Гемоглобины человека		
Стадия	Гемоглобин	Структура
Эмбрион	Gower I	$\zeta_2 \epsilon_2$
	Gower II	$\alpha_2 \epsilon_2$
	Portland I	$\zeta_2 \gamma_2$
Плод	F	$\alpha_2^G \gamma_2$
		$\alpha_2^A \gamma_2$
Взрослый человек	A	$\alpha_2 \beta_2$
		$\alpha_2 \delta_2$

глобиновые цепи различных гемоглобинов имеют общее эволюционное происхождение и возникли в результате последовательных дупликаций генов (см. разд. 7.2.3). Чем больше сходство между двумя цепями, тем позднее в эволюции произошла дупликация. Очевидно, цепи $^A\gamma$ и $^G\gamma$, которые различаются по одной аминокислоте, дивергировали позже всех других, а дупликация генов β - и α -цепей произошла в весьма отдаленном прошлом.

Гены гемоглобина. Аминокислотная последовательность каждой глобиновой цепи кодируется своим собственным геном. В гаплоидном наборе у нормального человека присутствует по крайней мере по одному гену α , β , γ , δ , ϵ , ζ , и по крайней мере по два таких гена-в диплоидном наборе. В большинстве популяций человека ген α -цепи существует в дублицированном состоянии, причем отличий между двумя α -генами не обнаружено [1350]. Имеются два гена γ -цепей $^A\gamma$ и $^G\gamma$, которые различаются по кодону, детерминирующему аминокислотный остаток в 136-м положении. Некоторые гены $^A\gamma$ несут необычный кодон, в результате в 75-м положении изолейцин замещен на треонин ($^{TA}\gamma$).

Синтез небелковой гемогруппы также контролируется генами, поскольку они кодируют ферменты, обеспечивающие биосинтез гема.

Различные гены глобинов, соответствующие им глобиновые цепи и различные нормальные гемоглобины приведены в табл. 4.12 и на рис. 4.37.

Была подробно исследована структура всех генов глобинов, опубликованы их полные нуклеотидные последовательности [981; 1041; 1200; 1273; 1304; 1314]. Подобно многим генам млекопитающих, гены глобинов у человека образуют мультигенное семейство и расположены на хромосомах в составе двух кластеров (рис. 4.38, 4.39). α -кластер глобиновых генов занимает 25000 пар оснований (25 т. п. н.) в коротком плече 16-й хромосомы. Семейство γ - β - δ -генов глобина расположено в коротком плече 11-й хромосомы на участке длиной 60 т. п. н. Пока остается неизвестным генетический механизм, регулирующий координированное функционирование генов на двух различных хромосомах, в результате которого образуется равное количество субъединиц α - и β -у-типа. В α -кластере структурные гены расположены в следующем порядке в направлении от 5' к 3': ген эмбриональной ζ -цепи, псевдоген ζ -цепи,

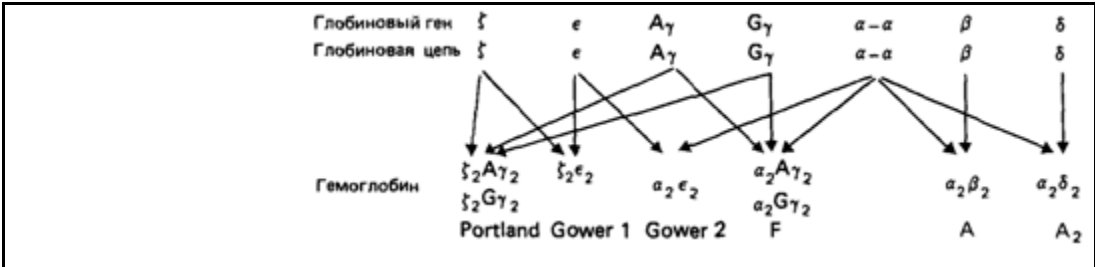
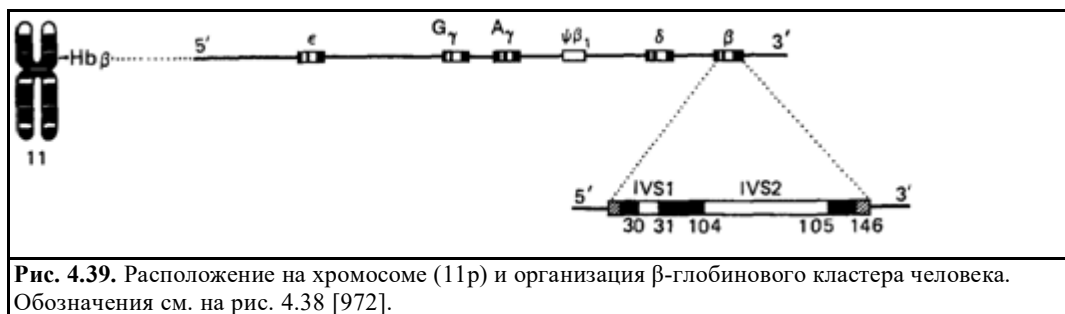
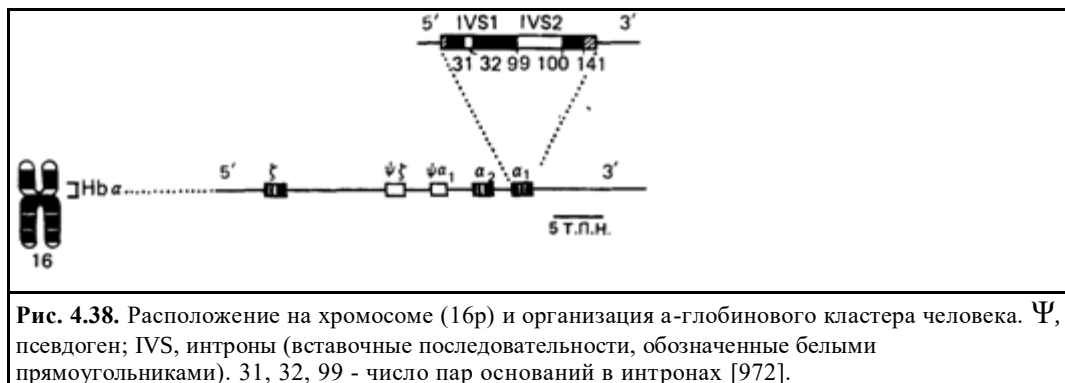


Рис. 4.37. Нормальные глобиновые гены человека. Цепи β -, δ -, ϵ - и ζ -глобинов кодируются уникальными генами. Гены, кодирующие цепи α и γ -глобинов, дублированы. Две γ -цепипродукты генов $Hb^A\gamma$ и $Hb^G\gamma$ отличаются друг от друга по одному аминокислотному остатку, аланину (A) или глицину (G) в положении 136. Не обнаружено различий между двумя генами $Hb\alpha$. Тетрамеры, образующиеся при формировании гемоглобина, показаны в нижней части рисунка.



псевдоген α -цепи и два идентичных гена α -цепи (рис. 4.38). Выяснено расположение генов и в β -кластере: ген эмбриональной ϵ -цепи, два гена фетальных γ -цепей (γ^A и γ^G), псевдоген β -цепи, ген δ -цепи и ген β -цепи (рис. 4.39). Порядок расположения генов в этих кластерах совпадает с очередностью их экспрессии в онтогенезе. По последовательности нуклеотидов псевдогены мало отличаются от своих функциональных гомологов. Однако в результате различных мутаций стала невозможной их транскрипция и, следовательно, экспрессия. Предполагается, что псевдогены возникли в результате дупликации, после которой их экспрессия перестала быть необходимой для нормального функционирования организма. Ген δ -глобина, продукт которого составляет лишь 2-3% всего гемоглобина, можно считать геном, который находится в переходном состоянии к псевдогену.

Все глобиновые гены во многом сходны по своей функциональной организации. Каждый из них имеет в составе три кодирующие последовательности, т. е. три экзона. Между 1-м и 2-м экзонами и между 2-м и 3-м экзонами расположены уникальные вставочные последовательности, или интроны, известные соответственно как IVS-1 и IVS-2 (от англ. intervening sequences) (рис. 4.38, 4.39, 4.40). Интроны транскрибируются вместе с экзонами, так что в первичном транскрипте представлены как кодирующие, так и некодирующие последовательности соответствующего гена. Вставочные последовательности вырезаются в ходе процессинга, который происходит в ядре, в результате чего конец первого экзона соединяется с экзonom 2, а конец второго экзона - с экзonom 3, при этом образуется функциональная мРНК, которая и служит матрицей для синтеза гемоглобина на рибосомах (рис. 4.40). Две вставочные последовательности идентичны у различных генов γ - δ -кластера, но отличаются от более коротких интронов генов α -кластера. Детали процесса сплайсинга пока не ясны, однако для его изучения оказались весьма полезными мутации, которые вызывают β -талассемии (см. ниже) и обусловлены нарушениями вырезания интронов. Все интроны начинаются с нуклеотидов GT (донорный сайт) и кончаются динуклеотидом AG (акцепторный сайт) - эти динуклеотиды состав-

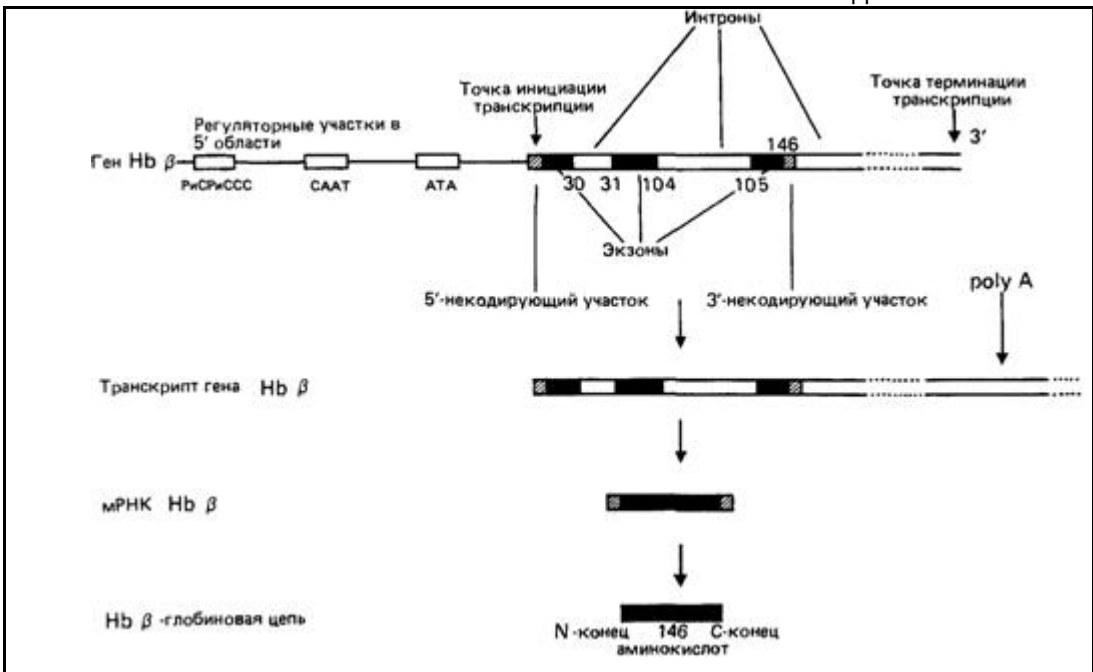


Рис. 4.40. Схематическое изображение гена Hb β , первичного транскрипта этого гена, мРНК Hb β и полипептидной цепи β -глобина. Показаны регуляторные последовательности, экзоны и интроны. Последовательность poly (A) добавляется к транскрипту, интроны вырезаются.

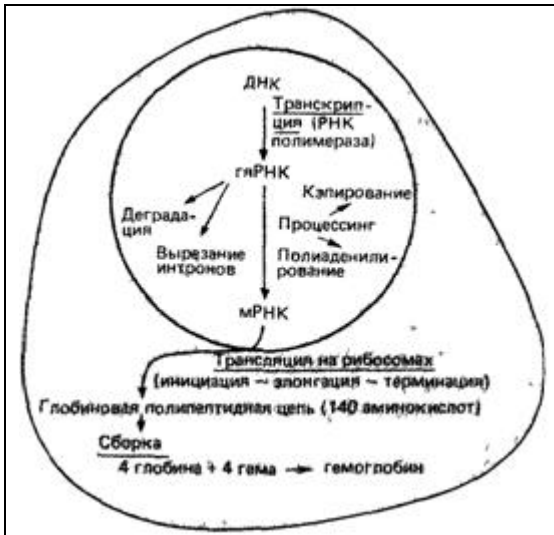


Рис. 4.41. Краткая схема этапов синтеза белка на примере гемоглобина. Нуклеотиды ДНК гена гемоглобина транскрибируются (транскрипция) ферментом РНК-полимеразой с образованием гетерогенной ядерной РНК (гЯРНК). Интроны, поскольку они не содержат структурную информацию, вырезаются. мРНК переносится из ядра (темно-серое) в цитоплазму (светло-серая), где на рибосомах осуществляется синтез глобинов (трансляция). Он делится на следующие этапы: инициацию, элонгацию и терминацию. К образующейся в результате трансляции полипептидной цепи глобина присоединяется гем. Четыре глобиновые цепи объединяются, образуя функциональную молекулу гемоглобина.

ляют часть так называемых обобщенных последовательностей сайтов сплайсинга. Более подробно см. в [1041 и 1238]. Некоторые детали этапов синтеза гемоглобина (от гена до белковой молекулы) представлены на рис. 4.40 и 4.41.

Генетические доказательства несцепленности генов α - и β -глобинов появились задолго до определения структуры кластеров этих генов. Было показано, что если один из родителей является двойной гетерозиготой с мутациями в генах α - и β -глобинов, а другой - нормальной в отношении гемоглобина гомозиготой, то в потомстве выявляются четыре фенотипа: нормальный, с измененным α -глобином, с измененным β -глобином и двойной мутант (рис. 4.42)

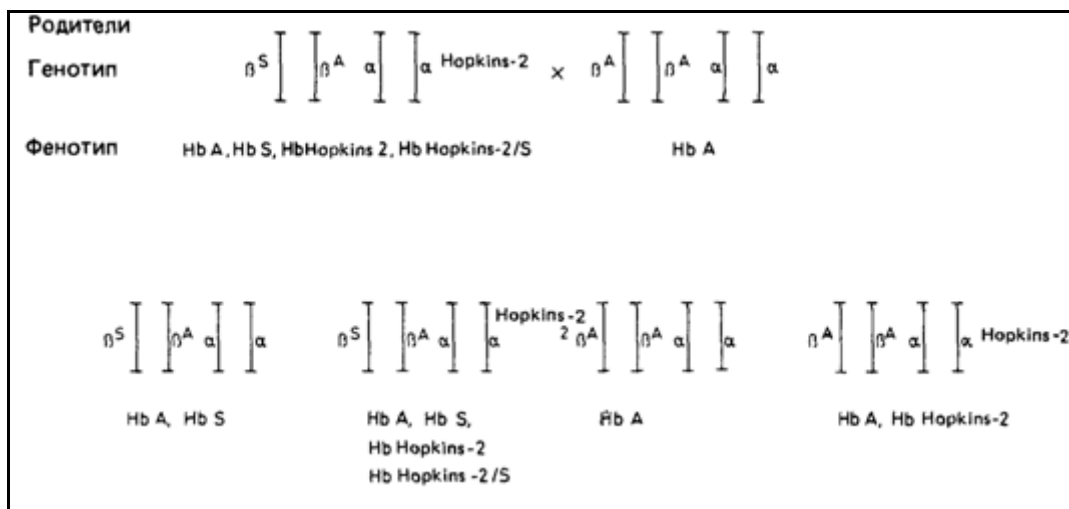


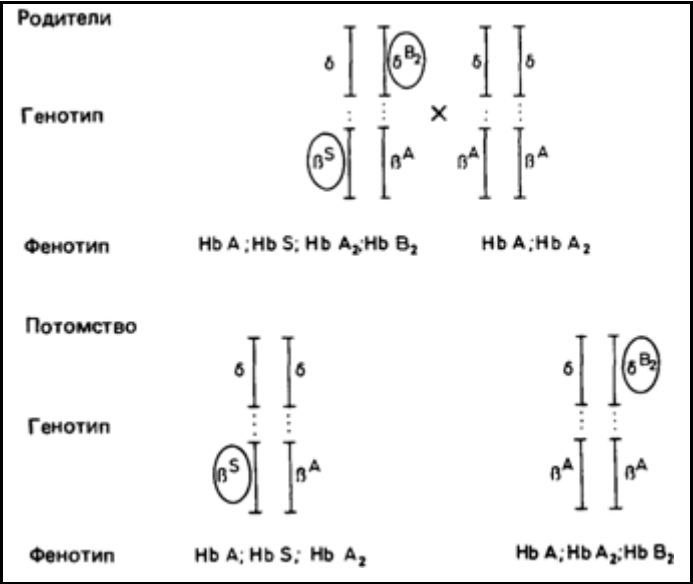
Рис. 4.42. Генетический анализ потомства от брака двойной гетерозиготы по Hb α ($\alpha^{\text{Hopkins-2}}$) и Hb β (Hb β^S) с нормальным индивидом. Поскольку гены Hb α и Hb β расположены в разных хромосомах, возникают всевозможные комбинации хромосом и в потомстве обнаруживаются четыре класса в равном соотношении: нормальный Hb A; Hb A/S; признак серповидноклеточности; Hb A/Hb Hopkins-2: признак Hopkins-2; гетерозиготность Hb S/Hb Hopkins-2 проявляется так же, как у больного родителя. Если бы гены Hb α и Hb β были тесно сцеплены, родительские фенотипы наблюдались бы в незначительной доли потомства, возникая только в результате мейотической рекомбинации (разд. 3.4). Чем теснее сцепление, чем меньше вероятность рекомбинации (см. рис. 4.43).

[1014]. Если бы гены α - и β -глобинов были тесно сцеплены, то в потомстве наблюдались бы генотипы Hb α^x и Hb β^x , но не было бы двойных мутантов или нормальных индивидов. Подобным образом генетически доказано тесное сцепление генов δ - и β -глобинов: если один из родителей был двойной гетерозиготой с мутациями в генах β - и δ -цепей, то рекомбинантов среди детей не было [1013] (рис. 4.43). Открытие гемоглобина Lepore - продукта слияния генов δ - и β -цепей - послужило биохимическим доказательством сцепления этих генов в составе одной хромосомы [1350] (см. ниже). Вывод о сцеплении генов γ - и β -глобинов был сделан на основании исследований гемоглобина Kenya, ген которого образуется при слиянии этих двух генов.

Промоторы. Перед каждым глобиновым геном расположены три различные последовательности. Они близки по структуре у разных генов и, судя по всему, участвуют в регуляции транскрипции (рис. 4.40). Их называют промоторными элементами [1041; 1238]. В их число входит ТАТА или АТА-блок (последовательность Хогнесса), который находится на расстоянии в 30 пар нуклеотидов от точки начала транскрипции. Эта последовательность представляет собой элемент промотора, необходимый для точной инициации транскрипции. Другая последовательность, СААТ, расположенная за 80 пар оснований от стартовой точки, служит сайтом узнавания для РНКполимеразы. Третий, дистальный, элемент локализован за 80-100 нуклеотидов, имеет характерную последовательность PuCPuCCC (Pu-пури́н). До сих пор неизвестно, требуются ли для образования глобинов «энхансеры» (усилители)-генетические элементы, влияющие на эффективность транскрипции независимо от их позиции или ориентации.

Последовательности, расположенные за геном. Терминация транскрипции осуществляется примерно через 1000 пар оснований после 3-го экзона гена β -глобина (рис. 4.40). Сигналом расщепления РНК эндонуклеазой служит последовательность AAUAA, к которой затем присоединяется polyA-«хвост» длиной в 220 нуклеотидов. Она не

Рис. 4.43. Генетический анализ потомства от брака двойной гетерозиготы по Hbβ (Hbβ^S) и Hbδ (Hbδ^{B2}) с нормальным индивидом. Очевидно, что гены β- и δ-цепей расположены на одной хромосоме и тесно сцеплены. Все потомки наследуют либо аномалию β^S, либо δ^{B2}. Среди детей не наблюдается нормальных индивидов или сложных гетерозигот, аналогичных родительскому типу. Эти данные согласуются с выводом о тесном сцеплении двух генов.



закодирована в ДНК и необходима для стабилизации мРНК, которая переносит генетическую информацию от ядерных генов к рибосомам, где в результате соединения аминокислот в нужной последовательности происходит синтез глобинов (рис. 4.41). *Полиморфизм ДНК в области глобиновых генов.* [972; 1253]. При картировании генов γ-δ-β-кластера с помощью рестрикционного анализа была обнаружена значительная вариабельность последовательности ДНК у различных индивидов (рис. 4.40). Все известные варианты β-глобинового комплекса генов возникли в результате одиночных нуклеотидных замен и обозначаются как присутствующие (+) или отсутствующие (—). Среди 17 полиморфных сайтов в β-кластере 12 локализованы во фланкирующих последовательностях, 3 внутри интронов, 1 внутри псевдогена и только 1 внутри кодирующей части гена р-глобина (синонимическая замена). Такое расположение закономерно, поскольку мутации в кодирующих областях скорее могут вызвать нежелательные эффекты. Большая часть ДНК, расположенной между структурными генами, не экспрессируется, поэтому изменения нуклеотидной последовательности в этих районах обычно не имеют функциональных последствий. Различные полиморфные сайты имеют древнее происхождение, поскольку они обнаружены у всех расовых групп (табл. 4.13). Заметим, однако, что некоторые варианты встречаются только у негров, у других расовых групп их нет.

Два случая полиморфизма ДНК в α-глобиновом локусе относятся к гипервариабельным районам, состоящим из различного числа случайно повторенных фрагментов ДНК длиной 36 нуклеотидов (разд. 2.3.3.9).

Специфическое сочетание полиморфных сайтов в генном кластере (или генетическом локусе) называется гаплотипом. Например, расположение пяти сайтов возможного полиморфизма можно записать как + – + – + в направлении от 5' к 3'. Совокупность четырех основных гаплотипов, различающихся между собой минорными вариациями в 5 сайтах гена β-глобина, (табл. 4.14) была названа «остов».

Отличительной чертой вариабельности ДНК в β-глобиновом кластере является неравновесие по сцеплению полиморфных сайтов. Если бы в течение многих поколений происходила свободная рекомбинация, сочетание полиморфных сайтов было бы случайным, а число различных гаплотипов составило 2ⁿ, где n - количество возможных сайтов полиморфизма. В действительности обнаруживается лишь несколько гаплоти-

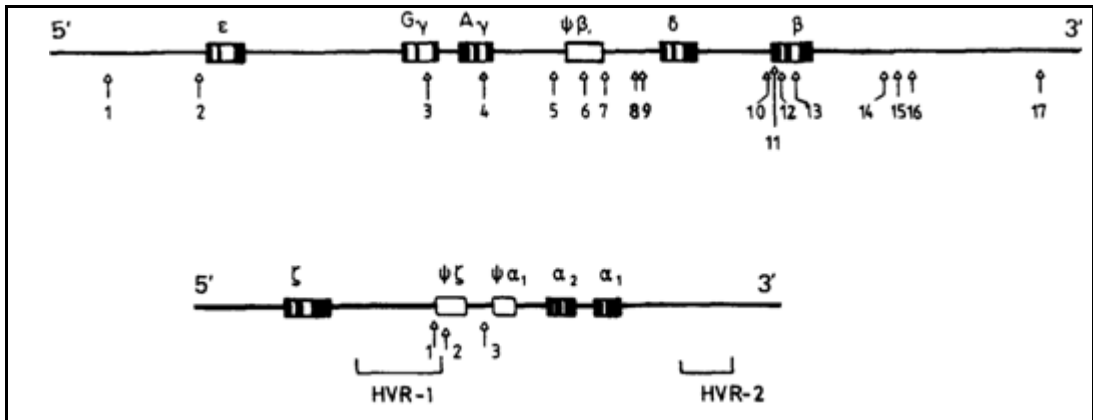


Рис. 4.44. Полиморфизм сайтов узнавания рестрикционных эндонуклеаз в генах Hbβ (вверху) и Hbα (внизу). Номерами обозначены сайты рестрикции различных ферментов. HVR-гипервариабельные районы (минисателлиты) (таблица 4.14).

только в том случае, если они существенно нарушают функционирование гемоглобина и приводят к болезни. Большинство мутаций гемоглобина независимо от того, меняют они заряд молекулы или нет, не влияют на функции гемоглобина и не приводят к патологии. Как правило, аминокислотные замены в участках полипептидной цепи, которые в молекуле гемоглобина обращены наружу, оказывают меньшее воздей-

Нормальный 67-й кодон гена

Val

Asp (Hb Bristol)

Glu (Hb Milwaukee)

Кодоны

Val	Glu	Asp
GUU	GAU	GAU
GUC	GAC	GAC
GUA	GAA	
GUG	GAG	

Рис. 4.45. Полиморфизм кодонов. Обычно 67-й аминокислотой в цепи β-глобина является валин. Гемоглобин Bristol и гемоглобин Milwaukee возникли в результате различных мутаций, в одном случае валин заменен на глутаминовую кислоту (Hb Bristol), в другом - на аспаргиновую кислоту (Hb Milwaukee). Триплеты, кодирующие валин, показаны в нижней части рисунка. Мутация, приводящая к замещению валина на аспаргиновую кислоту, могла быть только заменой GUU на GUG, а замещение валина на глутаминовую кислоту - только заменой GUA на GUG. Следовательно, исходные индивиды, у которых произошли указанные мутации, различались по 67-му кодону валина β-цепи глобина.

ствие на функцию, чем замены аминокислот во внутренних частях цепей или в участках присоединения тема. Замены, нарушающие нормальную спиральную структуру цепи, часто вызывают нестабильность гемоглобина. Замены аминокислот в участках, которыми субъединицы контактируют друг с другом, влияют на сродство к кислороду [1320]. Большинство гемоглобиновых вариантов-редки. Лишь немногие, например гемоглобины HbS, HbC иHbE, встречаются чаще других (разд. 6.2.1.6).

В кодирующей области гена полиморфизм тоже регистрируется. Известно, что генетический код - вырожденный (табл. 2.12), т. е. несколько триплетов кодируют одну и ту же аминокислоту (см. рис. 4.45). Анализ двух различных замен в 67-м положении цепи β-глобина (рис. 4.45) показал, что два индивида, у которых произошли мутации, и появились новые формы гемоглобина, должны были различаться по исходным триплетам, кодирующим валин в 67-м положении (рис. 4.45). Таким образом, у разных индивидов различные кодоны могут кодировать одну и ту же аминокислоту.

Клиническое значение вариантов гемоглобина. Нарушение функций гемоглобина ведет к возникновению различных заболеваний. Существуют четыре основных типа болезней гемоглобина: 1) гемолитические анемии, вызванные нестабильностью гемоглобинов; 2) метгемоглобинемии, обусловлен-

82 4. Действие генов

ные ускоренным окислением гемоглобина; 3) эритроцитоз, вызванный нарушением сродства гемоглобина к кислороду и 4) серповидноклеточные нарушения как следствие повреждений клеточных мембран гемоглобином S. Во всех случаях, кроме серповидноклеточных нарушений, гетерозиготы по аномальным гемоглобинам страдают различными заболеваниями, т. е. мутации ведут себя как аутосомно-доминантные.

Нестабильные гемоглобины [31; 1335-1357]. Описано свыше 100 нестабильных гемоглобинов. В большинстве случаев мутация затрагивает β-цепь. У многих нестабильных гемоглобинов в полипептидной цепи обнаруживаются аминокислотные замены или делеции в участках связывания гема. Клинические проявления варьируют от едва заметной нестабильности, практически не имеющей клинических последствий, до выраженной нестабильности, при которой происходит интенсивное разрушение эритроцитов. В некоторых случаях гемолиз усиливается при лечении сопутствующих заболеваний сульфониламидами. Нестабильность этих гемоглобинов часто обусловлена преждевременной диссоциацией тема и глобиновой цепи. Такие лишенные гема молекулы глобина преципитируют внутри клетки, образуя так называемые тельца Хейнца, нарушающие функционирование клеточных мембран. В селезенке тельца Хейнца могут быть удалены из эритроцитов без их разрушения. В конечном итоге такие эритроциты преждевременно уничтожаются ретикуло-эндотелиальной системой. При некоторых формах нестабильности гемоглобина сильный гемолиз удается смягчить удалением селезенки.

Точный диагноз нестабильности гемоглобина может быть затруднен, особенно если не наблюдается изменений электрофоретической подвижности. В этом случае необходимо выделение преципитированных глобиновых цепей для дальнейшего анализа в специализированных лабораториях. Нестабильные гемоглобины являются причиной врожденных несфероцитарных гемолитических анемий. Такие гемоглобины могут возникать в результате новых мутаций.

Метгемоглобинемия, обусловленная гемоглобином М [31]. Гемоглобин М интересен с исторической точки зрения, так как это первая доминантная гемоглобинопатия, выявленная в 1948 году в семье с врожденным цианозом [1130]. Любопытно, что рецессивная недостаточность метгемоглобин-редуктазы, которая также приводит к метгемоглобинемии, была первым изученным дефектом фермента у человека [1100]. Таким образом, метгемоглобинемия может быть вызвана как доминантной мутацией самого глобина, так и рецессивно наследуемой недостаточностью соответствующего фермента.

Известно пять различных мутаций, приводящих к образованию гемоглобина М. Собственно метгемоглобинемия обусловлена ускоренным окислением двухвалентного железа до трехвалентного (табл. 4.15). В четырех случаях образование гемоглобина М вызвано заменой одного из гистидинов, удерживающих группу гема в ее специфическом «кармане» (рис. 4.34) в глобиновой молекуле и стабилизирующих железо гема в его окисленной форме, на тирозин. Пятая мутация - гемоглобин Milwaukee 1 - пока не может быть достаточно четко объяснена с молекулярной точки зрения. Больные с мутациями в α-цепи, вызывающими образование гемоглобина М, страдают цианозом от рождения. При мутации в β-цепи цианоз развивается только через 6

Таблица 4.15. Гемоглобины М	
α-цепь	HbM
M Boston	α ⁵⁸ His → Tyr
M Iwate	α ⁸⁷ His → Tyr
β-цепь	
M Saskatoon ¹⁾	β ⁶³ His → Tyr
M Hyde Park	β ⁹² His → Tyr
M Milwaukee 1	β ⁶⁷ Val → Glu
¹⁾ Классический гемоглобин М Horlein и Weber [1130].	

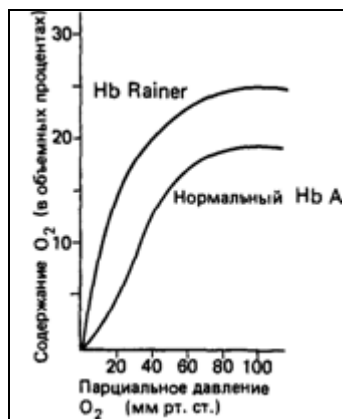


Рис. 4.46. Кривая диссоциации O₂ для гемоглобинов с повышенным сродством к кислороду. Обратите внимание, что аномальный Hb Rameг при низких парциальных давлениях кислорода высвобождает меньше кислорода, чем нормальный гемоглобин. Возникает тканевая гипоксия, стимулирующая образование эритропоэтина с последующим эритроцитозом.

месяцев после рождения, когда происходит замена γ -цепи на β -цепь. У больных с гемоглобином М обычно наблюдается слабый гемолиз.

Эритроцитоз, вызванный образованием гемоглобинов с нарушенным сродством к кислороду [31, 992]. Существует около 30 гемоглобинов с повышенным сродством к кислороду. В 11 случаях мутации происходят в месте контакта $\alpha_1\beta_1$ -субъединиц в тетрамере. При адсорбции кислорода происходит движение глобиновых субъединиц в месте контакта между цепями. Повышенное сродство к кислороду может быть вызвано стабилизацией «окси»-конформации или дестабилизацией «дезоксигемоглобин»-конформации (рис. 4.46). Большинство других гемоглобинов с высоким сродством к O₂ содержат мутации на COOH-конце β -цепи или в сайтах связывания дифосфоглицерата. В норме эти сайты обеспечивают стабильность «дезоксигемоглобин»-конформации.

Повышенное сродство к кислороду приводит к уменьшению количества кислорода, освобождающегося из комплекса с гемом в тканях организма, и вызывает гипоксию (рис. 4.46). Гипоксия ведет к выделению гормона эритропоэтина, стимулирующего образование эритроцитов и собственно эритроцитоз. Больные с эритроцитозом, обусловленным аномалиями гемоглобина, иногда ошибочно диагностируются как больные истинной полицитемией. Однако в отличие от полицитемии при дефектах гемоглобина наблюдается доминантное наследование, а спленомегалия, лейкоцитоз и тромбоцитоз отсутствуют. Известны спорадические случаи подобных дефектов гемоглобина, показано, что они возникли в результате новых мутаций.

Было обнаружено всего три гемоглобина с уменьшенным сродством к кислороду [992]. При таком дефекте количество кислорода, поступающее в ткани, увеличивается, поэтому следует ожидать уменьшения образования эритропоэтина. В двух случаях, как и следовало ожидать, наблюдалась слабовыраженная анемия.

Серповидноклеточные нарушения [31; 1211; 1298]. Образование гемоглобина S вызвано заменой глутаминовой кислоты на валин в 6-м положении β -цепи. В отличие от всех других замен, эта сильно влияет на растворимость и кристаллизацию гемоглобина в условиях гипоксии. Больные серповидноклеточной анемией наследуют мутантный ген от обоих родителей и не имеют гемоглобина А. При сравнительно низком уровне гипоксии гемоглобин S у таких больных полимеризуется с образованием пучков или волокон. Аномальные кристаллы гемоглобина нарушают структуру мембраны эритроцитов и обуславливают их серповидную форму (рис. 4.47). Некоторые из этих клеток остаются необратимо серповидными и преждевременно разрушаются. Серповидные клетки увеличивают вязкость крови и мешают ее нормальной циркуляции в небольших кровеносных сосудах. Вызванная этим гипоксия приводит к образованию еще большего числа серповидных клеток. Возникает порочный круг, для которого характерны стазы (замедление кровотока) и эпизодические кризы с болями в животе и скелетных мышцах.

Через несколько лет пониженное кровоснабжение часто приводит к некрозу органов, например селезенки, что в свою очередь ведет к их атрофии. У гетерозиготных носителей, которые имеют один нормаль-

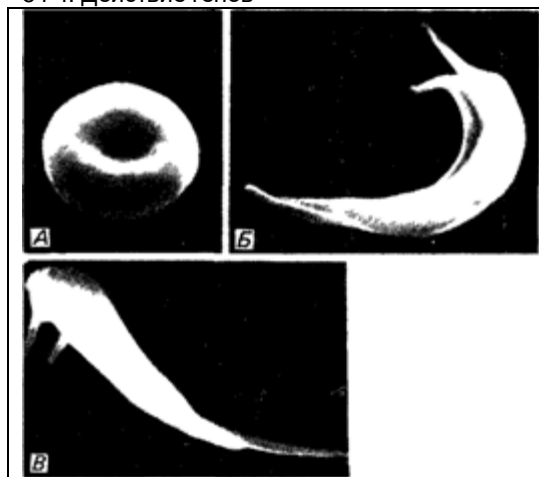


Рис. 4.47 Сканирующая электронная микрофотография оксигенированного (А) и дезоксигенированного (В и С) эритроцитов больного, гомозиготного по гену серповидноклеточной анемии. Обратите внимание на нормальную двояковогнутую форму эритроцита, полностью лишенного гемоглобина А, и ее изменение в условиях гипоксии. Клетки в условиях гипоксии напоминают по форме серп, поэтому их называли серповидными [31].

ный ген β -глобина $Hb\beta^A$ и один мутантный ($Hb\beta^S$), гемоглобин S составляет только 25-40% всего гемоглобина. Клинически такие люди вполне нормальны. Их эритроциты содержат как гемоглобин А, так и гемоглобин S, и по продолжительности жизни не отличаются от нормальных эритроцитов. Серповидноклеточность у таких индивидов сказывается только в условиях сильной гипоксии, например, при нахождении на высоте свыше 3000 м над уровнем моря [1292].

Серповидноклеточность может проявляться слабее, если в организме помимо гемоглобина S имеется другая редкая форма гемоглобина. Присутствие гемоглобина F в эритроцитах больных с серповидноклеточной анемией снижает степень агрегации и кристаллизации гемоглобина S, в результате пациенты, у которых гемоглобин F находится в высокой концентрации, имеют слабовыраженные симптомы серповидноклеточной анемии или не имеют их вовсе. В некоторых случаях присутствие гемоглобина F обусловлено геном, вызывающим постоянный синтез фетального гемоглобина в течение всей жизни (см. ниже). В целом, существует обратная корреляция между количеством гемоглобина F и остротой симптомов серповидноклеточной анемии. Таким образом, любое увеличение количества фетального гемоглобина приводит к ослаблению клинических симптомов серповидноклеточной анемии [970]. Клиническое проявление талассемий будет обсуждаться ниже.

4.3.3. Другие типы мутаций, изменяющих гемоглобин [1188; 1349]

Делеции. Установлено, что гены, детерминирующие синтез глобиновых цепей, могут делетироваться. Делеции генов $Hb\alpha$ приводят к α -талассемии, делеция генов $Hb\delta$ и $Hb\beta$ вызывает наследственное персистирование фетального гемоглобина или $Hb\delta\beta$ -талассемию (см. ниже).

Делеция, затрагивающая один триплет нуклеотидов, или один кодон, приводит к выпадению в цепи соответствующей аминокислоты. Делеция четырех кодонов (т.е. 12 нуклеотидов) обуславливает выпадение четырех аминокислот. Были обнаружены делеции протяженностью до 15 нуклеотидов, приводящие к утрате 5 аминокислот (табл. 4.16). По всей вероятности, более крупные делеции приводили бы к потере функциональной активности молекулы гемоглобина. Большинство делеционных гемоглобинов либо нестабильны, либо приводят к увеличению сродства к O_2 , а во многих случаях имеют оба этих свойства (табл. 4.16).

Если число нуклеотидов, утраченных при делеции, не кратно трем, то на участке гена, расположенном за делецией, смысл считываемой генетической информации полностью меняется - в результате возникает совершенно новая аминокислотная последовательность (мутации сдвига рамки считывания). В некоторых случаях образующиеся при этом глобиновые полипептиды удается идентифицировать. Оказалось, что мутация «гемоглобин Уэйне» (рис. 4.48) обусловлена делецией одного нуклеотида в 139-м кодоне вблизи конца гена α -глобина, состоящего из 141 триплета. Нуклеотиды терминирующего 142-го кодо-

Таблица 4.16. Варианты гемоглобина, возникающие в результате делеций			
Гемоглобин	Сайт делеций	Делегированные аминокислотные остатки	Свойства
Leiden	β6 или 7	Glu	Нестабильность, ↑сродство к O ₂
Lyon	β 17–18	Lys, Val	↑сродство к O ₂
Freiburg	β 23	Val Phe, Glu, Ser	↑сродство к O ₂ ↓сродство к O ₂ , нестабильность
Niteroi	β 42–44 или β 43–45	Gly, Asn, Pro, Lys	Нестабильность
Tochigi	β 56–59	Gly, Leu	Нестабильность, нормальное сродство к O ₂
St. Antoine	β 74–75		↑сродство к O ₂ , нестабильность
Tours	β 87	Thr	↑сродство к O ₂ , нестабильность
Gun Hill	β 91–95 или β 92–96 или β 93–97	Leu, His, Cys, Asp, Lys	↑сродство к O ₂ , нестабильность
Leslie	β 131	Gln	Нестабильность, нормальное сродство к O ₂
Coventry	β 141	Leu	Нестабильность
McKees Rock	β 145–146	Tyr + His	↑сродство к O ₂

на считываются в другой фазе, и новая рамка считывания продолжается до первого в этой рамке терминирующего кодона (UAG). Таким образом, формируется слегка удлинненная цепь молекулы гемоглобина, содержащая 5 дополнительных аминокислотных остатков, которые кодируются 3'фланкирующей областью гена (рис. 4.38 и 4.48). Поскольку рамка считывания сдвинута, эта аминокислотная последовательность отличается от дополнительной аминокислотной последовательности, возника-

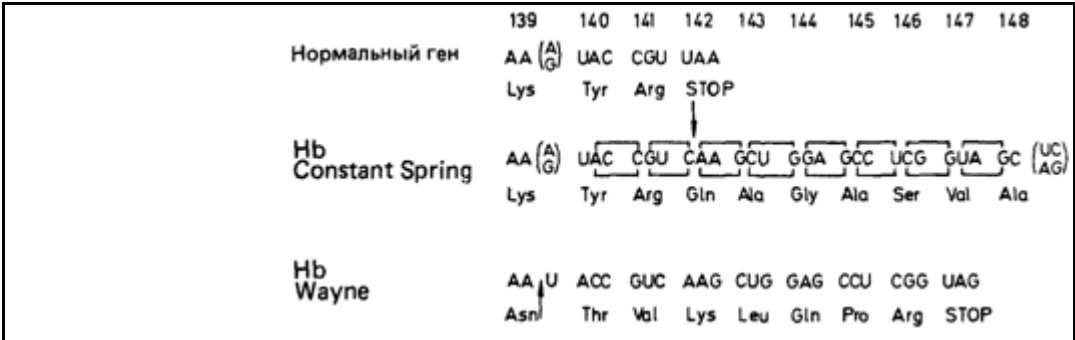


Рис. 4.48. 3'-конец гена Hbα. При мутации Constant Spring 142-й стоп-кодон UAA заменяется на CAA, это приводит к трансляции фланкирующих нуклеотидов, которые обычно не экспрессируются. Приведено 6 кодонов из дополнительной последовательности, содержащей 30 кодонов. Мутация Hb Wayne обусловлена делецией третьего нуклеотида в 139-м кодоне, поэтому U, занимающий первое положение в 140-м кодоне, используется как третий нуклеотид 139-го кодона и возникает новый кодон AAU, кодирующий аспарагин. В результате сдвига рамки считывания образуется ген Hb Wayne. Аминокислотную последовательность этого гемоглобина можно предсказать, если считывать последовательность Hb Constant Spring со сдвигом, как это отмечено скобками над и под последовательностью нуклеотидов Hb Constant Spring. Молекула Hb Wayne всего на пять аминокислот длиннее нормальной, поскольку через пять кодонов имеется стоп-кодон UAG.

ющей при мутации в стоп-кодоне гена Hba, например при мутации «гемоглобин Constant Spring» (рис 4 48) В этом случае трансляция происходит без сдвига рамки считывания

Совершенно естественно, что делеция, которая приводит к фенотипу «гемоглобин Wayne», локализуется вблизи конца α-цепи Действительно, любая делеция, вызывающая сдвиг рамки считывания на протяженном участке структурного гена, по всей вероятности, будет приводить к синтезу функционально неактивных полипептидов Фенотипически это проявится как «талассемия», и продукт гена вообще не будет обнаруживаться (как при β°-талассемии)

По-видимому, возникновение делеций является следствием ошибочного спаривания между гомологичными последовательностями во время мейотического или митотического деления развивающихся генеративных клеток При рассмотрении нуклеотидных последовательностей, окружающих области делеций у различных делеционных мутантов, обнаруживаются участки гомологии, которые могут быть причиной неправильного спаривания Если оно произошло, последующие рекомбинационные события приведут к возникновению делеций различной протяженности

Результатом неправильного спаривания может быть и образование комбинированных (или составных) генов Белковые продукты таких генов состоят из N-концевой части одного глобина и C-концевой части другого В качестве примера можно привести гемоглобин Lepore Его синтез контролируется комбинированным геном Hbδ-β

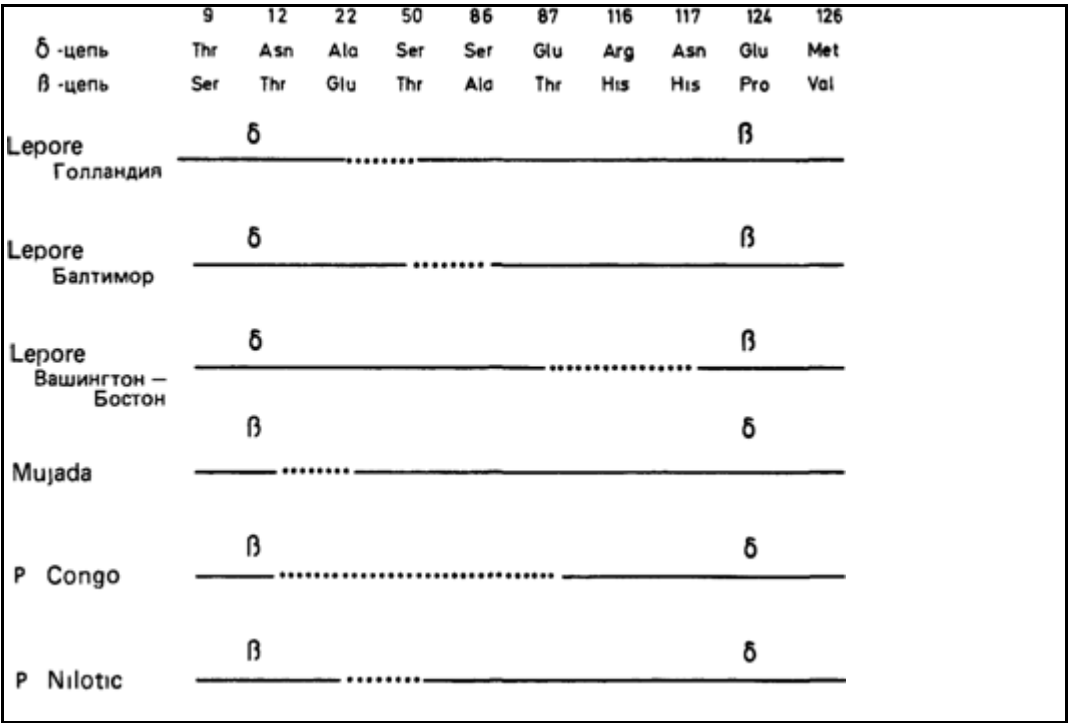


Рис. 4.49 Составные гены δβ и βδ В верхней части рисунка указаны 10 аминокислот, по которым гемогlobины δ и β различаются, в остальном эти молекулы идентичны Обнаружено три различных типа гемогlobина Lepore. В случае Lepore (Голландия) кроссинговер произошел на участке между 22-м и 50-м аминокислотными остатками. Локализовать точку рекомбинации точнее не удастся, так как между этими аминокислотами последовательности гемогlobинов δ и β идентичны. В случае гемогlobина Lepore (Балтимор) кроссинговер происходит между 50-й и 86-й аминокислотами, а в случае гемогlobина Lepore (Вашингтон - Бостон) между 87-й и 117-й Подобным образом локализованы участки кроссинговера для ряда гемогlobинов β-δ и анти-Lepore [1082]

	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158
Нормальный ген	AAG	UAU	CAC	UAA	GCU	CGC	UUU	CUU	GCU	GUC	CAA	UUU	CUA	UUA	AAG
	Lys	Tyr	His	STOP											
Hb McKees Rock	AAG	UAA													
	Lys	STOP													
Hb Tak	AAG	UAU	CAC	ACU	AAG	CUC	GCU	UUC	UUG	CUG	UCC	AAU	UUC	UAU	UAA
	Lys	Tyr	His	Thre	Lys	Leu	Ala	Phe	Leu	Leu	Ser	Asn	Phe	Tyr	STOP
Hb Cranston	AAG	AGU	AUC	ACU	AAG	CUC	GCU	UUC	UUG	CUG	UCC	AAU	UUC	UAU	UAA
	Lys	Ser	Ileu	Thre	Lys	Leu	Ala	Phe	Leu	Leu	Ser	Asn	Phe	Tyr	STOP
	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158

Рис. 4.50. 3'-конец гена β -глобина. Нормальная цепь β -глобина содержит 146 аминокислот. Гемоглобин McKees Rock состоит из 144 аминокислот, так как в результате мутации 145-й тирозиновый кодон UAU превращается в стопкодон UAA. В случае гемоглобина Так дублированы два последних нуклеотида 146-го кодона (AC), а в случае гемоглобина Cranston - два последних нуклеотида 144-го кодона (AG). Соответствующие нуклеотиды подчеркнуты одной и двумя линиями. Возникающие в обоих случаях сдвиги рамки считывания приводят к тому, что продукты этих генов идентичны, начиная со 147-го остатка вплоть до стоп-кодона (158-й). Скобки указывают триплетные кодоны, соответствующие нормальной последовательности, которая изображена в верхней части рисунка. Аминокислотные последовательности гемоглобинов Так и Cranston были определены в прямых экспериментах, они в точности соответствуют нуклеотидной последовательности нормального гена β -глобина.

(рис. 4.49). Известно несколько таких генов, возникающих при кроссинговере в разных точках. Они различаются по относительной длине последовательностей δ - и β -генов, входящих в их состав (рис. 4.49). Гемоглобин Кенуа возникает в результате ошибочного спаривания генов $Hb^{\Lambda\gamma}$ и $Hb\beta$ и последующего кроссинговера. Его хромосома содержит только ген $Hb^{\gamma\gamma}$ и комбинированный ген $Hb^{\Lambda\gamma-\beta}$ (рис. 4.51).

Дупликации. Дупликации могут охватывать целые гены. Именно так произошло в ходе эволюции различных цепей глобина. На более поздних этапах при внутриврохромосомных дупликациях появились два гена α -глобина и два гена γ -глобина (γ^{Λ} и γ^{γ}). Известны внутргенные дупликации. Например, при мутации «гемоглобин Grady» в α -цепи глобина дублированы остатки 116-118 [1136].

Дупликации одного или двух нуклеотидов могут приводить к мутациям со сдвигом рамки считывания. Подобные мутации обнаружены вблизи конца гена β -цепи [31]. Возникновение гемоглобина Так является следствием дупликации нуклеотидов AG после 146-го кодона, а гемоглобина Cranston - дупликации AG сразу после 144-го кодона в β -цепи (рис. 4.50). В положениях 145 и 146 этого гемоглобина находятся аминокислоты, которые не встречаются в соответствующем участке у других вариантов β -глобина. Гемоглобин Так имеет нормальную аминокислотную последовательность до 146-й аминокислоты включительно. Нормальная β -цепь содержит 146 аминокислот. Сдвиг рамки считывания при дупликации двух нуклеотидов в случае гемоглобинов Так и Cranston приводит к возникновению идентичных рамок вслед за 146-м кодоном. Оба мутантных гемоглобина имеют на С-конце добавочные аминокислотные последовательности, которые кодируются нуклеотидами, расположенными непосредственно за нормальным стоп-кодоном. Терминация трансляции в этом случае происходит с участием нового нонсенс-кодона (UAA) в положении 158 (рис. 4.50).

Если дупликация одного или двух нуклеотидов происходит внутри гена, а не у

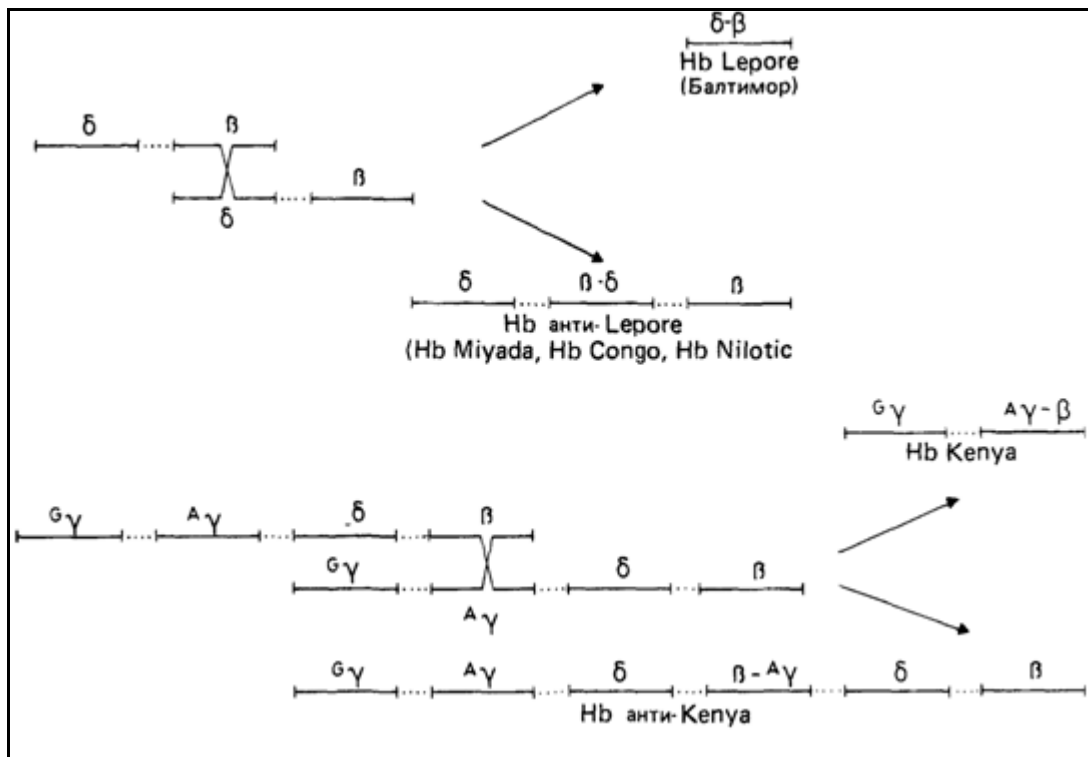


Рис. 4.51. Образование составных генов гемоглобинов. Ошибочное спаривание между генами $Hb\delta$ и $Hb\beta$ с последующей рекомбинацией внутри структурного гена приводит к возникновению составного гена $\delta\beta$ (Hb Lepore), при этом возникает и делеция нормальных генов $Hb\beta$ и $Hb\delta$. Второй продукт такого нехомологичного кроссинговера содержит составной ген $\beta\delta$, перед которым имеется нормальный ген $Hb\delta$ и за которым - ген $Hb\beta$. Такие гены Hb анти-Lepore действительно были обнаружены (Hb Miyada, Hb P, Hb Congo, см. рис. 4.49). Ошибочное спаривание между $Hb\beta$ и $Hb^A\gamma$ с последующей рекомбинацией приводит к возникновению гибридного гена $A\gamma\beta$, известного как Hb Kenya. На схеме показано, каким образом в случае Hb Kenya нормальные гены γ , δ и β утрачиваются, а ген $Hb^G\gamma$ сохраняется. Предполагаемый Hb анти-Kenya в настоящее время не обнаружен.

его конца, рамка считывания нарушается на большом протяжении. Маловероятно, что при этом будет синтезироваться функциональная молекула глобина. Дупликации, как и комбинированные гены, должны возникать в результате неравного кроссинговера (рис. 4.49 и 4.51). Действительно, вариант гемоглобина анти-Lepore встречался несколько раз и был описан под названием гемоглобин Hb Miyada, P-Congo или P-Nilotic (рис. 4.49). Предполагаемый вариант анти-Kenya ($G\gamma$, $A\gamma$, δ , β - $A\gamma$, δ , β) (рис. 4.51) не был до сих пор обнаружен. Дупликации, так же как и делеции, возникают, по-видимому, вследствие ошибочного спаривания и последующего нехомологичного кроссинговера (рис. 4.51).

4.3.4. Талассемии [31; 972; 138; 1253; 222; 97a]

Генетически детерминированное снижение или полное подавление синтеза той или иной цепи гемоглобина обуславливает ряд разнообразных патологических состояний, известных под общим названием «талассемии». Это слово происходит от греческого «Таласса» - Средиземное море, первоначально оно отражало средиземноморское происхождение большинства индивидов - носителей генов, ответственных за талассемию. Хотя с точки зрения географии или этнографии этот термин нельзя считать правильным, он используется достаточно широко. Все случаи талассемии можно под-

Таблица 4.17. Мутации, приводящие к β -талассемии [972; 1253]			
Локализация	Изменени е в последова тельности	Тип талассе мии	Этническая группа
1. Мутации, нарушающие транскрипцию			
а) удаленные регуляторные элементы			
–87	C–G	β^+	Жители Средиземноморья
–88	C–T	β^+	Негры США
б) ТАТА-последовательность			
–28	A–C	β^+	Курды
–28	A–G	β^+	Китайцы
–29	A–G	β^+	Негры США
2. Нарушения расщепления РНК на 1000 т. п. н. дальше экзона 3	T–C	β^+	Негры США
3. Неактивная РНК			
а) нарушения терминации			
кодон 17	A–T	β°	Китайцы
кодон 39	C–T	β°	Жители Средиземноморья
кодон 15	G–A	β°	Индийцы
б) мутации сдвига рамки			
кодон 8	–2	β°	Турки
кодон 16	–1	β°	Индийцы
кодон 44	–1	β°	Курды
кодон 8/9	+1	β°	Индийцы
кодон 41/42	–4	β°	Индийцы
кодон 6	–1	β°	Жители Средиземноморья
кодон 71/72	+ 1	β°	Китайцы
4. Мутации, затрагивающие процессинг РНК			
а) границы сплайсинга			
донорные участки			
IVS-1, поз. 1	G–A	β°	Жители Средиземноморья
IVS-1, поз. 1	G–T	β°	Индийцы
IVS-2, поз. 1	G–A	β°	Жители Средиземноморья
IVS-1, поз. 5	G–C	β^+	Индийцы
IVS-1, поз. 6	T–C	β^+	Жители Средиземноморья
акцепторные участки			
IVS-1	деления 25 п. н.	β°	Индийцы
IVS-1	A–G	β°	Негры США
б) образование новых сайтов сплайсинга			
новый донорный сайт			
IVS-1,	C–T	β°	Китайцы
IVS-2, поз. 705	T–G	β^+	Жители Средиземноморья
IVS-1, поз. 745	C–G	β^+	»
IVS-1, поз. 116	T–G	β^+	»
новый акцепторный сайт			
IVS-1, поз. 110	G–A	β^+	»
в) усиление криптических сайтов			
кодон 24	T–A	β^+	Негры США
кодон 26	G–A	β^E	Жители Азии
кодон 27	G–T	$\beta^{Knossos}$	Жители Средиземноморья

разделить на α - и β -талассемии. Талассемии различаются по этиологии, поскольку показано, что ослабление синтеза цепей гемоглобина может быть обусловлено несколькими генетическими механизмами [1037].

Успехи в исследовании талассемий на молекулярном уровне привели к тому, что мутационные повреждения, характерные для этой группы заболеваний, изучены в настоящее время гораздо полнее любых других мутаций у млекопитающих. Изучение различных генов, ответственных за талассемию, позволило многое узнать о структуре, функции и организации глобиновых генов в норме. Выяснилось, что мутации, затрагивающие различные этапы синтеза гемоглобина, могут ослаблять синтез гемоглобина (β^+ -талассемий) или даже полностью его предотвращать (β^0 -талассемии) [972; 1253; 1238; 4341] (табл. 4.17, 4.18).

Транскрипционные или промоторные мутации. Мутации, которые вызывают талассемию и затрагивают 5'-некодирующую область гена Hb β , можно рассматривать как регуляторные мутации, влияющие на транскрипцию. Такие мутации обнаружены в константном регуляторном элементе с последовательностью PuCPuCCC и внутри ТАТА-последовательности (табл. 4.17). Эти мутации ослабляют синтез гемоглобина и проявляются как относительно легкие формы талассемий. Мутации, затрагивающие СААТ-сайт, в настоящее время не обнаружены.

Мутации в сайте полиаденилирования РНК. У негров часто обнаруживается одиночная мутационная замена ААТААА $\rightarrow$ ААСААА в 3-фланкирующей области гена Hb β , приводящая к β^+ -талассемии; таким образом, мутации в 3-некодирующей области также могут влиять на эффективность транскрипции. Относительно слабое проявление β -талассемий в этой расовой группе объясняется явным преобладанием мутаций, затрагивающих ТАТА-последовательность (см. выше) и сайт полиаденилирования (табл. 4.17).

Нонсенс-мутации и мутации со сдвигом рамки считывания. Как уже указывалось ранее, мутации, приводящие к возникновению терминирующего кодона внутри экзона гена гемоглобина, обуславливают синтез укороченной, неактивной цепи и вызывают поэтому β^0 -талассемию. Выявлены три такие мутации, одна из них характерна для уроженцев Средиземноморья ($\beta^{39}\text{C}\rightarrow\text{T}$). Обнаружена рестриктаза (Mael), узнающая

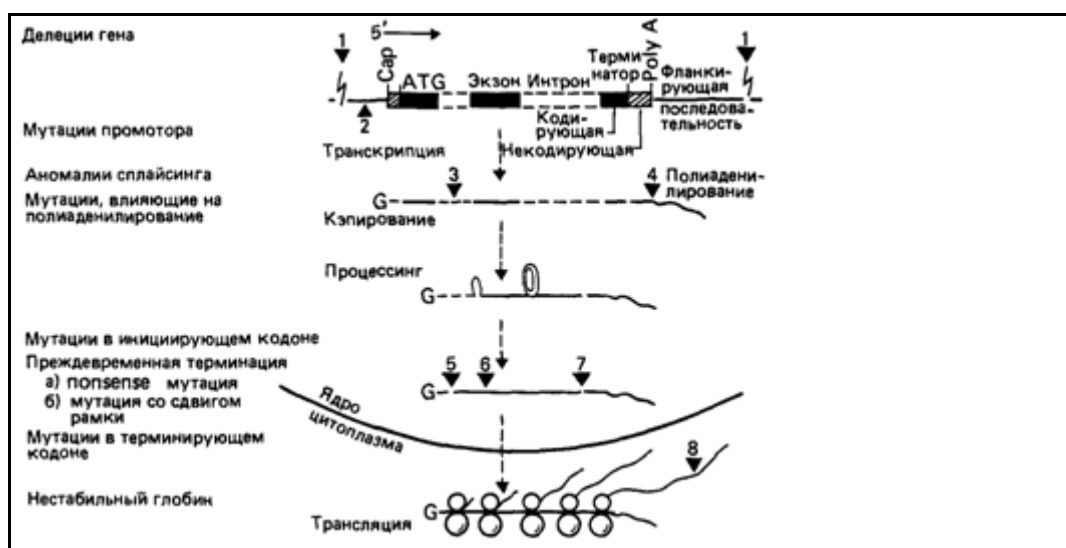


Рис. 4.52. Транскрипция и трансляция генов гемоглобина. Номера указывают сайты, которые изменяются при мутациях, вызывающих талассемию.

этот сайт, благодаря чему стала возможной пренатальная диагностика β^{39} -талассемии [1328a].

Делеции и инсерции, длина которых не кратна трем нуклеотидам, нарушают нормальное считывание генетической информации, в результате чего синтезируются нефункциональные цепи глобина. В различных популяциях обнаружено семь подобных мутаций, вызывающих β^0 -талассемию (табл. 4.17).

Мутации, нарушающие процессинг РНК. Процессинг РНК заключается в вырезании интронов и сплайсинге (сращивании) экзонов с образованием функциональной мРНК (рис. 4.40, 4.52). Описано много различных мутаций, нарушающих этот процесс. Например, известна целая группа мутаций, изменяющих динуклеотид GT (или AG) в донорном (или акцепторном) участке сплайсинга. Эти динуклеотиды входят в состав так называемых канонических (обобщенных) последовательностей, которые включают еще несколько нуклеотидов и играют центральную роль в нормальном сплайсинге. В результате одиночных замен в этих сайтах сплайсинг нарушается, что приводит к β^0 - или β^+ -талассемии. В некоторых случаях мутации активируют так называемые криптические сайты с динуклеотидами GT и AG. В норме, вероятно, эти сайты в сплайсинге не участвуют. В результате образование нормальной мРНК нарушается. Мутации в интронах могут генерировать новые сайты сплайсинга в интронах, которые конкурируют с нормальными сайтами, замедляя процессинг, и в конечном счете приводят к талассемии. Мутации другого класса усиливают уже существующие криптические сайты. Часто встречающаяся мутация такого типа HbE активирует такой сайт. Это приводит к ослаблению синтеза гемоглобина Hb β^E и, следовательно, к талассемии. Различные мутации, нарушающие сплайсинг, перечислены в табл. 4.17. Все точковые мутации в гене β -глобина, которые вызывают β -талассемию, показаны на рис. 4.53.

Делеции в β -глобиновом кластере генов и наследственная персистенция фетального гемоглобина. В отличие от α -талассемии β -талассемия обычно обусловлена не делениями генов. Однако из этого правила есть много исключений. Более трети случаев β -талассемии у индийцев оказывается связанной с делецией длиной 619 п. н., которая начинается во втором интроне и заканчивается за 3'-концом некодирующей области гена Hb β (рис. 4.54, табл. 4.18). Различные редкие делеции в этом гене описаны у негров США, известен один случай среди датчан. Обнаружено также несколько других, более крупных делеций в γ - δ - β -локусе. Их локализация и протяженность показаны на рис. 4.54. Методами цитогенетики эти делеции обнаружить не удается: они слишком малы для микроскопического изучения.

Мутации «гемоглобин Lepore» и «гемоглобин Kenya» представляют собой делеции, при которых сохраняются части функциональных генов и возникают их слияния: δ - β (гемоглобин Lepore) и γ - β (гемоглобин Kenya). Известно несколько делеций, при которых происходит утрата всего или почти всего кластера, при этом γ -, δ - и β -цепи не синтезируются. Принято различать делеции, приводящие к талассемическому фенотипу анемии, например δ - β -талассемия, и делеции, при которых отсутствие δ - и β -локусов компенсируется синтезом фетального гемоглобина (наследственная персистенция фетального гемоглобина, НПФГ). Это отличие не является абсолютным, поскольку при НПФГ компенсация благодаря синтезу γ -цепи не бывает полной. Остается

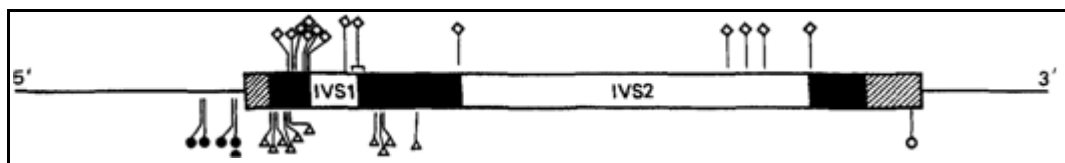


Рис. 4.53. Расположение мутаций, вызывающих β -талассемию в гене Hb β . Различные мутации перечислены в таблице 4.17.

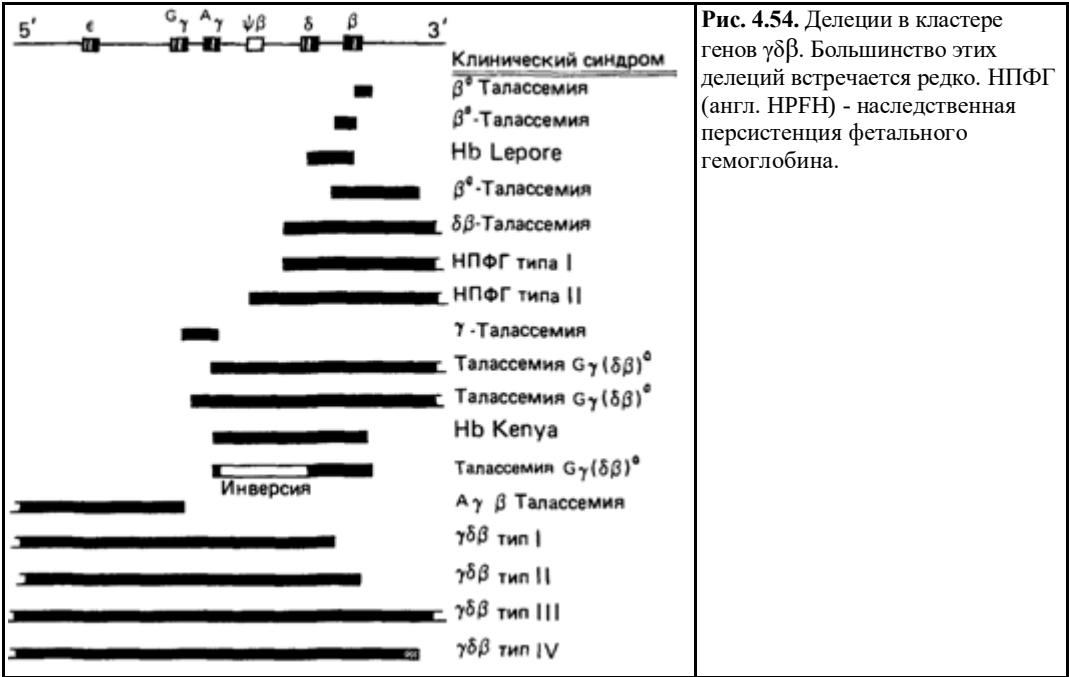


Рис. 4.54. Делеции в кластере генов $\gamma\delta\beta$. Большинство этих делеций встречается редко. НПФГ (англ. HPFH) - наследственная персистенция фетального гемоглобина.

неясным, почему некоторые делеции активируют ген фетального гемоглобина. В настоящее время этот вопрос интенсивно изучается.

Наследственная персистенция фетального гемоглобина может быть вызвана мутациями недеletionной природы. В случае греческой разновидности НПФГ обнаружена точковая мутация в 5'-фланкирующей области γ гена в положении —117 [1040]. Другая точковая мутация в положении 202 5'-фланкирующей области гена Hb γ найдена у негров с недеletionной НПФГ [1093]. Считается, что последовательности, которые изменяются под действием этих мутаций, в норме играют ключевую роль в остановке синтеза у-цепи в постнатальный период.

Изучение генетического контроля синтеза гемоглобина имеет большое значение для лечения талассемии и серповидноклеточной анемии, так как усиленный синтез гемоглобина HbF при этих заболеваниях мог бы обеспечить значительный терапевтический эффект.

Гетероклеточная наследственная персистенция фетального гемоглобина [222]. Группа гетерогенных генетических состояний характеризуется некоторым усилением синтеза фетального гемоглобина (2-3%, иногда; более) и явно неравномерным распределением в популяции эритроцитов. Этим и

Таблица.4.18. β -талассемии, наиболее часто встречающиеся у различных этнических групп [972]			
Этническая группа	Мутация, приводящая к β -талассемии	Тип	Частота, %
Негры США	ТАТА-последовательность (-29)	β^+	39
	Сайт полиаденилирования	β^+	26
Жители Средиземноморья	Инtron 1 (поз 110)	β^+	35
	β^{39} -терминатор	β^+	27
Индийцы	Инtron 1 (поз. 5)	β^+	36
	Делеция (619 п. н.)	β^0	36
Китайцы	Сдвиг рамки (поз. 71/72)	β^0	49
	Инtron 2 (поз. 654)	β^0	38

объясняется название состояния - гетероклеточная НПФГ. Оно не сопровождается анемией. Если ген, определяющий гетероклеточную НПФГ, сочетается в генотипе с геном HbS или с геном β -талассемии, уровень фетального гемоглобина может превышать обычные 2-3%. В частности, при серповидноклеточной анемии повышенный уровень гемоглобина HbF приводит к смягчению клинической картины заболевания. Гетероклеточная НПФГ наследуется как доминантный аутосомный признак и, судя по рестрикционному картированию, не связана с заметными делециями в β -глобиновом кластере. Молекулярные основы гетероклеточной НПФГ неизвестны, но некоторые данные свидетельствуют о том, что геи, ответственный за повышенный уровень гемоглобина F, не сцеплен с γ - δ - β -кластером [1012].

Значение в клинике. β -Талассемии широко распространены в тропических и субтропических областях, поскольку больные, как оказалось, имеют некоторое селективное преимущество перед здоровыми в отношении тропической малярии [1227] (разд. 6.2.1.6). У гетерозигот по β -талассемии наблюдается небольшая анемия (табл. 4.19), несколько повышено количество гемоглобина $A_2(\alpha_2\delta_2)$. Их эритроциты мельче и содержат меньше гемоглобина (показатели MCH и MCV снижены) [31; 222]. Гетерозиготы обычно не нуждаются в медицинском наблюдении или лечении. Внешний вид эритроцитов показан на рис. 4.55.

Гомозиготные больные с β -талассемией страдают сильной анемией и нуждаются в переливаниях крови. У гомозигот по β^0 -талассемии гемоглобин A полностью отсутствует, при β^+ -талассемии его уровень сильно снижен. Большая часть гемоглобина - это гемоглобин фетального типа. Заболевание характеризуется задержкой роста и приводит к летальному исходу в детстве или юности. Гомозиготы и гетерозиготы-компаунды по β^+/β^0 -талассемии страдают тяжелой гемоглобинопатией. Показано, что одновременное поражение α -талассемией смягчает клиническую картину у гомозигот по β -талассемии.

Сочетание гемоглобина S с β^+ -талассемией характерно для негритянских популяций и по симптоматике напоминает серповидноклеточную анемию. Сочетание гемоглобина E с β -талассемией часто встречается в Юго-Восточной Азии и, подобно β^0 -талассемии, вызывает тяжелую анемию. Это связано с тем, что мутация гемоглобина E сама по себе приводит к легкой талассемии (см. выше).

К настоящему времени идентифицировано более 30 различных точковых мутаций, обуславливающих β -талассемию (рис. 4.53, табл. 4.17). Из них 33%-нонсенс-мутации и мутации со сдвигом рамки считывания - препятствуют трансляции мРНК, 47% нарушают сплайсинг, 16%-транскрипцию и 1 % - механизм полиаденилирования. Повидимому, известна лишь небольшая часть мутаций, вызывающих талассемию.

Удивительная гетерогенность мутаций в β -глобиновом локусе проявляется и в высокой частоте гетерозигот-компаундов по β -талассемии. Такие пациенты несут сразу две мутации, обуславливающие β -талассемию, и наследуют их от обоих родителей. В изолированных популяциях гетерозиготы-компаунды встречаются несколько реже, поскольку большинство случаев заболевания в таких изолятах бывает связано с единичными, распространившимися мутациями. Например, нонсенс-мутация β^{39} составляет приблизительно 27% всех мутаций, вызывающих β -талассемию в среднем по Средиземноморью (табл. 4.18), и в то же время составляет абсолютное большинство на острове Сардиния. Поскольку нарушения у гомозигот могут быть самыми разными (от едва заметных до полного отсутствия синтеза глобина) и гетерозиготы-компаунды встречаются часто, тяжесть заболевания сильно варьирует. В табл. 4.19 приведены сведения о наиболее важных с клинической точки зрения гемоглобинопатиях.

α -Талассемии делеционной природы [1122, 1156а, 2322]. Большинство случаев α -талассемии связано с делециями генов. В ходе эволюции происходили конверсия генов (разд. 2.3.4) и множественные акты рекомбинации («согласованная эволюция»), что привело к высокой степени гомологии в

Таблица 4.19. Гемоглобинопатии, имеющие клиническое значение

	Заболевание	Генетическая природа	Степень тяжести
Серповидноклеточные синдромы	Серповидноклеточная анемия	Гомозигота по HbS	+++
	Серповидность эритроцитов, β -талассемия	Компаунд-гетерозигота по HbS и β -thal	от ++ до +++
	Серповидность эритроцитов, HbC	Компаунд-гетерозигота по HbS и HbC	от + до ++
	Признак серповидноклеточности	Гетерозиготы по HbS	0
α -Талассемии	Водянка плода	Делеция 4Hba	летальна
	Болезнь HbH	Делеция 3Hba (или делеция 2Hba и гетерозигота по HbCo Sp) или точковая мутация	++
	Гетерозигота по α -thal-1	Делеция 2Hba или точковая мутация	+
	Гетерозигота по α -thal-2	Делеция одного Hba или точковая мутация	0
β -Талассемия	Гетерозигота по Hb Constant Spring	Нарушена терминация трансляции α -цепи	+
	β^0 (Большая талассемия или анемия Кули)	Гомозиготы	+++
	β^+ (Большая талассемия или анемия Кули)	Гомозиготы	от +++ до ++++ ¹⁾
	β^0/β^+ -Талассемия	Компаунд-гетерозиготы	от ++ до +++
	Гетерозигота по Hb Lepore	Комбинированный ген $\delta\beta^0$	+ (++++ для гомозигот)
	β^0 , β^+ и признак $\delta\beta^0$ -талассемии	Гетерозиготы	+
Заболевания, сопряженные с нестабильностью гемоглобина	Hb E- β -талассемия	Компаунд-гетерозиготы	++++
	Конгенитальная сфероцитарная анемия типа Хейнца	Доминантные гетерозиготы (много разновидностей)	++
Гемоглобины с аномальной константой связывания кислорода	Семейный эритроцитоз (высокое сродство к кислороду)	Доминантные гетерозиготы (около 30 разновидностей)	++
М гемоглобин	Семейный цианоз (метгемоглобинемия)	Доминантная гетерозигота	++ (5 разновидностей)

¹⁾ Для β -thal⁺ гомозигот африканского происхождения характерна более легкая форма заболевания

структурных и фланкирующих областях нормальных генов α -глобинов. Гомология последовательностей в этих областях заставляет хромосомы неправильно спариваться, и при рекомбинации неидентичных спаренных хромосом возникают дупликации и делеции (рис. 4.56). Обнаружены хромосомы, содержащие только один ген (α) или три гена ($\alpha\alpha\alpha$). Селекция на устойчивость к малярии привела к увеличению в тропических и субтропических популяциях частоты гена Hba(— α). Это один из наиболее часто встречающихся типов талассемии. Хромосомы с утроенным локусом ($\alpha\alpha\alpha$), по-видимому, практически не вызывают отрицательных эффектов у их носите-

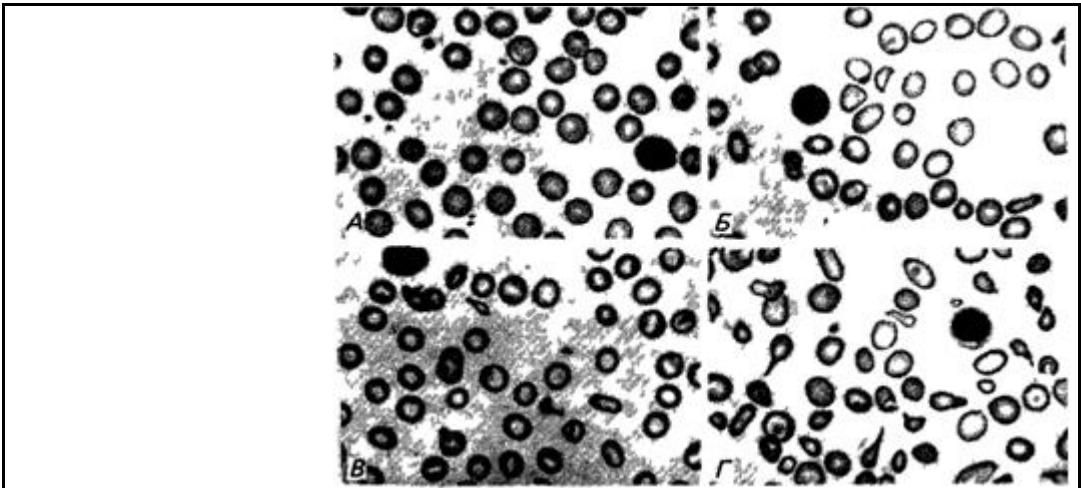


Рис. 4.55. Мазки крови из периферических сосудов нормального человека (А) и больных гетерозиготного по β -талассемии (Б), гетерозиготного по α -thal-1 (В) и больного тяжелой формой β -талассемии (Г)

лей и встречаются в этих популяциях гораздо реже

Два типа делеций обуславливают умеренную форму α -талассемии (α -thal или — α / α) Механизмы делеций проиллюстрированы на рис 4 56 При так называемом левостороннем кроссинговере возникает хромосома с одиночным геном $Hb\alpha$ вследствие ошибочного спаривания последовательностей, расположенных на 5'-конце α -псевдогена, и гомологичной ей последовательности в локусе $Hb\alpha_2$ При рекомбинации происходит утрата участка ДНК длиной 4,7 т п н Поскольку область, в которой происходит рекомбинация в данном случае, расположена перед участком правосторонних делеций (см ниже), используется термин «левосторонний» Так называемый «правосторонний» кроссинговер, являющийся результатом неправильного спаривания между генами $Hb\alpha_2$ и $Hb\alpha_1$, приводит к образованию комбинированного гена $\alpha_2\alpha_1$ и делеций в 3,7 т п н Этот «правый» α -ген (точнее, ген $\alpha_1\alpha_1$) — наиболее частая причина α -талассемии в Африке и в Средиземноморье, тогда как в Азии обнаруживаются продукты и левостороннего, и правостороннего кроссинговера Делеция одного гена α в обоих типах мутаций вызывает стертую форму талассемии и очень широко распространена во всем мире, причем частота гетерозигот достигает 33% в некоторых областях Африки и Средиземноморья

Делеций, обуславливающие утрату обоих α -локусов (—), показаны на рис 4 57 Возникающая в этом случае талассемия часто обозначается как α -thal-1 Такие мутации распространены в Юго-Восточной Азии, редки в Средиземноморье и никогда не обнаруживаются у африканцев

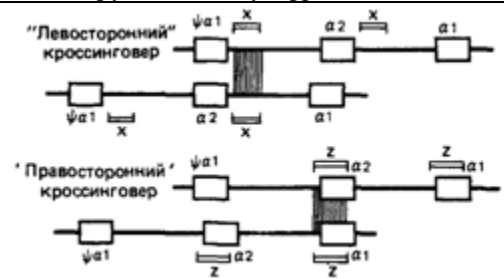


Рис. 4.56. Кроссинговер в X и Z участках гомологии в области гена $Hb\alpha$ При «левостороннем» кроссинговере происходит ошибочное спаривание X участков гомологии с последующей рекомбинацией, при которой возникает один ген $Hb\alpha$ (с делецией длиной 4 2 т п н) При «правостороннем» кроссинговере происходит ошибочное спаривание Z гомологичных участков, кроссинговер внутри α -генов приводит к образованию составного гена $\alpha_2\alpha_1$ и делеции длиной 3,7 т.п.н В результате обоих событий возникают хромосомы с тремя α -глобиновыми генами [1156a]

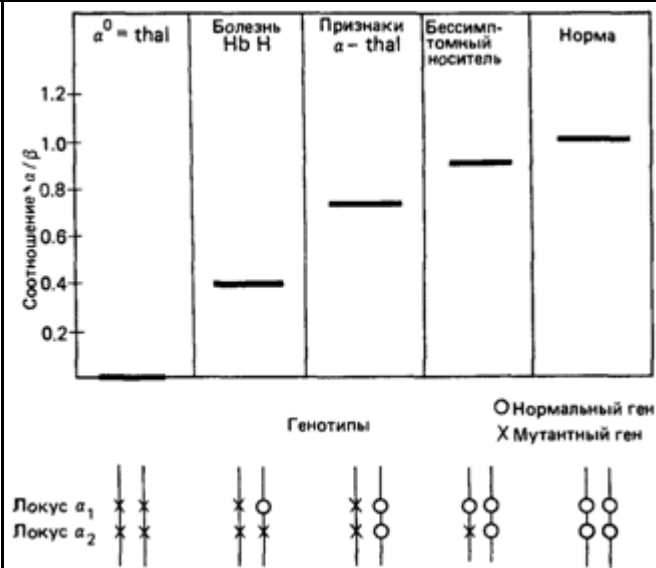
Таблица 4.20, Б. Мутации недеletionной природы, вызывающие α-талассемию [972; 1156]

I. Мутации, нарушающие сайт-специфическое расщепление РНК		
1. Ген α ₂	ААТААА → ААТААG	Саудовская Аравия
II. Неактивная мРНК		
1. Стартовый кодон гена α ₂	AUG → ACG	Сардиния
2. Ген α ₁	Сдвиг рамки в 14-м кодоне	Саудовская Аравия
III. Мутации, нарушающие процессинг РНК		
1. Ген α ₂	5'-consensus IVS-1: делеция 5 п. н.	Средиземноморье
IV. Мутации, нарушающие терминацию трансляции		
1. Hb Constant Spring	UAA → CAA (Glu)	Юго-Восточная Азия
2. Hb Icaria	UAA → AAA (Lys)	Греция
3. Hb Seal Rock	UAA → GAA (Glu)	Негры США
4. Hb Koya Dora	UAA → UCA (Ser)	Индия
V. Нарушение формирования димера α-β		
1. Hb Quong-Sze (α ₁)	CTG → CCG	Китай

Приведенный в таблице перечень не содержит регуляторных мутаций, локализующихся перед геном Hbα, однако найдена мутация, нарушающая стартовый кодон AUG. Фенотипически это изменение проявляется как α-талассемия – не образуется функциональной мРНК, поскольку AUG-кодон, с которого начинается трансляция, находится в 32-м положении. Это приводит к синтезу явно дефектного α-глобина, лишенного первых 32 аминокислот. Известна также мутация в 3'-фланкирующей области, вызывающая снижение синтеза функциональной мРНК.

В настоящее время обнаружена лишь одна мутация, затрагивающая процесс

Рис. 4.58. Синтез цепей глобина при α-талассемиях. Синтез молекул глобина представлен в виде отношения Hbα/Hbβ, которое в норме близко к 1, другими словами, α- и β-глобин синтезируются в эквивалентных количествах. Носители, у которых признаки заболевания не выражены, являются гетерозиготами по α-thal-2 (стертая форма α-талассемии), это удается выявить только специальными биохимическими тестами [1159].



сплайсинга. Это короткая делеция длиной 5 п.н., удаляющая акцепторный сайт сплайсинга в первом интроне.

Известны четыре различные мутации, изменяющие терминирующий кодон UAA на смысловой. В результате этого образуется цепь α -глобина, удлинённая на 31 аминокислоту по сравнению с нормальной. мРНК, кодирующие такой удлинённый гемоглобин, нестабильны. В крови обнаруживается лишь до 5% мутантного белка. Наиболее часто из этих мутаций встречается гемоглобин Constant Spring (рис. 4.58).

В случае гемоглобина Quong-Sze мутация нарушает способность к образованию димера $\alpha_1\beta_1$ и приводит к сильной нестабильности молекулы. Вероятно, будут обнаружены и другие варианты с подобными свойствами.

Прямых данных о частоте недеletionной α -талассемии нет, однако была изучена природа генов, аллельных генам α -талассемии, у больных с гемоглобином HbH (β^4), у которых в одной из хромосом делетированы по меньшей мере два гена Hb α ($-/\alpha\alpha$). В популяциях Саудовской Аравии и Китая при гемоглобинопатии HbH до 50% таких аллельных генов α -талассемии не содержали делеций.

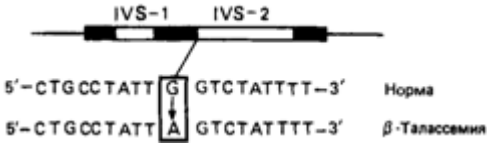
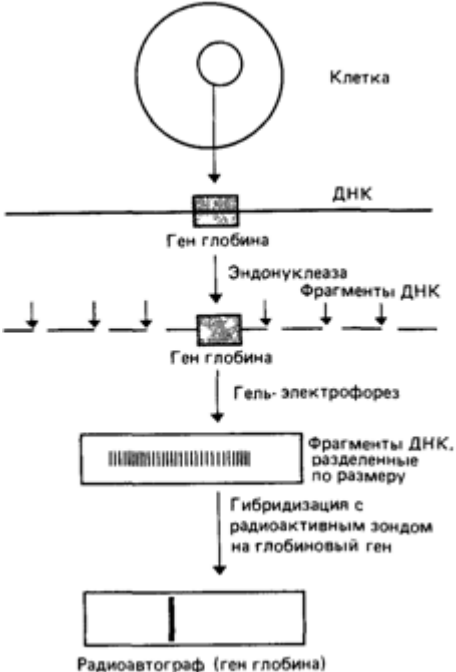
4.3.5. Популяционная генетика генов гемоглобина (см. [972], разд. 6.1.2.3)

Обнаруженный в локусе Hb β полиморфизм позволяет проследить возникновение и распространение различных гемоглобинопатий. Можно предположить, что мутация «гемоглобин S» возникла независимо в трех различных географических зонах (Сенегал, Бенин, Банту) и затем широко распространилась благодаря селективному преимуществу, которое она дает против заболевания малярией [1833]. Среди хромосом с мутацией HbE в Юго-Восточной Азии различают три гаплотипа, один из которых возникает в результате кроссинговера в «горячей точке» (см. выше). Мутация «гемоглобин C» сцеплена, как правило, с одним гаплотипом (см., однако, разд. 6.2.1.6). Отдельные мутации, приводящие к β -талассемии, обычно возникают в уникальных гаплотипах и затем распространяются благодаря селекции на устойчивость к малярии. Из 31 точечковой мутации, приводящей к β -талассемии, лишь 2 встречаются более чем у одной этнической группы. Связь конкретной мутации со специфическим гаплотипом в значительной степени облегчила установление природы различных мутаций, вызывающих талассемию. Поскольку для исследования были выбраны различные гаплотипы ДНК, существовала вероятность обнаружения новых, ранее неизвестных мутаций. И действительно, удалось открыть много новых типов талассемии [1253]. Можно заключить, что все распространенные талассемии и гемоглобинопатии возникли уже после дивергенции человеческих рас и в большинстве случаев остаются сцепленными с хромосомами, в которых они впервые появились. Если одна и та же мутация сцеплена с разными гаплотипами, это в большинстве случаев проще всего объяснить мейотическим кроссинговером в «горячей точке» рекомбинации, расположенной перед геном β -глобина.

Большой интерес вызывает возможность межаллельной конверсии. Так, мутация Hb β^{39} на острове Сардиния сцеплена с несколькими гаплотипами, что трудно объяснить простой рекомбинацией. Более вероятным механизмом считается однонаправленный перенос генетической информации, или конверсия (рис. 2.97). Этот же механизм предполагают для объяснения подобных данных по мутациям гемоглобин S, гемоглобин E и мутации сдвига рамки в гене β -глобина. Такой механизм представляется очень привлекательным, поскольку имеются убедительные доказательства генной конверсии в эволюции генов глобинов у нечеловекообразных обезьян. Высказываются предположения о молекулярных механизмах такой конверсии [972]. Для шести хорошо изученных мутаций в интронах, которые приводят к талассемии, признаков генной конверсии не обнаружено.

4.3.6. Пренатальная диагностика гемоглобинопатии [966; 2269; 2322; 2361]

Существует несколько возможных подходов к пренатальной диагностике гемо-

	
Рис. 4.59. Олигонуклеотидный зонд (олигонуклеотид из 19 остатков) для гена нормального β-глобина отличается от зонда для гена с мутацией, приводящей к β-талассемии только заменой G → A в интроне IVS-2. В соответствующих условиях гибридизации зонд для мутантного гена будет узнавать только мутантный ген, но не нормальный. Аналогичным образом «нормальный зонд» не будет гибридизоваться с мутантным геном.	Рис. 4.60. Обнаружение глобинового гена. ДНК выделяют из любого препарата клеточных ядер, в ее составе имеются глобиновые гены. Различные рестрикционные эндонуклеазы (рестриктазы) расщепляют ДНК на множество фрагментов (рестриктов), узнавая специфические последовательности нуклеотидов. Фрагменты разделяют по размеру с помощью гель-электрофореза. Готовят специфический радиоактивный зонд на глобиновый ген и гибридизуют его с фрагментами ДНК. Радиоактивный сигнал обнаруживают с помощью радиоавтографии [1252].

глобинопатий: а) биохимический анализ гемоглобина на уровне белка в образцах крови, получаемых при фетоскопии или пункции плаценты; б) амниоцентез (пункция амниотической жидкости) на 15-16-й неделе с последующим анализом ДНК амниотических клеток; в) анализ ДНК ворсинок хориона, полученных при биопсии хориона на 9-10-й неделе беременности (разд. 9.1.1). В прямой диагностике клеток и тканей плода используются рестрикционные эндонуклеазы (рестриктазы), позволяющие распознать специфические мутации, например гемоглобин S, а также олигонуклеотидные зонды [1254; 2376], способные гибридизоваться с ДНК при конкретной мутации, вызывающей талассемию (рис. 4.59). В основе косвенных методов пренатальной диагностики лежит семейный анализ рестрикционных сайтов ДНК (выявляемых при анализе полиморфизма длины рестрикционных фрагментов), тесно сцепленных с изучаемой формой талассемии (разд. 9.1.1).

Все эти методы были использованы к настоящему моменту. Взятие образцов крови при фетоскопии или пункции плаценты во многих случаях приводит к гибели плода (5% у опытных специалистов), хотя сам анализ относительно прост: для крови, взятой непосредственно у плода, достаточно методов исследования белков. По мере усовершенствования и упрощения методов молекулярной биологии (рис. 4.60) все большее число лабораторий переключается на их использование. Биопсия хориона имеет некоторые преимущества перед амниоцентезом: при этом удается получить больше ДНК, на более ранних сроках, меньше времени требуется для окончательного заключения. После амниоцентеза для получения биомассы, необходимой для анализа ДНК, клетки приходится культивировать в течение нескольких недель.

Методы прямого анализа ДНК всегда более предпочтительны, поскольку не связаны с изучением семей. Так, в диагностике талассемии большие надежды возлагают на применение специфических олигонуклеотидных зондов и разработку

тации, приводящей к талассемии, следует ожидать. В этом могут помочь данные по сцеплению конкретной мутации со специфическим гаплотипом ДНК. Таким образом, для установления природы мутации, вызывающей талассемию, требуется предварительное исследование ДНК больного родственника.

Гемоглобин как модельная система. Гемоглобин - наиболее изученная генетическая система у человека. На основе концепций, разработанных в ходе ее изучения, можно глубже понять другие явления в генетике человека. Например, если в разных семьях обнаруживаются наследственные заболевания с различным фенотипическим проявлением, обычно заключают, что они вызваны мутациями в разных генах. Исследования гемоглобина показывают, что так бывает не всегда. Например, хотя метгемоглобинемия фенотипически сильно отличается от гемолитической анемии или эритроцитоза, причиной их являются аллельные мутации. Таким образом, фенотип определяется тем, какая именно молекулярная аномалия лежит в его основе и каким образом при этом изменена нормальная функция.

Другой полезный урок можно извлечь из того, как тетрамерная структура гемоглобина обеспечивает функцию связывания кислорода, а также как мутации могут влиять на эту функцию, нарушая взаимодействие различных глобиновых цепей. Хотя большинство мутаций, изменяющих гемоглобин, нейтральны, все патологические варианты, за исключением серповидноклеточной анемии, наследуются по доминантному типу. Отсюда следует, что один из возможных механизмов доминирования заключается в нарушении взаимодействия между продуктами аллельных генов (разд. 4.6). Наконец, изучение гемоглобинов продемонстрировало многообразие механизмов возникновения мутаций у человека. Они могут затрагивать как структурные гены, так и прилегающие регуляторные участки. В большинстве случаев - это замены нуклеотидов, но встречаются и делеции, которые могут сильно различаться по длине. Хотя у прокариот мутации со сдвигом рамки считывания широко распространены, их обнаружение у человека было несколько неожиданным для специалистов. Наше представление о роли мутаций в эволюции во многом основано на результатах изучения мутаций гемоглобина.

4.4. Генетика антител и системы антиген/рецептор

Образование антител и их функции. Живые организмы постоянно подвергаются атаке как извне - со стороны бактерий и вирусов, так и изнутри - со стороны клеток, которые в результате случайных событий приобретают способность неограниченно делиться и формировать опухоли. В ходе эволюции выработалась сложная защитная система, состоящая из ряда клеточных и гуморальных факторов. Эта система называется иммунной, а изучающая ее наука - иммунологией [100]. На рис. 4.61 представлена сильно упрощенная схема иммунологической защиты и ее основные компоненты. Указаны также те компоненты, для которых обнаружены генетические дефекты. Важнейшие структуры иммунной системы - лимфоциты - обладают рецепторами к антигенам. Рецепторы лимфоцитов (и Т-, и В-клеток) закодированы в геноме и сходны по своей структуре, однако гены для этих двух типов рецепторов различны и локализованы в разных хромосомах. Секретируемые рецепторы В-клеток (антитела) представлены иммуноглобулинами. Рецепторы Т-клеток не секретируются.

Специфичность рецептора целиком определяется первичной структурой его антиген-связывающего участка. Этот участок кодируется целым набором генов, причем в ходе развития лимфоцита один из генов варибельной части молекулы (V-ген), выбранный случайным образом, объединяется с геном константной части (C-геном). Таким образом, дифференцированный лимфоцит способен продуцировать только один тип рецептора, специфичный для одного определенного антигена, а вся популяция лимфоцитов как целое содержит полный набор рецепторов, которые организм способен синтезировать. Контакт с определенным антигеном вызывает пролиферацию тех лимфоцитов (клонов), кото-

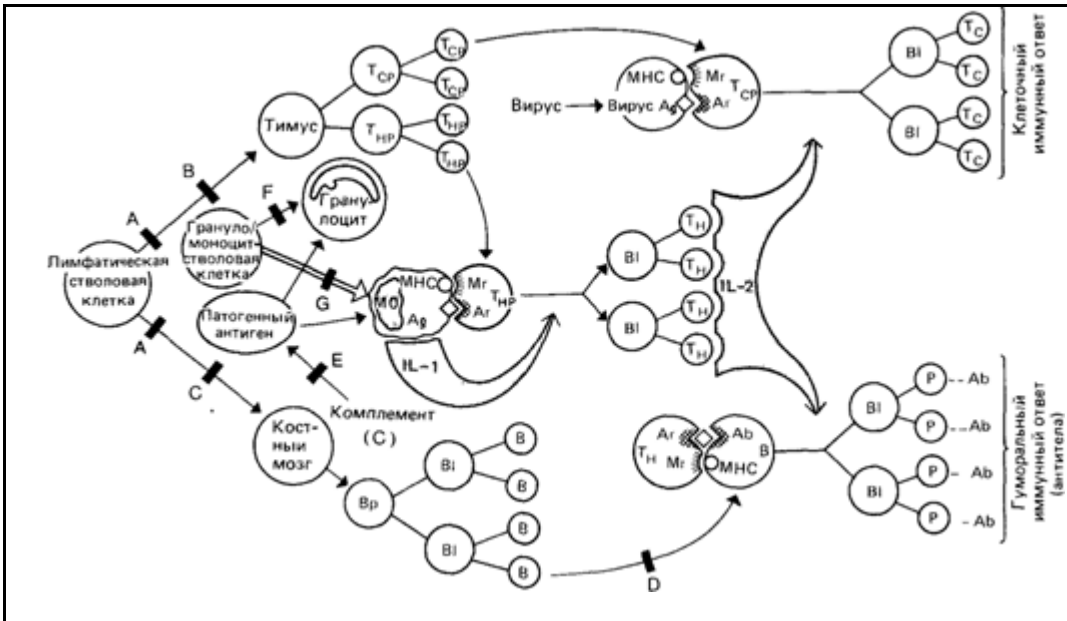


Рис. 4.61. Важнейшие компоненты и события иммунного ответа. Генетические дефекты, обозначенные на рисунке черными прямоугольниками, могут нарушать иммунную защиту на различных этапах. Т_{СР}-цитотоксический предшественник Т-клеток, Т_С цитотоксическая Т-клетка, Т_{НР} предшественник хелпера Т-клеток, Т_Н — Т-хелпер, Мф макрофаг, В_р-предшественник В-клеток, В-В-клетка, Р - плазматическая клетка, В1 бласт, Аг антиген, Аг - рецептор антигена, Ab — антитело (рецептор антигена В-клетки), МНС- молекулы главного комплекса гистосовместимости, Мг-рецептор молекул главного комплекса гистосовместимости; IL-1-интерлейкин- 1, IL-2 - интерлейкин-2, А - наследственные аномалии лимфоцитов, В лимфопенические иммунные аномалии и гиперплазия тимуса; С различные типы дефектов В-клеток; D- дефекты отдельных Ig; E-дефекты компонентов системы комплемента, F-агранулоцитоз, G — детский прогрессирующий грануломатоз.

рые имеют рецептор, соответствующий этому антигену. Генетика антител (рецепторов В-лимфоцитов) изучена значительно лучше, чем рецепторов Т-клеток. Впрочем, основные принципы в этих случаях, по-видимому, сходны.

Белки миеломы как инструмент исследования. У большинства людей иммуноглобулины (антитела, или секретируемые В-клетками рецепторы антигенов) представляют собой сложную смесь белков, синтезируемых многими различными клеточными клонами. На первый взгляд такая гетерогенность кажется непреодолимым препятствием на пути химического анализа антител, поскольку для него необходимы очищенные белки. Однако, как и во многих других случаях, сама природа «предусмотрела» ситуации, позволяющие решить эту задачу. Неоплазии возникают при злокачественном перерождении одиночных клеток. Во многих случаях это происходит в результате соматических мутаций (разд. 5.4.6). Если дифференцировка клеток, продуцирующих антитела, произошла до начала злокачественного роста, плазматические опухолевые клетки будут в большом количестве продуцировать один-единственный вид антител. Действительно, такие моноклональные белки были обнаружены у мыши и у человека при миеломатозах-это распространенный тип плазматических опухолей. Белки миеломы можно выделить и очистить в достаточных количествах для определения их аминокислотной последовательности. Таким путем была изучена структура антител.

Классификация иммуноглобулинов [1123; 1124]. Принято различать пять классов иммуноглобулинов: IgG, IgM, IgA, IgD и

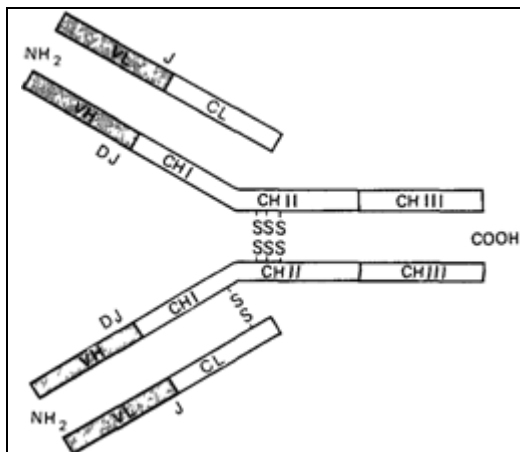


Рис. 4.62. Схема структуры молекулы IgG. Молекула IgG состоит из двух идентичных легких цепей и двух идентичных тяжелых цепей. Каждая цепь состоит из аминоконцевой V-области и карбоксиконцевой C-области. C-область легких цепей по длине приблизительно равна V-области; C-область тяжелых цепей IgG втрое длиннее и состоит из трех относительно гомологичных доменов, возникших в результате эволюции из общего гена-предшественника.

IgE. Молекулы иммуноглобулинов каждого из этих классов состоят из нескольких полипептидных цепей различной длины так называемых легких цепей (L) и тяжелых цепей (H). Класс иммуноглобулина определяется тем, к какому из пяти типов - γ , μ , α , δ или ϵ - относятся входящие в его состав тяжелые цепи. Легкие цепи бывают лишь двух типов - κ или λ . В любой молекуле присутствуют легкие цепи только одного из этих двух типов, но в каждом классе встречаются иммуноглобулины с легкими цепями как κ -, так и λ -типа.

Молекула IgG представляет собой типичный иммуноглобулин, в ее составе две H-цепи связаны дисульфидными мостиками друг с другом, а также с двумя L-цепями. Другие классы иммуноглобулинов отличаются более сложной структурой, например одна молекула IgM построена из пяти субъединиц, в каждой из которых имеется по две H-цепи. В ходе нормального иммунного ответа первыми образуются антитела класса IgM, затем они заменяются антителами класса IgG той же специфичности. Переключение синтеза происходит в тех же клетках, которые синтезировали IgM (рис. 4.62).

Константная и переменная области. Все тяжелые и легкие цепи иммуноглобулинов имеют общее свойство, отличающее их от всех изученных к настоящему времени белков: в них имеются константные и переменные области. Константная область (C) построена подобно большинству других полипептидов, ее аминокислотная последовательность одинакова у C-цепей всех типов, исключение составляют лишь отдельные аминокислотные остатки, по которым наблюдаются полиморфные варианты. Обычно они выявляются косвенно, по подавлению агглютинации эритроцитов специфическими антителами. Эти варианты обозначаются как группы Gm и Km (Inv) для тяжелых и легких цепей соответственно. Переменные области, напротив, по аминокислотным последовательностям оказались различными во всех изученных к настоящему времени белках миелом. Все переменные области легких и тяжелых цепей имеют примерно равную длину 107-120 аминокислот. Константная область легких цепей приблизительно равна по длине переменной области. В тяжелых цепях константная область по длине почти в точности соответствует нескольким копиям переменной области (рис. 4.63). Константные области тяжелых γ_1 - и α_1 -цепей в три раза, а μ - и ϵ -цепей в четыре раза длиннее сходных областей легких цепей. Более того, все сегменты константной области в некоторой степени гомологичны между собой, т.е. их аминокислотные последовательности, хотя и различаются по многим деталям, но все же настолько сходны, что это не может быть случайностью.

Общее происхождение генов всех цепей иммуноглобулинов. Проще всего такое сходство объяснить общим эволюционным происхождением всех этих сегментов. Предположим, что исходно существовал один ген, который кодировал полипептидную цепь, по длине приблизительно соответствующую константной области легкой цепи. В ходе эволюции этот ген многократно дуплицировался. Некоторые дубликации при-

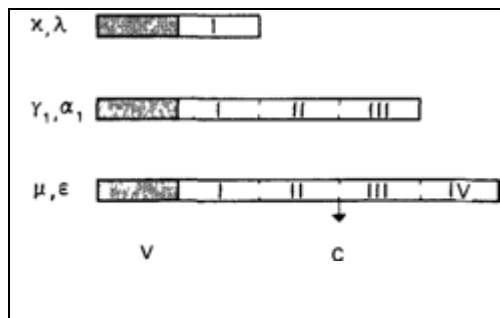


Рис. 4.63. Легкая цепь (вверху) состоит из переменной и одной константной области, которая может быть κ - либо λ -типа Тяжелая цепь (в центре и внизу) состоит из переменной (V) области и константной области, включающей три или четыре гомологичных участка, происходящих от общего гена-предшественника Например, константные области γ_1 и α_1 -цепей, входящие соответственно в IgG и IgA, состоят из трех таких доменов μ - и ϵ -тяжелые цепи содержат по 4 домена [1124]

вели к возникновению генов, кодирующих полипептиды, в составе которых одна и та же аминокислотная последовательность повторена три или даже четыре раза. Дублицированные участки ДНК были полностью гомологичны по структуре, но различались по относительному расположению. Дивергенция этих структурно гомологичных между собой участков в ходе эволюции обусловила наблюдающиеся в настоящее время различия в аминокислотной последовательности константных областей различных иммуноглобулинов.

Первая дупликация исходного гена, вероятно, произошла в ходе хромосомной перестройки. Последующие акты дупликации легко могли осуществляться путем неравного кроссинговера при ошибочном спаривании тесно сцепленных генов, гомологичных по структуре, но различающихся по расположению. По-видимому, это наиболее вероятный механизм увеличения числа гомологичных участков в константных областях различных генов тяжелых цепей. В дальнейшем эволюция различных легких и тяжелых цепей происходила в основном путем дупликаций и хромосомных перестроек. Гены легких и тяжелых цепей не располагаются рядом в составе одной и той же хромосомы. Генетически полиморфные сайты легких цепей (K_m-система) и тяжелых цепей (G_m-система) не сцеплены между собой [78].

Генетический контроль переменных областей. До сих пор мы рассматривали генетический контроль только константных областей, который можно удовлетворительно объяснить в рамках представлений классической генетики. Однако подобный подход не годится для переменных областей. Как объяснить, что все аминокислотные последовательности переменных областей, проанализированные к настоящему времени, оказались различными? Можно предположить, что любой человек обладает очень большим количеством клонов плазматических клеток, каждый из которых образует иммуноглобулин со структурой переменного участка, характерной лишь для этого клона. Возможно также, что специфичность антитела определяется его переменной областью (V). При этом остаются открытыми два принципиальных вопроса.

1. Какие генетические механизмы контролируют синтез переменных областей?
2. Каким образом в результате их действия возникает специфичность антител?

Соматические мутации или избирательная активация генов! Для объяснения генетического контроля переменных областей было предложено несколько гипотез. Наибольшую известность получили две из них: гипотеза «соматических мутаций» и гипотеза «избирательной активации генов». Согласно гипотезе соматических мутаций, в геноме человека имеется лишь один ген, в котором в процессе созревания В-лимфоцитов возникают многочисленные случайные мутации. На самом деле соматические мутации происходят в ходе пролиферации клеток всех типов (разд. 5.1.6). Однако эта гипотеза подразумевает наличие специфического механизма, который обеспечивает избирательное увеличение частоты соматических мутаций именно в гене переменной области. Можно представить себе такой механизм, например предположив, что рассматриваемый участок ДНК недоступен для действия ферментов репарации.

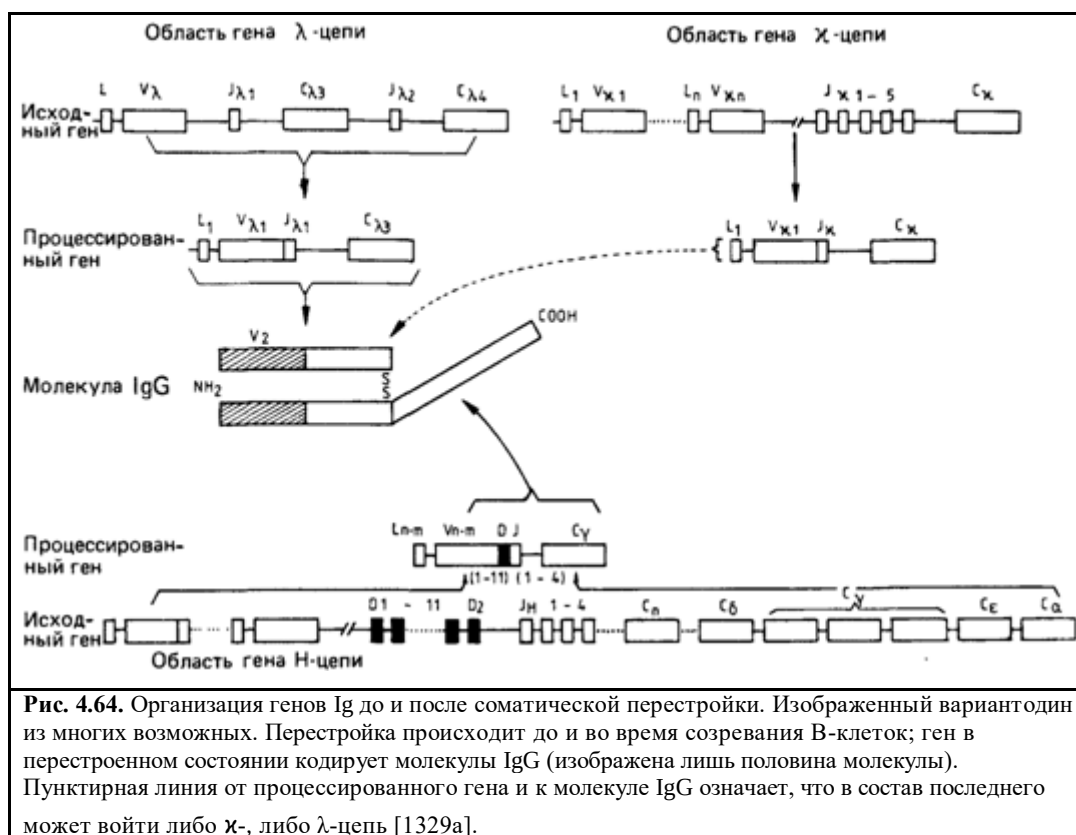
Соматические мутации, несомненно, случайны. Следовательно, изучение миеломных белков должно продемонстрировать полностью независимые аминокислотные замены в варибельных областях различных антител. Конечно, в молекуле могут быть такие участки, мутации в которых недопустимы и которые поэтому должны быть идентичными во всех варибельных областях иммуноглобулинов. Все исследованные к настоящему времени варибельные области можно подразделить на группы, в пределах которых определенные аминокислотные замены являются общими, тогда как другие аминокислотные замены совершенно различны.

Этот факт делает более убедительной альтернативную гипотезу генетического контроля варибельных областей. Согласно этой гипотезе, у каждого человека имеется большой набор генов, которые организованы в виде высокоповторяющейся последовательности. Однако в каждой клетке активным может быть только один из таких генов. Этот ген может каким-то образом соединиться с геном константной области полипептидной цепи, в результате образуется непрерывная молекула мРНК. Если допустить, что подобная организация генов возникла в результате многократных актов неравного кроссинговера, за которым в течение многих тысячелетий происходила ненаправленная фиксация точковых мутаций, то наблюдаемые закономерности вполне объяснимы. Мутации, которые являются общими для нескольких полипептидных цепей, очевидно, были фиксированы до того, как гены этих цепей дублировались; мутации, которые обнаруживаются лишь в одной цепи, по всей вероятности, возникли сравнительно недавно.

Обе гипотезы связаны с необычным для генетики допущением. Для накопления столь большого количества соматических мутаций необходимо увеличение частоты их возникновения или скорости отбора, характерное для В-лимфоцитов. Избирательное объединение одного из многих генов варибельной области с геном константной области должно осуществляться специальным механизмом, который ранее не был обнаружен. Такое соединение не может происходить на уровне белка, так же как и на уровне РНК, поскольку мРНК уже содержит полную информацию о белке. Следовательно, оно должно происходить на уровне ДНК. Первые предположения относительно такого механизма возникли после открытия ферментов рестрикции, способных расщеплять молекулу ДНК по определенным последовательностям нуклеотидов (разд. 2.3 и 9.2). Одна из нормальных функций таких ферментов может заключаться в расщеплении ДНК с образованием протяженных фрагментов, которые впоследствии объединяются в новом порядке и только после этого транскрибируются. Изучение одних аминокислотных последовательностей не позволяло решить, какая из гипотез была верна. Для ответа на этот вопрос необходимо прямое исследование структуры соответствующих генов.

Проблема была решена с помощью методов генной инженерии (разд. 2.3). Оказалось, что сторонники обеих гипотез были отчасти правы. На рис. 4.64 представлена структура генов мыши, кодирующих легкие λ - и κ -цепи и тяжелые цепи иммуноглобулинов. Хотя значительная часть этих исследований выполнена на мышах, существуют убедительные доказательства сходства соответствующих генов мыши и человека.

Имеются три типа сегментов генов иммуноглобулинов, которые организованы принципиально сходным образом: гены константной области, гены варибельной области и так называемый соединительный сегмент. Далее эти сегменты будут обозначаться соответственно буквами С, V и J - прямыми заглавными в случае участков молекул белка и курсивом в случае кодирующих их сегментов генов. Впрочем, в деталях эти элементы различаются (см. рис. 4.64). Для легкой λ -цепи имеются два гена константной области. Поскольку белок содержит единственную С-область, при его синтезе должен происходить выбор одного из четырех генов С-области (по два таких гена имеется на каждой из двух гомологичных хромосом). Помимо этого, для каждого С-гена имеются собственный ген J и один ген V. Имеется также короткий сегмент (так называемый L-сегмент), на-



ходящийся слева от V, внутри которого находится стартовая точка транскрипции. Ген легкой х-цепи содержит один С-сегмент и 5 различных J-сегментов. Гены V-области весьма многообразны, по современным оценкам их насчитывается 90-300. Среди последовательностей, кодирующих Н-цепь, обнаружено 8 различных С-сегментов. Продукт гена C_μ присутствует в белке IgM, продукты генов C_δ, γ₁, γ_{2b}, γ_{2a} входят в состав иммуноглобулинов IgD, IgG, IgA. Существуют также 4 различных гена J-сегмента. В отличие от легких цепей, тяжелые цепи содержат дополнительную аминокислотную последовательность, которая кодируется D-сегментом, присутствующим в 12 копиях. Кроме того, имеется 100-200 L_H-V_H сегментов.

В ходе дифференцировки клеток, образующих антитела, один L-Vсегмент соединяется с одним J-сегментом (а в случае клонов, образующих тяжелые цепи, с одним D- и одним J-сегментом) и одним С-сегментом. Поэтому возможно огромное количество комбинаций: если в геноме содержится 2V_λ, 3J_λ, 300V_κ и 4J_κ -сегмента, то общее число различных вариантов легких цепей равно 1206 (2 x 3 + 300 x 4). Подобным образом, если имеется 200V_H, 12D- и 4J_H-сегмента, то максимальное число различных тяжелых цепей должно быть 9600 (200 V_H x 12D x 4J_H). Не будем далее углубляться в вопрос о доказательстве гипотезы избирательной активации генов. Прямые исследования генов показали, что их перестройка осуществляется в ходе дифференцировки В-лимфоцитов, а также до нее. В настоящее время на изучении этой проблемы сосредоточили свои усилия несколько групп исследователей. Некоторые факты уже выяснены. В частности, оказалось, что воссоединение различных сегментов генов осуществляется не с абсолютной точностью, и это может служить дополнительным источником разнообразия. В других случаях подобные неточности приводят к сдви-

гу правильной рамки считывания, в результате нарушается трансляция белка. Таким образом, многообразие антител достигается ценой некоторых потерь. Иногда в месте объединения происходит инсерция одного или нескольких нуклеотидов.

Однако перечисленные факторы, определяющие различия, не могут полностью объяснить многообразие антител. В действительности сторонники гипотезы соматических мутаций оказались отчасти правы. В настоящее время путем сравнения гомологичных нуклеотидных последовательностей генов иммуноглобулинов разных индивидов получены убедительные данные, доказывающие, что в них происходят многочисленные соматические мутации. В большинстве случаев это простые нуклеотидные замены, которые приводят к замещению одной аминокислоты (см. разд. 5.1.4). Они были обнаружены не только в V-сегменте, но также и в J- и D-сегментах.

Итак, существуют 4 источника разнообразия антител в клетках:

1) только одна из множества копий V-сегментов соединяется с соответствующей

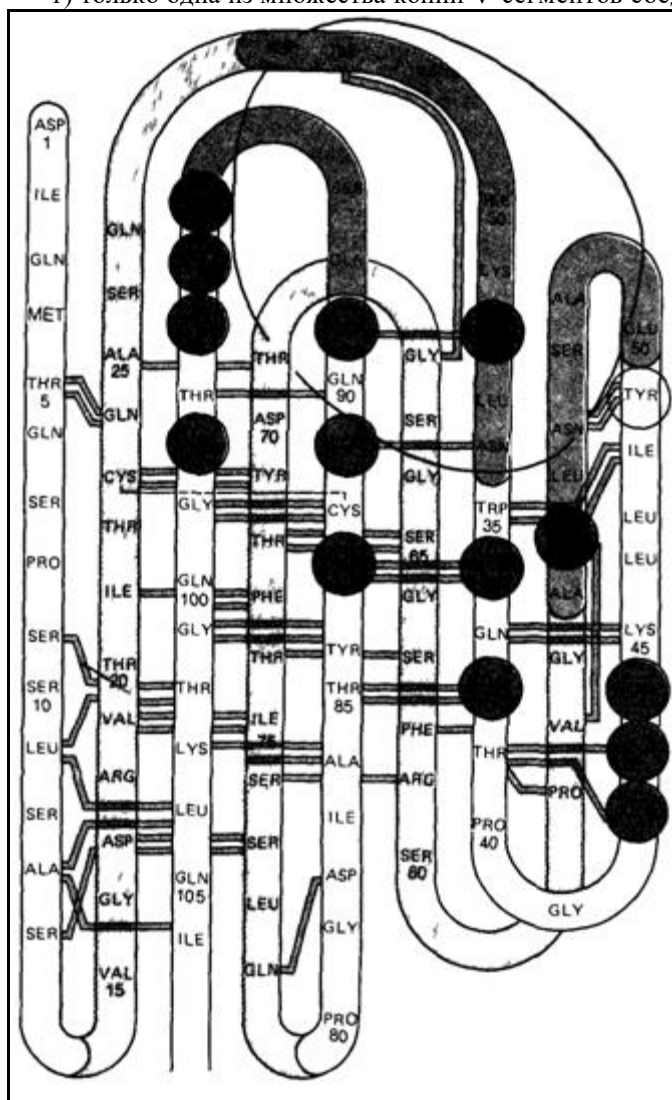
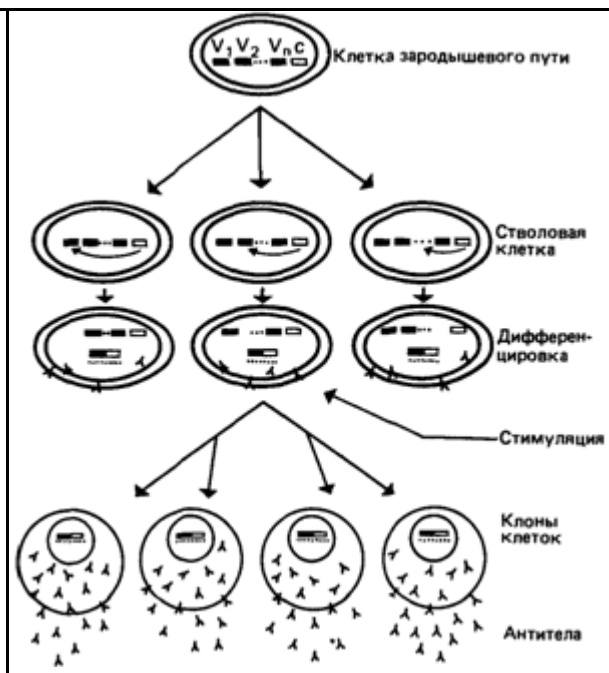


Рис. 4.65. Пространственная модель переменной области χ -цепи, построенная на основании данных рентгеноструктурного анализа. Цепь состоит как бы из двух слоев (нижний слой обозначен *светло-серым*). Сегменты связаны водородными связями. *Темным* цветом выделены наиболее вариабельные участки, все они располагаются вокруг кармана, который данная цепь образует совместно с другой χ -цепью (сплошная *черная линия*), вероятно, именно он является участком связывания антигена. Выделенные наиболее темным цветом аминокислоты участвуют в образовании связей со второй частью димера [1123]

Рис. 4.66. В ходе эмбрионального развития и дифференцировки образуется множество стволовых клеток, способных производить антитела. Каждая из них может синтезировать один определенный вид антител, так как ген константной области (*светлый* прямоугольник) способен присоединяться только к одному из множества генов варибельной области (*темный* прямоугольник). Специфический антиген стимулирует пролиферацию клона стволовых клеток, способных производить соответствующее ему антитело. В конечном счете это приводит к увеличению синтеза данного антитела [1123].



щими J-, D и C-сегментами с образованием функционального гена;

2)соединение концов сегментов происходит не с абсолютной точностью;

3)в месте соединения возможно встраивание дополнительных нуклеотидов;

4)помимо рекомбинации (как в трех предыдущих случаях) источником многообразия могут служить соматические мутации в V-, J- и D-сегментах.

Благодаря всем перечисленным механизмам один организм синтезирует многие тысячи различных антител. Отметим здесь другой факт, важный с эволюционной точки зрения. Как говорилось в разд. 3.5.5, иммунный ответ определяется, в частности, специфичностью HLA. Поэтому было вполне логично исследовать возможные сходные участки в аминокислотных последовательностях этих белков [1173; 1329a]. Как показано на рис. 3.39, молекула HLA состоит из тяжелой и легкой цепей. Тяжелая цепь включает внутриклеточную часть молекулы, а также участки α_3 , α_2 , α_1 . Была обнаружена статистически значимая гомология в аминокислотной последовательности между участками HLA-B7 и C-областью IgG. Эти белки имеют и другие общие структурные особенности, например у них совпадают три инвариантных аминокислотных остатка (два остатка цистеина и один остаток треонина), имеются также целые участки гомологии вокруг цистеина. В общем аминокислотные последовательности таковы, что возможно образование трехмерной структуры, весьма близкой к структуре молекулы IgG. Все эти данные, несомненно, указывают на общее эволюционное происхождение семейства генов HLA и генов иммуноглобулинов. Мы вернемся к этому вопросу в гл. 7.

Варибельная область и специфичность антител. Как уже отмечалось, специфичность антител определяется варибельными областями молекулы, которые различаются по аминокислотным последовательностям. Внутри варибельной области имеются участки, в которых варибельность выше, чем в других.

Антигены связываются со специфическими участками молекулы антитела. Если специфичность антитела действительно определяется различиями в аминокислот-

ных последовательностях, то участки связывания следует искать среди наиболее переменных областей. Для х-цепей это участки аминокислот 28-34, 50-56, 91-96. Пространственную структуру молекул белков определяют методом рентгеноструктурного анализа. В настоящее время рентгеноструктурные данные получены для переменной области х-цепи (рис. 4.65). Полипептидная цепь изогнута так, что образует двуслойную структуру, причем соседние сегменты одного слоя антипараллельны и связаны друг с другом водородными связями. Получены данные в пользу того, что переменные области λ-цепей и тяжелых цепей организованы сходным образом. Темно-серые участки на рисунке соответствуют гиперпеременным районам. Обозначены также аминокислоты, обеспечивающие контакты между двумя мономерами молекулы антитела. Две такие переменные области молекулы формируют карман диаметром 15Å, стенки которого образованы гиперпеременными участками [1123]. Весьма вероятно, что этот карман является частью участка связывания антигена и его форма определяет специфичность антитела. В свою очередь форма кармана определяется аминокислотной последовательностью гиперпеременных участков. Еще на ранних этапах развития иммунологии специалисты зачастую сравнивали взаимодействие антигена и антитела с ключом и замком. Пространственная модель, представленная на рис. 4.65, показывает, что эти представления, по-видимому, не просто метафора.

4.5. Фармакогенетика и экогенетика

4.5.1. Фармакогенетика

Развитие биохимической генетики человека, обнаружение наследственных дефектов ферментов, привели к возникновению новой отрасли генетики - фармакогенетики. Еще Гэррод, основатель биохимической генетики человека [75] (разд. 1.5), и известный английский генетик Холдейн [87] отмечали, что необычные реакции на лекарственные препараты и пищевые продукты могут объясняться биохимической индивидуальностью людей. Действительно, в 50-е годы было показано, что некоторые аномальные реакции, связанные с применением лекарств, обусловлены различиями в свойствах ферментов. Так, гемолитическая анемия, которая встречается у некоторых людей при употреблении в пищу бобов, а также при действии различных лекарств, в действительности объясняется недостаточной активностью глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (G6PD) (разд. 4.2.2.2). Было установлено, что с одним из вариантов псевдохолинэстеразы [1195; 1152] связана длительная задержка дыхания после введения суксаметониума - препарата, который широко применяется для релаксации мышц во время хирургических операций. Выяснилось, что значительная переменность уровня изониазидгидразина в крови обусловлена генетически детерминированными различиями в активности ацетилтрансферазы у разных индивидов [1073].

Эти факты побудили одного из авторов этой книги (А. Мотульски) высказать предположение о том, что аномальная реакция на лекарственные препараты иногда может быть связана с наследственной ферментативной недостаточностью [1222]. Другой автор (Ф. Фогель) первым предложил термин «фармакогенетика» [1337].

Система G6PD (30590). Эта система уже обсуждалась в разд. 4.2. Ген, контролирующий синтез этого фермента, локализован в X-хромосоме, поэтому гемолитические реакции на лекарственные препараты, обусловленные недостаточностью G6PD, проявляются главным образом у мужчин. У гетерозиготных женщин часто регистрируется промежуточный уровень активности фермента, причем у некоторых гетерозигот он приближается к нормальному, а у некоторых - к уровню, характерному для больных (рис. 4.6) [1234]. В крови таких гетерозигот присутствуют две популяции эритроцитов - нормальная и мутантная. Количественное соотношение между ними обычно близко к 1:1, но может и варьировать в отдельных случаях от 1:99 до 99: 1 [999]. Частота встречаемости G6PD-зависимой реакции на некоторые лекарства у женщин зависит от частоты соответствующего аллеля в популяции и от степени

инактивации X-хромосомы, которая определяется количественным соотношением нормальных и дефектных по G6PD клеток. Среди женщин с клиническими формами недостаточности, лишь незначительная часть приходится на гомозигот, в основном это гетерозиготы, у которых преобладают мутантные клетки с низким уровнем фермента. Различные лекарственные препараты с возможным гемолитическим эффектом также различаются по их потенциальной способности вызывать нарушения в крови.

Установлена связь некоторых распространенных вариантов G6PD с гемолитической реакцией (табл. 4.4). Показано, что помимо лекарственных препаратов, гемолиз может вызываться бактериальной или вирусной инфекцией, проявляться при желтухе новорожденных, когда печень еще не способна перерабатывать билирубин (продукт метаболизма гемоглобина), который выделяется при гемолизе.

Наиболее тяжелая форма гемолиза детерминруется такими мутантными формами G6PD, как Mediterranean и Canton (табл. 4.4). Для этих случаев характерно не только уменьшение активности, но и нестабильность молекул фермента [1146]. При распространенном типе недостаточности G6PD, характерном для лиц африканского происхождения, молодые эритроциты, возраст которых составляет менее 60 дней (продолжительность жизни нормального эритроцита составляет 120 дней), содержат достаточные количества фермента, а характерная для этого заболевания нестабильность фермента проявляется только в старых эритроцитах. В этом случае происходит лишь ограниченный гемолиз и летальные исходы почти не наблюдаются.

При более тяжелом гемолизе, который характерен для средиземноморского варианта, исход может быть и фатальным. Этот вариант отличается от недостаточности африканского типа также тем, что обусловленный им гемолиз индуцируется большим числом лекарственных препаратов. Для большинства других форм фермента данные о спектре потенциально опасных препаратов еще не получены.

Варианты псевдохолинэстеразы [1104]. Препарат суксаметоний, или сукцинилдихолин, широко применяется в качестве релаксанта мышц при хирургических операциях. Фермент псевдохолинэстераза катализирует гидролиз препарата, благодаря чему в норме его действие непродолжительно. У редко встречающихся больных этот фермент обладает очень низким сродством к препарату, что приводит к длительной задержке дыхания вследствие подавления деятельности дыхательных мышц. В таких случаях в течение многих часов, пока пациенту не введут очищенный фермент или плазму, содержащую активную псевдохолинэстеразу, приходится прибегать к искусственному дыханию. Причиной ненормального метаболизма препарата служат различные мутации как в гетерозиготном, так и в компаунд-гетерозиготном состоянии, изменяющие активный центр псевдохолинэстеразы, которая в этих случаях не способна эффективно гидролизовать субстрат. Наиболее часто встречается мутантный аллель CHE_1^D . Аллель, кодирующий нормальную псевдохолинэстеразу, обозначают CHE_1^U . Примерно 3-4% людей европейского происхождения являются гетерозиготами (CHE_1^U/CHE_1^D), а один из каждых 3500 индивидов - гомозиготой по мутантному аллелю. Вместе они составляют группу риска по продолжительной задержке дыхания при введении суксаметония. Измененный фермент обычно идентифицируют *in vitro* по его устойчивости к ингибитору дибукаину. У мутантных гомозигот фермент относительно устойчив к дибукаину, гетерозиготы проявляют промежуточную устойчивость (табл. 4.21). Другой аллель псевдохолинэстеразы (CHE_1^S) обуславливает полное отсутствие активности этого фермента. Гомозиготы по этому аллелю (CHE_1^S / CHE_1^S) очень чувствительны к действию суксаметония, так как в плазме крови этих больных псевдохолинэстеразы нет. Аллель CHE_1^S распространен среди эскимосов Аляски. Еще один мутантный аллель (CHE_1^F) детерминирует устойчивость к фториду. Обычно в качестве субстрата при исследованиях псевдохолинэстеразы применяют бензоилхолин. Однако у некоторых

Таблица 4.21. Типы псевдохолинэстеразы и чувствительность к суксаметониуму					
Генотип	Активность	Дибукаиновое число	Фторидное число	Частота фенотипа в европейских популяциях ¹⁾	Чувствительность к суксаметониуму
CHE ₁ ^U /CHE ₁ ^U	Нормальная	80	59	95%	Нет
CHE ₁ ^D /CHE ₁ ^D	Умеренно снижена	22	27	1:3200	+ + +
CHE ₁ ^S /CHE ₁ ^S	Отсутствует	0	0	1:170 000	+ + + +
CHE ₁ ^F /CHE ₁ ^F	Немного снижена	66	35	1 :28 000	+ +
CHE ₁ ^D /CHE ₁ ^S	Снижена	22	27	1:11000	+ + +
CHE ₁ ^D /CHE ₁ ^F	Немного снижена	49	33	1:2500	+ + +
CHE ₁ ^F /CHE ₁ ^S	»	67	43	1:33 000	+ +
CHE ₁ ^U /CHE ₁ ^D	»	62	48	3,5%	(+)
CHE ₁ ^U /CHE ₁ ^F	»	74	50	1,2%	(+)
CHE ₁ ^U /CHE ₁ ^S	»	80	59	1:200	Неизвестна
¹⁾ Приводится исходя из частот 3,5% для атипичного аллеля, 1,2% для устойчивого к фториду аллеля и 0,5% для «молчащего» аллеля. Частоты гомо- и гетерозигот рассчитаны с помощью экстраполяции теоремы Харди—Вайнберга на множественные аллели (По Technical reports series № 524 Geneva 1973 [969])					

больных с длительной задержкой дыхания нарушение фермента удается обнаружить только тогда, когда для этого используют непосредственно сукцинилдихолин [1103].

Варианты ацетилтрансферазы [1062; 1204, 1271]. Многие лекарственные препараты ацетируются в печени ферментом N-ацетилтрансферазой. В число этих препаратов входят изониазидгидразин, фенелзин, дапсон, салицилазосульфопиридин, сульфаметазин, нитрозепам, гидролазин и прокаинамид. Разные индивиды отличаются по способности ацетилировать контрольный препарат, например изониазидгидразин или сульфаметазин, при введении *in vivo*. Приблизительно 50% европейцев и африканцев инактивируют препарат медленно, тогда как 80-90% жителей Азии - быстро. Семейный анализ показал, что люди, медленно инактивирующие препараты, лишены активности ацетилазы, а быстро инактивирующие обладают одной или двумя копиями гена, который кодирует ацетилтрансферазу. Точный биохимический механизм, отвечающий за полиморфизм N-ацетилтрансферазы, не установлен. Тесты для оценки ацетилирования *in vitro* в настоящее время не разработаны, вот почему, чтобы выяснить способность конкретного человека осуществлять ацетилирование, ему приходится вводить контрольный препарат. С этой целью можно с успехом использовать кофеин в стандартной дозировке, которая эквивалентна его содержанию в чашке кофе, поскольку основной продукт ацетилирования кофеина (5-ацетиламиноб-формиламино-3-метилурацил) выделяется с мочой только у людей, способных к быстрой инактивации препаратов [1113]. Среди клинических последствий полиморфизма способности к ацетилированию следует отметить большую частоту полинейропатии в ответ на изониазидгидразин среди «медленно инактивирующих». Побочные эффекты, подобные явлениям при волчанке, чаще встречаются у «медленно инактивирующих» при действии гидролазина и прокаинамида. У «медленно инактивирующих» сильнее выражены гематологические эффекты дапсона и салицилазосульфопиридина. Возможно, «быстро инактивирующим» требуется вводить более высокие дозы различных препаратов для достижения требуемого терапевтического эффекта. Высказывались также предположения о том, что изониазидгидразин является у «быстрых инактиваторов» токсичным для печени, так как ацетилизониазид более токсичен для печени, чем изониазидгидразин [1280].

Кривые распределения и действие генов. При моногенном типе наследования должны наблюдаться качественные различия между продуктами нормального и мутантного генов. Если есть возможность производить измерение на уровне продукта гена, то при графической обработке результатов обычно удастся идентифицировать различные генетические классы в виде отдельных мод на кривой распределения. Кривая распределения активности G6PD у мужчин с нормальной активностью и с дефектом этого фермента имеет две неперекрывающиеся моды. Все три генетических класса вариантов псевдохолинэстеразы можно легко идентифицировать в опытах со специфическими ингибиторами. Этот метод

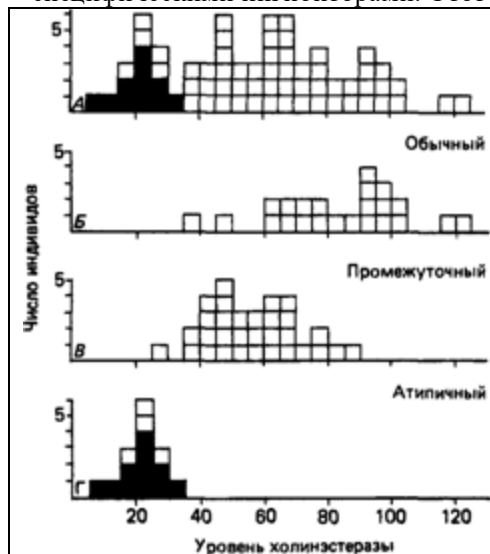


Рис. 4.67. Распределение уровней активности холинэстеразы сыворотки у 11 людей с необычайно высокой чувствительностью к суксаметониуму и 58 их родственников (Harris et al., 1960). Каждый квадратик соответствует одному человеку; суксаметониум-чувствительные индивиды выделены черным цветом *А*. Распределение активности холинэстеразы сыворотки. Активность фермента определяли манометрическим методом с использованием в качестве субстрата ацетилхолина. *Б*. Распределение активности у лиц, отнесенных к обычному фенотипу. *В*. Распределение активности у лиц, имеющих промежуточный фенотип. *Г*. Распределение активности у лиц, имеющих атипичный фенотип. Обратите внимание, что распределение *А* является суммой распределений *Б*, *В* и *Г*.

позволяет получить прямые качественные данные о природе мутации. Однако, если измеряется уровень псевдохолинэстеразы в крови, а не характер ее ингибирования, различить три класса вариантов столь же просто не удастся, поскольку между нормальными гомозиготами и гетерозиготами и между гетерозиготами и мутантными гомозиготами наблюдается перекрывание (рис. 4.67).

Эти данные показывают, что мультимодальную кривую распределения можно рассматривать как свидетельство моногенного наследования признака. Однако, если активность мутантного гена судят не по его первичному продукту, на результаты будут влиять другие генетические факторы и факторы среды, что в конечном счете может обусловить мономодальный характер кривой. Поскольку мономодальная форма кривой обычно интерпретируется как доказательство полигенного определения признака (разд. 3.6), в тех случаях, когда в распоряжении исследователей имеются только данные о распределении частот, выводы о механизме наследования следует делать с осторожностью.

Полиморфизм по реакции на дебрисохин и спартеин [971; 1072, 1305]. Распространенный полиморфизм, проявляющийся у 5-8% европейцев и африканцев, связан с дефектом окисления ряда лекарственных препаратов (табл. 4.22). Он был обнаружен независимо при изучении действия антигипертензивного препарата дебрисохина, имитирующего окситоцин, и антиаритмического препарата спартеина. Индивиды, способные быстро окислять эти препараты, могут быть как нормальными гомозиготами, так и гетерозиготами, тогда как медленное окисление свойственно лишь мутантным гомозиготам. Точная биохимическая природа полиморфизма не установлена, однако имеются надежные данные в пользу того, что изменен компонент системы цитохрома Р-450 печени (эта система участвует в метаболизме соединений, поступающих извне) [1050; 1219; 1258]. К сожалению, в настоящее время выявить окислительный полиморфизм *in vitro* невозможно. Для определения окислительно-

Таблица 4.22. Полиморфизм по спартеину/дебрисохину: патологические реакции у людей с «медленным» метаболизмом [1071]	
Препарат	Реакция
Дебрисохин	Пониженное давление
Спартеин	Усиленное действие, имитирующее окситоцин, и сердечная недостаточность
Фенацетин	Метгемоглобинемия
Фенформин	Молочный ацидоз
Пергексиллин	Периферическая нейропатия и агранулоцитоз
Каптоприл	Агранулоцитоз
Д-Пеницилламин	Протеинурия и тромбоцитопения
Нортриптилин	Пониженное давление
Гуаноксан	Пониженное давление
Метиамид	Агранулоцитоз
Энкаинид	Препарат не действует: активен только препарат, подвергшийся метаболизму
<i>β-блокаторы</i>	
Пропранолол	Брадикардия и пониженное давление
Метопролол	»
Тимолол	»
Алпренолол	»
Буфуролол	»

го статуса индивида необходим прием внутрь контрольного препарата и анализ его метаболизма в моче (т.е. определение соотношения 4-оксидебрисохина к дебрисохину). В настоящее время исследуется вклад этого полиморфизма в побочное действие так называемых бета-блокаторов [1051].

Полиморфизм по способности окислять мефенитоин [1353]. Показано, что окисление противосудорожного препарата мефенитоина контролируется отдельным геном, не сцепленным с полиморфизмом по реакции на дебрисохин. Относительно высокая частота побочных эффектов мефенитоина обусловлена, вероятно, тем, что 2-5% людей не способны окислять этот препарат. Окисление мефенитоина (дилактин), по-видимому, контролируется белковым продуктом этого же полиморфного гена.

Другие моногенные фармакогенетические признаки. Известен ряд других важных с точки зрения фармакогенетики состояний, которые наследуются как простые менделевские признаки. Они перечислены в табл. 4.23.

Таблица 4.23. Моногенные фармакогенетические признаки	
Энзиматические или метаболические аномалии	Результат и/или заболевание
А. Хорошо изученные признаки (см. текст)	
а) <i>Часто встречающиеся признаки</i>	
Некоторые варианты G6PD	Гемолиз
Полиморфизм по N-ацетилтрансферазе	Понижено ацетилирование ряда препаратов (см. текст)
Слабое окисление (дебрисохин/спартеин)	Неспецифические реакции на многие препараты (см. табл. 4.22)
б) <i>Редкие признаки</i>	
Варианты псевдохолинэстеразы	Продолжительная задержка дыхания под действием суксаметонима
Нарушение метаболизма кальция	Злокачественная гипертермия после ингаляционной анестезии
Некоторые нестабильные гемоглобины	Гемолиз
Различные порфирии	Ряд препаратов усиливает симптомы заболевания
Недостаточность метгемоглобин-редуктазы	Цианоз, вызываемый некоторыми препаратами-окислителями
Б. Менее полно изученные признаки	
Полиморфизм по параоксоназе	Люди с пониженной активностью фермента (~50%) более подвержены отравлению паратионом
Слабое окисление мефенитоина	Тяжелые побочные эффекты мефенитоина
Полиморфизм по тиопурин-метилтрансферазе (цитозоля) [1354]	Неэффективность тиопуриновых препаратов (например, меркаптопурина)
Полиморфизм по катехол-0-метилтрансферазе [2239; 1468]	Неэффективность L-допа и α-метилдопа
Недостаточность эпоксидгидролазы [1311]	Гепатотоксичность фенитоина

Таблица 4.24. Результаты измерений скорости метаболизма лекарственных препаратов или стационарного уровня препаратов у близнецов [1270]						
Препарат	Авторы, число пар близнецов	Измеренный параметр	Диапазон изменений	$t_{M3}^{3)}$	$t_{D3}^{3)}$	$h_2^{2\ 4)}$
Антипирин 18мг/кг (одной дозой, перорально)	Vesell and Page (1968) 9МЗ, 9ДЗ	Время полураспада в плазме (ч)	5,1-16,7	0,93	-0,03	0,99
Фенилбутазон 6 мг/кг (одной дозой, перорально)	Vesell and Page (1968) 7МЗ, 7ДЗ	Время полураспада в плазме (дни)	1,2-7,3	0,98	0,45	0,99
Дикумарол 4 мг/кг (одной дозой, перорально)	Vesell and Page (1968) 7МЗ, 7ДЗ	Время полураспада в плазме (ч)	7,0-74,0	0,99	0,80	0,98
Галотан 3,4 мг (одной дозой, внутривенно)	Cascorbi et al. (1971) 5МЗ, 5ДЗ	Выделение с мочой трифторацетата натрия за 24 ч	2,7-11,4	0,71	0,54	0,63
Этанол 0,5 г/кг (одной дозой, перорально)	Luth (1939) 10МЗ, 10ДЗ	β_{60} (мг/мл·ч) ¹⁾ СДЭ (мг/кг · г) ²⁾	0,051-0,141 50,00 109,63	0,64 0,77	0,16 0,45	0,63 0,67
1 мл/кг (одной дозой, перорально)	Vesell et al. (1971) 7МЗ, 7ДЗ	β_{60} (мг/мл·ч) ¹⁾	0,11-0,24	0,98	-0,38	0,98
1,2 мл/кг (одной дозой, перорально)	Kopun and Propping (1977) 19МЗ, 21ДЗ	Скорость всасывания (мг/мл · 30 мин)	0,20-1,12	0,56	0,27	0,57
Дифенилгидантоин 100 мг (одной дозой, внутривенно)	Andreasen et al. (1973) 7МЗ, 7ДЗ	Время полураспада в сыворотке (ч)	7,7-25,5	0,92	0,14	0,85
Литий 300 мг/12 ч (в течение 7 дней, перорально)	Dorus et al (1975) 5МЗ, 5ДЗ	Концентрация в плазме (м-экв/л)	0,16 0,38	0,94	0,61	0,86
		Концентрация в эритроцитах (м-экв/л)	0,050-0,102	0,98	0,71	0,83
		Соотношение концентраций эритроцитов и плазмы (через каждые 3 дня после введения)	0,18-0,56	0,84	0,62	0,92
Амобарбитал 125 мг (одной дозой, внутривенно)	Endrenyi et al., (1976) 7МЗ, 7ДЗ	Скорость осветления плазмы (мл/мин)	16,0-67,2	0,87	0,55	0,83
		Скорость очистки в пересчете на вес 1/(кг · ч)	1,76-6,16	0,92	0,60	0,80
		Константа скорости выведения (ч ⁻¹)	2,09-8,17	0,93	0,03	0,91
Нортриптилин 0,6 мг/кг в день (в течение 8 дней) перорально	Alexanderson et al. (1969) 19МЗ, 20ДЗ	Стационарный уровень в плазме (нг/мл)	8-78	Опубликованные данные не позволяют произвести такой расчет, но МЗ близнецы гораздо более сходны, чем ДЗ		

Продолжение табл. 4.24						
Препарат	Авторы, число пар близнецов	Измеренный параметр	Диапазон изменений	г _{МЗ}	г _{ДЗ} ³⁾	h ² ⁴⁾
Салицилат натрия 40 мг/кг (одной дозой, внутривенно)	Furst et al. (1977) 7МЗ, 7ДЗ	Скорость распада салицилата в сыворотке (мг/дл • ч)	0,64-1,02	0,64	0,32	0,86
Аспирин 65 мг/кг в день	См. Propping [1270]	Уровень салициловой кислоты в сыворотке	11,9-36,4	0,90	0,33	0,98
(в течение 3 дней) перорально)		Стационарная скорость выделения салицилмочевой кислоты (мг/кг • ч)	0,84-1,91	0,94	0,76	0,89
¹⁾ β₆₀ = скорость исчезновения из крови ²⁾ СДЭ = скорость деградации этанола ³⁾ г_{МЗ}, г_{ДЗ} = внутригрупповой коэффициент корреляции для МЗ и ДЗ близнецов соответственно. ⁴⁾ $h^2 = (\text{наследуемость}) \frac{V_{\bullet}(\text{ДЗ}) - V_{\bullet}(\text{МЗ})}{V_{\bullet}(\text{ДЗ})}$, V_• = дисперсия внутри пар близнецов.						

Мультифакториальная фармакогенетика. В ряде исследований, основанных на близнецовом методе, было продемонстрировано, что генетические факторы играют существенную роль в определении времени полураспада лекарственных препаратов. Во всех опытах, когда препарат вводили монозиготным и дизиготным близнецам, время полураспада различалось гораздо меньше для монозиготных близнецов [1335; 1270]. Расчеты коэффициента наследуемости, основанные на подобных данных, показали, что генетические факторы вносят большой вклад в общий размах времени полураспада препаратов, в некоторых случаях он оценивается в 99% (табл. 4.24).

Если препарат исследовать на большой выборке из нормальной популяции, наблюдается значительная вариабельность уровня препарата в крови. И хотя на этот показатель влияют различные факторы, решающую роль играют различия в метаболизме препаратов. Время полужизни (или устойчивый уровень препарата) является более или менее постоянным для индивида и, согласно результатам исследований на близнецах, контролируется в основном генетическими факторами. Биохимические механизмы конкретных реакций метаболизма препаратов в настоящее время не установлены. Вариации времени полураспада для большинства препаратов могут быть представлены в виде колоколообразной кривой Гаусса (рис. 4.68). После введения средней дозы препарата у определенной части популяции (по обе стороны от моды) в организме устанавливается либо слишком высокий, либо слишком низкий уровень препарата. С одной стороны, при высоком уровне препарата это может приводить к токсичности, а с другой, при низком уровне - к отсутствию терапевтического эффекта. После того как было доказано, что генетические факторы играют заметную роль в метаболизме большинства лекарственных препаратов, фармакогенетика из узкой области знаний о необычных реакциях на препараты превратилась в центральную дисциплину фармакологии и терапии [1229].

Фармакогенетическая вариабельность на уровне отдельных органов. Генетическая вариабельность на уровне отдельных органов уже рассматривалась при обсуждении дефекта G6PD в эритроцитах. Действие алкоголя на мозг будет обсуждаться в разд. 8.2.3.5. Кроме того, побочные эффекты некоторых психотропных препаратов также обусловлены генетически [1271]. Напри-



мер, при лечении фенотиазином может развиваться болезнь Паркинсона, причем риск заболевания втрое выше у людей, родственники которых больны паркинсонизмом [1272]. «Тардивная дискинезия», выражается в ненормальных и неконтролируемых движениях, нередко встречается у больных, получающих психофармакологические препараты; при этом наблюдается значительная внутрисемейная корреляция. Подобная терапия оказывает воздействие на работу нейромедиатора дофамина (разд. 8.2.3.6). Поэтому интересно, что при действии нейролептиков в хвостатом ядре крыс возрастает количество дофаминовых рецепторов, отдельные линии животных различаются по этому признаку. Шизофрения у людей может быть вызвана такими препаратами, как ЛСД, амфетамин и даже злоупотреблением алкоголем (алкогольные галлюцинации). Случаи заболевания шизофренией отмечаются значительно чаще у прямых родственников лиц, уже страдающих этим заболеванием.

Редкое, но опасное осложнение общей анестезии - злокачественная гипертермия - часто бывает связана с повышенной мышечной ригидностью. Примерно у половины обследованных больных отмечалось неполное аутосомно-доминантное наследование. Многие пробанды страдают от незначительных мышечных аномалий, таких как птоз, судороги, вывихи или ушибы. Отмечались отклонения в электромиограммах, а также незначительные цитологические признаки миопатии.

4.5.2. Экогенетика [143; 969; 1228; 1250]

Концепция экогенетики, впервые предложенная в 1971 г. Брюэром [1017], возникла в результате развития фармакогенетики. Лекарственные препараты составляют лишь небольшую долю химических факторов окружающей среды, воздействию которых подвергается человеческое сообщество. Существует множество других потенциально токсичных веществ, которые могут поражать людей с генетической предрасположенностью. Экогенетика расширяет центральную концепцию фармакогенетики о различных генетически обусловленных реакциях на лекарственные препараты, объясняя сходным образом реакции на другие факторы среды. Поскольку исследования, основанные на близнецовом методе, свидетельствовали о том, что метаболизм лекарственных препаратов подвержен генетическому контролю, можно было заключить, что превращение любых химических агентов также контролируется генетически. Экогенетика человека изучает реакцию человеческого организма на различные агенты среды. В ее задачи входят объяснение различной чувствительности отдельных людей к действию потенциально опасных внешних агентов и изучение индивидуальных особенностей адаптации к окружающей среде. Рабочая гипотеза фармакогенетики заключается в том, что биохимические особенности организма определяют характер реакции на внешний агент, особенно в тех случаях, когда уже известно, что данное действие вызывает у людей неодинаковые реакции. Подобно рассмотренным явлениям фармакогенетики, некоторые экогенетические реакции определяются действием редких мутантных генов и обуславливают резко аномальный ответ или идиосинкразию. Причиной разнообразия реакций может быть и полиморфизм. По всей вероятности, чаще всего экогенетические реакции определяются несколькими генами. Необычные ответные реакции проявляются у немногих людей, которые по своему генетическому статусу значительно отклоняются от моды распределения.

Канцерогены. Недавние исследования, проведенные на бактериальных системах (разд. 5.2.2), позволяют предполагать, что большинство мутагенов являются одновременно канцерогенами. Вероятно, принципы фармакогенетики справедливы и для потенциально канцерогенных веществ. Тот факт, что у большинства людей при действии химических агентов или других раздражителей рак обычно не развивается, можно отчасти объяснить генетическими механизмами. Неоплазии возникают только у людей с отклонениями в метаболизме, например в организме которых данное вещество медленно инактивируется или превращается в еще более канцерогенное. Генетические варианты ферментов репарации (разд. 5.1.6.3) или иммунного надзора в мутантных клетках также могут приводить к раковым заболеваниям.

Под действием ферментативной системы арилгидроксилазы полициклические углеводороды в организме человека могут превращаться в более мощные канцерогены. Данные близнецового и семейного анализа показывают, что уровень этого фермента контролируется генетически. Точный механизм пока не установлен, хотя высказывались предположения, что у человека наследование моногенное [1160], как и у мышей в случае аналогичной ферментативной системы [1235]. Однако более вероятно, что это полигенный признак [1235; 1026]. Так или иначе, люди с высокоактивной арилгидроксилазой, вероятно, более подвержены риску раковых заболеваний, индуцированных полициклическими углеводородами, например раку легких в результате курения [1161; 1068].

Совсем недавно для лимфоцитов человека описан генетический полиморфизм по глутатионредуктазе [1296]. Этот фермент играет важную роль в биологическом превращении и детоксификации различных эндогенных и поступающих извне соединений. В исследованной выборке, состоящей из 248 человек, обнаруживалось четкое тримодальное распределение. 133 человека обладали низкой, 94 - высокой, и 21 - очень высокой ферментативной активностью. Данные, полученные при обследовании 8 семей, можно было объяснить простым аутосомным кодоминированием. Вполне возможно, что люди с высокой активностью фермента в печени лучше защищены от вредного воздействия химически активных соединений.

Метаболизм конкретных соединений изучен еще недостаточно, чтобы с уверенностью можно было говорить о влиянии генетических вариаций у человека на канцерогенные эффекты факторов среды. К числу механизмов канцерогенеза, возможно, следует отнести и полиморфизм по ферментам репарации. Больные генетическими нарушениями систем, репарирующих мутации (анемия Фанкони, синдром Блума, атаксия-телеангиэктазия, пигментная ксеродерма), часто заболевают различными формами рака. Интересно, что среди гетерозиготных носителей этих заболеваний (их довольно много в человеческих популяциях) частота заболевания раком тоже повышена, но гетерозиготность по пигментной ксеродерме становится фактором риска лишь после воздействия мощного солнечного излучения (разд. 4.2.2.8). Поскольку многие формы рака связаны, по-видимому, с факторами среды, воздействию которых подвергается большинство населения, именно генетический подход может объяснить, почему заболевание развивается только у некоторых людей.

Недавно было предпринято исследование полиморфизма по окислению лекарственных препаратов типа дебрисохин/спартеин. Изучали 245 больных раком легких и 234 контрольных курильщика (рис. 4.69). Изначально предполагалось, что в организме людей, способных к быстрому окислению, может происходить более полная инактивация канцерогенных веществ табачного дыма. Полученные результаты свидетельствуют в пользу этого предположения: среди больных раком оказалось меньше «медленных окислителей» (т. е. людей, у которых обе копии гена были представлены полиморфными вариантами), чем в контроле (1,9% против 9% в контроле). Более того, распределение «быстрых окислителей» (т. е. нормальных гомозигот и гетерозигот по этому гену) среди больных раком сдвинуто таким образом, что позволяло предполагать более высокую частоту гомо-

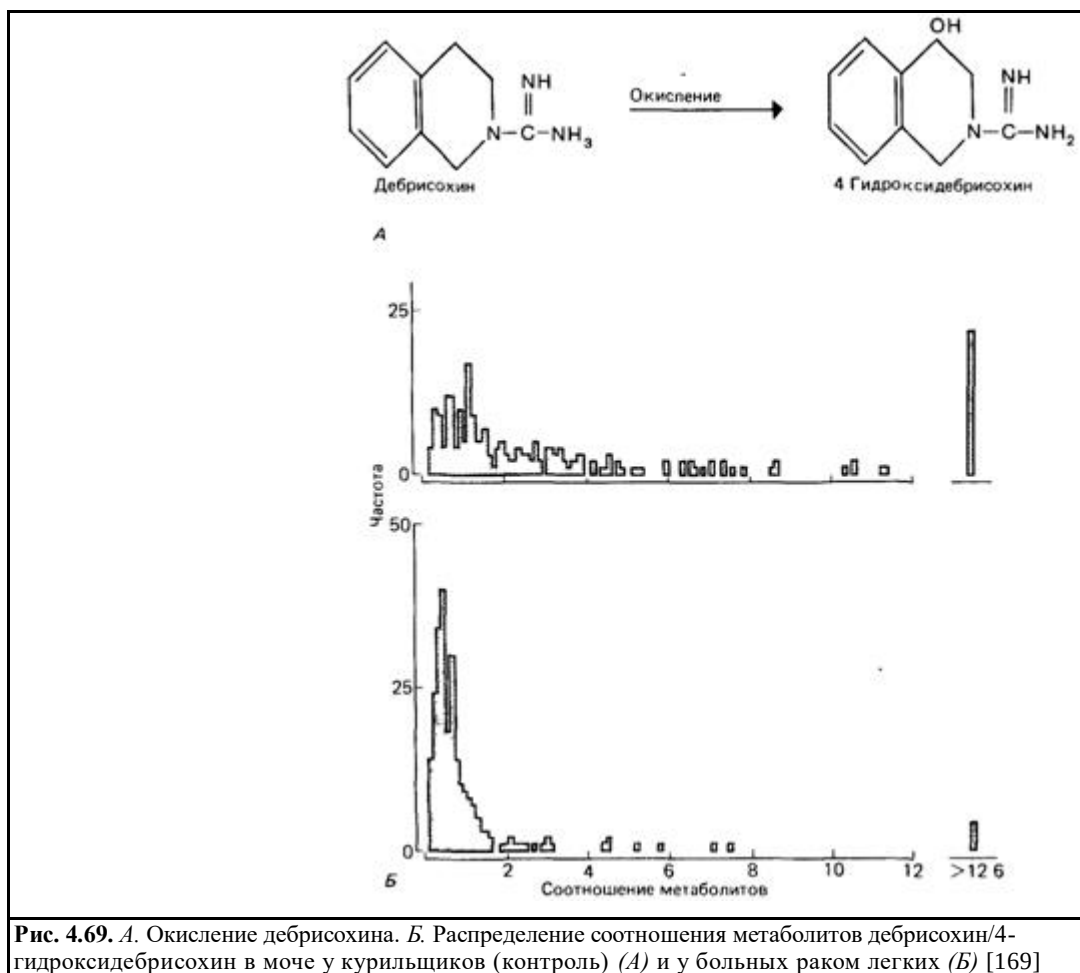


Рис. 4.69. А. Окисление дебрисохина. Б. Распределение соотношения метаболитов дебрисохин/4-гидроксидибрисохин в моче у курильщиков (контроль) (А) и у больных раком легких (Б) [169]

зигот по гену, определяющему быстрое окисление. Действительно, 77% раковых больных оказались гомозиготами по этому гену и 22%-гетерозиготами, тогда как в контроле эти частоты составили соответственно 49 и 42% (больные с раком легких $p^2 = 0,016$, $2pq = 0,22$, $q^2 = 0,77$, контрольная выборка: $p^2 = 0,09$, $2pq = 0,42$, $q^2 = 0,49$).

Хотя приведенные данные позволяют предполагать наличие генетического контроля этого полиморфизма, не исключено, что результаты исследований (т.е. гидроксилирование дебрисохина в печени и выделение продукта реакции с мочой) искажаются самим ходом ракового заболевания. Поэтому для окончательного вывода о наследственной природе полиморфизма необходим семейный анализ.

Рак мочевого пузыря эпидемиологически может быть связан с действием аминов, производимых химической промышленностью. Было проведено 7 исследований корреляции полиморфизма по ацетилированию и рака мочевого пузыря у 633 больных и соответствующей контрольной выборки [1268]. В целом, по данным этих исследований риск заболеть раком у «медленных инактиваторов» лишь в 1,3 раза выше. Из этого следует, что скорость ацетилирования играет незначительную роль в развитии рака мочевого пузыря, связанного с канцерогенностью неацетилированных аминов.

Сообщение о том, что у курильщиков, больных раком мочевого пузыря, котинина выделяется значительно больше, чем никотин-1-*n*-оксида, требует подтверждений. Однако достаточно интересно само предположение о том, что дефекты метаболизма никотина связаны с риском рака мочевого пузыря.

Недостаточность α_1 -антитрипсина (10740). Недостаточность α_1 -антитрипсина обусловлена Z-аллелем в гомозиготном состоянии и вызывает предрасположенность к ранней обструкции дыхательных путей. У гетерозигот по этому признаку функция легких несколько нарушена. Возможно, что на частоту заболеваемости у гетерозигот влияют также степень загрязнения окружающей среды и курение [1095; 653].

Параоксоназа [1231]. Широко используемый инсектицид - паратионин - превращается в печени в параоксон, который далее окисляется параоксоназой сыворотки. У европейцев наблюдается четкое бимодальное распределение уровня активности фермента, причем у 50% населения этот фермент имеет низкую активность. Семейный анализ показал, что лица, имеющие низкую активность параоксоназы, являются гомозиготами по аллелю, кодирующему низкоактивный фермент (его частота в популяции 0,7). Сложнее отличать гомозигот с высокоактивным аллелем от гетерозигот. Эпидемиологические данные о значении этого полиморфизма для людей, подвергшихся действию паратионина, в настоящее время отсутствуют. Можно предполагать, что при низких дозах паратионина более высокий риск отравиться имеют гомозиготы. Если дозы большие, генотип не сказывается на проявлении симптомов.

Продукты питания. Наиболее ярким примером генетических различий в реакции на пищевые продукты является гиполактазия у взрослых. У всех детей в кишечнике имеется фермент лактаза, необходимый для всасывания лактозы. У большинства людей кишечная лактаза исчезает после того, как прекращается кормление грудным молоком, поэтому большинство взрослых являются толерантными к лактозе. Существует мутация, при которой способность всасывать лактозу сохраняется. Естественно, она имеет селективное преимущество в сельскохозяйственных районах, где молоко - обычный продукт питания. В Центральной и Северной Европе большинство людей имеют такой мутантный ген в количестве одной или двух копий. Утрата гена приводит к неусвоению лактозы, это состояние наследуется как аутосомный рецессивный признак. Мутация, при которой всасывание лактозы сохраняется, распространена также в Африке и в Азии в некоторых популяциях, члены которых занимаются скотоводством и ведут кочевой образ жизни. Вопрос о частотах генов, ответственных за сохранение лактазы, будет обсуждаться в разд. 7.3.1. При употреблении в пищу молока или других продуктов, содержащих лактозу, люди, не способные к ее усвоению, страдают метеоризмом, кишечными расстройствами и диареей [1285].

Целиакическая болезнь является генетическим дефектом, при котором чувствительность к клейковине приводит к нарушению всасывания в кишечнике [1323]. Если подобрать диету без клейковины, патологические симптомы исчезают [1059].

У некоторых людей, мутантных по G6PD, при употреблении в пищу бобов развивается гемолитическая анемия [1079]. Для больных фавизмом характерно снижение уровня α -глутаровой кислоты, выделяющейся с мочой [1031], это может быть связано с биологическим превращением токсического вещества, содержащегося в бобах. Генетический механизм, лежащий в основе выделения глутаровой кислоты, в настоящее время неизвестен. Вообще говоря, гетерозиготность по аутосомно-рецессивным генам, которые в гомозиготном состоянии вызывают наследственные метаболические заболевания, заслуживают большего внимания исследователей. Такая гетерозиготность является источником генетических вариантов, различающихся по чувствительности к действию факторов среды. Отрывочные сведения, имеющиеся в настоящее время, позволяют предполагать, что чувствительность к различным факторам распространена значительно сильнее,

чем считалось ранее. По фенотипу гомозигот и природе ферментативных дефектов можно предсказывать, каким образом заболевание должно проявляться у гетерозигот. Характер питания в западных странах (высокое содержание жиров в пище), по мнению большинства специалистов, способствует развитию ишемической болезни сердца [1247]. Обнаружено несколько аутосомных доминантных генов, контролирующих метаболизм липидов; они обуславливают семейную гиперхолестеринемию, семейную триглицеридемию и семейную комбинированную гиперлипидемию [1109] (разд. 3.8.14.2). Представляется маловероятным, что частота семейной гиперхолестеринемии (приблизительно 1/500 в США) обусловлена характером пищи, поскольку уровни холестерина очень близки у японцев, больных гиперхолестеринемией, у европейцев и африканцев [1206], тогда как средний уровень холестерина в популяциях Японии значительно ниже. Гены, ответственные за наследственную гипертриглицеридемию и комбинированную гиперлипидемию, вообще не экспрессируются до 25 лет [1109]. Возможно, характер питания увеличивает частоту этих заболеваний. Влиянию диеты могут быть подвержены и еще неидентифицированные гены (полигены), которые участвуют в определении уровня холестерина, но не являются родственными главным генам. В настоящее время вопрос о влиянии диеты на работу всех этих генов интенсивно изучается.

Ген гемохроматоза характерен для ряда популяций в Европе [1010]. Гомозиготы, способные быстро поглощать железо, составляют приблизительно 1/500 популяции, однако симптомы заболевания развиваются лишь у немногих гомозигот. Дети и женщины часто страдают от недостатка железа в организме. В Швеции практикуется добавление соединений железа в хлеб. Это должно приводить к более частому и более раннему проявлению гемохроматоза. Вероятно, добавление железа в хлеб не наносит вреда гетерозиготам, которые весьма многочисленны и составляют 10% популяции. Страдать в этих условиях будут больные тяжелой формой талассемии, у которых и без того повышен уровень железа. Поэтому в ряде стран такая тактика не получила распространения, хотя, несомненно, она позволила бы снизить число случаев недостаточности железа. Эти соображения показывают, насколько сложные общественные проблемы могут быть связаны с генетической гетерогенностью популяции. То, что полезно для одной части популяции, для другой оказывается вредно. Более того, соотношение вреда и пользы не всегда поддается точной научной оценке. Вероятно, с развитием наших знаний о генетической вариабельности мы будем сталкиваться со все новыми подобными проблемами.

4.6. Механизм аутосомной доминантности

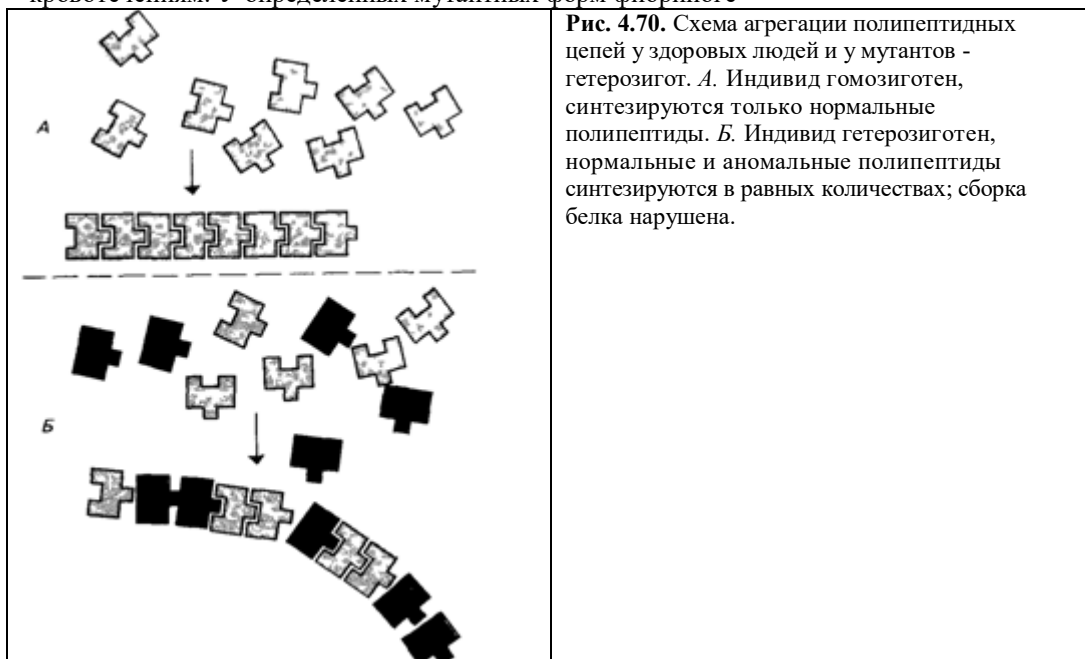
Аутосомно-рецессивные заболевания, как правило, обусловлены дефектами ферментов, которые возникают вследствие мутаций в соответствующих генах. Часто удается показать, что фермент имеет аномальную структуру или нестабилен (разд. 4.4.2) [1069]. У гетерозигот ферментативная активность составляет обычно 50% нормы, но это не приводит к заболеванию, поскольку такая активность фермента является достаточной для нормальной жизнедеятельности. Напротив, при аутосомно-доминантном наследовании гетерозиготы имеют все клинические признаки заболевания, т. е. присутствие лишь одной копии мутантного гена вызывает нарушение нормальной функции.

Механизмы аутосомно-доминантных наследственных болезней значительно более разнообразны, чем механизмы аутосомно-рецессивных заболеваний. Высказывалось предположение, что аутосомно-доминантные заболевания вызываются мутациями в генах структурных белков [132]. Это предположение выглядит еще более правдоподобным, если к числу структурных белков относить мембранные белки и рецепторы. Однако во многих случаях механизмы аутосомно-доминантных заболеваний остаются невыясненными. Мы не знаем, например, каким образом аномалия одного-единственного гена способна приводить к столь многочисленным проявлениям, как при нейрофиброматозе и туберозном скле-

розе. Нет никаких сведений и о механизмах патогенеза при таких заболеваниях, как хорья Гентингтона и полицистоз почек. Чтобы выяснить механизмы этих болезней, необходимы более глубокие знания генетики развития человека.

4.6.1. Аномальная агрегация субъединиц

Дисфибриногенемии (13480) [1112]. Для этой группы заболеваний характерно, что все симптомы проявляются у гетерозигот. Если такие гетерозиготы несут мутацию в гене, кодирующем белок с субъединичной структурой, то в организме будет присутствовать смесь мутантных и немутантных молекул. Вследствие этого нарушается формирование белкового агрегата (рис. 4.70). При некоторых формах дисфибриногенемии мутации, изменяющие молекулы фибриногена, приводят к кровотечениям. У определенных мутантных форм фибриноге-



на измененным оказывается участок, ответственный за агрегацию с образованием фибрина. Например, при мутации Detroit имеется аминокислотная замена в сайте, ответственном за превращение фибриногена в фибрин, она обуславливает сильные кровотечения у больных с таким генотипом [1007]. Хотя при большинстве аномалий фибриногена количество этого белка не отличается от нормы, известен случай, когда уровень фибриногена был снижен из-за уменьшения времени жизни молекулы, что, вероятно, связано с ее нестабильностью [1210]. Некоторые генетические аномалии фибриногена считаются причиной тромбозов, однако не известно, какие именно мутации повышают свертываемость крови. Большая часть вариантов фибриногена не связана с клиническими осложнениями. Очевидно, что для выяснения взаимосвязи структуры и функции молекулы фибриногена необходимы дальнейшие исследования аминокислотных замен, характерных для фибриногенемий.

4.6.2. Аномальные субъединицы нарушают функции мультимерных белков

Гемоглобинопатии. Существует целый ряд клинических форм гемоглобинопатии, которые имеют сходные причины возникновения, связанные с субъединичной структурой гемоглобина. Известно, что в состав функционально активной молекулы гемоглобина входят четыре субъединицы, которые кодируются двумя локусами. В связи с этим у гетерозигот образуются гибридные молекулы, которые содержат как нормальные, так и мутантные полипептидные цепи¹⁾. В зависимости от конкретной мутации, у гетерозигот могут наблюдаться различные проявления - метгемоглобинемия, гемолитическая анемия или эритроцитоз (разд. 4.3.2). Высокая степень кооперативных взаимодействий субъединиц в молекуле гемоглобина приводит к тому, что у гетерози-

¹⁾ Гибридные молекулы, например, содержащие $\beta^S \beta^A$, образуются, однако их не удастся идентифицировать, используя обычные методы разделения гемоглобинов, такие, как хроматография на колонках или электрофорез

тот, имеющих одну мутацию в гене Hbα или Hbβ, молекула гемоглобина с одной мутантной субъединицей становится функционально неактивной. Например, аминокислотные замены в участках α- или β-цепей, отвечающих за контакт между четырьмя полипептидами, могут нарушать взаимодействие между генами, необходимое для кислородного обмена. В результате возникает относительный недостаток кислорода в тканях, который компенсируется лишь за счет увеличения числа эритроцитов.

В этих случаях мутации доминантны, поскольку для обеспечения нормальной функции белок должен вступить в контакт с другим белком, который кодируется своим собственным аллелем. Возникающая в результате мутации аминокислотная замена располагается в сайте, ответственном за это взаимодействие. Аналогичные в функциональном отношении аминокислотные замены вполне могут быть причиной других доминантных мутаций.

4.6.3. Аномальное ингибирование ферментов по типу обратной связи и структурно аномальные ферменты

Порфирия (17600) [1282; 1217] - понижение ферментативной активности. Установлено, что различные варианты доминантной порфирии (табл. 4.25) являются следствием ферментативных дефектов на определенных этапах биосинтеза гема или порфирина. В каждом конкретном случае ферментативная активность составляла около 50% нормальной, как у обычных гетерозигот.

Таблица 4.25. Дефекты ферментов при наследственной доминантной порфирии	
Заболевание	Дефектный фермент
Острая перемежающаяся порфирия	Порфобилиноген-деаминаза
Вариегатная порфирия	Протопорфириногеноксидаза
Наследственная копропорфирия	Копропорфириногеноксидаза
Тяжелая кожная порфирия	Уропорфириноген-декарбоксилаза
Протопорфирия	Феррохелатаза

Патофизиология этой группы заболеваний изучена на примере острой перемежающейся порфирии. Многие больные, у которых понижена активность порфобилиноген-деаминазы, не страдают характерными для порфирии болями в области живота и нейропатией. Появление этих симптомов наблюдается при повышенной активности синтетазы δ-аминолевулиновой кислоты (АЛК), первого фермента на пути биосинтеза порфирина, который определяет скорость всего процесса. Существовало мнение, что первичным нарушением при острой перемежающейся порфирии является как раз нарушение регуляции, приводящее к избыточному синтезу этого фермента. Биосинтез синтетазы АЛК индуцируется многими препаратами, например барбитуратом, стероидными гормонами и т. д., и в норме репрессируется конечным продуктом синтеза - гемом. Последний этап биосинтеза гема катализируется ферментом уропорфириноген-синтетазой. При острой перемежающейся порфирии уровень фермента понижен, что приводит к снижению синтеза гема и в свою очередь к повышению активности АЛК-синтетазы. Вдвое сниженная активность фермента в этом случае недостаточна для нормального функционирования всей цепи биосинтеза, особенно в условиях стимуляции препаратами типа барбитуратов. В отличие от многих других ферментативных нарушений при острой перемежающейся порфирии мутация нарушает реакцию, которая играет ключевую роль во всем биосинтетическом пути.

Вполне возможно, что другие химические агенты и метаболиты также способны влиять на этот путь биосинтеза. Такое допущение делает понятным тот факт, что лишь у некоторых людей с пониженным уровнем фермента развиваются симптомы заболевания. Кроме того, сам принцип репрессии используется для терапии заболевания. Больным вводят гематин, который служит источником гема и ингибирует АЛК-синтетазу. Было показано, что снижение активности АЛК-синтетазы коррелирует с улучшением состояния больных.

Повышенная ферментативная активность при подагре. При довольно редко ветре-

чающейся доминантной разновидности подагры наблюдается повышение активности фосфорибозил-пирофосфат—трансферазы. Это связано со структурным изменением в молекуле фермента [990]. Аномальный фермент отличается от нормального по иммунологическим и электрофоретическим характеристикам. Вполне возможно, что первичное нарушение затрагивает непосредственно структуру фермента.

4.6.4. Мутации рецепторов

Рецепторы. На поверхности клеточной мембраны имеется множество рецепторов для гормонов, нейромедиаторов и лекарственных препаратов. Должно существовать множество различных мутаций, нарушающих работу белков-рецепторов [29]. Однако к настоящему времени детально охарактеризованы лишь две группы таких мутаций.

К первой относятся те из них, которые сцеплены с X-хромосомой и приводят либо к неспособности клеточной поверхности связывать дигидротестостерон, либо к неспособности активировать сайты связывания гормона в ядре. Другая группа мутаций затрагивает функцию связывания клетками комплекса холестерина с липопротеинами низкой плотности [29; 1107]. В кровотоке холестерин переносится главным образом липопротеинами низкой плотности (LDL от англ. low-density lipoprotein). Для связывания таких липопротеинов на поверхности клеток и транспорта комплекса LDL - холестерин путем эндоцитоза на поверхности фибробластов и лимфоцитов имеются особые специализированные структуры: окаймленные пузырьки. Рецепторы LDL (B/E-рецепторы) связывают только липопротеины, содержащие липопротеин В и липопротеин Е. Эндоцитоз с участием рецепторов представляет собой универсальный механизм транспорта крупных молекул в клетку (для каждого типа молекул существует специальный рецептор). При поглощении комплекса LDL-холестерин в клетке возрастает концентрация холестерина. Это служит сигналом к прекращению синтеза рецепторов LDL. Связывание холестерина и его транспорт внутрь клетки также ингибируются по механизму обратной связи за счет репрессии фермента HMG CoA-редуктазы, который лимитирует скорость всего процесса. Холестерин этерифицируется ацилCoA: холестеринацилтрансферазой (ACAT). Природа сигналов, осуществляющих запуск этих плейотропных реакций, еще не установлена.

Семейная гиперхолестеринемия [1087; 4440] (рис. 4.71). Семейная гиперхолестеринемия может быть обусловлена приблизительно десятком различных мутаций одного локуса в 19-й хромосоме, которые влияют на работу рецепторов LDL. Эти мутации подразделяются на несколько классов: 1) мутации, нарушающие синтез рецепторов; 2) мутации, нарушающие транспорт синтезированного рецептора на клеточную поверхность; 3) мутации, нарушающие связывание с LDL; 4) мутации, препятствующие компартиментализации; 5) мутации, нарушающие образование кластеров рецепторов в окаймленных пузырьках. Любая из этих мутаций может вызвать тот или иной дефект или полное отсутствие рецепторной функции. Примерно 1/500 часть людей гетерозиготна по наследственной гиперхолестеринемии. У таких индивидов нормальна лишь половина LDL-рецепторов, поэтому обычная скорость удаления холестерина из кровотока не достигается. Это приводит к развитию атеросклероза и сердечным приступам в сравнительно молодом возрасте. Около 50% мужчин-гетерозигот к 50 годам приобретают явные признаки ишемической болезни (разд. 3.8.14). Оказалось, однако, что у гетерозигот можно стимулировать работу нормального аллеля и добиться увеличения синтеза рецепторов LDL, вводя секвестранты желчи (например, холестеринамин), удаляющие из кишечника желчные кислоты [593]. Этот терапевтический прием, совместно с лечением мевинолином (аналог субстрата HMG CoA-редуктазы) [722], блокирующим синтез холестерина, позволяет понизить уровень холестерина в крови и таким образом воспрепятствовать развитию ишемической болезни. Секвестранты желчи используются уже много лет и зарекомендовали себя как вполне безопасные препараты.

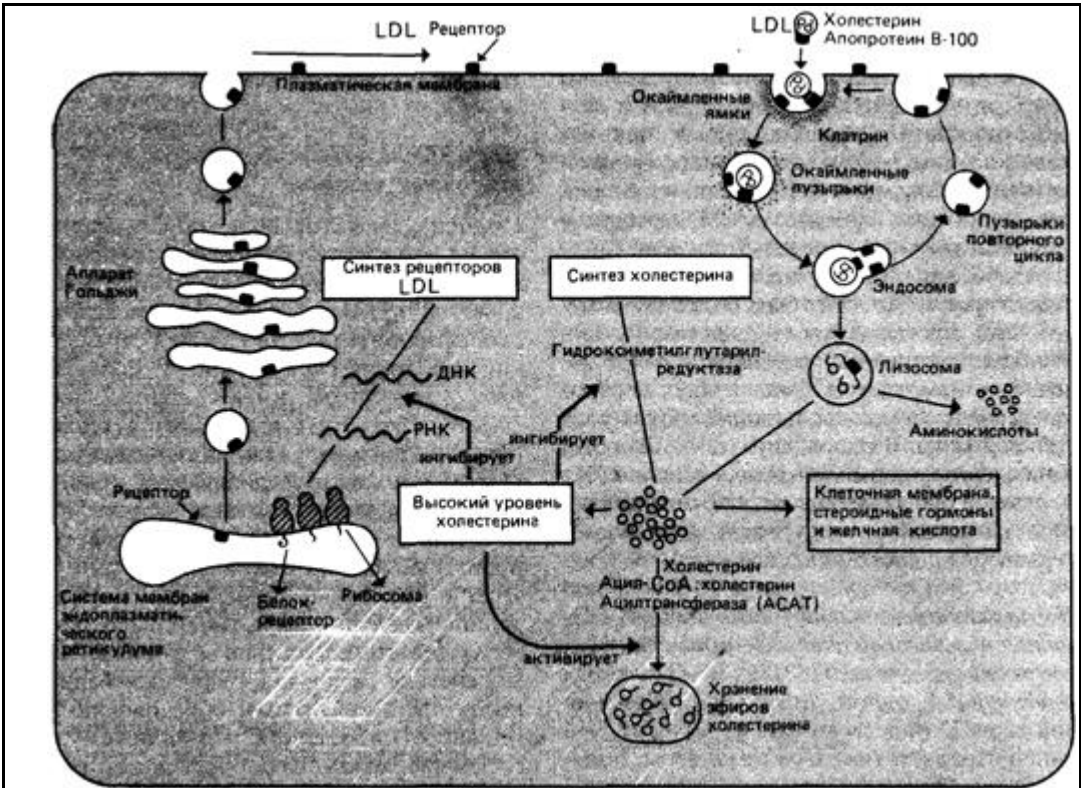
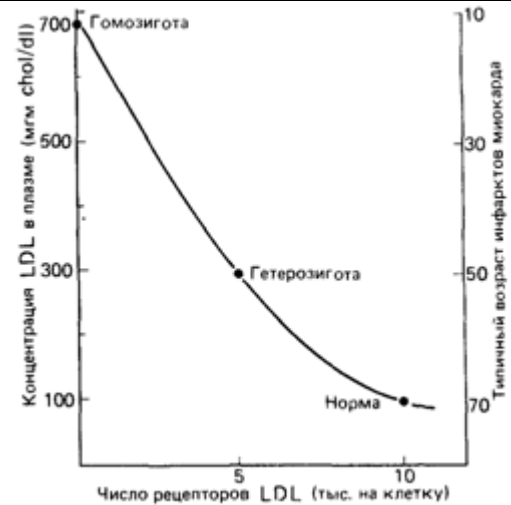


Рис. 4.71. А. Метаболизм холестерина в клетке. Липопротеины низкой плотности (LDL) транспортируют холестерин (вверху справа). LDL связываются рецепторами в окаймленных ямках, которые после этого превращаются в окаймленные пузырьки. Несколько таких пузырьков сливаются, образуя эндосому, в которой LDL отделяется от рецептора, после чего последний возвращается на клеточную мембрану. LDL поглощаются лизосомами, где происходит гидролиз апопротеина В-100 до аминокислот и разрушаются эфирные связи холестерина. Свободный холестерин используется для создания клеточных мембран, стероидных гормонов и желчных кислот. Клетка регулирует уровень холестерина, его повышение вызывает следующие эффекты: 1) ингибируется HMG-CoA-редуктаза, фермент, осуществляющий лимитирующую стадию синтеза холестерина; 2) активируется фермент ACAT, который катализирует этерификацию холестерина для запасаения с жирными кислотами; 3) ингибируется синтез новых рецепторов на уровне транскрипции. **Б.** Соотношение между концентрацией LDL и характерным возрастом для инфаркта миокарда вследствие коронарного атеросклероза как функция числа рецепторов LDL фибробластов в норме при гомо- и гетерозиготной формах семейной гиперхолестеринемии.



Число рецепторов LDL на клетку определяли из экспериментов, в которых максимальное связывание LDL измеряли при +4° С у активно растущих фибробластов, лишенных LDL в течение 48 ч [1107].

У гомозигот с дефектным рецептором вследствие очень высокого содержания липидов рано развивается ишемическая болезнь, и, как правило, они умирают в детском возрасте. Впрочем, многие так называемые гомозиготы в сущности являются гетерозиготами-компаундами, несущими две различные мутации по LDL-рецепторам. Тип мутации определяет степень тяжести заболевания, при полном отсутствии рецепторов LDL симптомы более тяжелые, чем при снижении числа рецепторов. Истинным гомозиготам медикаментозное лечение не помогает, в этих случаях необходимы другие подходы, например шунт портальной вены. В одном случае, чтобы обеспечить синтез нормальных рецепторов LDL, больному была сделана трансплантация печени. Действительно, уровень LDL-холестерина у больного снизился.

Доминантная гемолитическая анемия, вызванная повышенной активностью клеточной аденозиндезаминазы (25275) [1934] - дефект рецептора? В одной уникальной родословной 12 из 23 родственников по материнской линии страдали тяжелым гемолизом, однако анемия была выражена слабо, поскольку гемолиз в значительной степени компенсировался эритропоэзом. Активность аденозиндезаминазы в эритроцитах больных была в 45-70 раз выше нормы, а уровень АТР составлял 47% по сравнению с нормой. Уровень других нуклеотидов был понижен примерно в той же степени. Заболевание наследовалось по аутосомно-доминантному типу. Гемолитический синдром был обусловлен, очевидно, недостатком адениновых нуклеотидов, которые не могут синтезироваться в безъядерной клетке. Главный фактор, определяющий повышенную активность аденозиндезаминазы, неизвестен, однако можно предполагать, что это мутация в мембранном рецепторе, облегчающая проникновение аденозина в клетку. Ингибиторы транспорта аденозина в клетку подавляют также и активность аденозиндезаминазы. По аналогии с рецепторами LDL, модулирующими активность HMG CoA-редуктазы, можно допустить, что рецептор, участвующий в транспорте аденозина, влияет также на активность аденозиндезаминазы. При нарушении данного механизма регуляции уровень аденозиндезаминазы может возрасть.

4.6.5. Наследственные дефекты клеточных мембран

Очевидно, некоторые доминантные нарушения можно объяснить возникновением мутаций, влияющих на мембраны клеток. В качестве примера приведем наследственный сфероцитоз (18290), распространенный тип гемолитической анемии. У таких больных эритроциты имеют шарообразную форму. При этом уменьшается площадь поверхности мембраны, падает содержание в ней липидов и увеличивается проницаемость мембраны для ионов натрия [1142]. Сфероциты быстрее, чем нормальные эритроциты, удаляются из кровяного русла селезенкой. Как именно изменяются мембраны в данном случае неизвестно, однако, вполне вероятно, что нарушение затрагивает взаимодействие спектрина с другими белками, препятствуя тем самым образованию нормального цитоскелета. По-видимому, это состояние может быть обусловлено разными мутациями.

4.6.6. Накопление аномальных фибриллярных белков: наследственные амилоидозы (10480 10525) [1102]

Группа заболеваний, называемых амилоидозами, характеризуется накоплением во многих органах различных аномальных белков. Изучение их физико-химическими методами показало, что это белки с р-складчатыми слоями. Ненаследственные амилоидозы иногда возникают вследствие хронических гнойных инфекций. В других случаях амилоидозы могут быть связаны с различными дисплазиями плазматических клеток типа миеломатоза. При неопластической трансформации плазматических клеток фибриллярные белки образуются из иммуноглобулинов, тогда как происхождение амилоидогенных белков при амилоидозе, сопровождающем другие хронические болезни, неизвестно.

Существует несколько различных типов амилоидоза, наследуемого как доминант-

Таблица 4.26. Амилоидозы с аутосомно-доминантным наследованием [1102]
Общего характера
<i>Неврологические формы</i>
Амилоидная нейропатия, тип I (португальский тип или тип Andrade)
Амилоидная нейропатия, тип II (индийский тип)
Амилоидная нейропатия, тип III (тип Айова)
Амилоидная нейропатия, тип IV (финский тип)
<i>Соматические формы</i>
Висцеральный амилоидоз
Амилоидоз, сопровождающийся глухотой, крапивницей и болями в конечностях
Амилоидная кардиомиопатия
Локализованные накопления амилоидов
Церебральный артериальный амилоидоз
Решетчатая дистрофия роговицы
Кожно-лишайный амилоидоз
Медуллярная карцинома щитовидной железы при множественном эндокринном аденоматозе типа 2 с амилоидными отложениями

ный аутосомный признак (табл. 4.26). Наиболее часто встречается и лучше всего изучена так называемая амилоидная нейропатия I типа [1102]. Больные этой формой амилоидоза страдают сенсомоторной нейропатией и дисфункцией автономной нервной системы. Амилоидные фибриллы, характерные для этого состояния, уникальны. В иммунологическом отношении они отличны от амилоидных фибрилл, которые наблюдаются при заболеваниях плазматических клеток и происходят от иммуноглобулинов. Отличаются они и от фибрилл, состоящих из белков невыясненной природы, которые появляются при приобретенном системном амилоидозе.

Происхождение специфичного для наследственного амилоидоза фибриллярного белка непонятно. Возможно, что при определенной мутации возникает аномальный белок, способный образовать характерную для амилоидов структуру из β -складчатых слоев. Так как заболевание наследуется доминантно, аномальную структуру будут иметь лишь 50% молекул белка. Аномальный белок откладывается преимущественно в нервной ткани, это приводит к возникновению различных неврологических форм наследственного амилоидоза. Недавние исследования показали, что при фибриллярной амилоидной полинейропатии белки фибрилл состоят из мутантных преальбуминов с одной аминокислотной заменой. Хотя роль преальбумина в этой патологии неясна, изучение полиморфизма длины рестрикционных фрагментов ДНК в данном локусе дает возможность осуществлять доклиническую и пренатальную диагностику наследственного амилоидоза.

Амилоидоз наблюдается также при аутосомном рецессивном заболевании, известном как семейная средиземноморская лихорадка (24910). В этом случае амилоид накапливается преимущественно в почках и в иммунологическом отношении сходен с амилоидом, характерным для приобретенного системного амилоидоза. Амилоидоз при семейной средиземноморской лихорадке вторичен по отношению к основному заболеванию.

4.6.7. Доминантно наследуемые опухолевые заболевания

Существуют семьи с доминантно наследуемыми злокачественными и незлокачественными опухолями. Среди них такие часто встречающиеся наследственные заболевания, как нейрофиброматоз, полипоз и ретинобластома (18020), или злокачественная глазная опухоль у новорожденных и маленьких детей. В литературе описаны ненаследственная и наследуемая по доминантному типу ретинобластомы. Механизм доминантного наследования ретинобластомы уникален, возможно, сходным механизмом можно объяснить и данные по другим опухолям, которые наследуются подобным образом. В противоположность спорадической ретинобластоме при ее наследственной разновидности происходит передача единичной мутации в клетках зародышевого пути от одного из родителей (разд. 5.1.6). Эта мутация сама по себе не вызывает ретинобластомы, хотя мутантными оказываются все ретинальные клетки. Если идентичный участок 13-й хромосомы, унаследованной от другого родителя, функционирует нормально, опухоль не образуется.

Но если в гомологическом участке одной из ретинальных клеток происходит соматическая мутация, пораженными оказываются оба аллельных локуса. Это приводит к наследственной ретинобластоме. Таким образом, в данном случае наследуется мутация, фенотипически никак не проявляющаяся во всех ретинальных клетках. Вероятность возникновения соматической мутации того же локуса в одной из множества ретинальных клеток весьма высока - до 90%. В результате возникает гомозиготная мутантная клетка, это приводит к злокачественной пролиферации и в конечном счете к ретинобластоме. Важно помнить, что в действительности наследуется рецессивный аллель, который вызывает патологию только после перехода в гомозиготное состояние вследствие соматической мутации гомологичного аллеля.

Таблица 4.27. Некоторые механизмы доминантных заболеваний	
Механизм	Пример
Аномальная агрегация субъединиц белка	Аномальные фибриногены
Нарушение функций мультимерных белков аномальными субъединицами	Нестабильные гемоглобины
Ослабленное ингибирование конечным продуктом по типу обратной связи вследствие ферментной недостаточности	Недостаточность порфобилиноген-дезаминазы при острой перемежающейся порфирии
Дефекты клеточных рецепторов	Дефекты рецепторов LDL при семейной гиперхолестеринемии
Накопление аномальных фибриллярных белков	Наследственный амилоидоз (португальский тип)
Гомозиготизация соматических клеток на фоне рецессивного типа наследования гена	Ретинобластома (см. текст)

Общие замечания. В табл. 4.27 приведены сведения о различных механизмах доминантных заболеваний. Из нее видно, что по этому типу наследуются даже некоторые нарушения ферментативной активности, например недостаток ингибитора C1, обуславливающий наследственный сосудистый отек (10610) [1284], и недостаток антитромбина (10730) [1075], вызывающий повышенную склонность к тромбозу вен. Почему в этих случаях мутации в гетерозиготном состоянии приводят к заболеванию, пока неясно. Недостаточно исследованы также многие доминантные аномалии, обусловленные нарушением эмбрионального развития конечностей, например брахидактилия. Это же можно сказать и в отношении сложных синдромов, например нейрофиброматоза (16220) и несовершенного остеогенеза (16620). Приведенные примеры показывают, что менделевскому доминантному наследованию могут соответствовать совершенно различные механизмы. Их изучение способствовало бы выяснению многих аспектов генетически детерминированной взаимосвязи структуры и функции, которая может быть гораздо сложнее простых соотношений типа «один ген - один фермент», характерных для рецессивных нарушений метаболизма. Особенно интересно, что в результате одной мутации, затрагивающей рецептор, в клетке могут одновременно нарушаться сразу несколько ферментативных реакций. Такой биохимический плейотропизм наталкивает на мысль о возможности регуляции сложных биохимических цепей одним единственным геном. Очевидно, что повреждения, лежащие в основе доминантно наследуемых заболеваний, представляют значительный научный интерес.

4.7. Генетика эмбрионального развития

Результаты исследований по биохимической и молекулярной генетике многое прояснили в структуре генов, а также в генетическом контроле работы ферментов и других белков. В то же время наши знания о генетических основах эмбрионального развития нельзя назвать удовлетворительными. Поэтому, хотя о дефектах ферментов известно достаточно много, биохимические основы морфологических аномалий в большинстве случаев остаются невыясненными,

несмотря на успехи в выяснении биохимической природы доминантных заболеваний (разд. 4.6). Генетика развития по-прежнему остается белым пятном на карте молекулярной генетики.

Как и во многих других областях молекулярной биологии, в генетике развития зачастую в качестве экспериментальных моделей используются животные, поскольку эксперименты на человеке невозможны. В книге, посвященной генетике человека, трудно охватить всю эту область. Здесь будут описаны лишь основные направления с привлечением конкретных данных, полученных на человеке. Генетика развития базируется на концепции развития, расцвет которой пришелся на первое десятилетие нашего века.

4.7.1. Активность генов в раннем развитии

Эмбриональное развитие удобно подразделять на две фазы: раннюю, включающую оплодотворение и несколько первых делений зиготы вплоть до образования гастролы, и позднюю, на которой закладывается форма тела и развиваются органы. Результаты последних исследований экспрессии генов и ее регуляции в раннем развитии, полученные сначала на примитивных организмах, а впоследствии на млекопитающих, могут быть экстраполированы на человека [49; 1207].

1. Главной генетической проблемой эмбрионального развития является дифференцировка. До сих пор непонятно, каким образом группы клеток приобретают различные функции, несмотря на то, что их геномы идентичны. В настоящее время теории дифференцировки на уровне генов можно считать опровергнутыми. Действительно, геномы всех клеток организма, за отдельными исключениями, идентичны. В классическом эксперименте, проведенном на лягушках, удалось показать, что в результате трансплантации ядра клетки кишечника в безъядерное яйцо происходит развитие полноценного организма. Подобные эксперименты были осуществлены позднее и на мышах. Кроме того, гены гемоглобина были выделены из различных типов незритропоэтических тканей - фибробластов и лимфоцитов (разд. 4.3). Контроль дифференцировки на уровне ДНК продемонстрирован для иммуноглобулинов. Весьма возможно, что это не единственное исключение (разд. 4.4). Однако, как правило, контроль дифференцировки осуществляется на транскрипционном уровне: дифференцированные клетки производят различные наборы мРНК. Возможна также регуляция на других уровнях, меньше связанная с первичной активностью гена. Точный механизм такого контроля для высших эукариот не установлен, однако предполагают, что он может быть связан со структурой хромосом (разд. 2.3).

2. Число различных мРНК, транслируемых в раннем эмбриональном развитии, достаточно велико, их набор изменяется в зависимости от стадии развития. Вероятно, для раннего эмбрионального развития требуется работа большого числа генов.

3. У иглокожих ранние стадии развития до или даже после гастрულიи контролируются большей частью или исключительно материнским геномом. В зиготе имеется пул материнских мРНК, которые и обеспечивают этот контроль. Более того, тРНК и рибосомы - также материнского происхождения. Различные части отцовского генома начинают работать не строго одновременно.

В исследованиях, проведенных на мышах, были получены несколько иные результаты [1070; 1208]. Преимущество этой экспериментальной системы заключается в том, что в распоряжении ученых имеется много генетических линий как нормальных, так и аномальных мышей. Это позволило использовать современные аналитические методы и генетическое маркирование. Например, требуется выяснить, на какой стадии начинается экспрессия генов эмбриона. Установлено, что синтез РНК начинается уже на стадии двух клеток, однако это еще ничего не говорит о синтезе белка. Эту проблему мы сумеем решить, если научимся (с помощью генетических маркеров) различать транскрипцию отцовского и материнского геномов. Появление у зародыша отцовских маркерных признаков указывает самую позднюю возможную стадию, на которой начинается экспрессия генов самого эмбриона. (Впрочем, не исключено, что транскрипция с материнского генома начинается раньше). Такие отцовские маркеры, как HPRT (разд. 4.2.2.6)

или антиген НУ, появляются на стадии 8 клеток, β -галактозидаза и β -глюкозидаза - на стадии 4, а синтез макроглобулина включается на стадии двух клеток (рис. 3.39). Более того, продемонстрировано, что оба сцепленных с X-хромосомой гена HPRT (из обоих геномов) функционируют до ее инактивации (разд. 2.3.3.3). Поэтому соответствующая ферментативная активность у самок вдвое выше. Сложность такого рода опытов связана с определением пола. Впрочем, существует и альтернативный подход, состоящий в искусственном получении монозиготных близнецов. Зародыш на стадии двух клеток вымывают из фаллопиевых труб, клетки отделяют друг от друга и каждую из них выращивают в культуральной среде. В результате получают два генетически тождественных зародыша, один из которых используют для биохимического изучения, а другой для кариотипирования.

Даже если геном эмбриона начинает экспрессироваться на стадии двух клеток, это еще не означает, что такая экспрессия необходима для нормального развития. Решению этого вопроса может помочь анализ генетических вариантов с аномалиями развития. Доминантная мутация олигосиндактилии обуславливает аномалии формирования конечностей и почек, у гомозигот по такой мутации развитие останавливается на шестом делении зиготы. Метафазы при этом похожи на метафазы клеток, обработанных ингибитором митоза колцемидом. Дефект образования веретена, приводящий к накоплению метафазных клеток, был обнаружен уже на стадии бластоцисты, следовательно, уже на этой стадии необходима работа определенной части генов зиготы.

Одинаков ли вклад материнского и отцовского генотипа в фенотип потомства? Как уже отмечалось, отцовский генотип начинает функционировать в раннем развитии, что, однако, не обязательно означает равный вклад материнского и отцовского геномов в развитие зародыша, особенно если учесть, что зигота содержит большое количество материнской РНК. Действительно, некоторые биологические явления позволяют предполагать больший вклад материнского организма. Например, потомок от спаривания лошади и осла – мул – гораздо меньше похож на осла, чем потомок коня и ослицы.

У человека, как правило, слишком сложно количественно оценить признаки, которые можно сравнивать у детей и обоих родителей. Однако имеются некоторые данные (полученные с помощью семейного анализа), которые свидетельствуют в пользу большего сходства в строении пальцев, кисти и стопы у детей и их матерей, чем у их отцов [1169; 1279]. Заметим, что интерпретировать подобные результаты не просто.

Тератокарцинома мышей как инструмент исследования раннего развития [1140]. Возможности биохимического исследования ранних стадий развития млекопитающих на клеточном уровне сильно ограничиваются недостаточным количеством материала. Многие важные события дифференцировки происходят, когда соответствующих клеток еще очень мало. Кроме того, клетки, находящиеся на различных стадиях дифференцировки, располагаются очень близко друг к другу. Недавно появилась возможность преодолеть некоторые из этих затруднений благодаря использованию клеток тератокарциномы мышей. Тератокарцинома яичников или семенников мышей возникает спонтанно или может быть индуцирована во многих инбредных линиях мышей. Опухоли состоят из разнообразных тканей, происходящих из трех зародышевых слоев. Кроме того, эмбрионоподобные злокачественные клетки демонстрируют инфильтративный рост. Однако их дифференцированные варианты не являются злокачественными.

Клетки тератокарциномы можно получить в культуре; такие культуры способны расти и дифференцироваться в различные ткани. Получено множество линий эмбрионоподобных клеток; если их инъецировать мышам, возникают опухоли, в состав которых входят различные типы дифференцированных клеток. Такие клетки во многом похожи на нормальные зародышевые клетки и при этом доступны в большом количестве. Поэтому их можно использовать в качестве модельных систем для изучения дифференцировки. Например, они смешиваются с нормальными зародышевыми клетками, если их инъецировать в 4-дневную бластоцисту, что приводит затем к образованию генетических мозаиков.

В культуре легко получить большие количества гомогенных клеток, происходящих из тератокарциномы, на определенной стадии дифференцировки. Такие клеточные популяции могут быть использованы для биохимического анализа, результаты которого сопоставимы с данными, полученными на эмбрионе. Показано, что большинство классов мРНК являются общими для зародышевых клеток и предшественников клеток крови (миелобластов), тогда как глобиновая мРНК обнаруживается в миелобластах, но не обнаруживается в зародышевых клетках. Кроме того, установлено, что обе X-хромосомы в клональных культурах недифференцированных клеток самок генетически активны; инактивация одной из X-хромосом происходит, когда начинается дифференцировка [885]. Особенно удобна данная система для исследования роли поверхностных клеточных антигенов в дифференцировке. В разд. 3.5.5 при обсуждении главного комплекса гистосовместимости (МНС) указывалось,

что такие антигены могут выполнять определенную функцию в дифференцировке клеток. Обнаружено, что клетки раннего эмбриона совершенно лишены антигена МНС Н-2 (он соответствует человеческому HLA); впрочем, в этих клетках имеются другие антигены, например F-9. Он утрачивается, когда ранние эмбриональные клетки дифференцируются в фибробласты, миобласты и другие типы клеток, для которых характерно наличие Н-2 антигена. У взрослых животных антигены F-9 можно обнаружить только в сперматогонияльных элементах. По-видимому, они имеют отношение к комплексу генов T/t. Некоторые аллели этой системы нарушают нормальное эмбриональное развитие, вызывают его остановку на определенных стадиях. F-9 играет также определенную роль в образовании морулы. Этот вывод был сделан на основании того, что образование морулы, обычно нормально протекающее в культуре, можно предотвратить специфическими моновалентными анти-F-9-антителами. Дробление клеток происходит правильно, это свидетельствует против неспецифического токсического эффекта. По-видимому, антитела ослабляют клеточные взаимодействия и тем самым нарушают компактность морулы и ее переход в бластоцисту. Ранее, в разд. 4.2.2.6, обсуждалась метаболическая кооперация HPRT⁺ и HPRT-фибробластов в культуре. Подобная метаболическая кооперация наблюдается и между клетками раннего эмбриона; она подавляется анти-P-9-антителами.

Использование тератокарциномы мышей в изучении дифференцировки представляет собой пример распространенной стратегии: если определенная проблема слишком сложна, для ее решения следует прибегнуть к упрощенной экспериментальной модели. Возможно, благодаря этому мы все-таки сможем ответить на один из основных вопросов генетики развития: почему генетически идентичные клетки становятся фенотипически различными?

4.7.2. Поздние стадии эмбрионального развития; фенокопии

Формирование систем органов, конечностей, головы и мозга происходит на поздних стадиях эмбрионального развития. Существует ряд типичных наследственных аномалий этого этапа эмбриогенеза, что свидетельствует о его генетическом контроле. Генетические механизмы, определяющие поздний эмбриогенез, могут нарушаться под действием различных внешних факторов, например недостатка кислорода, ионизирующих излучений, вирусных инфекций типа краснухи или цитомегалии, а также препаратов, таких как талидомид или этанол. Знание тератогенных свойств этих факторов важно для предотвращения нарушений развития плода. Мы не будем касаться деталей, поскольку предмет тератологии человека, играющий, безусловно, ключевую роль в дифференциальной диагностике дефектов у новорожденных, все же выходит за рамки настоящей книги.

Доказательства взаимодействия генетических и негенетических факторов в возникновении уродств. Со времен опытов Жоффруа Сент-Илера (1832-1836), в которых он индуцировал возникновение уродств у куриных эмбрионов, покрывая яйца лаком и нарушая тем самым газообмен, многие исследователи пытались использовать различные воздействия для нарушения эмбрионального развития. Большинство этих экспериментов производилось с целью выяснения механизмов нормального эмбриогенеза. Иногда удавалось получить фенотипы, сходные с теми, которые возникают при некоторых мутациях (фенокопии) [1106]. Однако в целом эти работы не расширили наши представления о механизмах возникновения дефектов у новорожденных и не будут далее обсуждаться. Впрочем, некоторые из них позволили заключить, что генетические факторы могут иметь значение даже при индукции уродств внешними факторами [1187].

У цыплят нередко встречаются наследственные нарушения формирования хвостовой части нервной трубки. Признак может наследоваться и как доминантный, и как рецессивный; пенетрантность и экспрессивность сильно зависят от генотипа. Более того, этот дефект спонтанно возникает в линиях цыплят, которые не имеют соответствующих генов. Частота проявления признака варьирует в разных линиях от 0,5 до 5,7%. Мутантный фенотип можно индуцировать рядом соединений, в том числе инсулином, борной кислотой и пилокарпином; причем, чем выше частота спонтанных дефектов, тем выше и частота фенокопии, индуцированных химически. Подобные наблюдения имеются и для прочих уродств у кур. Кортизон вызывает образование рас-

щелины губы и нёба у 10% мышей в тех линиях, для которых частота таких же спонтанных дефектов составляет 5%. У мышей другой линии с частотой спонтанных мутаций 0,2% после обработки кортизоном лишь 1,8% животных оказываются дефектными [1085].

Понятно, что подобные исследования на человеке невозможны. Поэтому и нет строгих доказательств участия генетических факторов в формировании уродств под действием факторов среды. Однако такое предположение весьма правдоподобно. Изучение генетических механизмов развития у человека основано главным образом на исследованиях неиндуцированных аномалий, среди которых наибольшее значение имеют хромосомные aberrации и генетические нарушения определения пола.

Перед обсуждением этих вопросов следует коснуться проблемы экспрессии генов в развитии и дифференцировке с более общих теоретических позиций. Некоторые общие закономерности регуляции экспрессии были установлены при изучении бактерий и вирусов. И хотя для высших эукариот они оказались в чистом виде неприменимыми, их открытие имело историческое значение для генетики, в том числе для генетики человека. Мы не можем осветить здесь всю проблему и приведем лишь два классических примера положительной и отрицательной регуляции экспрессии генов [117; 120].

4.7.3. Регуляция активности генов у бактерий и эукариот

Отрицательная и положительная регуляция. Многие бактериальные гены активны только тогда, когда их экспрессия необходима, а все остальное время они выключены. Экспрессия таких генов контролируется геном-оператором и геном-репрессором. Регуляция этого типа характерна для лактозного оперона *E. coli* [1141], в котором три тесно сцепленных структурных гена контролируются подобной системой. Кроме такой отрицательной регуляции существует еще и положительная; в этом случае для инициации транскрипции требуется специфический белок.

Роль регуляторных механизмов. Способность бактерий оптимально использовать различные источники энергии сыграла значительную роль в их эволюции. Контролирующие системы, например лактозный оперон, как раз и нацелены на выполнение этой функции. Бактерии затрачивают энергию на синтез ферментов, расщепляющих лактозу, только в том случае, если в среде имеется лактоза, таким образом благодаря обратной связи энергия не растрачивается попусту.

Циклический АМР используется в метаболизме бактерий для многих целей, в частности для регуляции транскрипции. У высших эукариот, в том числе у человека, он имеет еще одну важную функцию: служит эффектором, опосредующим действие гормонов. Большинство гормонов высших организмов не способно проникать внутрь клетки, и в результате контакта лиганда и рецептора в клеточной мембране происходят изменения, влияющие на синтез и катаболизм сАМР, который, в свою очередь регулирует транскрипцию.

Важная проблема дифференцировки состоит в том, как клетка того или иного типа «решает», какие именно рецепторы должны быть на поверхности ее мембраны. Существенную роль в эмбриональном развитии играют гормоны. В целом высшие эукариоты, включая человека, нуждаются в гораздо более тонких механизмах регуляции экспрессии генов, чем микроорганизмы. Однако, исходя из принципов эволюционной генетики, можно предположить, что основные принципы регуляции экспрессии и дифференцировки должны иметь сходство. В ходе эволюции происходила многоэтапная адаптация ко все более сложной обстановке, которая требовала изощренной регуляции. Поэтому логично было бы исследовать различные биологические системы, опираясь на выводы теории эволюции и при переходе к более сложным системам соответственно усложнять интерпретации и модели.

Исследования регуляторных механизмов (рецепторов, гормонов, сАМР, других химических модуляторов) развития у высших организмов активно развиваются по различным направлениям. Не последнее

место среди них занимают молекулярнобиологические подходы. Генетический контроль образования антител обсуждался в разд. 4.4. Это первый пример подробного исследования дифференцировки. Он наглядно показывает, что соответствующие изменения могут происходить на разных уровнях: на уровне перестройки ДНК, транскрипции, молекулярной организации конечного белкового продукта - антитела. Например, растворимая и мембранно-связанная формы IgM отличаются дополнительной аминокислотной последовательностью, позволяющей мембранно-связанным формам IgM «заякориваться» в клеточной мембране. Оба белка кодируются одним локусом, но процессинг первичного транскрипта протекает в этих случаях по-разному.

Один ген может кодировать даже два различных белка. В качестве примера приведем пептидный гормон кальцитонин у крыс [968]. Он обнаруживается в щитовидной железе и гипоталамусе, причем в гипоталамусе ему сопутствует другой полипептид, CGRP (от англ. calcitonin gene-related product - продукт, имеющий отношение к гену кальцитонина). У CGRP и кальцитонина первые 78 аминокислот одинаковы, но общая длина составляет 128 аминокислот. Обе молекулы кодируются одним геном, однако процессинг первичных транскриптов происходит по-разному: из мРНК CGRP вырезается целый экзон и одновременно добавляется другая последовательность (рис. 4.72). Такой вариант процессинга РНК преобладает в гипоталамусе, но не в щитовидной железе, это и определяет дифференциальную экспрессию одного и того же гена в различных тканях. Аналогичный механизм характерен для синтеза соматостатина. В гипофизе человека наряду с нормальным гормоном, состоящим из 191 аминокислоты, присутствует другой, близкий по структуре белок, в котором отсутствует 15 аминокислот в положениях 32-46. В этом же участке начинается второй экзон, его первые 45 нуклеотидов могут функционировать либо как часть экзона, либо как часть интрона.

Вероятно, альтернативный процессинг первичных транскриптов играет очень важную роль в дифференцировке. Однако остается неясным, какой первичный механизм определяет выбор пути процессинга. Возможно, для более глубокого понимания этой проблемы потребуются новые теоретические концепции, позволяющие строить модели и предлагать гипотезы, которые можно экспериментально проверить. Результаты таких проверок позволили бы постепенно модифицировать модель, все более приближая ее к истине. Подобные модели должны, по нашему мнению, сыграть значительную роль в выборе направлений исследований в будущем.

Модель Дэвидсона-Бриттена. Дэвидсон и Бриттен в 1969 г. предложили модель регуляции экспрессии генов у высших организмов [1019]. Авторы логически развили соответствующую модель для микроорганизмов, чтобы учесть более тонкие требования, предъявляемые к регуляции в процессе дифференцировки.

Согласно этой модели, существуют четыре класса генов: гены-продуценты; гены-рецепторы, сцепленные с генами-продуцентами и способные индуцировать транскрипцию при воздействии активаторов, которые кодируются генами-интеграторами; гены-сенсоры, которые служат участками посадки агентов (возможно, гормонов), модулирующих характер экспрессии генома. Эта модель согласуется с данными эмбриологии; например, она учитывает возможность индукции одним геном изменений в ходе дифференцировки, а также интегрированное действие ряда генов в установлении определенного дифференцированного состояния. Модель предусматривает возможность взаимодействия генов на различных уровнях интеграции. Однако за 10 лет существования данной модели было получено слишком мало экспериментальных фактов в ее пользу.

К сожалению, эта модель, как и многие другие, не приближает нас к решению основного вопроса дифференцировки-почему в различных клетках активируются разные наборы генов и почему эти клетки приобретают различные свойства. Уже указывалось, что неодинаковые свойства клеток могут быть обусловлены разным набором рецепторов на их поверхности. Модель Дэвидсона-Бриттена предполагает, что, кроме этого, гомологичные сенсорные участки в разных клетках обладают разной чувствительностью. Но почему тогда у одних клеток есть рецепторы, которых нет у других, и почему их геномы реагируют на разные сигналы? Эти основополагающие вопросы дифференцировки остаются пока без ответа.

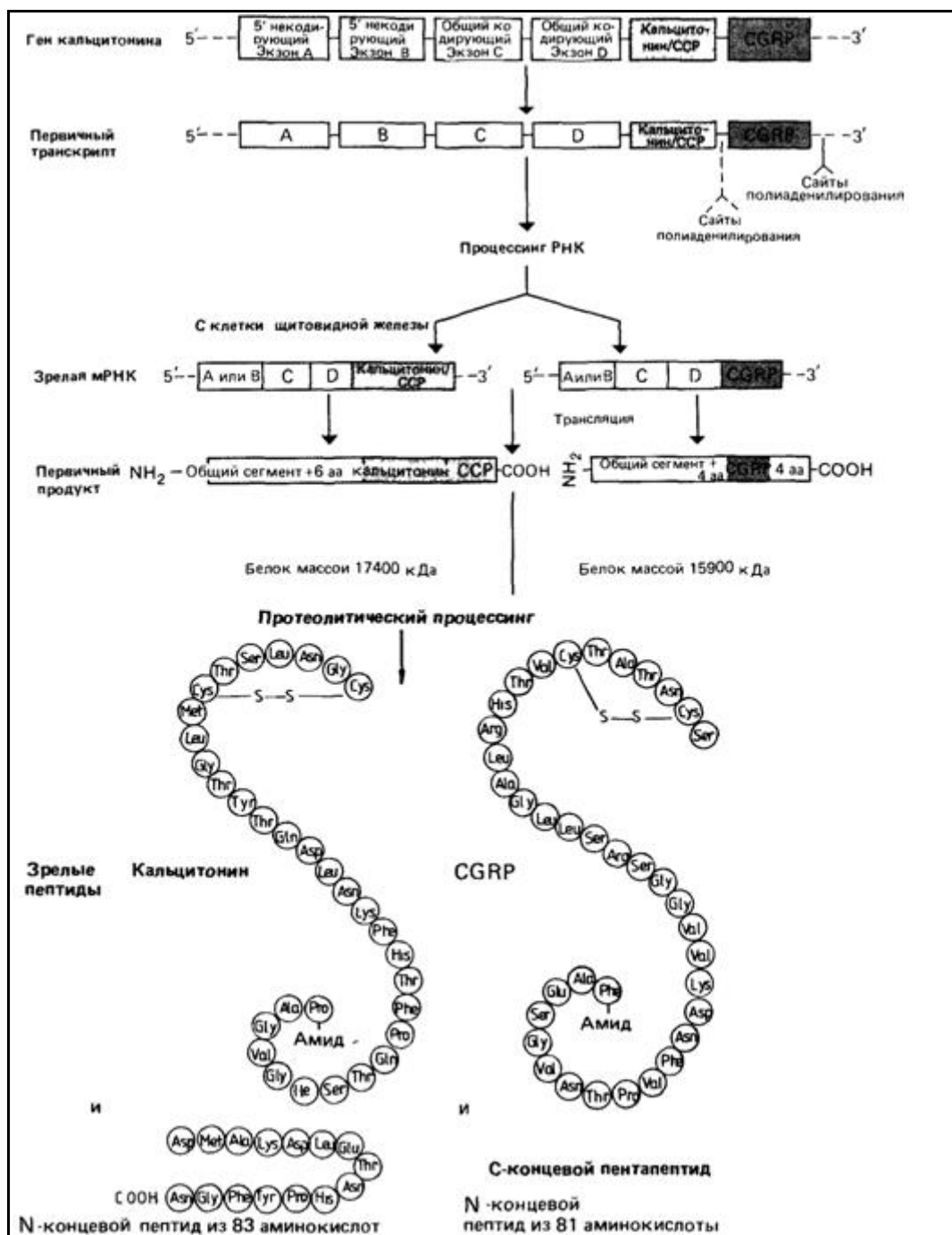


Рис. 4.72. Механизм тканеспецифической экспрессии гена кальцитонина. Разветвленная стрелка указывает различие путей процессинга в щитовидной железе и гипоталамусе. Некоторые детали остаются гипотетическими, однако гены и конечные продукты (кальцитонин и CGRP) твердо установлены. (По *Amara et al*, *Nature*, **298**, p. 243, 1982) aa-аминокислота

4.7.4. Соотношения генотипа и фенотипа при хромосомных aberrациях у человека [1176]

Большинство хромосомных aberrаций не нарушает структуры генов, например при трисомии целостность всех генов утроенной хромосомы не нарушается, изменяется лишь их число. Тем не менее при этом наблюдаются резкие нарушения эмбрионального развития. Можно предположить, что в этом случае нарушены механизмы регуляции. Более того, большинство клинических симптомов у больных со структурными aberrациями хромосом, связанными с утратой генетического материала (делеции, кольцевые хромосомы), мало отличается от симптомов при многих трисомиях. «Характер большинства из этих симптомов не зависит от локализации структурного дефекта. Логично предположить, что фенотипические отклонения обусловлены скорее дисбалансом экспрессии генов в эмбриогенезе, чем утратой определенных генов. Изучение развития зигот с хромосомными aberrациями может быть полезным для выяснения нормального хода эмбриогенеза.

4.7.4.1. Эффект дозы генов при трисомиях и картирование генов

Ранние работы по картированию генов с использованием эффекта дозы генов. Обычно при аутосомно-рецессивных аномалиях ферментов их активность у гетерозигот близка к величине, средней для фенотипов двух типов гомозигот. В тех случаях, когда активность фермента у мутантных гомозигот близка к нулевой, у гетерозигот обычно наблюдается примерно 50%-ная активность (разд. 4.2.2.8). Это означает, что в норме ферментативная активность прямо отражает количество синтезированного белка и нет никаких специальных механизмов, корректирующих интенсивность синтеза до «нормального» у таких гетерозигот. Поэтому вполне логично было бы предположить, что активность ферментов, которые кодируются генами, локализованными в трисомных хромосомах или их сегментах, должна в полтора раза превышать активность у гомозигот. По этой же причине предполагалось, что измерения ферментативной активности у трисомиков позволит установить, находятся ли гены этих ферментов в утроенных хромосомах или сегментах.

В 1960-х годах действительно удалось обнаружить повышение ферментативной активности при трисомии по 21-й хромосоме; в некоторых выявленных случаях она оказалась в полтора раза выше, чем в норме. Однако уверенность исследователей в справедливости такого подхода пошатнулась, когда было установлено, что при трисомии-21 повышается активность G6PD (ген этого фермента, как известно, сцеплен с X-хромосомой). Более того, при сравнении результатов картирования генов с помощью клеточной гибридизации и на основании ферментативной активности у трисомиков оказалось, что последний способ часто приводит к артефактам. Возможно, вариации ферментативных активностей являются по сути неспецифическими нарушениями, обусловленными генным дисбалансом. В более поздних исследованиях «дозовый эффект» для большого набора ферментов, картированных на хромосомах независимыми методами, все-таки был продемонстрирован (табл. 4.28). Эффект дозы гена при трисомии и моносомии-21 подтвердился и при анализе количества мРНК в фибробластах [1189]. Такие исследования могут быть полезны в будущем для понимания межхромосомных взаимодействий в регуляции активности генов.

В настоящее время не удастся обнаружить связь каких-либо симптомов при синдроме Дауна с эффектом дозы гена. И вообще имеющиеся на сегодня данные не позволяют предложить общую теоретическую концепцию механизмов взаимодействия между генами.

4.7.4.2. Другие биохимические аномалии при хромосомных aberrациях

Фетальный и эмбриональный гемоглобины при трисомии 13. Нормальный синтез гемоглобина описан в разд. 4.3.2. ζ , ϵ и γ -цепи вместе с α -цепями входят в состав ранних эмбриональных гемоглобинов Gower-I и Gower-II соответственно. В ходе эмбрио-

Таблица 4.28. Эффекты дозы аутосомных генов [1176]					
Продукт гена		Хромосома или ее сегмент	Тип аномалии	Тип клеток ²⁾	Отношение аномальной/ нормальной ферментативно й активности
название	сокращенное обозначение ¹⁾				
Фумаратгидратаза	FH(13685/86)	1p2 или 3- 1qter	Частичная три-	F	1,57
			сомия		1,6(i) ³⁾
Кислая фосфатаза-1	ACP-1(17150)	2p23-2pter	Частичная моносомия	E	0,58
Кислая фосфатаза-1	ACP-1(17150)	2p23-2pter	Частичная трисомия	E	1,39 ⁴⁾
Галактозо-1 -фосфат—					
уридинтрансфераза	GALT(23040)	3q21-3qter	То же	E	1,44
Аденилаткиназа-1	AK-1(10300)	9q33-9qter	То же	E	1,43
Глицеральдегидтрифос-	GAPD(13840)	12p12.2-12pter	То же	E	1,47
фатдегидрогеназа					1,37
Триозофосфатизомераза	TPI(19045)	12p12.2-12pter	То же	E	1,86
					2,20
Нуклеозидфосфорилаза	NP(16405)	14q11-14q21	То же	E	1,49-1,73
Аденин- фосфорибозилтрансфераза	APRT(10260)	16	Трисомия	A	1,69
Супероксиддисмутаза-1	SOD-1(14745)	21	»	E	1,45
Супероксиддисмутаза-1	SOD-1(14745)	21	»	E	1,56
		21q22.1	Частичная трисомия	E	1,75
Супероксиддисмутаза-1	SOD-1 (14745)	21	Трисомия	P	1,56

¹⁾ В соответствии с каталогом Мак-Кьюсика (1978) [133]

²⁾ А-клетки амниона, E - эритроциты, F-фибробласты, P-тромбоциты.

³⁾ Нормальная величина принимается за 2/3 суммы удельных активностей, определяемых двумя В-аллелями и одним А-аллелем.

⁴⁾ Определено иммунологически

нального развития эти гемоглобины замещаются фетальным гемоглобином (F), который в свою очередь замещается «взрослым» гемоглобином А в первые месяцы после рождения (рис. 4.36).

При трисомиях 18 и 21 различные формы гемоглобина в ходе развития сменяют друг друга в правильной последовательности и вовремя. При трисомии 19 уровень гемоглобина F при рождении повышен и с возрастом снижается медленнее, чем в норме. В крови новорожденных присутствует также некоторое количество гемоглобина Barts, спустя некоторое время после рождения обнаруживаются следы гемоглобина Gower-II [1135]. Такие же нарушения в переключении синтеза различных форм гемоглобина имеют место при трисомии 13, вызванной робертсоновской транслокацией. Они связаны, по-видимому, с трисомией сегмента, дистального по отношению к 13q21.

Нарушения в синтезе гемоглобина при трисомии 13, очевидно, обусловлены ошибками механизма, контролирующего переключение с синтеза ε-цепи на синтез γ-цепи и последующего переключения с синтеза γ-цепи на синтез β- и δ-цепей. Аномалии синтеза гемоглобина при трисомии 13 были обнаружены в то время, когда Жакоб и Моно предложили свою модель регуляции экспрессии генов у бактерий. Неудивительно, что экспериментальные данные пытались интерпретировать в рамках именно этой модели. Убедительные доводы в пользу или против нее до сих пор не получены.

Сохранение ϵ - и γ -цепей при трисомии 13 не сопровождается аномальным увеличением длительности мегалобластической фазы гематопоеза. Возможный механизм этого переключения может заключаться в метилировании и деметилировании генов гемоглобина (разд. 2.3.2). По-видимому, оно не связано с изменениями ткани, в которой происходит синтез.

Аномалии синтеза гемоглобина указывают на возможные пути исследований в данной области: анализ изменений, сопутствующих включению и выключению синтеза определенных белков. К сожалению, найти подходящие модели оказалось нелегко.

Трисомия 21 и репарация ДНК. Аномальное эмбриональное развитие при синдроме Дауна может вызываться нарушением репарации. Установлено, что число хромосомных aberrаций при облучении рентгеном или ультрафиолетом лимфоцитов и фибробластов больных выше чем в норме. Эти данные, а также уменьшение на 25-30% индуцированного ультрафиолетом внепланового синтеза ДНК у пациентов свидетельствуют о возможном нарушении у них эксцизионной репарации [1186].

4.7.4.3. Изучение хромосомных aberrаций на уровне клеток

Фенотипы клеток при хромосомных aberrациях у человека. Биохимические исследования не позволяют сделать определенных выводов о механизмах регуляции эмбриогенеза. Вопрос можно поставить так: чем отличаются клетки, несущие хромосомные aberrации, от нормальных? Сравнительное описание фенотипов клеток могло бы пролить свет на природу нарушений развития [1179; 1181-1183]. В культуре клеток с различными хромосомными aberrациями, которые в основном получают при спонтанных абортах, анализировали клеточный цикл, морфологию клеток, а также гистохимические, иммунологические и биохимические свойства. Например, клеточная линия с трисомией 7, помимо прочих аномалий, отличается пониженной способностью формировать характерные для этого типа клеток структуры, низким уровнем синтеза

Таблица 4.29. Изучение параметров роста фибробластов при трисомии 21 [1176]
Увеличена доля фибробластов с промежуточным содержанием ДНК; возможно, увеличена продолжительность S-фазы
Замедлена скорость синтеза ДНК в фибробластах
Значительно увеличено время удвоения популяции; уменьшено время жизни
Увеличено время удвоения популяции фибробластов
Увеличена продолжительность фаз G ₂ и, возможно, S у фибробластов
Увеличена продолжительность G ₂ -фазы у фибробластов
Сокращена длительность клеточного цикла у лимфоцитов

—коллагена и пониженной активностью кислой фосфатазы. В клеточном цикле G₂-период вдвое превышал по длительности нормальный [1181], S-фаза была укорочена [1179]. Другой клеточный синдром описан в случае линии клеток с трисомией 14. Сниженная способность к росту и неспособность формировать характерные структуры были обнаружены и в этом случае, но биохимические характеристики оказались несколько иными, например активность кислой фосфатазы была низкой, а концентрация полисахаридов - высокой [1182]. У трисомиков по 14-й или 9-й хромосоме клеточный цикл не отличается от нормального. Помимо упоминавшейся трисомии 7 увеличение длительности фазы G₂ характерно для трисомии 21 и моносомии 21. Для трисомии 21 были исследованы некоторые другие параметры роста, при этом обнаружен ряд отклонений от нормальных эуплоидных клеток (табл. 4.29). Особенно любопытно, что фенотип трисомных клеток оказался практически нормальным [1183], поэтому нет оснований говорить о синдроме на уровне клеток.

Можно предположить, что уродства, наблюдаемые при трисомии, не связаны с заметными аномалиями самих клеток и возникают на другом уровне интеграции, вызывая плацентарную недостаточность [458].

Изучение спонтанных абортусов. Как указывалось в разд. 2.2.1, один из характерных признаков беременности с триплоидным плодом заключается в пузырном заносе плаценты. Нормальное развитие плаценты прерывается (особенно если триплоидия отцовского происхождения [1504]) до окончания сосудообразования в ворсинках, т. е. между 21 и 31 днем беременности. Как показывает гистологическое изучение триплоидных эмбрионов [1094], развитие плода прекращается примерно в это же время. Следует помнить, что в большинстве случаев триплоидных плодов наблюдаются выкидыши, до родов такие эмбрионы доживают исключительно редко. С другой стороны, при трисомии 5 развитие амниона и органов нарушено, по-видимому, еще на более ранних стадиях развития [1180]. Эти примеры показывают, что тонкие гистопатологические исследования эмбрионов на различных стадиях развития и при различных хромосомных aberrациях способствуют постепенному проникновению в механизмы образования уродств [1011, 1180].

Анеуплоидные мыши в качестве модели для изучения развития. Установлено, что некоторые природные популяции мышей несут робертсоновские транслокации. У таких мышей с помощью скрещиваний удастся получать трисомию и моносомию по различным хромосомам. Особую известность в этом отношении приобрела «табачная» мышь [1115]. Моносомия по наименьшей, 19-й хромосоме мыши приводит к задержке деления клеток начиная со 2-го дня после оплодотворения; как правило, гибель наступает после образования бластулы. При слиянии таких эмбрионов с нормальными удастся добиться выживания моносомных клеток в различных тканях, таким образом моносомия не обязательно летальна для отдельной клетки. Ген аспарат-аминотрансферазы-1, фермента, участвующего в синтезе аспартата из глутамата, находится в 19-й хромосоме. Если летальность при моносомии 19 как-то связана с недостаточностью этого фермента, в культуральную среду необходимо добавлять аспарат. Оказалось, что при этом клетки действительно живут на два дня дольше [1070].

Возможно, трисомия по 16-й хромосоме у мышей хотя бы в некоторых аспектах может служить экспериментальной моделью трисомии-21 у человека, поскольку эти хромосомы частично гомологичны. *Фенотипические аномалии, обусловленные хромосомными aberrациями, и регуляция активности генов.* Регуляция активности генов в эмбриональном развитии предполагает определенное количественное равновесие продуктов генов, находящихся в разных хромосомах. Эти продукты могут быть ферментами или структурными белками или иметь регуляторную функцию, например могут репрессировать другие гены. Логично предположить, что дисбаланс в количестве генетического материала приведет к нарушениям во взаимодействии генов и, кроме того, повлияет на механизм регуляции эмбрионального развития. В связи с этим отметим, что триплоидия практически не приводит к крупным дефектам на уровне клеток. Нарушение развития при триплоидии является специфической аномалией плаценты (пузырный занос), которая приводит к подавлению газообмена и вызывает неспецифическое голодание плода. При триплоидии относительное количество материала хромосом не изменяется. С другой стороны, при трисомии часть генетического материала присутствует в большем количестве. Если для нормальной регуляции требуется взаимодействие продуктов генов разных хромосом (именно так предполагается, например, в модели Дэвидсона и Бриттена [1019]), то нарушений развития на уровне клеток следует ожидать как раз при трисомии и моносомии, но не при триплоидии.

Для изучения механизмов этих аномалий необходимо систематическое сравнение всех этапов биосинтеза белков и метаболизма в нормальных и aberrантных клетках. Подобные исследования помогут значительно продвинуть наше понимание как нормального эмбрионального развития, так и его нарушений.

4.7.5. Определение пола

Развитие половых признаков. Формирование половых признаков у человека – один из аспектов его развития, изученный относительно хорошо. Эта область представляет собой пример удачного сочетания теории, наблюдений непосредственно на человеке и экспериментов на животных. Теория подсказывала исследователям направления экспериментов, которые в свою очередь позволяли усовершенствовать саму теорию. Наблюдения генетических аномалий определения пола у человека тоже способствовали развитию теории и, кроме того, указывали на необходимость новых экспериментов.

Принято различать четыре уровня половой дифференцировки:

- 1) хромосомное определение пола (46 XX или 46 XY);
- 2) определение пола на уровне гонад (яичники или семенники);
- 3) фенотипическое определение пола (женский или мужской; внешние половые признаки);
- 4) психологическое определение пола.

Четвертый уровень будет обсуждаться в разд. 8.2.2.3, первый частично уже затрагивался в разд. 2.2.3. Как отмечалось, анализ аутосомных aberrаций, несмотря на его несомненную важность для понимания механизмов нормального развития и его нарушений, до сих пор не позволил выяснить ничего конкретного о механизмах развития. С другой стороны, анализ нарушения числа и структуры половых хромосом дал очень много ценной информации не только о хромосомном определении пола (1-й уровень), но также об определении пола на уровне гонад и фенотипа (уровни 2 и 3, см. ниже и [1068a]). Зачатки гонад у ранних эмбрионов (до 5-й или 6-й недели) не различаются у разных полов и не содержат клеток зародышевого пути. Первичные клетки зародышевого пути у человека можно обнаружить на 3-й неделе эмбрионального развития в эктодерме желточного мешка. Затем под влиянием хемотаксических сигналов они мигрируют в гонады. Эта миграция не зависит от пола; в соответствующих экспериментальных системах женские половые клетки мигрируют в мужские гонады и наоборот. Зачатки гонад могут развиваться в яичники или семенники (уровень 2). В норме направление развития определяется наличием Y-хромосомы; мужские гонады развиваются, если имеется одна Y-хромосома, независимо от числа X-хромосом. Согласно современным данным, это развитие зависит от H-Y-антигена.

Y-хромосома и H-Y-антиген. Эйчвальд и Силмсер в 1955 г. описали у мыши трансплантационный антиген, контролируемый Y-хромосомой (разд. 3.1.4) [643]. Лишь значительно позднее стало понятным его значение для определения пола и особенно для дифференцировки мужских гонад [1248; 1249; 1341; 1343; 1342]. В настоящее время H-Y-антиген, определяющий пол, обнаружен у нескольких видов. По-видимому, его секретируют мужские первичные клетки зародышевого пути. Как только эти клетки попадают в зачатки гонад, начинается дифференцировка семенников. Этот вывод в значительной степени основан на изучении случаев отклонений в развитии пола, например у фримартин (т.е. коров генетически женского пола, у которых гонады превратились в семенники в результате того, что некоторое количество клеток близнеца мужского пола транспортировалось через общую кровеносную систему в гонады женского эмбриона). В настоящее время получены экспериментальные данные в пользу того, что H-Y-рецепторы имеются на поверхности клеток гонад обоих типов.

Совместная инкубация дезинтегрированной ткани семенников с H-Y-антигеном приводит к сборке структур, напоминающих семенники. Такая сборка может быть индуцирована и в случае клеток женских гонад. Если активность H-Y-антигена подавить добавлением анти-H-Y-антисыворотки, то возникают структуры, характерные для яичников. Данные, полученные в последнее время для редких случаев в определении пола (например, для мужчин с генотипом XX), удастся объяснить, предположив, что H-Y-антиген кодируется не Y-хромосомой, а структурным аутосомным геном, который находится под контролем Y-хромосомы. Этот ген может быть репрессирован у всех индивидов, не имеющих Y-хромосомы; его экспрессия может быть индуцирована факторами, которые в норме определяются Y-хромосомой. Следователь-

но, возможны конститутивные мутации, при которых будет синтезироваться Н-У-антиген, приводя к развитию мужского фенотипа даже в тех случаях, когда все клетки организма лишены Y-хромосомы. Возможно, однако, что произошла транслокация, в результате которой ген Н-У-антигена переместился с Y-хромосомы на аутосому. С другой стороны, Н-У-антиген обнаруживали (хотя и в низком титре) даже у женщин с синдромом Тернера (ХО), а также у ХХ-мужчин. Эти и другие наблюдения привели к выводу, что определение пола на уровне гонад может быть пороговым феноменом; для превращения зачатка гонад в семенники необходима некоторая минимальная концентрация Н-У-антигена.

В последнее время роль Н-У-антигена в формировании семенников вызывает некоторые сомнения, которые связаны с новыми наблюдениями на животных и человеке. Например, Н-У-антигены, обуславливающие реакцию отторжения трансплантата и вызывающие цитотоксический эффект, вероятно, не идентичны, поскольку у некоторых животных эти два теста дают противоположные результаты [1114]. Следует учесть, однако, что тест на цитотоксичность связан с практическими трудностями и несколько субъективен [1038].

Развитие вторичных половых признаков. Развитие половых признаков обусловлено дифференцировкой гонад. Половые органы формируются из мюллеровых и вольфовых протоков, которые происходят из первичной почки. У женщин мюллеровы протоки развиваются в фаллопиевы трубы и матку, а вольфовы протоки атрофируются. У мужчин вольфовы протоки развиваются в семенные протоки и семенные пузырьки. Под влиянием хорионического гонадотропина матери клетки Лейдига в эмбриональных семенниках синтезируют стероидные гормоны тестостерон и 5-дигидротестостерон. В клетках Сертоли синтезируется гормон, который называют мюллеровым ингибирующим фактором (MIF). Эти гормоны действуют на бипотентные зачатки внешних и внутренних половых органов, прежде всего на вольфовы протоки, мюллеровы протоки и мочеполовой синус. Нормальные индивиды мужского пола развиваются, только если все эти элементы функционируют в нужное время и в надлежащем месте. При их полном отсутствии формируются женские половые признаки; таким образом, развитие женских половых признаков не требует специальных регуляторных факторов, оно в этом смысле является «конститутивным». Незначительные отклонения в работе этой системы на различных уровнях вызывают неполное развитие мужского фенотипа в организме с мужским генотипом (мужской псевдогермафродитизм); анализ таких аномалий позволил получить обширную информацию о нормальной физиологии развития пола. Джост писал по этому поводу: «Становление мужского организма – это длительное, нелегкое и рискованное предприятие, своего рода борьба против имманентного стремления к женственности». Известно по меньшей мере 19 различных дефектов генов, аутосомно-рецессивных или сцепленных с X-хромосомой, которые вызывают нарушения дифференцировки внешних и внутренних мужских половых признаков. Например, нарушенными могут быть и синтез андрогенов и синтез хорионического гонадотропина, могут отсутствовать рецепторы для этого гормона на клетках Лейдига; дефектными могут оказаться и пять ферментов, участвующих в синтезе тестостерона. Причиной аномалий может быть и нечувствительность клеток вольфовых протоков или мочеполового синуса к тестостерону или 5-дигидротестостерону вследствие дефектов рецепторов.

Пути биосинтеза тестостерона и соответствующие генетические блоки приведены на рис. 4.73. В левой части рисунка (G, F) показаны нарушения, характерные для адреногенитальных синдромов у женщин, но не для псевдогермафродитизма у мужчин. Нарушения, обозначенные А (наследственная липоидная гиперплазия надпочечников), изучены мало; такие индивиды с мужским генотипом не только имеют женские наружные половые органы, но также страдают от сильных нарушений солевого обмена. Это справедливо и для блока В. В правой части рисунка показаны нарушения, которые вызывают псевдогермафродитизм.



Рис. 4.73. Пути биосинтеза тестостерона и эстрадиола и их генетические дефекты [1068a].

дитизм различной степени, не сопровождающийся другими проявлениями адреногенитального синдрома.

Особого внимания заслуживает аутосомно-рецессивный признак - дефект 5- α -редуктазы (не показан на рис. 4.73). В норме этот фермент восстанавливает тестостерон до 5- α -дигидротестостерона в клетках мочеполювого синуса. При его отсутствии развиваются нормальные мужские внутренние половые органы (семенные пузырьки, простата), а также вторичные мужские половые признаки, включая развитие мускулатуры, характер волосяного покрова и т.д., за исключением внешних половых органов, которые при поверхностном обследовании можно принять за женские. Отсюда название псевдовагинальная перинеоскротальная гипоспадия (26460).

Эти дефекты ферментов встречаются редко. Существуют более частые синдромы, при которых андрогены не изменены, но соответствующие ткани-мишени полностью или частично невосприимчивы к ним.

Синдром тестикулярной феминизации (31370) [1114]. При рождении эта аномалия никак не проявляется; больные выглядят как обычные девочки и в детском возрасте аномалию обычно удается идентифицировать, только если при паховых грыжах обнаруживаются семенники. Больные с таким синдромом имеют мужской кариотип, и мужские гонады. Термин «тестикулярная феминизация» был предложен Моррисом в 1953 г. [1220]. С наступлением половой зрелости отмечается аменорея, а в большинстве случаев обращает на себя внимание также полное или частичное отсутствие подмышечных волос, волос в области лобка и на теле. У взрослых рост и пропорции типично женские, хотя ноги часто несколько длиннее. Молочные железы хорошо развиты. Пропорции тела таких индивидов соответствуют скорее современным представлениям о женской красоте, чем среднему телосложению, поэтому неудивительно, что больные неоднократно встречались среди манекенщиц.

Влагалище обычно укорочено и заканчивается слепым мешком. Вместо матки часто имеются остатки мюллеровых протоков, а вместо фаллопиевых труб можно найти мышечно-волокнистый тяж. Семенники локализируются в больших половых губах, паховом канале или в брюшной полости, и могут содержать нормальное или даже увеличенное количество клеток Лейдига, продуцирующих гормоны. Сперматогенез обычно отсутствует. Иногда наблюдаются злокачественные опухоли семенников.

У больных андрогены секретируются в нормальных количествах, в особенности тестостерон, и потому можно было бы

ожидать нормального мужского развития. Наиболее очевидное объяснение механизма этой болезни, которое приводилось в течение многих лет, заключается в ненормальной конечной реакции органов на гормон. Недавно был обнаружен дефект рецепторов андрогенов [1359]. Это подтвердилось в различных экспериментах: например, лечение тестостероном не позволяет добиться изменений в голосе, росте бороды, гипертрофии клитора или (у больных мышей) индукции алкогольдегидрогеназы в почках. Психологическое развитие при тестикулярной феминизации происходит целиком по женскому типу. В настоящее время получены данные, указывающие, что взаимодействие андрогенов и их рецепторов влияет на развитие мозга, электроэнцефалограмму и поведение (разд. 8.2.2.3).

Многие случаи таких отклонений встречаются чисто случайно, однако иногда наблюдаются семейные корреляции, при этом обнаруживается наследование от здоровых женщин и дополнительные случаи среди сестер матерей (матроклинные тетки пробандов). Это позволяло предположить мутацию, сцепленную с X-хромосомой. Однако, поскольку репродукция у больных полностью нарушена, не удавалось получить и окончательных доказательств сцепления с X-хромосомой, т.е. наблюдать наследование признака от гемизиготы всеми дочерьми, но не сыновьями. Поэтому нельзя исключить ограниченного полом проявления аутосомно-доминантного гена. Однако, в 1971 г. у мыши была обнаружена мутация с очень близким фенотипом [1025], которая явно была сцеплена с X-хромосомой. X-хромосома млекопитающих остается эволюционно стабильной, расположенные в ней гены являются гомологичными у всех до сих пор изученных видов млекопитающих [156]. Более того, рецепторы тестостерона можно обнаружить также в фибробластах, причем гетерозиготы имеют две разные популяции фибробластов - нормальную и неспособную связывать тестостерон, как это предсказывалось гипотезой Лайон [985]. Таким образом, сцепление с X-хромосомой можно считать установленным. Любопытно, что Паттерсон и Бонньер, основываясь на анализе родословных, еще в 1937 г.



предполагали (тогда определение пола по генотипу было еще невозможно), что больные являются генотипически мужчинами и признак либо наследуется сцепленно с X-хромосомой, либо ограничен полом. В результате новых мутаций могут появляться спорадические случаи, давление отбора в этом случае довольно значительное, больные бесплодны, поэтому можно ожидать обнаружения многочисленных новых мутаций (разд. 5.1.3).

Генетическая гетерогенность Полипептидные гормоны, такие как инсулин, связываются с рецепторами, расположенными на мембранах клеток-мишеней (разд. 3.8.14). С другой стороны, стероидные гормоны, как например, тестостерон, после проникновения в клетку путем диффузии связываются с цитоплазматическими рецепторами. На рис. 4.74 показан путь тестостерона и дигидротестостерона в клетке, начиная со связывания с цитоплазматическим 8S-рецептором, через 4S-рецепторный комплекс к 5S-

рецепторному комплексу, который транспортируется в ядро. Большинство мутаций, приводящих к тестикулярной феминизации, затрагивают 8S-рецептор. Вполне вероятно, что мутантными могут быть 4S- и 5S-комплексы. Действительно, зарегистрированы случаи тестикулярной феминизации, при которых 8S-рецептор нормален. Кроме того, известны больные с неполной тестикулярной феминизацией, для которых характерно наличие интерсексуальных гениталий. При этом 8S-рецепторы, хотя и обнаруживаются, но в меньшем количестве.

Мы коснулись лишь немногих генетических нарушений определения пола у мужчин. Известно много других, которые согласуются с теоретической концепцией становления пола и благодаря которым мы составили себе представления об этом процессе. Даже у фенотипически нормальных мужчин иногда встречаются генетические дефекты, вызывающие стерильность, например, нарушение формирования из половых клеток жизнеспособных сперматозоидов [1032].

5. Мутации

5.1. Спонтанные мутации

Самое важное свойство генов - их способность передаваться неизменными от поколения к поколению. Однако, если бы генетический материал никогда не менялся, была бы невозможна эволюция. Поскольку существуют убедительные доказательства общности происхождения всех живых существ, обитающих на нашей планете, гены - носители генетической информации - должны обладать способностью к случайным изменениям. Такие изменения действительно происходят; их называют мутациями.

Еще в незапамятные времена животноводов и растениеводов было известно, что признаки могут меняться и что такие изменения передаются последующим поколениям. Дарвин очень интересовался этими фактами. Он называл измененные формы «спортами». Например, спортом является так называемая анконская овца. Ее укороченные конечности (хондродистрофия) - результат мутации. Такие овцы были тогда очень популярны среди фермеров, поскольку они не могут перепрыгивать через изгороди.

Термин «мутация» был введен Де Фризом (1901) [см. 7] для обозначения случайных генетических изменений у *Oenothera lamarckiana*. Изучая это растение, Де Фриз впервые наблюдал внезапное и генетически стабильное изменение в контролируемых условиях эксперимента. Впоследствии было показано, что довольно частое возникновение мутаций у растений этого вида обусловлено одной особенностью кариотипа: их хромосомы соединены своими концами; в пахитене они образуют сложную структуру, а в метафазе происходит закономерное распределение их центромер. Этот механизм иногда не срабатывает, что приводит к фенотипическим изменениям, которые Де Фриз называл «мутациями».

5.1.1. Генетические изменения, обусловленные мутациями *de novo*

Различают следующие типы мутаций:

- а) *геномные мутации*, приводящие к изменению числа хромосом. Геномные мутации часто возникают у растений. При этом может происходить умножение целых наборов хромосом (полиплоидия) или же увеличение (трисомия) или уменьшение (моносомия) числа отдельных хромосом;
- б) *хромосомные мутации* (см. разд. 2.2), при которых нарушается структура хромосом, а их число в клетке остается неизменным. Хромосомные мутации можно обнаружить при микроскопическом исследовании.
- в) *генные мутации*, не приводящие к выявляемым с помощью микроскопа изменениям хромосом; эти мутации можно обнаружить только путем генетического анализа фенотипических изменений (см. разд. 3.6).

Изучение мутаций у человека на уровне белков и ДНК (особенно мутаций гемоглобиновых генов) внесло большой вклад в понимание их молекулярной природы. Результаты этих исследований и результаты анализа структуры хромосом высокоразрешающими методами дифференциального окрашивания привели к размытию грани между хромосомными и генными мутациями. Мы знаем теперь, что делеции и инсерции возможны и на молекулярном уровне и что неравный кроссинговер может изменять микроструктуру [748]. Методы дифференциальной окраски позволили выявлять под микроскопом прежде неразличимые хромосомные перестройки. Следует помнить, что изменения хромосом, обнаруживаемые при дифференциальном окрашивании, отличаются на несколько порядков

от таких изменений, как делеции структурных генов. Поэтому разграничение структурных хромосомных aberrаций и генных мутаций полезно для практических целей.

Клетки, в которых возникают мутации. Кроме типа генетического повреждения, чрезвычайно важна его локализация. Мутации могут происходить и в половых, и в соматических клетках. Те из них, которые возникают в половых клетках, передаются индивидам следующего поколения и, как правило, обнаруживаются во всех клетках потомков, ставших их носителями. Соматические мутации можно обнаружить только в потомстве соответствующей мутантной клетки, что приводит к «мозаичности» особи. Фенотипические последствия будут проявляться только в том случае, если эти мутации препятствуют осуществлению специфических функций, свойственных данным мутантным клеткам.

Частоты мутаций. Один из параметров, наиболее часто используемых при изучении мутационного процесса, - частота возникновения мутаций (или скорость мутирования). Применительно к человеку она определяется как вероятность осуществления мутационного события за время жизни одного поколения. Как правило, при этом имеют в виду частоту мутаций в оплодотворенных яйцеклетках. Вопрос о частотах мутаций в соматических клетках обсуждается в разд. 5.1.6.

5.1.2. Геномные и хромосомные мутации у человека

5.1.2.1. Частота возникновения мутаций (скорость мутирования)

Методы оценки. Чтобы оценить частоту возникновения мутаций, необходимо подсчитать число тех случаев, когда какойлибо признак или наследственная болезнь не обнаруживаются у родителей и других членов семьи пробанда (т. е. число спорадических случаев). Точно оценить частоту хромосомных aberrаций стало возможно после того, как Курт Браун [42] предложил изучать популяционные выборки, например выборки новорожденных. Частота мутации рассчитывается по простой формуле:

$$\mu = \frac{\text{Число спорадических случаев проявления данной аномалии}}{2 \times \text{Число обследованных индивидов}}$$

Этот так называемый прямой метод может применяться как для признаков, детерминированных одним геном, так и в случае геномных и хромосомных мутаций.

Когда эта оценка основана на данных о сериях новорожденных, ее следует считать заниженной, так как в ней учтены лишь те мутации, носители которых выживают к моменту рождения. У человека же, равно как и у других млекопитающих, преобладающее большинство геномных и хромосомных мутаций летально и обуславливает гибель зиготы.

Частота возникновения геномных мутаций. Данные об аномалиях по числу половых хромосом и аутосом, выявленных в семи разных исследованиях новорожденных, приведены в табл. 5.1 и 5.2. Эти аномалии, за исключением синдрома Тернера, нескольких случаев хромосомного мозаицизма и транслокаций (см. раздел 5.1.6), возникают в результате нерасхождения хромосом в первом или втором делении мейоза в гонадах одного из родителей. Их носители - мутанты de novo. В табл. 5.3 даны оценки частот возникновения мутаций.

Более низкие значения частот в случае трисомий по хромосомам 13 и 18 по сравнению с трисомией по 21-й хромосоме, по-видимому, не отражают реальной ситуации; большая часть эмбрионов с трисомиями по 13-й и 18-й хромосомам гибнет на ранних стадиях развития (см. обсуждение вопроса о хромосомных aberrациях у спонтанно абортированных плодов в разд. 2.2.4).

Частота возникновения хромосомных мутаций. Данные о числе структурных аномалий аутосом приведены в табл. 5.2. В тех работах, в которых они были получены, применялся стандартный метод окрашивания ацетоорсеином. Последующие исследования с использованием методов дифференциальной окраски дали несколько большие частоты сбалансированных реципрокных

Таблица 5.1. Частота аномалий по половым хромосомам в семи популяционных выборках [1581]

Кариотип	Число	Частота × 1000
47, ХУУ	28	0,81
47, ХУУ мозаики	7	0,20
47, ХХУ	33	0,96
47, ХХУ мозаики	6	0,17
♂ 46, ХХ	2	0,06
♂ 45, Х/46, ХУ	1	0,03
46, Х, inv (Y)	9	0,26
45, Х	2	0,10
45, Х мозаики	6	0,29
47, ХХХ	20	0,98
47, ХХХ мозаики	4	0,20

Общий объем выборок ♀ 20 370, ♂ 34 379, ♀ + ♂ 54 749

Выборки взяты в Эдинбурге (Великобритания), Онтарио (Канада), Виннипеге (Канада), Бостоне (США), Москве (СССР) и Орхусе (Дания).

Таблица 5.3. Частота геномных мутаций по результатам изучения новорожденных [1581]

Аномалия	Расчет	Частота мутаций
Трисомии по половым хромосомам	39	$5,67 \times 10^{-4}$
ХХУ, включая	$2 \times 34\,379$	
ХХХ мозаиков	24	$5,89 \times 10^{-4}$
	$2 \times 20\,370$	
ХХУ и ХХХ вместе (нерасхождение X)		$5,8 \times 10^{-4}$
ХУУ, включая мозаиков (нерасхождение Y)	35	$5,09 \times 10^{-4}$
Трисомии по аутосомам	$2 \times 34\,379$	
47, +21	63	$5,8 \times 10^{-4}$
	$2 \times 54\,749$	
47, +18	8	$7,3 \times 10^{-5}$
	$2 \times 54\,749$	
47, +13	3	$2,7 \times 10^{-5}$
	$2 \times 54\,749$	

Таблица 5.2. Частота аутосомных аномалий (геномных и хромосомных мутаций) у 54749 новорожденных [1581]

Кариотип	Число	Частота × 1000
47, +13	3	0,05
47, +18	8	0,15
47, +21	63	1,15
47, + «ломкая» хром.	12	0,22
47, + «ломкая» хром., мозаики	5	0,09
Делеции	5	0,09
Инверсии	7	0,13
D/D-транслокации	43	0,79
D/G-транслокации	11	0,20
Реципрокные транслокации	47	0,85
Несбалансированные Y-аутосомные транслокации	2	0,04

транслокаций и особенно инверсий, однако и их значения относительно невелики [1476; 1582]. Делеции можно считать мутациями de novo. Соответствующий расчет дает оценку их частоты, равную $4,57 \times 10^{-5}$. Что же касается различных транслокаций, то в таблице не показано, сколько из них возникло de novo. Поэтому такого рода данные не могут быть использованы для вычисления частоты возникновения мутаций. Джекобс и др. [1500; 1502], основываясь на менее обширном материале, получили следующие оценки частот аберраций: $1,9 \times 10^{-4}$ – $2,2 \times 10^{-4}$ для всех сбалансированных перестроек (транслокаций и инверсий) вместе; $3,24 \times 10^{-4}$ для несбалансированных робертсоновских транслокаций и $3,42 \times 10^{-4}$ для несбалансированных неробертсоновских перестроек. Эти частоты рассчитаны из данных о пробандах, «доживших до стадии распознаваемой беременности», т. е. включая абортусов. Они представляют потенциальный интерес, так как именно структурные аберрации хромосом у новорожденных весьма перспективны для использования в будущих программах мониторинга популяций на возможное увеличение темпа мутирования в результате действия мутагенных факторов, например, ионизирующей радиации. Было бы интересно сопоставить частоты для отдельных, определенных транслокаций, однако в настоящее время мы располагаем лишь предварительными оценками, осно-

ванными на весьма ограниченном материале [1491, 1500].

Частоты как геномных, так и хромосомных мутаций, оказываются выше при расчете из данных амниоцентеза, что свидетельствует об абортировании значительного числа плодов за период между 16-17 неделями беременности (время проведения амниоцентеза) до момента рождения [1665; 1496].

5.1.2.2. Нерасхождение хромосом и возраст матери

Статистические данные. Чем старше родители, тем больше вероятность рождения у них ребенка с синдромом Дауна. Этот факт известен уже много лет. На рис. 5.1 представлены частоты новорожденных с синдромом Дауна у матерей из разных возрастных групп. До 29 лет величина риска изменяется незначительно, однако начиная с 35-39, лет кривая круто идет вверх. Табл. 5.4 характеризует существовавшие до недавнего времени представления о риске в различных возрастных группах женщин. Данные амниоцентеза у женщин старше 35 лет показали, что оценки риска возникновения трисомии по 21-й хромосоме занижены. Ведь старые статистические данные были собраны до наступления хромосомной эры. Смещение оценок, по-видимому, связано с не всегда правильной постановкой диагноза или с большей вероятностью мертворождений для детей с синдромом Дауна. Вряд ли, однако, это смещение очень значительно: оценки, рассчитанные из старых данных, хорошо согласуются с оценками, основанными на материалах популяционно-цитогенетических исследований (табл. 5.2). Различия частот, еще более выраженные в случае трисомии по 13-й и 18-й хромосомам [1496], можно объяснить эмбриональной смертностью за период от проведения амниоцентеза ($\approx$ 16-17 недель беременности) до родов. Последние данные свидетельствуют о действительном увеличении риска рождения ребенка с трисомией для матерей в возрасте от 35 лет и старше. В печати появились сообщения об определенном выравнивании кривой риска рождения трисомиков при переходе к самой старой возрастной группе (матери в возрасте от 46 до 49 лет). Однако материалы одного весьма обстоятельного исследования не подтверждают этого результата [1494].

Возрасты матерей и отцов обычно коррелируют: чем старше жены, тем, как правило, старше их мужья. Вот почему без специального анализа мы не можем ответить на вопрос, связано ли увеличение риска возникновения трисомии с возрастом отцов, матерей или обоих родителей. В случае синдрома Дауна, возрастание риска, как показал еще в 1933 г. Пенроуз, обусловлено увеличением возраста матери [1590]. Основываясь на данных о 150 случаях, в которых известен и возраст матери, и возраст отца, он получил следующие частные коэффициенты корреляции:

- а) частную корреляцию между возрастом матерей и частотой детей с синдромом Дауна при постоянном возрасте отцов $r = +0,221$;
- б) частную корреляцию между возрастом отцов и частотой синдрома Дауна у их детей $r = -0,011$.

Вычисление частных корреляций позволяет оценить корреляции между двумя переменными, исключив влияние третьей. Пенроуз провел анализ тех же данных с использованием метода регрессии и получил практически такой же результат.

Действительно ли степень риска определяется только возрастом матери? Эффект возраста матери признавался и неоднократно подтверждался на протяжении 50 лет. Однако несколько лет назад были опубликованы данные, свидетельствующие о некотором влиянии возраста отца, дополняющем влияние возраста матери [1646]. Речь идет об изучении 224 пациентов с синдромом Дауна, родившихся в Дании между 1960 и 1971 годами, 176 из которых были идентифицированы с помощью цитогенетических методов как трисомии по 21-й хромосоме. Эту выборку сравнивали с контрольной – 6053 отобранными случайным образом индивидами, родившимися в той же стране и в тот же период времени, а также с выборками, описанными в литера-

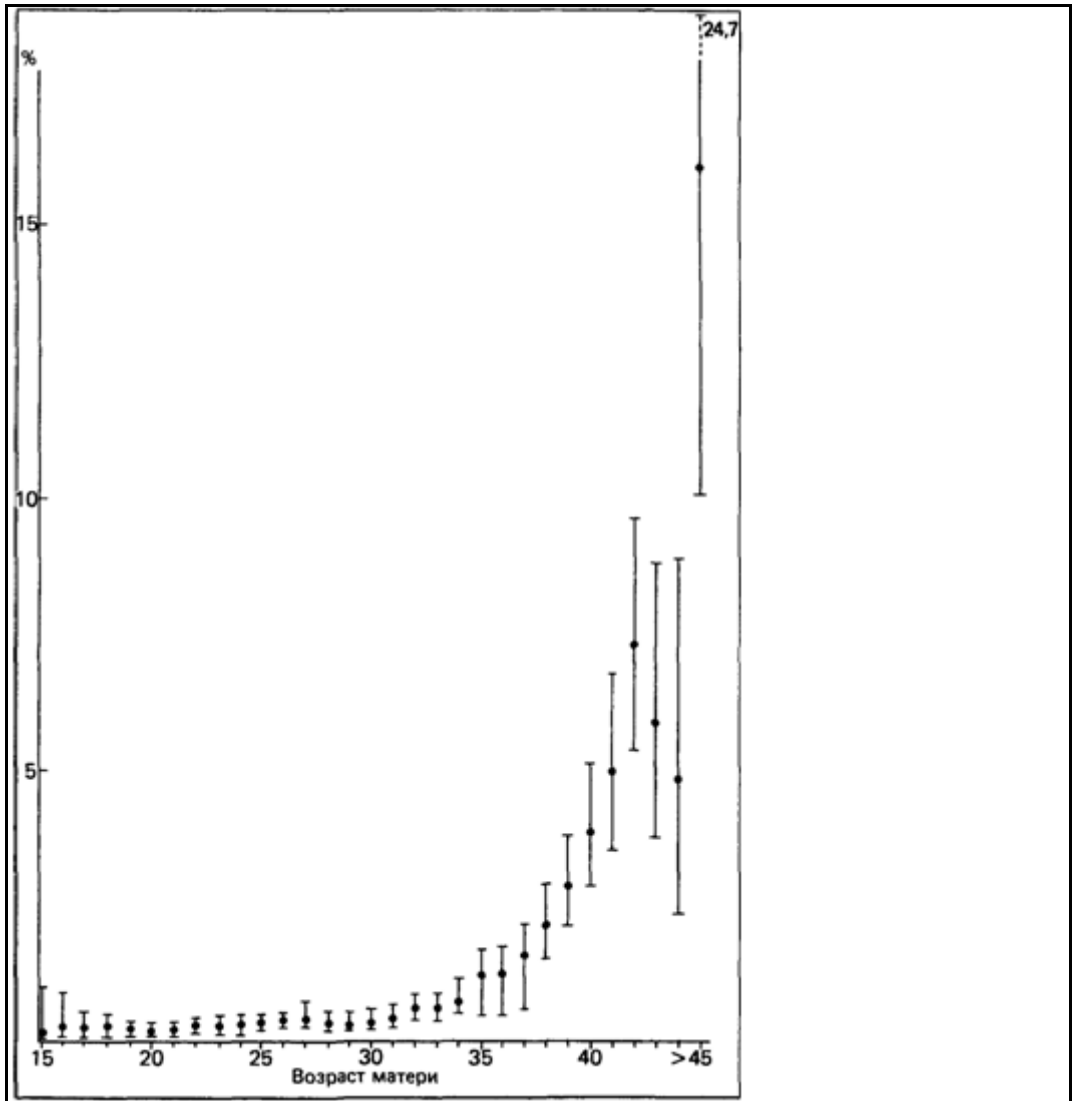


Рис. 5.1. Частота новорожденных с синдромом Дауна (с указанием 95%-ных доверительных интервалов). (По Upstate New York, 1963-1974; Hook and Chamber, Birth Defects Orig. Art. Ser. Vol. 13, 1977.) (933 случая на 1 729 909 живорожденных)

туре. Получены следующие результаты:

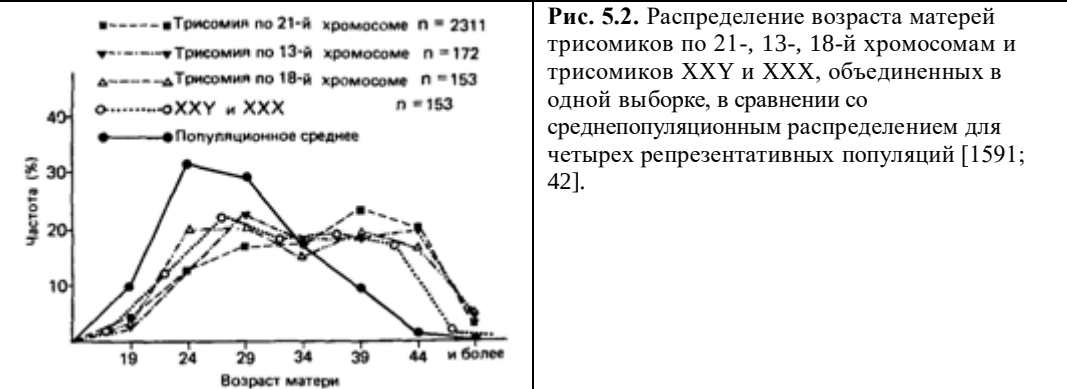
- 1) риск иметь детей с синдромом Дауна значительно повышен для мужчин от 55 лет и старше;
- 2) почти во всех крупных выборках, изучавшихся в опубликованных работах, эта трисомия связана со случаями, когда возраст отца сильно превышает возраст матери.
- 3) при сравнении пациентов и контроля методом частной корреляции по отдельным группам, выделенным в соответствии с возрастом матерей, было обнаружено, что доля отцов детей с синдромом Дауна возрастает, хотя и незначительно, с увеличением возраста отцов. Этот вывод подвергается все новым и новым проверкам, приводящим к проти-

Таблица 5.4. Частота детей с синдромом Дауна у матерей различного возраста, зарегистрированная во время родов (числа живорожденных у матерей определенных возрастов) и при проведении амниоцентеза [90] ¹⁾						
Возраст матери	При рождении		При амниоцентезе			
	Синдром Дауна		Синдром Дауна		Все хромосомные aberrации	
	число на 1000	частота (округленно)	число на 1000	частота (округленно)	число на 1000	частота (округленно)
30 лет	1,4	1/700	д.о. ²⁾	д.о.	д.о.	д.о.
35 лет	2,2	1/450	3,9	1/250	8,7	1/115
37 лет	4,0	1/250	6,4	1/150	12,1	1/80
39 лет	6,5	1/150	10,4	1/100	18,4	1/50
41 год	12,5	1/80	16,9	1/60	29	1/35
43 года	20	1/50	27,4	1/35	45	1/20
Все возрасты	1,5	1/650	д.о.	д.о.	д.о.	д.о.
¹⁾ Данные по Швеции, Австралии и Уэльсу (Великобритания).						
²⁾ д.о. – данные отсутствуют.						

воречивым результатам. Например, данные по Японии [1550], Западной Германии [1647] и Норвегии [1444] подтверждают существование эффекта отцовского возраста (дополняющего гораздо более сильный эффект возраста матери). Данные же по Швеции [1443], штату Нью-Йорк [1493] и Франции [1606] не согласуются с выводом о существовании такого эффекта. Эти противоречия привели к обширной дискуссии относительно адекватности соответствующих статистических методов. С другой стороны, в недавней работе с использованием хромосомных маркеров было показано, что нерасхождение 21-х хромосом связано с отцами приблизительно в 20% всех случаев трисомии по данной хромосоме [1503].

Справедливо ли мнение о повышенном риске для детей очень молодых матерей? Выдвигался тезис, что синдром Дауна встречается с повышенной частотой также и у детей очень молодых матерей. Однако данные на этот счет довольно противоречивы. В старых работах, на основе вполне достоверных данных, было показано, что в возрастных группах женщин моложе 20 лет частота рождения детей с синдромом Дауна ниже, чем в группе 20-24-летних [1532]. В некоторых канадских, шведских и датских выборках, изучавшихся в последнее время, частота таких детей у матерей из самой молодой возрастной группы несколько выше, чем у матерей следующей группы [1527]. Рис. 5.1 демонстрирует это увеличение риска, особенно заметное в случае 17-18-летних и более молодых матерей.

Пенроуз [1591] исследовал зависимость абсолютных частот больных детей от возраста матерей. На рис. 5.2 представлены частоты трисомиков по 21-й, 18-й, 13-й хромосомам, а также детей с генотипами ХХУ и ХХХ у матерей из разных возрастных групп. Проведено сравнение этих



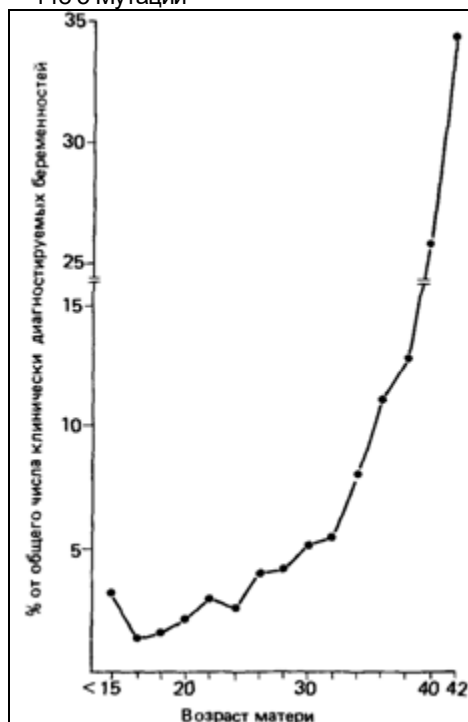


Рис. 5.3. Частота случаев трисомий среди всех клинически диагностируемых беременностей, включая спонтанные аборт, исходя из предположения, что частота спонтанных абортов составляет 15% [1481]

частот с распределением материнских возрастов в четырех репрезентативных популяциях. В отличие от общепопуляционного, явно унимодального распределения, распределение матерей трисомиков обнаруживает отчетливые признаки двувёршинности. Это свидетельствует о смещении зависимой и независимой от возраста групп, что подтверждается и другими данными (см. разд. 5.1.2.4).

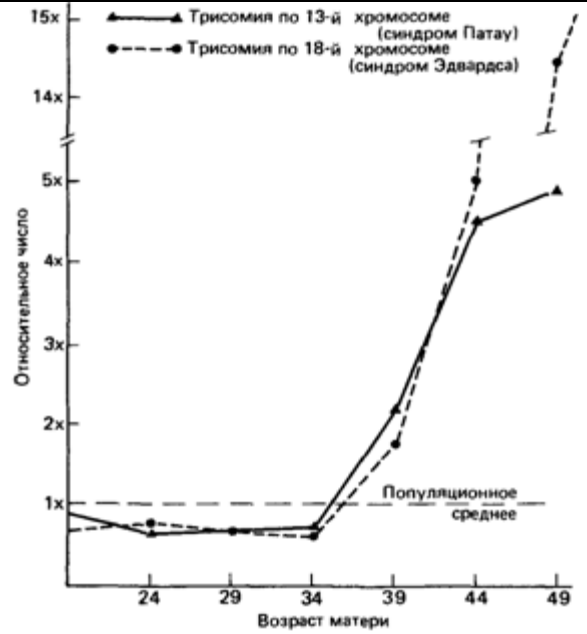
Зависимость частоты трисомий от возраста матери. Рис. 5.3 иллюстрирует влияние материнского возраста на частоту различных трисомий среди всех клинически диагностируемых беременностей (то есть у живорожденных и спонтанных абортусов) при предположении, что частота спонтанных абортов составляет 15%. Как мы видим, существует сильный эффект возраста матери: у женщин старше 42 лет около одной трети всех клинически диагностируемых зачатий аномальны. Если предполагать, что нерасхождение приводит к возникновению равного числа моносомных и трисомных зигот, то можно считать, что большинство ооцитов у женщин старших возрастов анеуплоидны.

Эффект возраста матери в случае некоторых трисомий. Относительные частоты трисомиков по 13-й и 18-й хромосомам у матерей разных возрастов представлены на рис. 5.4, а относительные частоты детей с синдромами, обусловленными нерасхождением X хромосомы (XXY и XXX), — на рис. 5.5. Об эффекте материнского возраста можно говорить также и при трисомии по 9-й хромосоме, поскольку один из чрезвычайно редких случаев этой трисомии, диагностированных с помощью амниоцентеза, обнаружен при обследовании сорокалетней женщины [1455]. Большинство трисомий, выявленных при изучении материала спонтанных абортусов, чаще встречаются среди детей женщин старших возрастов (табл. 5.5). Однако для больших хромосом этот эффект мал и недостоверен. В случае самой распространенной из трисомий по хромосомам меньших размеров, для которых обычно обнаруживается значимый эффект, — трисомии по 16-й хромосоме эффект хотя и достоверен, но невелик. В ранних работах при изучении этой трисомии не было обнаружено вообще никакого влияния материнского возраста. Никаких значимых эффектов такого рода не найдено и для некоторых хромосомных перестроек de novo [1496]. Данные о влиянии возраста матери при синдроме 18p-, к сожалению, пока не были подтверждены в повторных исследованиях.

Эффект отцовского возраста, изучавшийся для кариотипа XXY, либо мал, либо отсутствует [1410].

5.1.2.3. У какого пола и в каком из мейотических делений происходит нерасхождение хромосом?

Рис. 5.4. Эффект возраста матери в случае трисомий по 13-й и 18-й хромосомам [212]



1. У кого преимущественно происходит нерасхождение хромосом в мейозе, у мужчин или у женщин?

2. В каком именно делении мейоза оно происходит, в первом или во втором?

Поскольку эффект родительского возраста связан, как показано выше, исключительно или (если верить некоторым дискуссионным данным) преимущественно с матерями, напрашивается вывод, что большинство наблюдавшихся случаев нерасхождения хромосом произошло в женском зародышевом пути. Однако, согласно результатам исследований, в которых использовались

Рис. 5.5. Эффект возраста матери в случае синдромов, обусловленных нерасхождением X-хромосом. трисомий ХХУ и ХХХ вместе (по данным о 153 трисомиках, родившихся в Великобритании) [42]

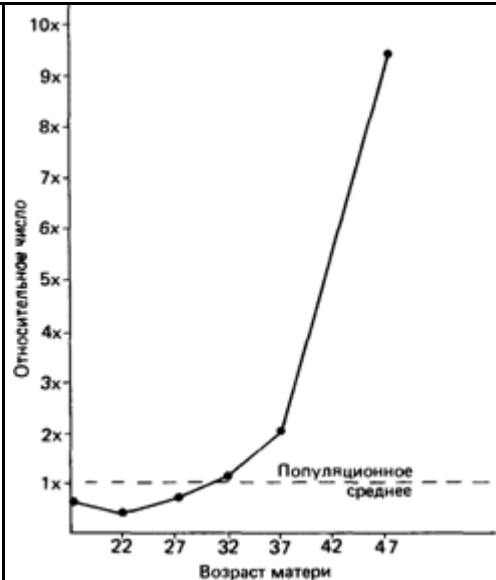


Таблица 5.5. Возраст матери (среднее $\pm$ стандартное отклонение) в двух выборках спонтанных абортусов (Нью-Йорк: 372 выкидыша 46, XX или XY, 190-47, XX или XY; Гавайи: 418-46, XX или XY; 172-47, XX или XY) [1480]

46, XX или XY новорож- денные	47, +2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
25,8 25,0	28,3 $\pm 6,2$	25,5 $\pm 6,4$	27,9 $\pm 6,2$	22,0	24,0 $\pm 4,2$	30,2* $\pm 6,7$	24,6 $\pm 4,9$	29,0 $\pm 6,9$	31,8 $\pm 7,7$	25,0	26,6 $\pm 7,0$
46, XX или XY абортусы	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
26,7 $\pm 6,2$	29,2 $\pm 5,6$	25,6 $\pm 7,4$	31,0*** $\pm 6,3$	28,2* $\pm 5,3$	32,8 $\pm 8,6$	33,3*** $\pm 5,6$		33,8*** $\pm 5,5$	30,0** $\pm 7,0$	31,7*** $\pm 5,3$	

Цифры сверху столбцов обозначают номера хромосом.
 Звездочками обозначены случаи статистически достоверных различий между возрастом матерей нормальных и трисомных абортусов: * $P = 0,005$; ** $P = 0,01$; *** $P = 0,001$.

маркеры, сцепленные с X-хромосомой, для X-хромосомы этот вывод не верен.

Данные по X-хромосоме, полученные в исследованиях с использованием сцепленных с ней маркеров. Принцип, позволяющий установить генезис трисомной половой клетки, проиллюстрирован на рис. 5.6. Проанализируем случай, когда дейтероаномальный пациент с синдромом Клайнфельтера - сын дейтероаномальной матери и отца с нормальным цветовым зрением. Трисомная половая клетка предположительно происходит от матери, гомозиготной по аллелю дейтероаномалии. Мы не можем сказать, когда произошло нерасхождение - в первом или втором делении мейоза. Выбор между этими альтернативами становится, однако, возможным, если отец обладает нормальным цветовым зрением, а мать гетерозиготна, как в случае, изображенном на рис. 5.6. Если их сын с синдромом Клайнфельтера страдает цветовой слепотой, нерасхождение, очевидно, произошло во втором делении мейоза, в котором осуществилось нормальное разделение сестринских хроматид одних и тех же хромосом.

Такой же в принципе ход рассуждений применим при использовании группы крови Xg, сцепленной с X-хромосомой. Рейс и Сэнгер (1969) [846], опубликовавшие обзор данных о нерасхождении при синдроме Клайнфельтера (XXY), пришли к выводу, что 40% нерасхождений произошло в отцовском зародышевом пути - все в первом делении мейоза. 50% имели место в первом и 10%-во втором мейотическом делении у матерей. Во всех четырех случаях XXXY и XXXXY дополнительные хромосомы появились в материнском зародышевом пути; в случаях XXY нерасхождение произошло у отцов.

Среди пациентов XO, информация о типах Xg которых использовалась в этом исследовании, около 74% несут материнскую и около 26%-отцовскую X-хромосому. Вполне возможно, что большинство генотипов XO возникло вследствие потери хромосомы на ранних стадиях развития зиготы, а не по причине нерасхождения в мейозе (разд. 2.2.1). Эти данные совпадают с результатами, полученными на мышах, у которых X-хромосома самцов оказалась особенно уязвимой в течение короткого периода времени после оплодотворения (раздел 5.2.1.3).

Аналогичная аргументация может использоваться при идентификации родительских хромосом на основе данных о хромосомных вариантах, различимых под микроскопом.

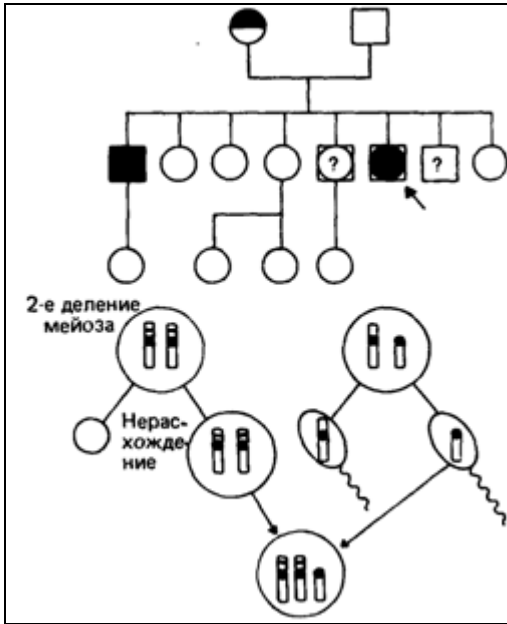


Рис. 5.6. Изучение происхождения трисомных половых клеток по генеалогическим данным. Пациент с синдромом Клайнфельтера (отмечен стрелкой) имеет дейтероаномальное зрение. Его отец обладает нормальным цветовым зрением, а мать должна быть гетерозиготой, так как один из ее сыновей дейтероаномал. Если лишняя хромосома получена от отца, сын с синдромом Клайнфельтера должен быть нормальной гетерозиготой или гомозиготой. Тот факт, что он имеет дейтероаномальное зрение свидетельствует, что обе его X-хромосомы произошли от одной X-хромосомы матери (см. разд. 2.2.3.1). Кроме того, очевидно, что нерасхождение произошло во втором делении мейоза [8].

Прямые доказательства, основанные на данных о хромосомных вариантах. Хромосомы человека обнаруживают постоянный в течение многих поколений уровень индивидуальной изменчивости, известной также под названием гетероморфизма. Общая частота вариантов варьирует приблизительно от 5% до 50%, в зависимости от метода их выявления (разд. 2.1.2.3) [441]. Особенно часто они встречаются в акроцентрических хромосомах групп D и G, что делает эти группы пригодными для использования в исследованиях, посвященных выяснению происхождения хромосом при соответствующих трисомиях. Изменчивость других хромосом, трисомии по которым достаточно жизнеспособны, а именно X и 18-й, мала или не обнаружена. Поэтому ниже мы ограничимся обсуждением данных о трисомии по 21-й хромосоме.

Наблюдаемые варианты можно разделить на хромосомы с удлинненным коротким плечом (ph +), с большим сателлитом (ps +), с удвоенным сателлитом (pss) и с укороченным коротким плечом при наличии или отсутствии сателлита (ph—). Кроме того, существуют различия по интенсивности флуоресценции сателлитов и коротких плеч и различия по размеру прицентромерного гетерохроматинового блока, который можно идентифицировать с помощью С-дифференциального окрашивания.

Использование хромосомных вариантов для идентификации хромосом при нерасхождении. Гетероморфизм может использоваться для установления происхождения определенной хромосомы, т. е. для выяснения того, получена ли она от отца или от матери и где именно произошло нерасхождение – в первом или втором делении мейоза (рис. 5.7). В случае, изображенном на рис. 5.7, А, трисомный ребенок имеет три различные 21-е хромосомы: вариант ph+ (а, заштрихован), нормальную (b, черная) и вариант ph— (с). Изучение родителей показало, что отец гомозиготен по а, а мать гетерозиготна по b и с. Отсюда мы сразу заключаем, что нерасхождение произошло в зародышевом пути матери, так как ребенок несет две материнские и только одну отцовскую хромосомы. Кроме того, нерасхождение, очевидно, произошло в первом делении мейоза, потому что ребенок имеет обе материнские хромосомы. Если бы нерасхождение случилось во втором делении, ребенок получил бы или две хромосомы b, или две хромосомы с. Таким образом, нам удалось установить факт нерасхождения в первом мейотическом делении, происшедшем в яичнике матери.

Часто, однако, ситуация бывает иной, как, например, в случае, изображенном на рис. 5.7, Б. Данные, проиллюстрированные на этом рисунке, неинформативны. На рис. 5.7, В генотипы родителей те же, что и на рис. 5.7, Б. В этом случае дополнительная хромосома, очевидно, получена от ма-

тери и могла появиться только в результате нерасхождения во втором мейотическом делении.

Подобным же образом можно оценить доли информативных и неинформативных ситуаций при нерасхождении в первом и втором мейотических делениях для всех возможных типов брака [1526].

Полученные результаты показывают, что нерасхождение происходит как в 1-м, так и во 2-м делениях мейоза (табл. 5.6). Заметим, что 20% всех случаев синдрома Дауна обусловлено нерасхождениями у отцов, из которых две трети возникло в результате ошибки в 1-м делении мейоза, а одна треть - вследствие ошибки во 2-м мейотическом делении. Преобладающее большинство случаев материнского происхождения, составляющих 80%, возникло вследствие нерасхождения в 1-м делении мейоза.

Эти данные были скорректированы с учетом систематической ошибки, приводящей к повышению вероятности выявления нерасхождений во 2-м делении мейоза [1504, 1526].

Выявление биохимических вариантов позволит увеличить число информативных семей. Для выявления биохимических вариантов можно использовать маркеры, принадлежащие к любым полиморфным системам. Как было показано выше, в случае X-хромосомы учитывали полиморфизм по цветовой слепоте и по группе крови Xg. Описанный подход имеет то преимущество, что он основан на данных о точно идентифицированных аллелях, частоты которых известны. Недавно был получен ДНК-зонд, специфичный для 21-й хромосомы и пригодный для выявления полиморфизма по сайтам рестрикции (ПДРФ). При изучении 25 человек из популяции Лондона частота более редкого аллеля оказалась равной 0,38, а частота гетерозигот - 0,47 [1433].

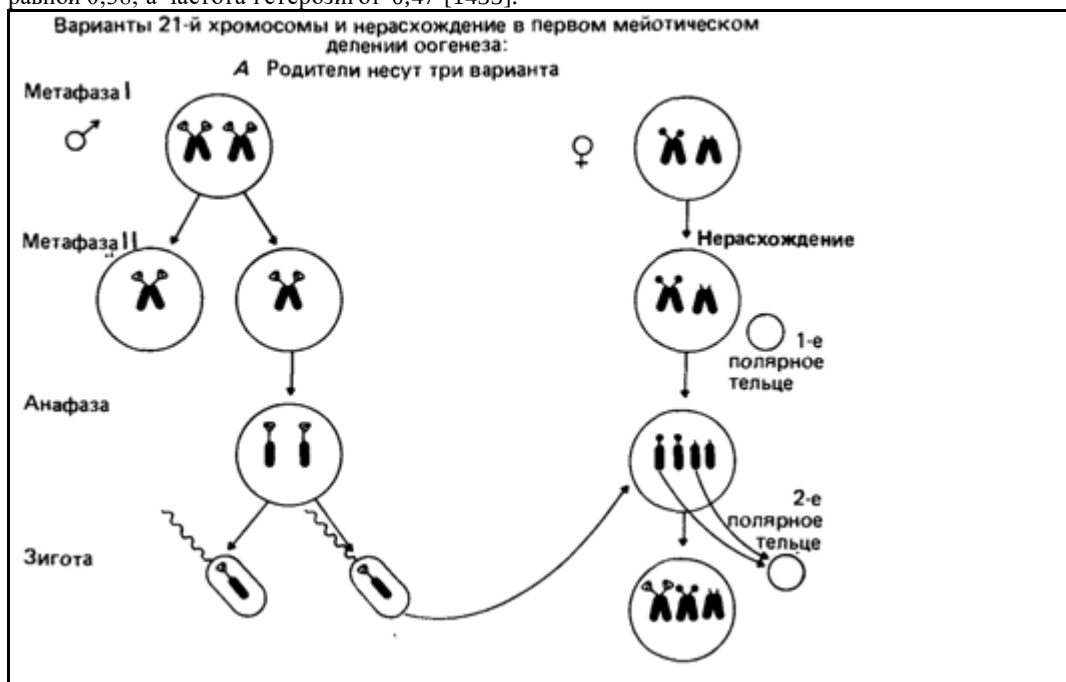
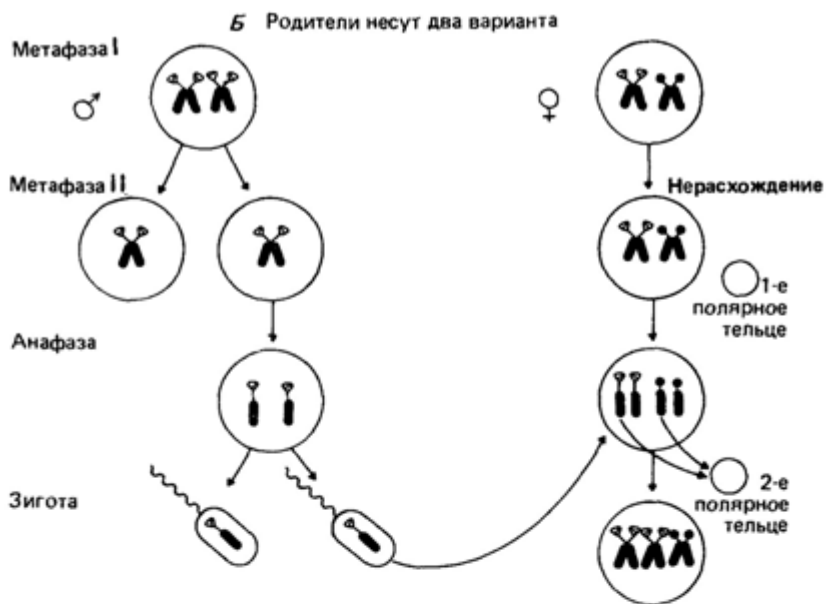


Рис. 5.7. Установление происхождения определенной хромосомы (т.е. выяснение того, у кого произошло соответствующее нерасхождение - у отца или у матери, в первом или во втором делении мейоза). *А.* Трисомный ребенок несет три различающиеся 21-е хромосомы. В данном случае нерасхождение произошло в первом мейотическом делении у матери. *Б.* Нерасхождение произошло в первом делении мейоза. Однако этот случай неинформативен, так как к тому же результату могло привести нерасхождение во втором мейотическом делении у отца. *В.* Нерасхождение произошло в материнском зародышевом пути во втором мейотическом делении.



В Нерасхождение во втором мейотическом делении оогенеза

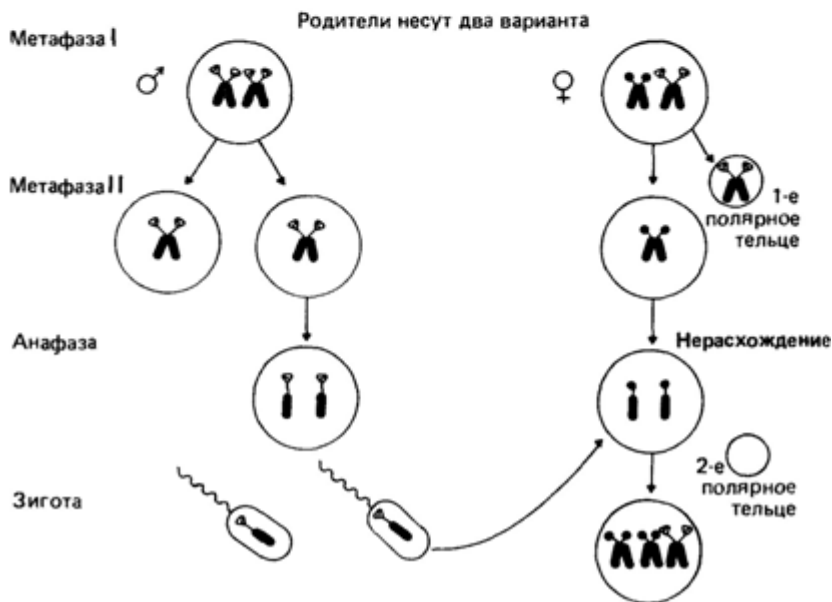


Таблица 5.6. Происхождение дополнительной 21-й хромосомы при синдроме Дауна

	Всего	Происхождение					
		Отцовское			Материнское		
		первое деление мейоза	второе деление мейоза	?	первое деление мейоза	второе деление мейоза	?
Число	391	45	27	4	238	51	26
Процент	100%	11,5%	6,9%	1%	60,9%	13%	6,6%
Процент 1-х делений мейоза		19,4%			{ 15,9% отцовского происхождения 84,1% материнского происхождения		
Процент 2-х делений мейоза		72,4%					
		27,6%			{ 34,6% отцовского происхождения 65,4% материнского происхождения		

5.1.2.4. Нерасхождение, хромосомные варианты и сателлитные ассоциации

Получение материала, о котором шла речь в предыдущем параграфе, было возможно только потому, что 21-я хромосома, подобно другим акроцентрическим хромосомам, обнаруживает высокий уровень изменчивости, особенно в области центромеры и короткого плеча. Высказывалось предположение о влиянии этой вариабельности на вероятность нерасхождения, весьма правдоподобное ввиду того, что участки коротких плеч акроцентрических хромосом располагаются близко друг к другу около ядрышка. Их близкое взаиморасположение не разрушается полностью даже при применении грубых методов приготовления препаратов метафаз.

Сателлитная ассоциация. Акроцентрические хромосомы обнаруживают тенденцию располагаться на метафазных пластинках бок о бок; при этом сателлитные участки, как правило, обращены друг к другу [1446]. В проявлении данного феномена существует значительная межиндивидуальная изменчивость. Было высказано предположение, что у индивидов с повышенной частотой сателлитных ассоциаций должна быть выше вероятность нерасхождений. Сущность феномена сателлитной ассоциации проиллюстрирована на рис. 5.8 [1712]. Сателлитные ассоциации изучали у родителей 40 детей с синдромом Дауна и у 81 контрольной пары, использовавшей для сравнения (табл. 5.7). В случае 21-й хромосомы у матерей пробандов обнаружено существенное увеличение частоты сателлитных ассоциаций, а у отцов не обнаружено; заметное, хотя и несколько меньшее, повышение их частоты наблюдалось в случае 14-й хромосомы. В другой работе [1428] также сообщалось о значительной гетерогенности сателлитных ассоциаций у родителей, выявляемых при изучении разных хромосом. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что усиление тенденции к образованию сателлитных ассоциаций повышает вероятность нерасхождений.

В одном недавно опубликованном исследовании [1503] сообщалось о слабом увеличении частоты сателлитных ассоциаций у тех родителей, в зародышевом пути которых произошло нерасхождение. Авторы не обнаружили ее специфического увеличения для хромосом, претерпевавших нерасхождения (например, 21-й хромосомы). Их вывод о том, что роль сателлитных ассоциаций в возникновении нерасхождений незначительна, основывался на том, что трисомии

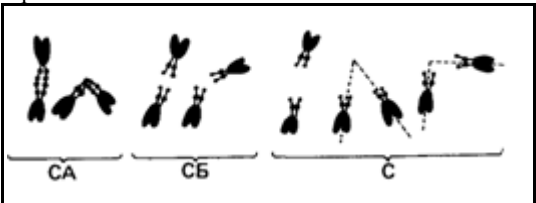


Рис. 5.8. Иллюстрация феномена сателлитной ассоциации. СА – сателлитная ассоциация; СБ – сильно сближены; С – сближены [1712].

Таблица 5.7. Индексы сателлитной ассоциации								
Номер хромосомы	Матери детей с синдромом Дауна (n = 36) Средний ИА"	Контроль (n = 51) Средний ИА ±σ	t	P	Отцы детей с синдромом Дауна (n = 27) Средний ИА ±σ	Контроль (n = 30) Средний ИА +σ	t	P
13	0,34 ± 0,019	0,34 ± 0,012	0,05	> 0,025	0,31 ± 0,020	0,36 ± 0,015	2,02	=:0,05
14	0,37 ± 0,015	0,32 ± 0,013	2,19	<0,05	0,34 ± 0,019	0,34 ± 0,019	0,03	>0,25
15	0,30 ± 0,017	0,29 ± 0,014	0,69	> 0,125	0,30 ± 0,018	0,31 ± 0,019	0,48	>0,25
21	0,48 ± 0,018	0,34 ± 0,017	5,79	< 0,001	0,34 ± 0,025	0,33 ± 0,025	0,30	>0,25
22	0,31 ± 0,015	0,31 ± 0,081	0,10	>0,25	0,30 ± 0,024	0,29 ± 0,025	0,39	>0,25
1) ИА – число ассоциированных хромосом определенного типа, разделенное на общее число хромосом этого типа У каждого индивида изучалось по 50 метафаз (Миккельсен)								

образуются и неacroцентрическими хромосомами, а у родителей, имеющих более одного трисомного ребенка, не обнаружено никакого увеличения частоты сателлитных ассоциаций По нашему мнению, совокупность данных, приводимых в литературе, не дает оснований для заключения о каком-либо влиянии сателлитных ассоциаций на вероятность нерасхождения

Заболевание щитовидной железы и анти тиреоидные антитела. Изменение функции щитовидной железы долгое время считалось фактором риска, благоприятствующим нерасхождению. Еще в 1921 г. Доллинггер опубликовал сообщение о повышенной активности щитовидной железы у матерей, имеющих детей с синдромом Дауна, а позднее Эк (1959) [1441] обнаружил при изучении 41 матери детей с этим синдромом достоверное увеличение у них уровня йода, связанного с белком сыворотки крови (7,1 мг% против 5,9 мг% в контроле) Впоследствии эти результаты не подтвердились, что может объясняться большим временным интервалом между рождением трисомного ребенка и обследованием матери [1583]. Фиалков с соавт (1967) [1447] обнаружили у матерей детей с синдромом Дауна существенно более высокую концентрацию антител, чем в контроле (рис. 5.9) Стимулом к проведению этого исследования послужило клиническое наблюдение, сделанное одним из авторов настоящей книги (А. Мотульски): две обследованные им девушки с синдромом Тернера, связанным с изохромосомами по X-хромосоме, страдали также тиреоидитом Хашимото. Трудно поверить, что это совпадение было случайным

Определенная Фиалковым концентрация анти тиреоидных антител у матерей пожилого возраста была примерно такой же, как и у более молодых Из-за увеличения частоты положительных реакций в контрольной популяции с возрастом, достоверное различие между матерями детей с синд-

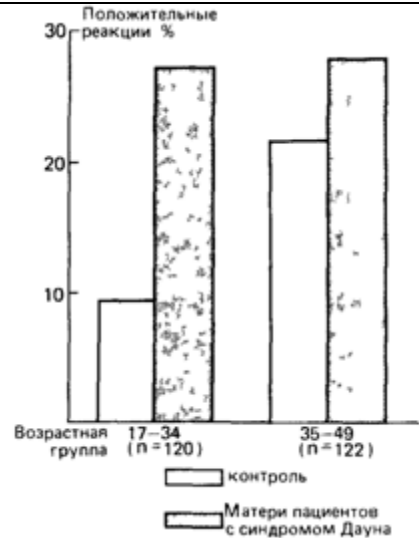


Рис. 5.9. Концентрация анти тиреоидных антител у матерей, имеющих детей с синдромом Дауна, в сравнении с их концентрацией у таких же по возрасту матерей, дети которых не проявляют признаков этого синдрома Достоверное увеличение обнаружено у молодых и не обнаружено у более старших по возрасту матерей детей с синдромом Дауна [1448]

периодичности, правомерны следующие соображения:

1. Во время перехода от неовуляторного периода к овуляторному и наоборот овуляция задерживается. В репродуктивной биологии животных эти переходы соответствуют «восстановительной стадии», в течение которой появляется функциональная готовность к оплодотворению, и «стадии подавления», во время которой способность к размножению падает.

2. У человека, как и у животных, предовуляционное перезревание, вызванное задержкой овуляции, приводит к нерасхождению.

У людей в весенние месяцы могут проявляться следы перехода от неовуляторного периода к овуляторному; осенью может происходить переход от овуляторного периода к неовуляторному; обеим этим стадиям, возможно, свойственна повышенная вероятность нерасхождения. Эта гипотеза остроумно соединяет данные общей биологии с результатами статистической обработки данных по цитогенетике человека. *Увеличивается ли риск возникновения синдрома Дауна вследствие применения оральных контрацептивов?* В ряде популяционных исследований не обнаружено общего снижения частоты синдрома Дауна, чего можно было бы ожидать в связи с уменьшением в последнее время доли женщин, родивших в возрасте старше 35 лет [1556]. По-видимому, это объясняется увеличением числа случаев синдрома Дауна, обусловленных старением матерей. Конечно, данный феномен может быть связан и с более полным выявлением аномальных новорожденных, однако вполне вероятно, что их частота действительно повысилась. Какие же факторы окружающей среды претерпели наибольшие изменения за тот период времени, когда происходил рост этой частоты (т. е. приблизительно с 1960 г. до 1975 г.)? Среди таких факторов - широкое распространение оральных контрацептивов. В разд. 3.8.3 объясняется, каким образом влияют эти противозачаточные средства на частоту рождения дизиготных близнецов. Может ли подобная причина привести к увеличению риска возникновения анеуплоидий? Согласно Кэрру (1967) [1411], у женщин, забеременевших после прекращения приема противозачаточных таблеток, наблюдается повышенная частота триплоидных спонтанных аборт. Этому противоречат результаты других работ; опубликованы данные, свидетельствующие о небольшом и недостоверном увеличении частоты трисомий, связанном с действием указанного фактора, и об отсутствии предполагаемого эффекта [1399; 1438]. В одном недавнем исследовании проводилось сравнение уровня потребления оральных контрацептивов у 103 матерей детей с синдромом Дауна и в такой же по численности и распределению возрастов контрольной группе женщин, имеющих нормальных детей. Оно показало, что матери пациентов с синдромом Дауна не употребляли повышенного количества противозачаточных таблеток ни во время беременности, ни в течение года, предшествующего зачатию [1505]. Однако влияние контрацептивов не обязательно должно быть прямым и непосредственным. Так, понижение частоты дизиготных близнецов (см. разд. 3.8.3), вероятно, вызвано изменением репродуктивного поведения, сопутствующим широкому применению контрацептивов. В прошлом женщины, рожавшие детей в возрасте старше 35 лет, проходили отбор на оплодотворяемость (то есть на способность к зачатию). Однако высокая оплодотворяемость, по-видимому, должна коррелировать с полиовуляцией - необходимым условием появления дизиготных близнецов. Кроме того, можно предположить, что *более низкая* оплодотворяемость коррелирует с более высоким риском нерасхождения.

Мысль о связи оплодотворяемости и нерасхождения вытекает также из данных одного недавно опубликованного исследования, проведенного на мышах [1403]. Односторонняя овариоэктомия привела не только к более раннему окончанию репродуктивного периода, но и к более раннему возникновению анеуплоидий. Экстраполируя полученные результаты на людей, авторы делают вывод, что определяющим фактором процесса нерасхождения является не хронологический возраст женщины, а «временной интервал до приближающейся ме-

нопаузы». Эту гипотезу можно проверить, проведя ретроспективное изучение матерей пациентов с синдромом Дауна.

В экспериментах на мышах увеличение анеуплоидий в ооцитах на стадии метафазы II после обработки норэтистеронацетатом происходило только при очень высоких дозах этого гормона и сразу после его удаления. Из таких результатов оптимист сделал бы вывод, что оральные контрацептивы не увеличивают риск возникновения хромосомных аномалий. Однако эти данные не дают оснований для бесспорного отрицательного заключения, исключающего всякое сомнение в его правильности.

5.1.3. Генные мутации: анализ на фенотипическом уровне

Почти все трисомии, обнаруженные в популяциях человека, возникли в результате мутаций *de novo*. Больные с этими аномалиями появляются только в отдельных семьях; т. е. здесь мы имеем дело со «спорадическими» случаями. Если такой индивид не имеет детей, он не передаст свою добавочную хромосому следующему поколению. Человек, несущий доминантную (или сцепленную с X-хромосомой) генную мутацию, как правило, передает ее следующему поколению (см. разд. 3.1). Если эта мутация не слишком вредит здоровью, репродуктивная способность останется нормальной, что может привести к появлению родословных со многими носителями. Почти каждый такой носитель будет иметь мутантных предков и родственников. Если какие-либо причины мешают многим носителям определенной мутации обзавестись детьми, большинство новых мутантных генов исчезнет вскоре после их возникновения и относительно большое число всех выявленных случаев носительства следует отнести к спорадическим, появившимся вследствие мутаций *de novo*. Для оценки частоты этих мутаций необходимы широкомасштабные популяционные исследования. Частоты генных мутаций можно изучать на уровне качественных менделирующих признаков фенотипа, на уровне белков-ферментов или на уровне ДНК.

5.1.3.1. Методы оценки частот мутаций

В последующих разделах будут описаны различные методы оценки частот мутаций на основе данных о редких наследственных болезнях. В большинстве случаев эти методы применяются в исследованиях, проводимых на уровне качественных менделирующих фенотипических признаков и предполагающих существование простого способа наследования нозологических форм при отсутствии сведений о специфических генных локусах.

Прямой метод. Читатель уже знаком с принципом, на котором основан прямой метод (разд. 5.1.2.1). Этот метод, использовавшийся в работах по геномным мутациям и структурным абберациям хромосом, применим также к данным о доминантных генных мутациях. Он требует лишь определения численности (частоты при рождении) носителей какого-то признака в изучаемой популяции и выяснения вопроса о том, действительно ли их появление носит спорадический характер. Принимая, что все спорадические случаи рождения носителей обусловлены мутациями *de novo*, можно легко рассчитать частоту этих мутаций (см. формулу в разд. 5.1.2.1). Практическое применение данного метода встречается с некоторыми трудностями и может приводить к ошибочным результатам.

- 1 Наиболее тривиальный источник ошибок - внебрачные связи, возможность которых следует принимать во внимание главным образом в ситуациях, когда селективная вредность признака не очевидна и когда очень небольшое число спорадических случаев наблюдается на фоне семейных случаев, составляющих большинство. С другой стороны, если селективная вредность признака велика и если многочисленные спорадические случаи наличествуют вместе с немногими семейными случаями, редкие внебрачные связи не могут слишком сильно исказить вычисляемую оценку. В настоящее время, когда идентифицированы многие генетические маркеры, ложное отцовство, как правило, можно исключить с помощью соответствующих тестов.
- 2 Второй возможный источник ошибок - существование фенотипически сходных или идентичных признаков, которые не наследуются (фенокопии). Наиболее эффективным генетическим тестом на смещение оценок, обуслов-

ленное этой причиной, служит анализ потомков спорадически появляющихся носителей. Если все они мутанты, то ожидаемое расщепление индивидов с данным признаком и без него будет 1:1. Однако, когда совокупная доля фенкопий мала, этот тест не эффективен. Предварительное представление о ситуации дает рассмотрение генетического равновесия. Для поддержания определенной доли спорадических случаев среди всех подобных случаев необходим достаточно сильный отбор против соответствующего признака [1667]. Из этого положения вытекает общее правило: доля спорадических случаев приблизительно пропорциональна селективной вредности признака. В крайней ситуации, когда мутантные аллели не передаются следующему поколению вследствие ранней смерти их носителей, все эти аутосомно-доминантные мутации, имеющиеся в популяции, будут спорадическими. В промежуточной ситуации вновь возникшие мутанты составляют большую и разную в разных случаях долю индивидов с данным признаком.

3. Многие аутосомно-доминантные болезни могут быть представлены различными формами. Если все такие формы объединяются и рассматриваются как одна болезнь, возможно фиктивное завышение частоты мутации. К тому же, помимо аутосомно-доминантного типа болезни, может существовать ее аутосомно-рецессивная форма. Их можно различить с помощью тщательного клинического и лабораторного анализа фенотипа с учетом возраста начала заболевания, истории болезни и анализа сцепления с использованием, например, маркерной ДНК. Кровное родство, если оно есть, в популяциях, где инбридинг обычно не практикуется, может свидетельствовать об аутосомно-рецессивном наследовании.
4. Возможны случаи с неполной пенетрантностью. Если она не намного ниже 100%, смещение оценки поддается коррекции.

Частоту мутаций можно оценить, только установив с достаточной точностью долю спорадических случаев, когда больные индивиды определенно являются мутантами *de novo*, и исключив фенкопий. Наиболее прямой метод оценки заключается в сравнении числа пациентов, несущих новые мутации, с общим числом детей, родившихся в том же году. То есть он сводится к определению числа носителей. Этот метод применим главным образом в случае заболеваний, диагностируемых в раннем детстве. К ним относятся, например, акроцефалосиндактилия (синдром Аперта) (10120), которая выявляется у всех больных ею детей уже при рождении; в случае этого дефекта вполне ясен и клинический статус родителей. Зная общее число детей, родившихся в данной популяции, можно рассчитать частоту соответствующей мутации. Однако большинство наследственных болезней не диагностируется при рождении и преобладающая часть имеющихся данных получена при изучении именно таких заболеваний. Поэтому, например, изучая мутационный процесс в случае гемофилии, необходимо учитывать, что продолжительность жизни пациентов, страдающих этой болезнью, составляет одну треть от продолжительности жизни здоровых индивидов. Таким образом, для получения частоты надо умножить относительное число больных на множитель, равный 3. Обратите внимание, что в этом примере число гемофиликов соотносится с общей численностью популяции, тогда как в предыдущем примере берется отношение числа детей с акроцефалосиндактилией, родившихся в течение года, к числу всех рожденных за один и тот же год.

Прямой метод, несмотря на его простоту, стал применяться только после появления концепции генетического равновесия между мутационным процессом и отбором.

Формулировка Данфорта. Первым, кто сформулировал в 1921 г. эту концепцию и предложил использовать ее для оценки частот мутаций, был Данфорт [1429].

«Уместно напомнить, что значительное число доминантных признаков принадлежит к слабо вредным... Несомненно, что в какой-то мере частота этих признаков поддерживается повторными мутациями. Частоту таких мутаций можно оценить, если известно среднее число генераций, в которых они воспроизводились. По имеющимся данным, среднее время существования некоторых из них составляет лишь несколько поколений. Частота возникновения мутаций должна быть такой, чтобы мутационный процесс повышал частоту соответствующего признака до ее фактического значения и уравнивал противоположное действие отбора»

Он вывел формулу для расчета среднего числа поколений, в которых до элиминации воспроизводилась мутация и которое может слу-

жить мерой частоты возникновения мутаций. Данфорт дал четкую формулировку концепции равновесия между мутациями и отбором. Тем не менее она оставалась незамеченной и лишь 15 лет спустя была повторно сформулирована Холдейном [1472].

Непрямой метод оценки частоты мутаций, предложенный Холдейном. Холдейн излагает эту концепцию следующим образом:

«Сцепленная с полом рецессивная болезнь гемофилия известна более 100 лет. Поскольку до брачного возраста доживает лишь незначительное меньшинство гемофиликов и поскольку (как будет показано ниже) свыше одной трети всех генов гемофилии, имеющих у новорожденных детей, расположены в X-хромосоме у мальчиков, болезнь быстро бы исчезла, если бы гены гемофилии не возникали в результате мутаций. Возможны только две альтернативы - либо гетерозиготные женщины более плодовиты, чем нормальные, либо при протекающем у них мейозе нормальный аллеломорф ... имеет большие шансы попасть в полярное тельце. Ни одна из этих возможностей, по-видимому, не осуществляется ...

Теперь предположим, а затем попытаемся показать, что большинство популяций человека находится в приблизительном равновесии по гемофилии - отбор сбалансирован мутациями, если x - доля мужчин-гемофиликов в популяции, а f - их эффективная плодовитость, т.е. относительные по сравнению с нормальными мужчинами шансы оставить потомков, то в большой популяции численностью $2N$ индивидов элиминируется $(1 - f)xN$ генов гемофилии за поколение. Мутации должны приводить к замене такого же числа нормальных генов. Поскольку, однако, в клетках каждой из N женщин имеется по две X-хромосомы, а у каждого мужчины одна, средняя частота мутаций, отнесенная к числу X-хромосом, равна $1/3(1 - f)x$ или при малых x немного меньше $1/3x$. Следовательно, для получения соответствующей частоты возникновения мутаций, мы должны разделить частоту гемофилии у мужчин»

Кроме того, Холдейн произвел некоторые формальные выкладки, приведшие к следующим результатам. Отношение числа гетерозиготных женщин к числу мужчин-гемофиликов оказалось

равным $1 + \frac{2\mu + v}{2\mu + v}$, где μ - частота мутаций в женских половых клетках, а v в мужских. Часть всех гемофиликов, равная $(1 - f)\mu(2\mu + v)$ (сыновья негетерозиготных матерей), представляет долю спорадических случаев гемофилии. В той же работе Холдейн показал, что генетическое

равновесие действительно восстанавливается за очень короткое время после любого его нарушения.

Метод Холдейна удобен для практического применения, так как он основывается на информации только об одном поколении. Вместе с тем эту информацию можно использовать по-разному. Одна из полезных идей состоит в том, чтобы оценивать частоты мутаций отдельно в мужских и отдельно в женских половых клетках (см. разд. 5.1.3.4).

Проблемы, связанные с практическим применением непрямого метода. Как и в случае прямого метода, при использовании непрямого метода на практике возникает множество проблем:

- 1) внебрачные связи не играют роли в их создании, так как оценка во всех случаях основывается на учете заболеваний в существующей популяции, а не в предшествующих поколениях;
- 2) фенкопии и генетическая гетерогенность вызывают сложности, идентичные тем, которые возникают при использовании прямого метода;
- 3) неполная пенетрантность не влияет на оценки частот мутаций при условии, что носители патологического гена, не проявляющие признаков заболевания, не имеют селективного преимущества;
- 4) специфической проблемой, связанной с применением непрямого метода, является оценка / (средней плодовитости родителей, отнесенной к соответствующей популяционной средней). Эта проблема решается просто, если $f = 0$, т.е. если носители патологического гена совсем не оставляют потомства, как, например, в случае мышечной дистрофии Дюшенна. Доля пациентов, являющихся сыновьями здоровых матерей, выражается формулой $m =$

$$= \frac{(1 - f)\mu}{2\mu + v}$$

и при $\mu = v$ и $f = 0$ равна $1/3$. Это означает, что одна треть наблюдаемых случаев болезни обусловлена новыми мутациями, если, конечно, частота мутаций одинакова у мужчин и женщин.

Проблема становится намного сложнее, если плодовитость носителей данного признака лишь немного снижена по сравнению с нормой. Полезную аппроксимацию / дает сравнение способности к деторождению пациентов и их здоровых сибсов, когда плодовитость родителей достоверно субнормальна. В противном случае возможно значительное смещение оценки, связанное с осуществляемым сибсами планирова-

нием семьи. Наилучший метод заключается в определении числа детей, родившихся у индивидов, составляющих выбранную случайным образом возрастную группу из данной популяции, до конца их репродуктивного периода, и сравнении его с числом детей у соответствующих пациентов [1595; 1597]. Но даже этот метод может дать искаженные данные, если благодаря усовершенствованной медицинской терапии пациенты рожают детей чаще, чем в прежние времена. При таком условии популяция уже не является равновесной, что должно приводить к занижению частот мутаций.

Указанные смещения делают ненадежными все оценки величин λ . Поэтому можно считать, что непрямой метод дает общее представление о действительном порядке величин частот мутаций только в том случае, если плодовитость пациента (λ) значительно ниже средней.

Преобладающее большинство оценок, приведенных в табл. 5.8, получено с помощью прямого метода. Непрямой метод использовался главным образом в случае рецессивных болезней, сцепленных с X-хромосомой. Плодовитость больных гемофилией в то время, когда собирались эти данные, была существенно ниже средней. Плодовитость падает до нуля при мышечной дистрофии Дюшенна и в случае двух болезней — пигментного дерматоза и ротопальцевого дизостоза, гемизиготы по генам которых детальны. Поэтому соответствующие оценки могут считаться довольно надежными.

В случае аутосомно-рецессивных болезней получить оценки частот мутаций невозможно. Прямой метод, очевидно, нельзя использовать в случае полностью рецессивных болезней, так как соответствующие мутации чаще всего возникают в половых клетках индивидов, находящихся в браке с гомозиготами по нормальному аллелю; в этих браках должны рождаться гетерозиготные дети и дети, гомозиготные по нормальному аллелю. Если бы у нас были надежные методы выявления гетерозигот по различным патологическим генам, эту проблему можно было бы снять [1595]. Заметим, однако, что большинство методов не позволяет с высокой степенью достоверности отличить гетерозиготных индивидов от гомозиготных по нормальному аллелю и, кроме того, важно помнить, что существуют молчащие аллели. Вот почему проблема пока еще ждет своего решения. В настоящее время прямой метод не используется.

Теоретически в случае рецессивных болезней можно использовать непрямой метод. С каждой гомозиготой, не оставившей детей, популяция теряет два мутантных гена, которые, для поддержания равновесия, должны компенсироваться мутациями. Однако применение этого метода требует выполнения двух условий. Селективная вредность должна быть свойственна только гомозиготам, а гетерозиготный генотип должен быть селективно нейтральным. Согласно закону Харди—Вайнберга (см. разд. 3.2), частота гетерозигот равна $2pq$, а частота больных гомозигот q^2 . Следовательно, гетерозиготы встречаются гораздо чаще, чем больные гомозиготы, особенно в случае редких наследственных болезней. Поэтому при небольшой селективной вредности аллеля для поддержания генетического равновесия необходима высокая частота возникновения мутаций; если же аллель обладает небольшим преимуществом, генетическое равновесие может сохраняться в отсутствие мутаций.

К тому же, было бы, очевидно, неверно предполагать, что в современных популяциях человека существует генетическое равновесие по рецессивным мутациям. В прошлом народонаселение разделилось на множество изолированных групп, численность которых увеличивалась с различными скоростями; большинство этих групп стали смешиваться друг с другом относительно недавно. Осуществление программы скрининга редких врожденных ошибок метаболизма выявляет удивительные различия по частоте рецессивных генов даже между близкородственными популяциями (см. разд. 6.1.3). Характерное почти для всего мира уменьшение числа кровнородственных браков также внесло свой вклад в нарушение любого генетического равновесия, которое могло существовать в прошлом. В настоящее время число случаев редких рецессивных болезней меньше равновесного; ожидается, что его повышение до равновесной величины будет происходить

Таблица 5.8. Частоты мутаций некоторых генов человека

Болезнь	Происхождение популяции	Частота мутаций	Число мутантов/10 ⁶ гамет	Авторы
А. Аутосомные мутации				Mörch (с поправками Slatis)
Ахондроплазия	Дания	1×10^{-5}	10	Stevenson Scheimann
	Северная Ирландия	$1,3 \times 10^{-5}$	13	
	ФРГ	$6 - 9 \times 10^{-6}$	6 - 9	
Аниридия	Дания	$2,9 - 5 \times 10^{-6}$	2,9 - 5	Møllenbach (с поправками Penrose)
Миотоническая дистрофия	Мичиган (США)	$2,6 \times 10^{-6}$	2,6	Shaw et al.
	Северная Ирландия	8×10^{-6}	8	Lynas
	Швейцария	$1,1 \times 10^{-5}$	11	Klein (с поправками Todorov et al.)
Ретинобластома	Англия, Мичиган (США), Швейцария, Германия	$6 - 7 \times 10^{-6}$	6 - 7	Vogel
	Венгрия	6×10^{-6}	6	Czeizel et al.
	Нидерланды	$1,23 \times 10^{-5}$	12,3	Schappert-Kinmijser et al.
	Япония	8×10^{-6}	8	Matsunaga
	Франция	5×10^{-6}	5	Briat-Guillemot et al.
	Новая Зеландия	$9,3 - 10,9 \times 10^{-6}$	~9 - 11	Fitzgerald et al.
	Англия	3×10^{-6}	3	Blank
Акроцефалосиндактилия (синдром Аперта)	ФРГ	4×10^{-6}	4	Tünte and Lenz
Несовершенный остеогенез	Швеция	$0,7 - 1,3 \times 10^{-5}$	7-13	Smårs
	ФРГ	$1,0 \times 10^{-5}$	10	Schröder
Туберозный склероз (эпилепсия)	Оксфордская региональная больница (Англия)	$1,05 \times 10^{-5}$	10,5	Nevin and Pearce
Нейрофиброматоз	Китай	6×10^{-6}	6	Singer
	Мичиган (США)	1×10^{-4}	100	Crowe et al.
	Москва (СССР)	$4,4 - 4,9 \times 10^{-5}$	44-49	Cepreew
Полипоз кишечника	Мичиган (США)	$1,3 \times 10^{-5}$	13	Read and Neel
Синдром Марфана	Северная Ирландия	$4,2 - 5,8 \times 10^{-6}$	4,2-5,8	Lynas
Поликистоз почек	Дания	$6,5 - 12 \times 10^{-5}$	65-120	Dalgaard
Диафизарная ахалазия (множественные экзостозы)	ФРГ	$6,3 - 9,1 \times 10^{-6}$	6,3-9,1	Murken
Синдром Хипплея—Линдау	ФРГ	$1,8 \times 10^{-7}$	0,18	Burhorn
Б. Сцепленные с полом рецессивные мутации				
Гемофилия	Дания	$3,2 \times 10^{-5}$	32	Andreassen (с поправками Haldane)
	Швейцария	$2,2 \times 10^{-5}$	22	Vogel
	ФРГ	$2,3 \times 10^{-5}$	23	Reith
Гемофилия А	Гамбург (ФРГ)	$5,7 \times 10^{-5}$	57	Bitter et al.
	Финляндия	$3,2 \times 10^{-5}$	32	Ikkala
Гемофилия В	Гамбург (ФРГ)	3×10^{-6}	3	Bitter et al.
	Финляндия	2×10^{-6}	2	Ikkala
Мышечная дистрофия Дюшенна	Ута (США)	$9,5 \times 10^{-5}$	95	Stephens and Tyler
	Нортумберленд и Дерхэм (Англия)	$4,3 \times 10^{-5}$	43	Walton

Продолжение табл. 5.8.

Болезнь	Происхождение популяции	Частота мутаций	Число мутантов/10 ⁶ гамет	Авторы
Пигментный дерматоз (синдром Блоха – Сулиц-бергера)	Зюдбаден (ФРГ)	$4,8 \times 10^{-5}$	48	Becker and Lenz
	Северная Ирландия	$6,0 \times 10^{-5}$	60	Stevenson
	Лидс (Англия)	$4,7 \times 10^{-5}$	47	Blyth and Pugh
	Висконсин (США)	$9,2 \times 10^{-5}$	92	Morton and Chung
	Берн (Швейцария)	$7,3 \times 10^{-5}$	73	Moser et al.
	Фукуока (Япония)	$6,5 \times 10^{-5}$	65	Kuroiwa and Miyazaki
	Северо-восточная Англия	$10,5 \times 10^{-5}$	105	Gardner-Medwin
	Варшава (Польша)	$4,6 \times 10^{-5}$	46	Prot
	Венеция (Италия)	$3,5 - 6,1 \times 10^{-5}$	35–61	Danieli et al.
	ФРГ	$0,6 - 2,0 \times 10^{-5}$	6–20	Essig
Ротопальцелицевой дизостоз (синдром Папийон-Леаж – Псома)	ФРГ	5×10^{-6}	5	Majewski

По Фогелю и Ратенбергу, 1975 [1683] с дополнениями [1460, 1430, 1451].

очень медленно ([1473]; разд. 6.3.1). В случае рецессивной болезни можно из одних и тех же данных получить почти любую оценку частоты возникновения мутаций в зависимости от принимаемых более или менее произвольных предположений. Следовательно, получение таких оценок представляет собой своего рода игру «угадайку», не имеющую научного значения. До тех пор пока мы не научимся выявлять гетерозиготных носителей аутосомно-рецессивных аллелей, что позволило бы использовать принцип расчета, применяемый в случае аутосомно-доминантных признаков, следует полностью отказаться от изучения мутационного процесса на основании данных об аутосомно-рецессивных признаках. Такие расчеты можно проводить только в случае болезней, обусловленных доминантными и X-сцепленными рецессивными мутациями.

5.1.3.2. Результаты оценки частот мутаций

Оценки, полученные в популяционных исследованиях. Оценки частот мутаций приведены в табл. 5.8. Основным критерий, которым мы руководствовались, включая данные в эту таблицу, – достаточная достоверность определения числа случаев, особенно спорадических, наследственной болезни. Относительно некоторых конкретных болезней следует сделать ряд замечаний, которые могут оказаться полезными.

Ахондроплазия (10080) – довольно хорошо диагностируемая наследственная болезнь, характеризующаяся укорочением конечностей, седловидной переносицей, специфическими изменениями позвонков и иногда внутренней гидроцефалией. Репродуктивные функции таких больных значительно снижены; поэтому большинство всех известных случаев ахондроплазии являются спорадическими и обусловлены новыми мутациями. При вычислении приведенных оценок не учитывались данные о по крайней мере двух внешне похожих болезнях, приводящих к смерти вскоре после рождения: ахондрогенезе (20060, 20061, 20070) и летальной карликовости (27367). Прогресс в нозологической систематике остеодисплазий, имеющих множество различных подтипов, которые можно спутать с классической ахондроплазией, порождает сомнения в правильности старых оценок частот мутаций, основанных на



Рис. 5.13. Ребенок с акроцефалосиндактилией (синдромом Аперта). Обратите внимание на синдактилию и деформацию головы.

ствующих костей (рис. 5.13) Во многих случаях отмечалось наличие других, дополнительных врожденных пороков развития и повышенная вероятность ранней смерти. В тех редких случаях, когда больные имели детей, по крайней мере три раза наблюдалась передача синдрома. Вывод о том, что синдром Аперта обусловлен доминантной мутацией, основан на этих фактах и на данных, свидетельствующих об очень сильном эффекте отцовского возраста (раздел 5.1.3.3) [1394; 1591a, 1689].

Несовершенный остеогенез (16620) сопровождается, помимо повышенной ломкости костей, такими симптомами, как голубые склеры и прогрессирующая нейросенсорная глухота. Крайне изменчивая экспрессивность соответствующих генов делает ненадежной любую оценку частоты возникновения мутаций. Генетическая гетерогенность и особенно существование рецессивных типов привносят дополнительные трудности.

Туберозный склероз (19110)-одна из первых наследственных болезней, для которых были получены оценки частот возникновения мутаций [1471] Однако это заболевание не принадлежит к числу наиболее подходящих для расчета таких оценок, поскольку экспрессия соответствующих генов довольно изменчива.

Нейрофиброматоз (16220) также проявляет довольно изменчивую экспрессивность. Первая из приведенных здесь оценок частот возникновения мутаций основана на результатах очень обстоятельного эпидемиологического исследования, проведенного в Мичигане [1426]. Эта частота оценивалась с применением как прямого, так и непрямого методов. Оценка, приведенная в табл. 5.8 (1×10^{-4}), - наивысшая из всех известных на сегодняшний день для наследственных болезней человека. Тем не менее мы не располагаем какими-либо убедительными доказательствами генетической гетерогенности нейрофиброматоза, если не считать данных о семьях с невриномой слухового нерва («центральной нейрофиброматозом»). Оценка, полученная позднее в Советском Союзе [1617], несколько лучше согласуется с другими оценками частот мутаций. Однако в данной работе определение частоты случаев болезни основано на материалах обследования 16-летних допризывников. В этом возрасте симптомы заболевания выражены слабо и их можно не заметить.

При *полипозе кишечника* (17510) возникают проблемы, связанные с генетической гетерогенностью этого заболевания, так как есть по крайней мере еще один синдром, включающий множественные полипы толстой кишки (синдром Гарднера).

В случае *синдрома Марфана* (15470) ситуация усложнилась в результате обнаружения гомотистинурии (23620) - аутосомно-рецессивного заболевания, сходного с синдромом Марфана.

166 5. Мутации

Из данных о *поликистозе почек* (17390) получены наиболее высокие из известных на сегодняшний день (после оценок для нейрофиброматоза) частоты возникновения мутаций.

Оценка, полученная для *множественных экзостозов* (диафизарной аклазии) (13370), основана на данных о семи спорадических случаях, обнаруженных в относительно небольшой популяции. На пенетрантность, по-видимому, влияют гены-модификаторы, сцепленные с полом (см. разд. 3.1.7); приведенная оценка частоты мутаций не может быть очень точной.

В случае *синдрома Хиппеля—Линдау* (19330) оценка частоты мутаций основана на результатах исследования, проведенного Рёрборном и двумя его аспирантами [1407; 1587]. Хотя сами результаты еще не опубликованы, из сформулированных выводов ясно, что мы должны различать здесь по крайней мере три заболевания: отдельные унилатеральные ангиомы сетчатки, имеющие ненаследственный характер; отдельные ангиомы мозжечка также ненаследственной природы и аутосомно-доминантный синдром, обычно включающий билатеральный ангиоматоз сетчатки, гемангиомы мозжечка и другие опухоли внутренних органов (почек и т. д.). К сожалению, приведенная оценка частоты мутаций основана на данных о всего лишь трех больных, родители которых не имеют этого заболевания. Тем не менее результаты данного популяционного исследования, по-видимому, довольно достоверны. Эта частота - самая низкая из известных на сегодня частот возникновения мутаций, полученных для классических доминантных болезней, диагностируемых по специфическим фенотипам.

Х-сцепленные рецессивные болезни. В случае *гемофилии* (30670; 30690) оценки частот мутаций для разных популяций довольно хорошо согласуются друг с другом. Первые из таких оценок (для Дании и Швейцарии) были основаны на объединенных данных о гемофилии А и гемофилии В; позднее эти две нозологические формы стали рассматривать по отдельности. Частота возникновения мутаций в случае гемофилии А примерно на порядок выше частоты мутаций в случае гемофилии В. Это заболевание представляет большой интерес для генетики, так как биохимический анализ гемофилии А и В дал информацию относительно биологического механизма процесса мутирования [1509; 1594]. По этой причине гемофилия - единственная из всех наследственных болезней, в случае которой при оценке частоты мутаций проводился анализ на уровне ДНК (см. разд. 2.3.3.7) и белков-ферментов.

Для *мышечной дистрофии Дюшенна* (31020) известно по крайней мере 11 оценок частот мутаций, полученных из данных о разных популяциях. Как и в случае ретинобластомы, проблемы, связанные с идентификацией заболевания, преодолеваются довольно легко. Диагноз может быть поставлен без особых затруднений [1221]. Применение непрямого метода в данном случае, очевидно, вполне обосновано. Больные никогда не имеют детей. Следовательно, против этой мутации действует очень сильный отбор. По порядку величины все десять оценок удивительно хорошо согласуются друг с другом.

Оценка для *пигментного дерматоза* (синдрома Блоха—Сульцбергера) (30830) основана на гипотезе, предложенной Ленцем [759] (см. раздел 3.1.4), согласно которой этот синдром имеет сцепленный с полом доминантный тип наследования, а гемизиготное состояние у мужчин летально. Такой тип наследования должен приводить к сильному отбору против соответствующей мутации.

Оценка для *ротопальцецевого дизостоза* (31120) также основана на генетической гипотезе о летальности гемизигот и доминантности соответствующих генов у женщин; она базируется на данных о нескольких спорадических случаях [674].

Точность двух последних оценок частоты мутаций относительно невелика, так как они получены на основе обобщения небольшого числа случаев.

Насколько репрезентативны рассматриваемые мутации в отношении частоты возникновения мутаций в геноме человека? Все оценки частот возникновения мутаций, приведенные в табл. 5.8, - имеют порядок от 10^{-4} до 10^{-6} . На первый взгляд обсуждаемые материалы свидетельствуют в пользу предположения об их репрезентативности. Однако такой вывод был бы ошибочным. Заболевания, перечисленные в табл. 5.8, выбраны на основании их пригодности для получения соответствующих оценок. Пригодность, в свою очередь, определяется легкостью распознавания данной болезни, а также, в большой степени ее частотой в популяции. Во всех проводившихся до сих пор эпидемиологических исследованиях наследственных заболеваний, численность изучавшихся популяционных групп не превышала 10 миллионов. Чтобы выявить нуж-

ное число больных, достаточное для получения вполне приемлемой оценки частоты возникновения мутаций в популяциях такого размера, необходимо использовать данные о довольно распространенных патологиях.

Этот аспект рассматриваемой проблемы обстоятельно изучался Стевенсоном и Керром [1651] на болезнях, связанных с X-хромосомой. По их мнению, данные о частотах нозологических форм и темпах мутирования можно разделить на три категории.

1. В случае немногочисленных распространенных наследственных болезней были проведены соответствующие целенаправленные исследования. Полученные оценки частот возникновения мутаций относительно достоверны.
2. Для получения оценок, касающихся редких наследственных патологий, эти авторы провели регистрацию всех сцепленных с X-хромосомой дефектов у 875 000 новорожденных мальчиков.
3. В случае очень редких наследственных заболеваний единственный способ оценить частоту вызывающих их мутаций проанализировать имеющиеся в литературе данные о больных и их семьях. Стевенсон и Керр [1651] провели исследование 49 редких наследственных патологий. В их числе - системы полиморфных признаков, частота которых, как очевидно, не зависит от равновесия между мутациями и отбором (цветовая слепота, группа крови Xg, варианты G6PD). Представление о примерном порядке величин частот мутаций, оценка которых основана на данных об этих 49 болезнях, дает рис. 5.14. Авторы не считают свои результаты точными, однако они приводят убедительные доказательства в пользу правдоподобия этих оценок.

Существует лишь одна наследственная патология - мышечная дистрофия Дюшен-

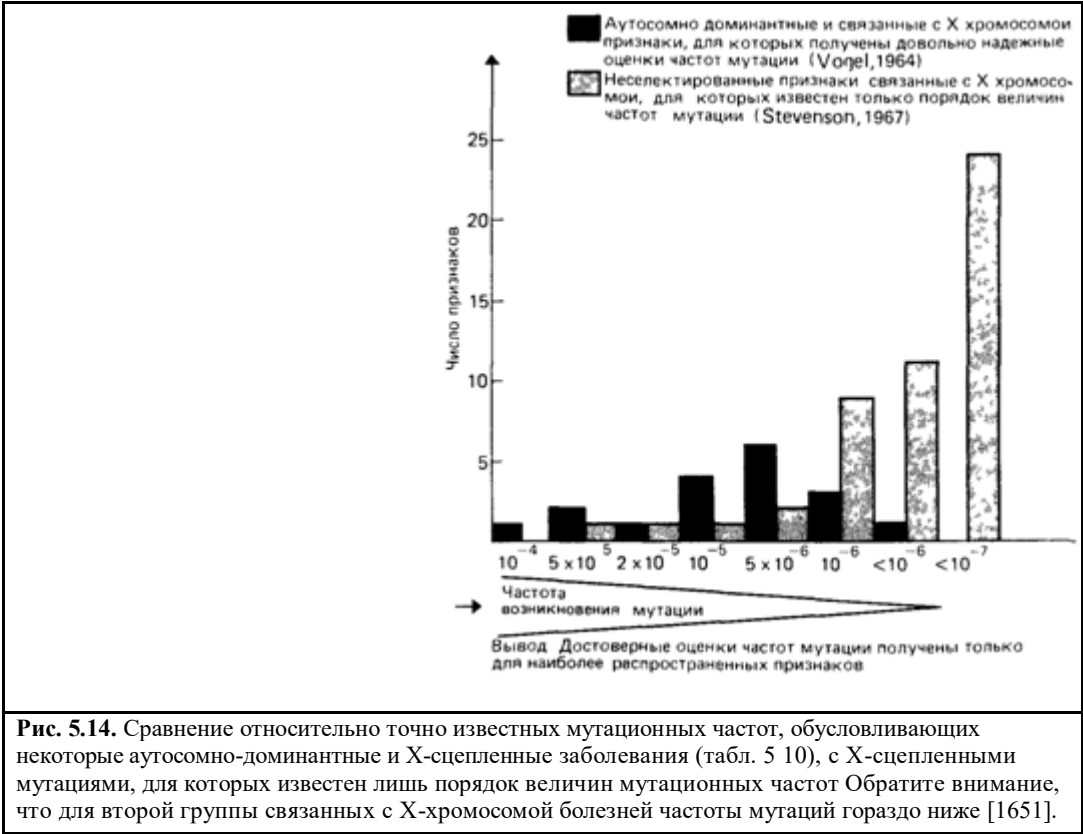


Рис. 5.14. Сравнение относительно точно известных мутационных частот, обуславливающих некоторые аутосомно-доминантные и X-сцепленные заболевания (табл. 5 10), с X-сцепленными мутациями, для которых известен лишь порядок величин мутационных частот. Обратите внимание, что для второй группы связанных с X-хромосомой болезней частоты мутаций гораздо ниже [1651].

на,-для которой частота мутаций выше 5×10^{-5} . Для 24 болезней оценка частоты мутаций ниже 1×10^{-7} , а для других 11 она заключена в интервале между 1×10^{-7} и 1×10^{-6} . Такое распределение сильно затрудняет расчет соответствующей средней, в особенности из-за того, что данный список болезней отнюдь не полон. К нему надо добавить большое число других, преимущественно очень редких патологий, связанных с X-хромосомой. Вероятность обнаружения определенной наследственной болезни, очевидно, увеличивается вместе с ее частотой.

Результаты этих авторов можно принять в качестве первого приближения. По их мнению для мутаций в локусах X-хромосомы, приводящих к наблюдаемым фенотипическим отклонениям, средняя частота мутаций на гамету на поколение равна 4×10^{-6} .

Поскольку распределение частот мутаций, по-видимому, очень сильно смещено к низким частотам, может оказаться полезным использование медианного значения, полученного из этих данных. (Медианой распределения называют величину, которая делит площадь под кривой плотности распределения пополам.) Известные генетики популяционисты Кавалли-Сфорца и Бодмер [36], основываясь на тех же данных, рассчитали, что медианная частота мутаций равна $1,5 \times 10^{-7}$. Это свидетельствует о том, что для многих признаков частоты мутаций действительно очень низки. Хотя относительно аутосомно-доминантных мутаций каких-либо конкретных данных не получено, можно предположить, что они возникают с той же частотой. *Отражают ли эти частоты мутаций общую мутабельность всех генных локусов?* Из сказанного выше вовсе не следует, что в обсуждаемых работах охарактеризована общая мутабельность различных генных локусов. Полученные оценки основаны только на тех мутациях, которые приводят к видимым изменениям фенотипов.

Мутации других типов не поддаются анализу. К ним относятся:

- 1) мутации, обуславливающие такие замены аминокислот в определенной полипептидной цепи, которые не имеют заметного влияния на биологические функции этой цепи. На основании наших знаний об известных полипептидах, особенно о молекуле гемоглобина, можно заключить, что к этой группе принадлежат многие, вероятно даже, большинство мутаций;
- 2) летальные мутации, вызывающие гибель зигот в период эмбрионального развития;
- 3) большинство мутаций, затрагивающих нетранскрибируемые участки ДНК, если только нет реальной возможности применить на популяционном уровне подходящие методы анализа ДНК.

Причины больших различий между оценками частот мутаций, полученными из данных по фенотипам, могут быть разными. Проще всего предположить, что получение в ряде случаев относительно высоких частот мутаций объясняется повышенным уровнем генетической гетерогенности соответствующих заболеваний. Вторая возможная причина состоит в том, что многочисленные мутации, происходящие в одном гене, могут приводить к одинаковому мутантному фенотипу, тогда как в случае ряда других локусов для возникновения определенного фенотипа требуются весьма специфические изменения, а большинство мутаций или легальны, или дают совершенно иные фенотипы [1571]. В-третьих, возможны истинные различия частот мутаций, обусловленные разницей по числу нуклеотидов в генах или по вероятности мутаций на нуклеотид. Проблему общей мутабельности какого-либо гена нельзя решить, проводя анализ на фенотипическом уровне (см. раздел 3.6); для этого нужны исследования на уровне ДНК. Необходимо идентифицировать не только определенный ген, но и конкретный мутационный сайт. К этому вопросу мы вернемся в разд. 5.1.3.1.

Какие условия необходимы для изучения частот мутаций у человека, выявляемых по доминантным или X-сцепленным фенотипам? Для получения оценки частот мутаций по данным о какой-либо наследственной болезни, надо провести очень обстоятельное предварительное исследование. В относительно большой популяции с макси-

мально возможной полнотой должны выявляться все лица, подозреваемые на наличие данного заболевания, причем особое внимание следует уделять «спорадическим» случаям. Выявленные таким образом больные и их семьи должны проходить индивидуальный осмотр у опытных специалистов для постановки диагноза и исключения случаев сходных заболеваний, имеющих иную генетическую основу. Подобное обследование требует больших затрат времени и труда многих людей и редко, если вообще когда-нибудь, предпринимается с единственной целью определить частоту мутаций. Таким образом, этот вопрос удобно изучать в ходе комплексных эпидемиологических исследований, посвященных, например, генетической классификации неохарактеризованной группы болезней, анализу репродуктивной способности пробандов или разработке системы регистрации, создающей основу для генетического консультирования или популяционного мониторинга. Большинство оценок частот мутаций, приведенных в табл. 5.8, получены в исследованиях по клинической популяционной генетике, проводившихся в 1940-х и 1950-х годах.

Деятельность центров, внесших основной вклад в сбор таких данных, описана в разд. 3.1.8. В настоящее время не существует ни одного центра, специализирующегося на генетико-эпидемиологических исследованиях этого типа. По нашему мнению, наиболее правдоподобное объяснение свертывания популяционных исследований дает социология науки. Наступивший в конце 1950-х-начале 1960-х г. расцвет биохимической генетики, цитогенетики, генетики соматических клеток и иммуногенетики открыл совершенно новые перспективы для генетического анализа человеческих индивидов. Исследователи получили в свое распоряжение методы и концепции молекулярной биологии. Вполне понятно, что многие научные работники соблазнились этими новыми возможностями и отказались от проведения очень трудоемких и не очень убедительных работ по выявлению и изучению соответствующих больных в больших популяциях. Эта тенденция усилилась в результате своеобразного развития ряда разделов популяционной генетики человека, превратившихся в сильно формализованные, понятные лишь посвященным области знания. Они кажутся настолько далекими от биологии, что большинству исследователей, занимающихся биологическими и медицинскими вопросами, их значение для углубления понимания общих биологических проблем представляется сомнительным.

Такое развитие популяционной генетики человека также привело к определенным социальным последствиям. Во многих странах были организованы кафедры, отделы и исследовательские группы, занимающиеся медицинской генетикой, однако их целью были не эпидемиологические исследования, а лабораторные, с применением генетических, биохимических и других современных методов. Это с неизбежностью приводит к тому, что усилия вновь приходящих талантливых сотрудников направляются в то же самое русло, усугубляя наметившийся крен. А между тем такие проблемы, как определение числа случаев наследственного заболевания, частоты мутаций, генетической гетерогенности и разграничение наследственных и ненаследственных форм болезней, далеки от своего решения. Учитывая все увеличивающееся загрязнение окружающей среды потенциально мутагенными химическими и физическими агентами (см. разд. 5.2), знания о мутационном процессе у человека на всех уровнях организации становятся более необходимыми, чем когда-либо прежде. Хотя многие генетики нередко выступают на тему о мутациях перед широкой общественностью, их высказывания основаны все на том же ограниченном наборе старых данных. Подробная информация о генетической гетерогенности и умение ставить диагноз по фенотипу особенно нужны в настоящее время: этого требуют возрастающие запросы генетического консультирования, а также необходимость улучшить генетическое прогнозирование.

Что можно предпринять для корректировки такого однобокого развития нашей науки? Средством исправления сложившегося положения, очевидно, не могут служить барьеры на пути внедрения новой методологии или отказ от нее в пользу

популяционных подходов. Научный прогресс зависит от квалификации исследовательских кадров, а квалифицированные научные работники не согласятся проводить исследования, которые им неинтересны. Кроме того, проводившиеся ранее исследования, несмотря на некоторые достоинства, имели бесспорно слабые места, что снижает их эффективность и заставляет нас отказаться от простого повторения. Пришло время планировать такие работы, в которых объединены два подхода: анализ на молекулярном или хромосомном уровне и анализ на популяционном уровне. Мы можем изучать, например в случае синдрома Леша—Найхана, мутации разного типа, возникающие в отдельных клетках, культивируемых *in vitro* (см. разд. 5.1.5). Разве не интересно сравнить спектр этих мутаций со спектром мутаций, полученным из данных обстоятельного популяционного исследования? Аналогичные сравнительные исследования возможны в случае гемофилии, а также других наследственных болезней, встречающихся с относительно высокой частотой. Они помогли бы не только генетикам-популяционистам в их попытках найти более адекватные объяснения процессам, наблюдаемым в популяциях, но также биохимикам и цитогенетикам в их стремлении углубить свое понимание некоторых явлений, обнаруженных *in vitro*. И последнее, очень важное обстоятельство: такие исследования могли бы оказать громадную помощь в социальной поддержке и генетическом консультировании больных и их семей.

Частоты возникновения мутаций в случае редких вариантов ферментов. Частоты редких вариантов ферментов будут обсуждаться в разд. 6.1.2. Учитывая, что на данный момент никаких новых мутаций, приводящих к появлению таких вариантов у людей, не подвергавшихся воздействию мутагенных агентов, не обнаружено, знание этих частот позволяет рассчитать верхний предел скорости мутирования; он оказался равным $\mu = 2,24 \times 10^{-5}$ на ген на поколение [1788]. Эта оценка свидетельствует, что частоты возникновения мутаций в соответствующих генах не выше частот мутаций в случае доминантных и Х-сцепленных болезней. Это не исключает возможности, что на самом деле они значительно ниже; для выяснения этого вопроса необходимо собрать дополнительные данные.

5.1.3.3. Частота мутаций и возраст отца

Блестящая идея Вайнберга. В одной из своих работ под названием "Zur Vererbung des Zwergwuchses" (О наследуемой карликовости - нем.) Вайнберг (1912) [1692] обсуждает генетические основы ахондроплазии. Материалы, которыми он располагал, это родословные, опубликованные Ришбитом и Баррингтоном (1912) [1599]. Вайнберг проверял предположение о простом рецессивном типе наследования ахондроплазии и в результате отказался от этой гипотезы. Он пришел к выводу, что эти данные лучше согласуются с предложением о дигибридном рецессивном наследовании. Вайнберг упомянул и о точке зрения Плэйти, который считал, что ахондроплазия наследуется по доминантному типу. Анализ имеющихся материалов показал, что более поздно родившиеся сибсы (родные братья и сестры - *Прим. перев.*) заболевают ею с большей вероятностью. Сделав несколько замечаний о возможных смещениях, он продолжал:

«Если бы более точный анализ с учетом порядка рождения действительно подтвердил вывод о высокой частоте ахондроплазии у последних детей в семье, это указывало бы на то, что карликовость возникает в результате мутации»

Примерно 30 лет спустя это предположение нашло подтверждение в работе Мерха [795], который проанализировал все случаи ахондроплазии в Дании, включая сведения о нескольких карликах, умерших за несколько лет до исследований. Он представил убедительные данные, свидетельствующие о том, что спорадические случаи этой патологии действительно возникли вследствие мутации *de novo*. Он также показал, что в этих спорадических случаях средний материнский, равно как и отцовский, возраст значительно выше популяционной средней и что эффект материнского

возраста не связан с влиянием порядка рождения, который коррелирует как с отцовским, так и с материнским возрастом. Ему не удалось установить, обусловлен ли этот эффект возрастом матерей, отцов или и тех и других.

Модель Уотсона—Крика стимулировала новые исследования влияния отцовского и материнского возраста. В 1953 г. Уотсон и Крик [1347] предложили свою модель структуры ДНК. Эта модель не только объясняет процессы репликации и хранения наследственной информации, но и позволяет выдвинуть убедительную гипотезу о механизме спонтанных мутаций, связывающую их возникновение с включением некомплементарных оснований при репликации. Такой механизм предполагает зависимость мутационного процесса от репликации. И действительно в ряде работ на микроорганизмах подтвердилось, что почти все мутации происходят в делящихся клетках [1668]. Эта концепция дала новый импульс статистическим исследованиям, посвященным изучению влияния отцовского возраста на мутационный процесс у человека. Касаясь данного вопроса, Пенроуз [1590а] высказал следующее соображение:

«В женском зародышевом пути происходит очень мало клеточных делений, а в мужском - много, так как сперматогонии постоянно делятся. Поэтому частота мутаций, обусловленных неточным копированием гена в процессе клеточного деления, вряд ли испытывает скольконибудь сильное влияние материнского возраста; однако у отцов старших возрастов должно наблюдаться заметное увеличение числа дефектов, возникших по этой причине».

Следствия из этой гипотезы о механизме мутаций можно сравнить с выводами, вытекающими из других возможных предположений о механизме их возникновения [1590а, 1668]. В табл. 5.9 каждой из пяти возможных гипотез поставлены в соответствие те или иные экспериментально-генетические результаты. Пенроуз рассматривал главным образом вторую модель (в которой мутации зависят от деления клеток). Она предсказывает увеличение частот мутаций с возрастом, происходящее только у мужчин, и более высокую мутационную

Таблица 5.9. Упрощенные модели возникновения мутаций и статистические следствия из них					
Модель №	1	2	3	4	5
Механизм:	Мутации зависят только от времени	Мутации зависят только от деления клеток	Мутации происходят в течение определенного промежутка времени после полового созревания	Мутации происходят после прекращения клеточных делений	Мутации возникают в зрелых половых клетках
Самцы половые клетки	Число мутаций с возрастом линейно увеличивается; различий по полу нет	Число мутаций с возрастом увеличивается; у самцов частота мутаций выше	Число мутаций с возрастом не увеличивается; различий по полу нет	Число мутаций с возрастом не увеличивается; у самцов частота мутаций ниже	Число мутаций с возрастом не увеличивается; частота мутаций, возможно, несколько выше у самцов
Самки половые клетки	Число мутаций с возрастом линейно увеличивается	Число мутаций с возрастом не увеличивается; у самок частота мутаций ниже	Число мутаций с возрастом не увеличивается	Число мутаций с возрастом увеличивается; у самок частота мутаций выше	Число мутаций с возрастом не увеличивается; частота мутаций, возможно, несколько выше

частоту в половых клетках мужчин, чем в половых клетках женщин.

Клеточные деления в процессе развития половых клеток у мужчин и женщин. Для того чтобы более точно предсказать частоту мутаций, помимо правильного, но очень общего тезиса Пенроуза, мы должны знать число клеток и клеточных делений в зародышевых путях мужчин и женщин. В настоящее время данные из различных областей биологии и медицины, касающиеся этого вопроса, собраны воедино. По ним можно составить следующую картину ранней стадии развития половых клеток, оогенеза и сперматогенеза [1683].

Ранняя стадия развития. Первичные половые клетки человека выходят из желточного мешка на 27-й день после оплодотворения и мигрируют в гонадные складки. На 46-й день беременности гонады претерпевают половую дифференцировку и становятся либо яичниками, либо семенниками.

Оогенез. Оогенез (рис. 5.15) протекает в течение внутриутробной жизни плода и прекращается к моменту рождения. После половой дифференцировки в результате митотических делений происходит быстрое увеличение числа стволовых клеток яичников. Начиная со 2-го месяца беременности то или иное число ооцитов вступает в профазу мейоза; оогонии, существующие свыше семи месяцев, претерпевают дегенерацию. Стадии лептотены и зиготены (см. разд. 2.1.2.4) приходится на период между 2-м и 7-м месяцами беременности. После рождения все стволовые клетки, как правило, утилизируются, оогонии превращаются в ооциты или дегенерируют.

Общая популяция половых клеток эмбриона увеличивается от 6×10^5 на 2-м месяце беременности до максимальной численности в $6,8 \times 10^6$ клеток во время 5-го месяца. Затем, к моменту рождения, эта популяция уменьшается до 2×10^6 . Если принять правдоподобное предположение о пролиферации путем дихотомических делений, то можно рассчитать, что к моменту рождения оогонии разделится 22 раза. Расчет этого числа сводится к вычислению показателя степени, в которую надо возвести 2, чтобы получить приблизительную величину общей численности ооцитов, то есть 2^{22} и $6,8 \times 10^6$. От рождения до половой зрелости и оплодотворения женская половая клетка претерпевает только два мейотических деления независимо от того, в каком возрасте происходит оплодотворение.

Сперматогенез. При сперматогенезе (рис. 5.16) кинетика клеточных делений выглядит по-другому. На той стадии эмбрионального развития, на которой у женщин первичные половые клетки превращаются в оогонии, у мужчин они становятся *гоноцитами*. С ранней стадии эмбрионального развития и до половой зрелости семенные каналцы непрерывно пополняются так называемыми Ад-сперматогониями (от англ. d-darkтемный) и примерно к 16 годам происходит полное установление процесса сперматогенеза Число Ад-сперматогониев можно оценить тремя различными способами: по результатам измерения соответствующих объемов; на основании их

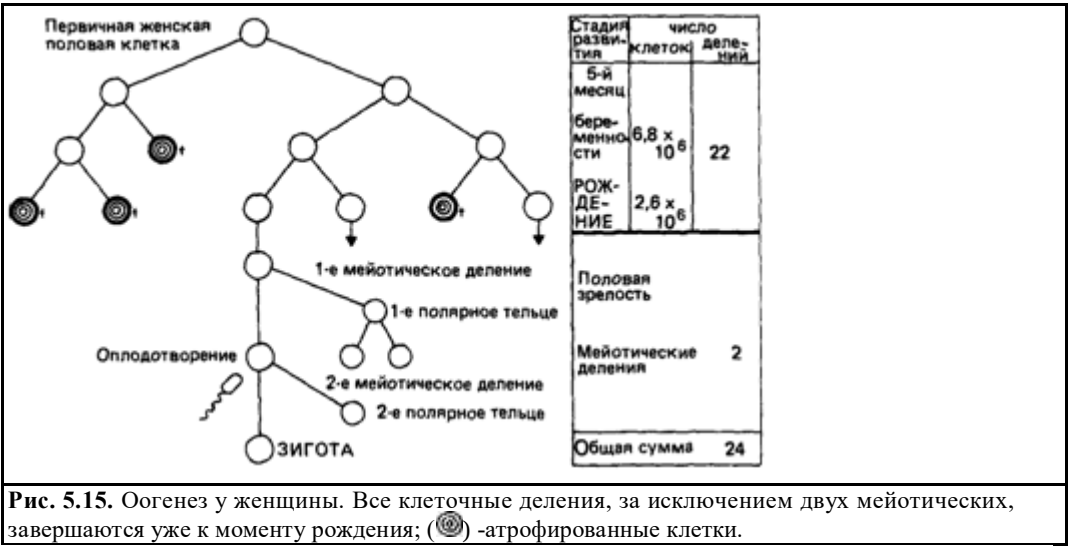


Рис. 5.15. Оогенез у женщины. Все клеточные деления, за исключением двух мейотических, завершаются уже к моменту рождения; (⊗) -атрофированные клетки.

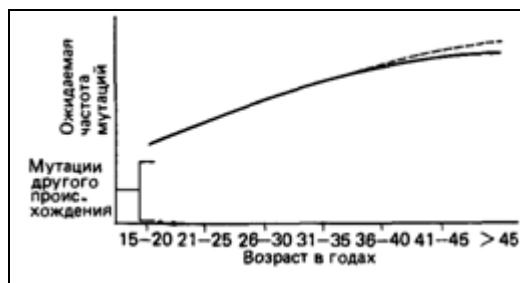


Рис. 5.17. Кумулятивное распределение клеточных делений при сперматогенезе и ожидаемое увеличение частоты мутаций с возрастом отцов. Кривая распределения получена на основе данных Кинси о числе эякуляций у мужчин из разных возрастных групп; *прерывистая* кривая иллюстрирует предположение о повышенном содержании сперматозоидов в эякуляте мужчин старших возрастов.

так как все исследования, на результатах которых основаны оценки, проводились на более молодых людях. Однако хорошо известно, что сексуальная активность, измеряемая числом эякуляций, понижается уже на 4-м десятилетии жизни. Некоторые данные свидетельствуют о том, что число сперматозоидов, подсчитанное в этом возрасте, по-видимому, немного увеличивается, но в целом, как показано на рис. 5.17, интенсивность сперматогенеза с возрастом несомненно понижается.

Рис. 5.17 может служить также иллюстрацией кумулятивного распределения числа сперматогониальных делений, если замедление сперматогенеза обусловлено пролонгацией циклов делений Ad-сперматогониев. Возможны, однако, и другие механизмы такого замедления: например, может быть так, что одни Ad-сперматогонии дегенерируют, а другие продолжают делиться с прежней скоростью. Удивительно, но изменения процесса сперматогенеза, происходящие при старении мужчин, никогда не изучались с применением гистологических методов ¹⁾.

Рост частоты мутаций с возрастом отца. Гистологические исследования необходимы, чтобы понять механизм, лежащий в основе реально наблюдаемого увеличения частоты мутаций с увеличением возраста отцов. На графиках, изображенных на рис. 5.18, нанесены относительные частоты мутаций, приведенные к соответствующей популяционной средней, для разных возрастных групп мужчин и нескольких болезней; помимо ахондроплазии, в их числе такие заболевания, как акроцефалосиндактилия (синдром Аперта) [1394], синдром Марфана [1570] и оссифицирующий миозит (болезнь, приводящая к прогрессирующему окостенению мышц) [1662] (см. табл. 5.11). Особенно интересен рост частоты спорадических случаев гемофилии А с увеличением возраста дедов по материнской линии [1486, 1598].

При проведении всех этих исследований возникали некоторые проблемы, связанные с получением адекватных контрольных выборок из общей популяции, так как большая часть популяционных статистических данных содержит информацию о числе новорожденных в зависимости от возраста матерей, а не отцов. Однако рассматриваемый эффект выражен столь отчетливо, что некоторое несоответствие контроля не окажет слишком сильного влияния на получаемый результат.

Все кривые, изображенные на рис. 5.18, имеют две общие особенности:

1) частота мутаций в самой старшей груп-

¹⁾ Единственное исключение составляет знаменитая работа Фон Винивартера (1912) о числе хромосом человека [543], в которой изучался сперматогенез у четырех мужчин в возрасте 21, 23, 25 и 41 года. У первых трех он обнаружил все стадии процесса на всех сделанных им поперечных срезах семенных канальцев. Совершенно другая картина наблюдалась в случае 41-летнего мужчины. В то время как в некоторых участках сперматогенез протекал нормально, в других были найдены только сперматогонии и сперматоциты, а на срезах третьих вообще ничего не обнаружено, даже сперматогониев. Согласно имеющемуся описанию, этот тщательно изучавшийся пробанд был совершенно здоров и вел нормальную половую жизнь. Фон Винивартер не смог обнаружить в его семенниках каких-либо следов инфекции. Он сделал вывод, что эти изменения отражают нормальный процесс старения. Если этот единичный результат подтвердится, то характерный наклон кривой зависимости вероятности возникновения мутаций от возраста можно будет считать свидетельством в пользу гипотезы ошибок копирования.

Рис. 5.18. Частоты мутаций (отнесенные к популяционной средней) в различных возрастных группах мужчин для некоторых доминантных болезней [1683].

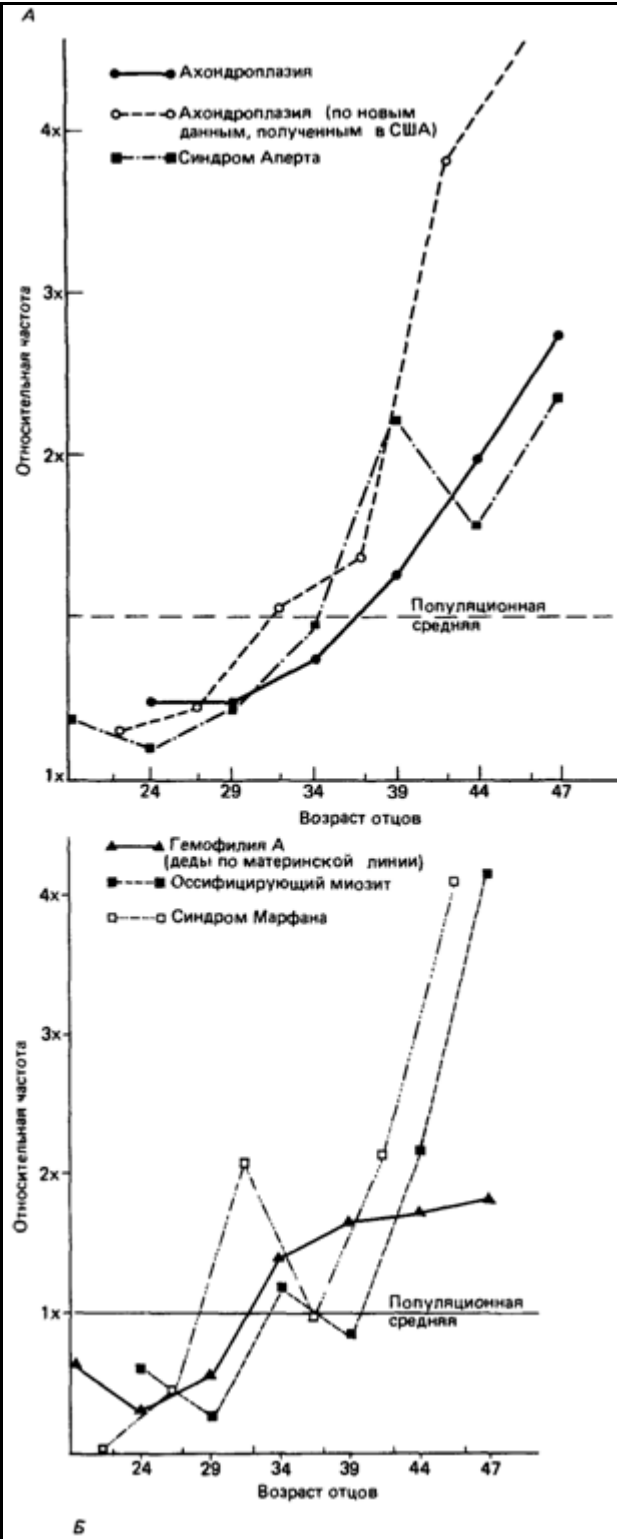
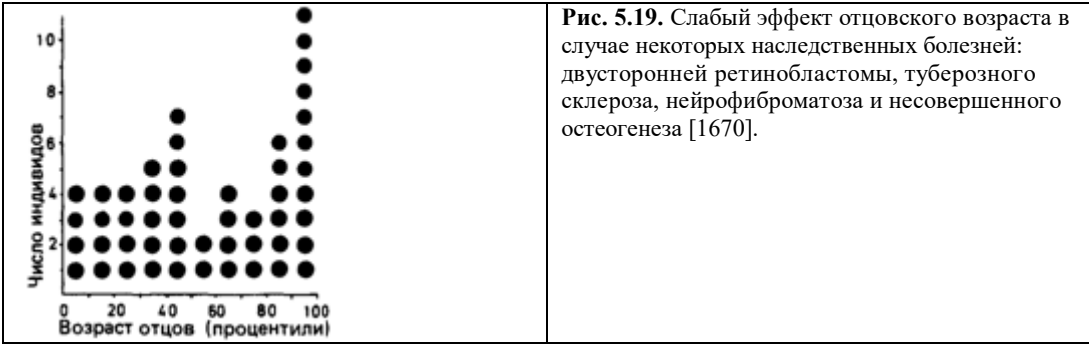


Таблица 5.11. Средний возраст родителей пробандов, страдающих некоторыми доминантными болезнями [1683]						
Болезнь	Родители пробандов			Родители контрольных индивидов		
	Отцы	Матери	Разница	Отцы	Матери	Разница
Ахондроплазия	38,7	32,1	6,6	33,3	28,6	4,7
	36,1	30,5	5,6	29,9	26,5	3,3
	37,7	34,3	3,4	30,9	28,6	2,3
	40,2	33,0	7,2	31,0	28,4	2,6
Акроцефалосиндактилия	36,9	31,8	5,1	31,0	28,0	3,0
	35,0	30,8	4,2	31,0	27,8	3,2
Оссифицирующий миозит	36,6	30,4	6,2	32,0	?	7
Синдром Марфана	36,6	29,3	7,3	29,9	26,5	3,3

пе в несколько раз (приблизительно в пять) выше, чем в наиболее молодой группе;
2) наклон кривой роста проявляет тенденцию к прогрессирующему увеличению крутизны с увеличением возраста. Первая особенность согласуется с предположением, что этот рост обусловлен накоплением клеточных делений. Однако вторая особенность противоречит этому предположению; скорее следовало бы ожидать, что кривая выйдет на плато (по крайней мере в том случае, если скорость делений Ad-сперматогониев действительно замедляется с возрастом). Данное противоречие пока не нашло своего разрешения.

Другие доминантные мутации, для которых возможен эффект отцовского возраста. Отцовский возраст может также служить ключом при идентификации доминантных мутаций, являясь фактором, способствующим возникновению синдромов, которые сопряжены с пороками развития и приводят к бездетности их носителей. К возможным кандидатам на роль доминантных патологий относятся гидроцефалии, за исключением расщелины позвоночника и микрофтальмии/анофтальмии [1590a]. К числу доминантных или возможно доминантных болезней, для которых предполагается существование эффекта отцовского возраста, принадлежат синдром базальноклеточного невуса, синдром Ваарденбурга, болезнь Кроутона, окулоденто-дигитальный синдром и синдром Тречера- Коллинза [1506].

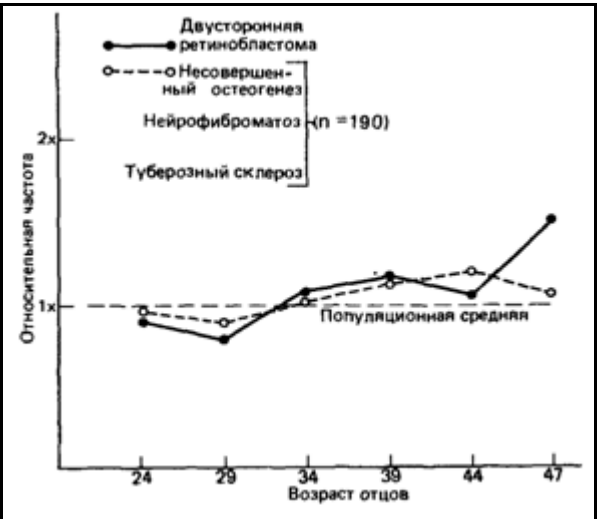
Мутации, приводящие к возникновению неустойчивых гемоглобинов или гемоглобина М, и возраст отцов [1643]. Как отмечалось в разд. 4 3.2, гемоглобин М (метгемоглобин) и нестабильные гемоглобины служат причиной клинических синдромов, передающихся по аутосомно-доминантному типу. Стаматояннопулос собрал обширную информацию о родословных, анализ которых показывает, что один из этих гемоглобинов появился в результате мутации de novo. В общей сложности были собраны данные о 50 проживающих в 14 странах индивидах, имеющих такие гемоглобины. Все они родились между 1922 и 1976 гг. Средний возраст отцов 32,7 года, а матерей - 28,3 года. Для того чтобы сравнить возраст родителей пробандов с возрастом родителей из общей контрольной популяции, авторы рассчитали для каждого года и каждой страны кумулятивные частотные распределения возраста всех родителей. Возраст отца и матери каждого пробанда выражали в процентилях этих распределений. Процентили распределения отцовских возрастов смещены к верхнему концу интервала, 11 из 50 возрастных групп отцов пробандов заключены между 90-м и 100-м процентилями (рис. 5.19). Хотя этот результат наводил на мысль о существовании эффекта отцовского возраста, отличие данного распределения от контрольного не достоверно. Адекватная проверка отцовства в большинстве случаев невозможна. Следовательно, среди этих пробандов могло оказаться заметное число «ложных мутантов», появившихся вследствие ошибочных предположений об отцовстве. Позднее были опубликованы данные о новой мутации одного из Hb М; отцу мутантного ребенка было 49 лет, а матери - 37 [1586]. Опубликованы чрезвычайно подробно документированные сообщения о мутации de novo в случае β-талассемии [1657; 1658] Клинические и биохимические обследования ребенка, которому к моменту постановки диагноза



исполнилось 2 года, а также обоих родителей и трех сибсов не оставили никаких обоснованных сомнений в том, что это действительно новая мутация; ложное отцовство полностью исключено. Ко времени рождения пробанда отцу было 45 лет, а матери - 44 года. В том же 1965 году в Швейцарии средний возраст отцов был равен 31 году, а матерей - 28,2. Сообщение о единичном случае не может заменить статистического исследования; тем не менее этот результат - убедительное свидетельство в пользу существования эффекта отцовского возраста. Однако знание того, что мутации de novo с большей вероятностью возникают у отцов старших возрастов, может привести к перекосу в сторону публикации сведений о таких отдельных случаях.

Некоторые доминантные мутации обнаруживают слабый эффект отцовского возраста. Пенроуз [1590] отметил, что не все доминантные мутации проявляют сильный эффект отцовского возраста. К заболеваниям, для которых этот эффект выражен гораздо слабее, относится такая хорошо изученная болезнь, как двусторонняя ретинобластома [1683]. В числе других-туберозный склероз, нейрофиброматоз и несовершенный остеогенез. На рис. 5.20 приведены данные о соответствующих частотах мутаций. Для трех последних из вышеупомянутых болезней увеличение частот с возрастом отцов не достоверно; однако обнаружен достоверный эффект порядка рождения, свидетельствующий все-таки в пользу гипотезы о влиянии отцовского возраста. Сравнение рисунков 5.18 и 5.20 приводит к обоснованному выводу о гетерогенности доминантных мутаций в отношении эффекта отцовского возраста. Вероятно, есть разные типы мутаций: одни обнаруживают сильный отцовский эффект, а другие - слабый или вообще его не проявляют. Из факта существования эффекта отцовского возраста для летальных или полуметальных мутаций Х-сцепленных генов следуют важные выводы. Если предположить, что в поколении дедов мутации происходили чаще, чем в поколении отцов, можно ожидать, что эффект отцовского возраста будет часто обнаруживаться на дедах пробандов по материнской линии.

Рис. 5.20. Процентильные распределения возрастов отцов пробандов в случае мутаций de novo нестабильных гемоглобинов или Hb М. Вероятность отсутствия эффекта отцовского возраста для каждой категории равна пяти. Обратите внимание на большое число случаев, обнаруженных в самой старшей возрастной группе (составляющей ≤ %90 популяции) [1643].



Кроме того, если мутации зависят от репликации, то они должны гораздо чаще встречаться у дедов, чем у бабок, так как при сперматогенезе происходит намного больше клеточных делений, чем при оогенезе. Эта проблема изучалась с использованием двух групп данных о 77 индивидах с гемофилией А, среди которых предполагалось найти мутанта *de novo* [1486; 1598]. С увеличением возраста дедов действительно наблюдался существенный рост частоты мутаций (рис. 5.18, *Б*), что нашло подтверждение в одной из последующих работ. Это еще один аргумент в пользу предположения о более высокой частоте мутаций в половых клетках мужчин (см. ниже).

Другая X-сцепленная патология: синдром Леша—Найхана (30800). Синдром Леша—Найхана - болезнь, сцепленная с X-хромосомой, - возникает в результате дефекта гипоксантин-гуанин—фосфорибозилтрансферазы. Этот дефект можно диагностировать не только у мужчин, являющихся, как известно, гемизиготами, но и в клетках гетерозиготных женщин с лайонизированной X-хромосомой.

В рассматриваемом ниже исследовании [1456] обнаружено пять случаев, когда мать пробанда была гетерозиготой, а бабушка по материнской линии - нормальной гомозиготой. Следовательно, мутация должна была возникнуть в половой клетке деда со стороны матери. Возраст дедов и бабок

Таблица 5.12. Возраст дедов и бабок по материнской линии при рождении гетерозиготных дочерей - носительниц мутации <i>de novo</i> , приведшей к дефекту гипоксантин-гуанин—фосфорибозилтрансферазы [1456]		
	Деды	Бабки
	27	24
	35	35
5 семей	40	31
	38	32
	40	39
Средний +σ	36,0 ± 5,43	32,2 ± 5,54
Популяционная средняя (США)	28,7 ± 6,8	25,9 ± 6,2

приведен в табл. 5.12. Соответствующие средние величины гораздо выше усредненных значений для популяции Соединенных Штатов. Таким образом, весьма вероятно, что для синдрома Леша—Найхана величина эффекта отцовского возраста имеет такой же порядок, как и в случае других рассмотренных выше болезней.

5.1.3.4. Возможные различия частот возникновения мутаций у индивидов разного пола

Если большинство мутаций зависит от клеточных делений и репликации ДНК, то следует ожидать не только роста частоты мутаций в мужских половых клетках с увеличением возраста мужчин, но и абсолютно более высокой частоты мутаций у мужчин по сравнению с женщинами. Мужская половая клетка претерпевает намного больше клеточных делений, чем женская (см. рис. 5.15 и 5.16).

В случае доминантных мутаций у человека это предположение не поддается прямой проверке, так как мы не можем определить, где возникла та или иная отдельная мутация, проявляющаяся в фенотипе «спорадического» больного, - в мужской или в женской зародышевой клетке. Однако для мутаций, сцепленных с X-хромосомой, такая проверка возможна. Для трех X-сцепленных болезней - гемофилии А, синдрома Леша—Найхана и мышечной дистрофии Дюшенна - имеется достаточный фактический материал; анализ данных по каждому из этих заболеваний привел, однако, к противоречивым результатам.

Различия частот мутаций у индивидов разного пола в случае гемофилии А. Холдейн [1474] был первым, кто, анализируя данные о случаях гемофилии, полученные в одном популяционном исследовании, проведенном в Дании [557], постулировал, что частота мутаций в мужских половых клетках выше, чем в женских. Согласно Холдейну [1472], определенная часть (*m*) всех носителей X-сцепленного рецессивного аллеля

$$m = \frac{(1 - f)\mu}{2\mu + v}$$

должна быть представлена сыновьями матерей, гомозиготных по нормальному аллелю, т. е. (при наличии генетического равновесия) индивидами, болезнь которых возникла вследствие мутации *de novo*, произошедшей в половых клетках их матерей. Мутации в зародышевых клетках матерей должны приводить к появлению спорадических случаев заболевания, т. е. к появлению больных, являющихся единственными гемофиликами среди своих братьев и сестер. Однако, принимая во внимание статистические соображения, следует ожидать, что некоторое число изолированных случаев болезни будет встречаться даже в ситуации, когда все матери гетерозиготны (см. разд. 3.3.4; приложение 3). Если же еще возникают мутации *de novo*, доля таких случаев будет больше. Эту долю *m* можно оценить из посемейных данных; можно также проверить «нулевую гипотезу» о том, что эти данные не обнаруживают достоверного отклонения от ожидаемых в ситуации, когда *все* гемофилики - сыновья гетерозиготных матерей. Однако, чтобы избежать неконтролируемых смещений при выявлении сибств только с одним и более чем одним больным, надо всякий раз, когда это возможно, определять частоту мутантных мужчин в серии семей, отобранных в ходе полного (усеченного) отбора (разд. 3.3.4). Последнее означает, что в пределах определенного временного интервала выявлены все живущие в данной популяции гемофилики и их семьи. В случае гемофилии и других сцепленных с полом рецессивных болезней такие исследования должны ограничиваться мальчиками и семьями, родословные которых не дают доказательств гетерозиготности матерей.

В литературе мы нашли четыре серии данных, удовлетворяющих условиям, необходимым для достаточно точного и полного выявления указанных случаев [1671]. В этих сериях не обнаруживается никакого излишка спорадических случаев над ожидаемым для ситуации, когда все матери гетерозиготны. Это означает, что рассматриваемые данные согласуются с гипотезой о том, что все или почти все мутации *de novo* происходят в мужских половых клетках (табл. 5.13), если справедливо предпо-

Таблица 5.13. Ожидаемое и наблюдаемое число сибств с одним пораженным мальчиком среди всех сибств с различным числом пораженных братьев. Использованы данные как о гемофилии А, так и о гемофилии В [1683]		
Число братьев в сибстве	Число пациентов с гемофилией	
	1	> 1
2	20	18
3	10	11
4	5	6
5	2	8
6	-	1
7	-	-
8	-	1
Наблюдаемое	37	45 $\chi^2 = 0,104$
Ожидаемое	38,457	43,543 $P \geq 0,05$

ложение о существовании генетического равновесия между мутационным процессом и отбором или если потеря аллелей, обусловленная отбором против гемофиликов, компенсируется каким-либо другим способом, например нарушением расщепления в пользу гетерозигот или в результате их адаптивного преимущества. В случае гемофилии эти возможные механизмы компенсации исключены. Если бы в настоящем исследовании использовались материалы работ, выполненных в последнее время, следовало бы учесть ослабление отбора, обусловленное лечением гемофиликов препаратами фактора VIII (см. разд. 4.2.2.9). Эти данные не совместимы с гипотезой о равенстве частот возникновения мутаций в гаметах индивидов разного пола. Дополнительные данные можно получить, проведя тестирование на гетерозиготность, поскольку определение отношения активности фактора VIII к концентрации антигена гемофилии позволяет выявить большую часть гетерозигот. Сравнение результатов такого тестирования заведомых гетерозигот и матерей спорадических больных, казалось, должно было показать, что последние чаще характеризуются нормальными величинами этих отношений, чем первые. Однако из табл. 5.14, в которой суммированы результаты нескольких исследований, видно, что заведомые гетерозиготы мало

Таблица 5.14. Диагностика носительства в случае гемофилии А на основании активности фактора VIII и содержания антигена фактора VIII у заведомых носителей (матерей, имеющих более одного сына-гемофилика или других больных гемофилией родственников) и возможных носителей (матерей, имеющих только одного сына-гемофилика и не имеющих других больных родственников) (По литературным данным, см также [1674])

Работа	Заведомые носители					Возможные носители				
	<i>n</i>	Средняя актив-ность, %	Средняя конц антиге-на, %	Отноше-ние ¹⁾ актив-ность / конц антигена	Диаг-ности-руется, %	<i>n</i>	Средняя актив-ность, %	Средняя конц антиге-на, %	Отноше-ние ¹⁾ актив-ность / конц антигена	Диаг-ности-руется, %
Hathawey et al. (1976)	32	72	126	0,61		12	99	129	0,65	
Biggs, Rizza (1976)	82	52,5	111,6	0,53		41	43,8	105,9	0,46	
Ratnoff, Jones (1977)	82				94,3 ²⁾	39				85 ²⁾

¹⁾ В норме величина отношения активность/конц антигена равна 1,0 Это отношение уменьшается как в случае заведомых, так и возможных носителей

²⁾ На основании анализа дискриминантных функций для активностей и содержания антигенов авторы пришли к выводу, что применение данного геста позволяет на 95%-ном доверительном уровне диагностировать как носителей 94,3% всех заведомых и 85% возможных носителей

отличаются от матерей спорадических больных. Это еще одно доказательство того, что почти все матери спорадических больных являются гетерозиготами. Проведенное позднее сравнение оценок, полученных методом максимального правдоподобия [1699] с использованием данных о факторе VIII, для заведомых носителей и для матерей спорадических больных (возможных носителей) показало, что $\mu \approx 1/10v$, т. е. частота мутаций в мужских половых клетках должна быть приблизительно в десять раз выше частоты мутаций в женских гаметах [1701]. Таким образом, доказательства того, что в случае гемофилии большинство мутаций возникает действительно в мужских половых клетках, довольно убедительны. Два других возможных объяснения, состоящие в том, что гетерозиготные женщины гораздо более плодовиты, чем нормальные, или что существует некоторое нарушение расщепления в пользу мутантного гена, можно отвергнуть как маловероятные.

Частота мутаций в мужских половых клетках, вероятно, выше и в случае синдрома Леша—Найхана [1456]. Мы уже говорили о повышенном возрасте дедов пораженных по материнской линии. У мужчин болезнь протекает так тяжело, что они никогда не имеют детей. Следовательно, их относительная плодовитость (f) равна 0. Если $\mu = v$, приведенная формула упрощается до $m = 1/3$. При равенстве мутационных частот у индивидов разного пола треть всех пораженных, принадлежащих к одному поколению, должна быть сыновьями гомозиготных по нормальному аллелю матерей, так как болезнь возникла у них вследствие мутации de novo в гаметах их матерей.

В настоящее время нет данных об эпидемиологических исследованиях, в которых были бы изучены все семьи определенной популяции. Однако при этой болезни гетерозиготы можно диагностировать с помощью лабораторных тестов. Поэтому интересно проверить, действительно ли одна треть всех известных больных – сыновья гомозиготных по нормальному аллелю матерей. В коллективном исследовании [1456] было изучено 47 семей: 39 – из США, 3 – из Великобритании и по 1 - из Канады, Бельгии, Германии, Ирландии и Швейцарии. В 27 семьях было только по одному-единст-

венному больному мужского пола. Во всех этих случаях проведено тестирование матерей на гетерозиготность и обнаружено всего четыре гомозиготы по нормальному аллелю. В остальных 23 случаях (а также во всех семьях с более чем одним больным) матери оказались гетерозиготами. Таким образом, гомозиготы по нормальному аллелю составляли намного меньше одной трети *всех* матерей.

Имеются три гипотезы, объясняющие наличие большого числа гетерозигот среди матерей:

- 1) поскольку семьи не были проранжированы на основе результатов эпидемиологического исследования, их выборка может быть смещена в сторону семей с более чем одним пораженным;
- 2) возможно репродуктивное преимущество гетерозигот или нарушение расщепления;
- 3) частота мутаций в мужских половых клетках выше, чем в женских.

Первое и второе предположения представляются маловероятными. Наиболее правдоподобное объяснение этих данных дает третья гипотеза о более высокой частоте мутаций в мужских половых клетках.

Синдром «ломкой» X-хромосомы Этот синдром-вероятно, самая распространенная X-сцепленная наследственная болезнь человека (см разд. 8.2.1.2). Недавно полученная для него оценка частоты мутаций оказалась самой высокой из всех оценок, вычисленных для «классических» фенотипов человека (разд. 5.1.3.2). Сегрегационный анализ родословных, объединенных в большое число серий [1619], не выявил спорадических больных, причину недуга которых можно объяснить мутациями, возникшими в половых клетках их матерей. В случае синдрома «ломкой» X сегрегационный анализ дал результат, сходный с полученным ранее для гемофилии А (см. табл. 5.13) Авторы сделали вывод, что в случае синдрома «ломкой» X *все* мутации *de novo* произошли в мужских половых клетках. Нам представляется такой вывод преждевременным. Ведь смещения выборки родословных, взятых в анализ, неизбежны. Как отмечалось в разд. 5.1.3.2, эти исследования не основываются на результатах изучения всех случаев болезни в популяции ограниченной численности. Кроме того, нельзя исключить возможность «инфляции» оценки частоты мутаций, обусловленной частичной компенсацией потери генов вследствие происшедшего в прошлом увеличения плодовитости носителей с легкой формой заболевания [1678]. Правильный вывод, по нашему мнению, можно сформулировать так. частота мутаций, как и в случае гемофилии А, в женских половых клетках *ниже*, чем в мужских ($v \approx 10\mu$) [1682, 2230].

Отсутствие различий между частотами мутаций у индивидов разного пола в случае мышечной дистрофии Дюшенна. Четвертая болезнь, для которой имеются достаточно большие, хорошо изученные популяционные выборки, - это мышечная дистрофия Дюшенна (31020). При этом заболевании относительная плодовитость (/) пораженных также равна 0. Они никогда не имеют детей, и, если частоты мутаций одинаковы у индивидов разного пола, одна треть всех пораженных, вероятно, будут сыновьями матерей, гомозиготных по нормальному аллелю. Эту проблему анализировали на основе данных о трех обширнейших популяционных выборках. После коррекции на очевидное смещение выяснилось, что эти данные удивительно хорошо согласуются с ожидаемой зависимостью $m = 1/3$. Тогда казалось, что частоты соответствующих мутаций в мужских и женских половых клетках одинаковы. С тех пор опубликовано много новых данных и появились методы тестирования на гетерозиготность (приложение 8). Некоторые авторы считают, что в случае дистрофии Дюшенна частота мутаций в женских половых клетках ниже, чем в мужских [1404; 1430], высказывается и противоположная точка зрения [1405]. Однако основная часть имеющихся на сегодня данных свидетельствует о *приблизительном равенстве* мутационных частот у индивидов разного пола [1413; 1432]. Мышечная дистрофия Дюшенна характеризуется необычайно высокой частотой соответствующих мутаций и необычным распределением мутационных частот по полу. Вероятно, соответствующий ген очень велик по размеру и имеет несколько более или менее гомологичных по структуре псевдогенов. Это может послужить причиной частого неравного кроссинговера (см. разд. 3.5.8), приводящего к возникновению мутантных фенотипов [1700]. Поскольку ген,

детерминирующий дистрофию Дюшенна, находится в X-хромосоме, кроссинговер (в том числе неравный кроссинговер) может происходить только в женском зародышевом пути.

Косвенное доказательство более высокой частоты возникновения мутаций в мужских половых клетках. Как отмечалось выше, в случае аутосомно-доминантных аномалий прямое изучение проблемы различий между частотами мутаций в мужских и женских половых клетках невозможно. Однако мы можем построить чисто умозрительное доказательство, основываясь на том, что частота мутаций (например, в случае ахондроплазии) повышается с увеличением отцовского возраста. Если отцовский эффект обусловлен исключительно возрастом отца, что весьма вероятно [1591; 1596], представление о равенстве мутационных частот у индивидов разного пола неприемлемо, даже если все мутации, имеющиеся у детей молодых отцов, возникли в женских половых клетках. Если бы частоты мутаций у молодых родителей разного пола были равны, излишек мутаций *de novo*, обусловленный эффектом отцовского возраста, привел бы к тому, что частота мутаций в мужских половых клетках оказалась бы гораздо выше, чем в женских. Подробное изложение этого вопроса см. в работе [1677].

Различие между частотами мутаций у мышей разного пола. В исследованиях на людях можно использовать только косвенные методы. При изучении лабораторных животных указанные трудности отсутствуют. Поэтому логично предположить, что рассматриваемая проблема для животных уже решена. Однако соответствующие данные, хотя и важны для развития теории, выглядят не вполне убедительно. Они получены при изучении индуцированного мутагенеза у мышей с помощью многолокусного теста. Этот метод выявляет мутации *de novo* в F₁ с помощью обратного скрещивания с использованием тестерной линии, гомозиготной по семи рецессивным мутациям (разд. 5.2.1). Результаты экспериментов суммированы в табл. 5.15. Различия по

Таблица 5.15. Спонтанные однолокусные мутации генов дикого типа (нормальных) у мышей [1616; 1609]			
Пол	Число проанализированных гамет	Число мутаций	Частота/локус
♂	649 227	36	$7,9 \times 10^{-6}$
♀	202 812	7 ¹⁾	$6,1 \times 10^{-6}$
¹⁾ Включая группу из шести особей Альтернативная оценка, основанная на предположении, что все эти мутанты возникли в результате одной мутации, равна $1,4 \times 10^{-6}$			

полу не очень значительны. Семь мутантов, обнаруженные среди самок, включают группу из шести мутантов, по-видимому, возникшую в результате одной-единственной мутации, произошедшей на очень ранней стадии развития яичника. Если эта группа засчитывается только один раз, частота мутаций у самок будет равна $1,4 \times 10^{-6}$, что действительно намного ниже частоты мутаций у самцов. Гипотеза о том, что частота мутаций у самок ниже, чем у самцов, подтверждается данными, свидетельствующими о низком выходе мутаций при облучении самок низкими дозами радиации [1616].

Статистические результаты и механизм мутирования. Различные результаты, о которых говорилось выше, можно сравнить с ожидаемыми в случае каждого из пяти механизмов, перечисленных в табл. 5.9. Для группы мутаций с сильным эффектом отцовского возраста мы можем исключить механизмы, при которых возникновение мутаций предшествует периоду половой зрелости (модель 3) или происходит после завершения клеточных делений (модель 4). Для этой категории весьма маловероятна и зависимость числа мутаций от времени (модель 1). Для группы мутаций с менее выраженным эффектом отцовского возраста остается возможность линейного увеличения их числа с течением времени, вероятно, сочетающегося с мутациями в зрелых половых клетках (модель 5). Большая часть данных свидетельствует в пользу модели (2), предполагающей зависимость от клеточных делений. Эта модель предсказывает существование различий по полу и увели-

чение числа мутаций с возрастом отцов. Однако имеются два момента, заставляющие относиться с осторожностью к возможности полного принятия этой модели:

- 1) в некоторых случаях не удалось получить доказательств существования сильного эффекта отцовского возраста;
- 2) крутизна наклона кривой зависимости увеличения числа мутаций от возраста (для болезней, проявляющих сильный эффект отцовского возраста) растет с увеличением возраста.

Как показано выше, можно было бы ожидать выравнивания кривой роста числа мутаций в старших возрастных группах. Однако имеющиеся материалы не позволяют решить интересующую нас проблему, так как о природе изменений в ходе сперматогенеза, происходящих с увеличением возраста, мы знаем слишком мало. И все же эти данные свидетельствуют о том, что мутационный процесс как-то связан с репликацией ДНК и делением клеток. Видимо, не стоит чересчур увлекаться анализом статистических данных; исследования на молекулярном уровне обещают дать более обстоятельные и доказательные материалы. Некоторые авторы считают, что доводы, приведенные в этом разделе, неубедительны и что частоты мутаций у индивидов разного пола в действительности равны друг другу [1560].

5.1.3.5. Герминативноклеточные и соматоклеточные мозаики по доминантным и X-сцепленным мутациям

Анализ родословных. Если мутация происходит во время раннего развития половых клеток, возможно образование герминативных мозаиков, у которых более или менее значительная часть клеток одной из гонад несет эту мутацию. Такая ситуация хорошо известна из работ по изучению мутагенеза у *Drosophila melanogaster*; кроме того, у мыши описан «кластер» клеток, возникший в результате мутации на ранних стадиях развития ооцита (см. табл. 5.15). Вероятность обнаружения таких кластеров у людей очень мала; их можно выявить только в том случае, если мутация имеется в клетках, составляющих большую часть гонады.

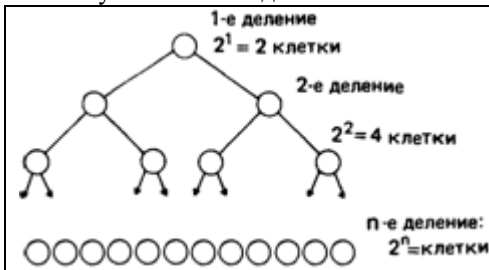


Рис. 5.21. Зависимость числа мутантных половых клеток от стадии развития, во время которой произошла мутация.

Чем раньше в процессе развития возникает мутация, тем больше мутантная часть гонады. Доля мутантных половых клеток равна 1, если уже первая клетка оказывается носителем мутации; она составляет $1/2$, если мутация произошла при первом делении стволовой клетки, и $(1/2)^2$, если мутация возникла во время второго деления; в общем случае, если мутация произошла в n -м делении, она равна $(1/2)^n$ (рис. 5.21). Если общее число клеточных делений по порядку величины совпадает с полученной выше оценкой (разд. 5.1.3.3; рис. 5.15 и 5.16), а вероятность мутации одинакова для всех клеточных делений, то доля мутаций *de novo*, образующих кластеры, выявляемые при герминативном мозаицизме, будет хотя и небольшой, но все же ощутимой. Если мутация доминантна, можно ожидать появления немногочисленных семей, в которых оба родителя нормальны и в то же время имеется более одного ребенка с мутантным фенотипом.

Описано несколько редких родословных, в которых, вероятно, возникли такие кластеры, в частности одна большая родословная с аниридией [1596] и семья, где есть больные с расщепленной кистью и стопой [1542]. Во всех подобных случаях очень трудно исключить более тривиальную альтернативу, а именно неполную пенетрантность у одного из родителей.

Соматическая мозаичность в случае доминантных мутаций. Мозаичность, возникшая в результате мутации, бывает не только в герминативной, но и в соматической ткани. Последняя может быть мозаична не

только по числу хромосом, о чем говорится в разд. 5.1.6, но и по генным мутациям. Однако характер фенотипического проявления генных мутаций сильно затрудняет обнаружение такого мозаицизма. Тем не менее по крайней мере один такой факт нам известен. В ходе изучения нейрофиброматоза [1426] обнаружено четыре индивида, имеющих нейрофиброму, ограниченную какой-либо одной частью тела, например конечностями, крестцовым отделом или спиной. В семейных историях этих четырех индивидов подобных больных не было. Они произвели в общей сложности шесть детей, ни один из которых, по имеющимся сведениям, не страдал данной болезнью. Следовательно, у этих четырех индивидов возникли соматические мутации, оказавшие влияние на относительно ранние стадии развития.

Мутации в полухроматидах? Недавно Гартлер и Франке (1975) [676] выдвинули гипотезу о существовании специального механизма образования мозаиков по точковым мутациям, связанного с мутациями в полухроматидах (рис. 5.22). Как отмечалось выше, многие мутации, по-видимому, возникли вследствие ошибок копирования при репликации ДНК. Если такая ошибка копирования происходит в последнем перед образованием половой клетки цикле репликации ДНК, возникшая половая клетка будет содержать неспаренную пару оснований, например AG вместо AT (рис. 5.22). В первом делении дробления A образует пару с T, а G – с C. Следовательно, один из продуктов этого деления будет, как и прежде, содержать пару оснований AT; другая же клетка получит новую пару оснований GC и будет мутантной.

Примером таких мозаиков могут служить больные пигментным дерматозом. Как мы уже говорили, это заболевание, вероятно, обусловлено доминантным геном, сцепленным с X-хромосомой и летальным у гемизиготных мужчин. Всего было описано 593 случая этой болезни у женщин и шесть у мужчин, имевших нормальные кариотипы XY. Распределение пораженных участков кожи было сходным у индивидов обоего пола и напоминало мо-

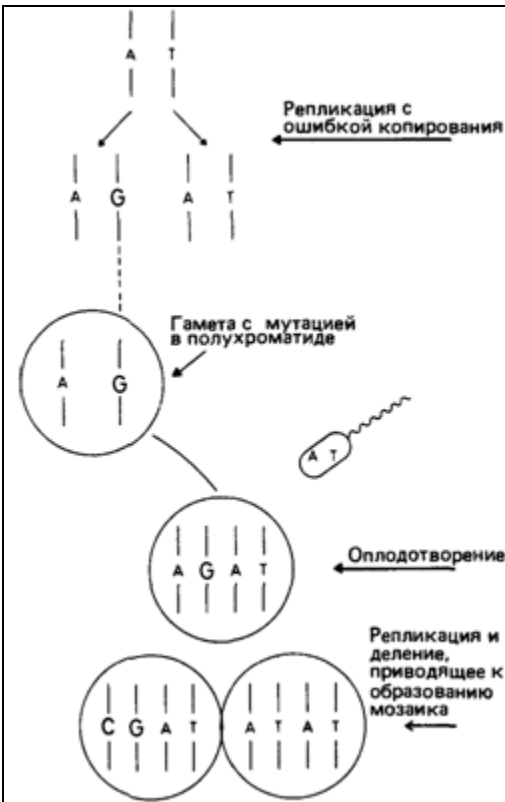


Рис. 5.22. Возникновение мутации в полухроматиде: замена основания в одной полухроматиде, происходящая во время последнего перед мейозом цикла репликации ДНК. В первом делении дробления мутантная полухроматида дает начало клону клеток, имеющих генную мутацию; нормальная полухроматида приводит к образованию клона нормальных клеток. Данный индивид будет мозаиком с соотношением нормальной и мутантной ткани 1:1.

заичный рисунок на шкурках мышей, хомячков и кошек, гетерозиготных по некоторым X-сцепленным генам.

Кроме того, случаи заболевания мужчин носили спорадический характер. Тот факт, что больные мужчины обнаруживают большое фенотипическое сходство с женщинами-мозаиками, мозаицизм которых обусловлен эффектом Лайон (см. разд. 2.2.3.3), делает вероятным предположение, что эти мужчины также являются мозаиками и что соответствующая мутация произошла на ранней стадии эмбрионального

развития. Подобные случаи хорошо объясняются гипотезой о мутациях в полухроматидах [760].

5.1.4. Генные мутации: анализ на молекулярном уровне

Анализ нуклеотидных последовательностей ДНК и аминокислотных последовательностей позволяет уточнить представление о механизмах возникновения мутаций. При этом особенно информативными оказались варианты гемоглобина человека (разд. 4.3). Большинство известных мутаций возникло в результате замены одного основания на другое; меньшинство возникает вследствие делеций нескольких пар оснований, сдвига рамки считывания, элонгации полипептидной цепи, обусловленной мутацией в терминирующем кодоне, и рекомбинационных событий, приводящих к мутационноподобным эффектам (гемоглобин типа Lepore). При переходе на молекулярный уровень снова возникает множество вопросов, некоторые из которых нам уже известны из обсуждения исследований на фенотипическом уровне.

5.1.4.1. Частоты кодонных мутаций

Какова вероятность мутирования данного кодона в определенном направлении, приводящего к замене одной аминокислоты на другую?

Первая попытка ответить на этот вопрос. Один из авторов данной книги (А. Мотульский) когда-то писал [1563]:

«В идеале такие расчеты можно проводить самым прямым путем, определяя частоту данного варианта в популяции и тестируя родителей. В большинстве случаев один из родителей передаст вариант своему ребенку. Можно предполагать, что в семьях, где оба родителя нормальны (не исключая при этом возможность ложного отцовства), произошла мутация *de novo*».

В то время когда проводились описанные ниже расчеты, еще не было результатов крупномасштабных популяционных исследований, выполненных с применением электрофореза. Поэтому частоту мутаций приходилось оценивать более косвенным путем по частоте редких вариантов в популяции (1:2000), т.е. по доле возможных вариантов, выявляемых с помощью электрофореза, и немногим мутациям, обнаруженным при изучении одной определенной группы вариантов, приводящих к метгемоглобинемиям, обусловленным HbM различных типов.

Оценка порядка величины частоты кодонных мутаций, полученная для определенной нуклеотидной замены с учетом всех этих моментов, составила

$$\mu^n = 2,5 \times 10^{-9}.$$

Это число представляет собой вероятность замещения данного основания другим определенным основанием, в результате которого одна аминокислота меняется на другую. Такой же косвенный подход применялся в работе, выполненной позднее и обобщившей материалы о мутациях *de novo* в случае HbM и нестабильных гемоглобинов, идентифицированных как мутанты *de novo* [1643] (см. также разд. 5.1.3.3); в ней было проведено сравнение числа больных, выявленных в данной стране, с общим числом индивидов, родившихся в этой стране в течение одного или двух поколений. Авторы отдавали себе отчет в том, что оценка, основанная на столь ограниченных данных, может дать только очень грубое приближение к реальной величине. При ее вычислении предполагалось, например, что они действительно обнаружили всех больных, родившихся в этих популяциях на протяжении определенного временного периода. С другой стороны, неясно, все ли больные, изучавшиеся в этой работе, на самом деле являются мутантами *de novo*; тестирование на отцовство проводилось только для 19 из 55 обследованных больных. При всех этих оговорках, частота мутаций для отдельных нуклеотидов оказалась равной $5,3 \times 10^{-9}$ в случае нестабильных гемоглобинов *de novo*, $10,0 \times 10^{-9}$ в случае α -мутантов и $18,9 \times 10^{-9}$ в случае β -мутантов, откуда следует, что частота нуклеотидных мутаций в случае мутаций *de novo*, возникших в β -цепи, вычисленная на основе объединенных данных о нестабильных Hb и β -мутантах, равна $7,4 \times 10^{-9}$. Теперь эту оценку можно экстраполиро-

вать на весь ген Hb β (исключая, конечно, мутации других типов и в особенности те из них, которые происходят вне транскрибируемого участка ДНК и приводят к β -талассемиям). Частота, полученная в результате такой экстраполяции, составляет $8,6 \times 10^{-6}$ на ген β -цепи. Повторяем еще раз, что эта оценка представляет собой очень грубое первое приближение к фактической частоте, основанное на скудных данных и произвольной экстраполяции.

Оценка частоты кодонных мутаций была получена с применением совершенно иного (и тоже косвенного) подхода - из скорости эволюции глобиновых псевдогенов, поскольку было показано, что в отсутствие отрицательного отбора скорость замены кодона в процессе эволюции равна частоте мутаций (см. обсуждение «нейтралистской» гипотезы Кимуры в разд. 7.2.3). Итоговая оценка, равная 5×10^{-9} , удивительно сходна с другими оценками.

Оценка на основе более прямых данных. В Японии получены данные о громадной популяционной выборке, состоящей из нескольких сотен тысяч человек, использовавшиеся для оценки частоты мутаций [1498; 1510; 1702; 1511]. Частота редких вариантов в этой выборке равна 1:5000, а доля мутаций *de novo* среди всех вариантов составляет 1/12. Отсюда следует, что частота кодонных мутаций равна $\mu^n = 5 \times 10^{-9}$. Четыре полученные оценки, несмотря на то что данные, на основе которых они вычислялись, очень ограничены, удивительно хорошо согласуются друг с другом.

При тестировании новорожденных на наследственные болезни метаболизма был обнаружен и подтвержден проверкой отцовства один мутант *de novo*-вариант Hb α (из 25 000 образцов, проанализированных на варианты гемоглобинов) [1373]. Теоретически этот подход позволяет обнаружить мутации в десяти родительских генных локусах (1 β , 2 α и 2 γ у каждого родителя), однако электрофоретический метод не выявляет всех имеющихся мутаций.

Как сравнивать частоты кодонных мутаций с оценками, основанными на признаках фенотипического уровня? Сравнение этих оценок с оценками частот мутаций, рассчитанными по данным о специфических фенотипах (табл. 5.8), показывает, что все последние имеют один порядок $\approx 1 \times 10^{-5}$. Однако эти частоты основаны на материалах об относительно распространенных фенотипах, хорошо подходящих для расчетов частот мутаций. Как было показано выше, средняя частота возникновения мутаций в случае визуально диагностируемых патологических фенотипов, вероятно, ближе к 1×10^{-6} на гамету, чем к 1×10^{-7} или более низкой величине (разд. 5.1.3.2). Эта величина приблизительно в 40-400 раз больше оценок частот кодонных мутаций, однако на первый взгляд она вполне сравнима с приведенной выше оценкой для гена Hb β , полученной в результате экстраполяции. Очевидно, это объясняется тем, что классические фенотипы представляют собой результат большого числа мутационных событий, произошедших в одном гене. Как показало изучение полипептидных цепей, есть гены более длинные и более короткие. Кроме того, 100-1000-кратные различия по порядку величины между частотами кодонных и генных мутаций вполне соответствуют теоретически ожидаемым, если вспомнить, что некоторые мутации гемоглобинов не приводят к сколько-нибудь выраженному изменению фенотипа. Однако при проведении таких сравнений нужно учитывать следующее:

- 1) некоторые фенотипы, перечисленные в табл. 5.8, возможно, сформировались под влиянием двух или даже большего числа генетических факторов;
- 2) опыт медико-генетического изучения вариантов гемоглобина показал, что не все мутации одного и того же гена должны приводить к идентичным или даже похожим фенотипам. Фенотип, возникший в результате мутации, зависит скорее от специфического функционального изменения соответствующего белка (разд. 4.3). Например, мутация в гемоглобиновых генах может приводить к гемолитическим анемиям, эритроцитозу или вообще не вызывать никаких клинических симптомов. Не удивительно, если окажется, что различия между частотами «классических» мутаций для разных фенотипов объясняются тем, что в случае одних генов очень многие или даже

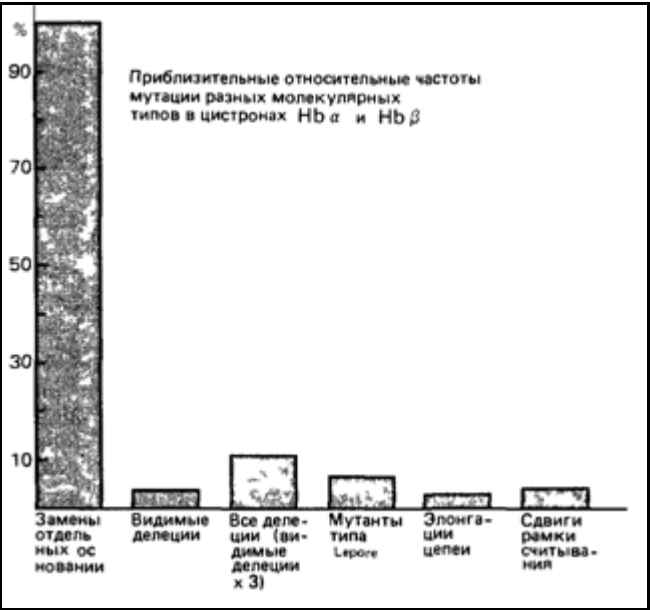
почти все мутации приводят к одному и тому же специфическому фенотипу, тогда как в случае других генов изучаемый фенотип возникает в результате одной единственной или очень немногих мутаций. Кроме того, гены различаются по длине.

Ожидаемое в ближайшее время увеличение производства ДНК-зондов поможет решить эти проблемы в ходе исследований на уровне ДНК.

Относительные частоты мутаций разных молекулярных типов в гемоглобиновых генах. Как отмечалось выше и подробно разъяснялось в разд 4 3, мутации, изменяющие гемоглобиновые гены, можно разделить на различные молекулярные типы. Приняв предположение, что относительные числа мутаций разного типа, зарегистрированных к настоящему времени, более или менее репрезентативны в отношении средней частоты их возникновения, мы можем оценить относительные частоты мутаций (рис 5 23). Эти относительные частоты мутаций дают лишь грубое приближение к фактическим величинам. Основными источниками смещения являются (1) широкие доверительные интервалы частот кодонных мутаций для отдельных аминокислотных замен и (2) смещения, связанные с выявлением у человека вариантов гемоглобина, принадлежащих к разным типам. Тем не менее по относительному порядку величин оценки для мутаций различных типов могут быть вполне точными. Например, весьма вероятно, что отдельные аминокислотные замены происходят довольно часто, делеции - гораздо реже, а элонгация цепей - событие очень редкое.

На первый взгляд наиболее разительное отличие в характере распределения мутаций гемоглобина и распределения мутаций у микроорганизмов заключается в редкости возникновения у человека мутаций сдвига рамки считывания. У бактерий большинство мутаций, поддающихся биохимическому анализу, представлено именно мутациями сдвига рамки считывания [1698], а у бактериофагов они составляют большую часть мутаций, зависящих от репликации [53]. Кроме того, нет оснований предполагать, что из всех возможных делеций, происходят лишь те, которые включают три или кратное трем число пар нуклеотидов. Очевидно, что делеций многих пар нуклеотидов будут часто приводить к сдвигам рамок считывания. На рис 5 23 это смещение скорректировано посредством умножения наблюдаемой частоты делеций на 3. Одна-

Рис. 5.23. Относительные доли и вероятные мутационные частоты для отдельных нуклеотидных замен, приводящих к заменам аминокислот, делеций на молекулярном уровне, мутаций типа Лепоре (аномальных рекомбинаций), мутаций сдвига рамки считывания и элонгации цепей. Число мутаций, нарушающих сплайсинг, по порядку величины равно числу неточковых мутаций (см раздел 4 3)



ко полученная величина оказалась по-прежнему гораздо меньше частоты замен отдельных аминокислот. Такая нехватка делеций отчасти может быть обусловлена пониженной выживаемостью. С другой стороны, спектр мутаций, выявленных у бактерий и фагов, смещен в противоположном направлении. Многие одиночные аминокислотные замены остаются незамеченными, так как они не приводят к обнаружимому фенотипическому эффекту [1698]. Например, мы можем выявить только 10% мутаций, возникающих, по имеющимся данным, в гистидиновом локусе *Salmonella*, благодаря их летальности; все остальные - это такие замены оснований, которые или не имели никакого эффекта, или лишь частично инактивировали генные локусы и не выявляются при тестировании [1374, 1512, 1695].

5.1.4.2. Проблема оценки общей частоты мутаций на геном и на поколение

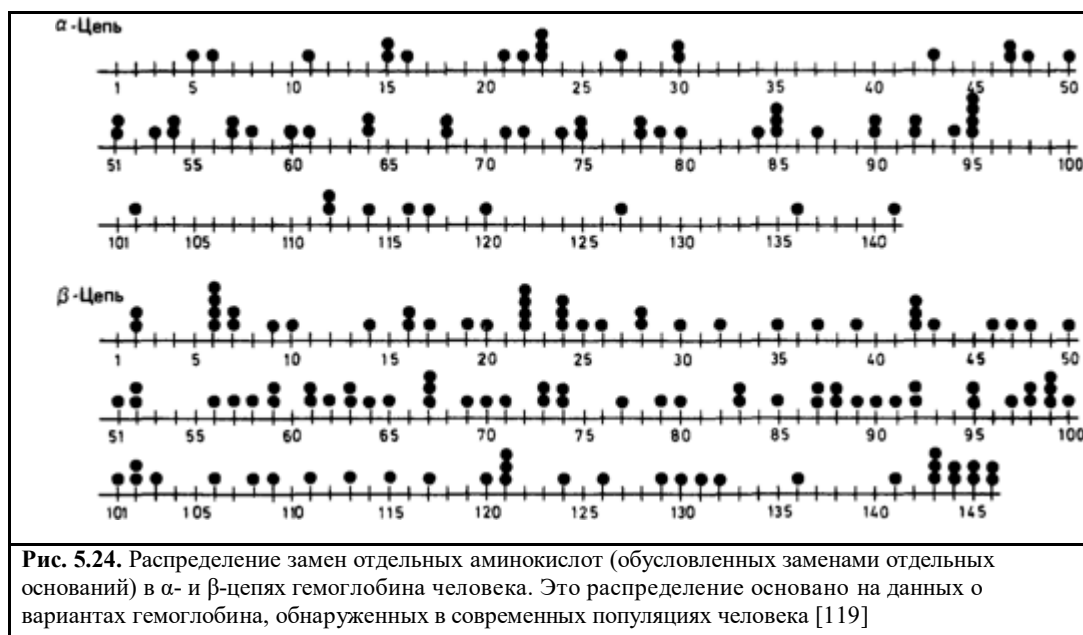
Условия, необходимые для получения оценки. До сих пор мы рассматривали только частоты мутаций отдельных генов или кодонов. Было бы желательно экстраполировать эти величины и получить общую частоту мутаций на геном. Однако решение этой проблемы требует выяснения ряда вопросов.

1. Необходимо знать частоты мутаций более чем одного кодона.
2. Надо располагать определенной информацией о том, являются ли частоты этих кодонных мутаций репрезентативными в отношении большинства кодонов структурных генов. Например, должно быть известно, возникают ли мутации в этих генах случайно или некоторые сайты более мутабельны, чем другие.
3. Происходят ли мутации вне структурных генов с теми же частотами, что и мутации в структурных генах? Как отмечалось выше (разд. 2.3), преобладающая часть ДНК человека не содержит структурных генов, кодирующих полипептидные цепи. Однако относительно функции большей части этой ДНК пока можно лишь строить предположения. При любой попытке оценить частоту мутации для генома в целом следует принимать во внимание возможную роль ДНК, не кодирующей структурные гены, о которой мы знаем так мало.

Случайно ли распределяются известные мутанты гемоглобина по длине генов Hb α и Hb β ? Один из наиболее поразительных феноменов, связанных со спонтанными мутациями у бактериофагов, - существование «горячих точек», т.е. точек, характеризующихся особенно высокой мутабельностью. Этот феномен был открыт Бензером (1957) [1390] на фage T4 *E. coli*. Если, обобщая, перейти от гемоглобиновых генов ко всему геному человека, следует в первую очередь поставить вопрос, можно ли обнаружить такие горячие точки также и у людей. Наиболее прямой подход, который здесь можно было бы применить, заключается в сравнении частот мутаций в различных сайтах внутри генов. Однако осуществление этого подхода невозможно, так как такие частоты мутаций неизвестны. Поэтому пришлось ограничиться изучением распределения известных мутантов по длинам α - и β -генов.

Отклонения от случайности могут быть в том случае, если частота мутаций одних кодонов выше, чем других, или если некоторые кодоны проявляют более выраженную или менее выраженную тенденцию к мутационному превращению, чем соседние с ними. Распределение известных мутаций в генах Hb α и Hb β показано на рис. 5.24 [119]. Небольшое отклонение от случайности для генов Hb α можно объяснить с помощью правдоподобного предположения о том, что определенные сайты столь важны для функции, что мутации в них несовместимы с жизнью и потому не будут выявляться и учитываться в соответствующих исследованиях.

Вполне возможно, что новых мутаций в расчете на геном и поколение возникает много, однако получение достоверной оценки их частоты пока невозможно. Общее количество ДНК в гаплоидной клетке человека равно $\sim 3,0 - 3,5 \times 10^{-12}$ г, а гаплоидный геном содержит около $3 - 3,5 \times 10^9$ пар нуклеотидов. Поскольку один кодон состоит из трех нуклеотидных пар, максимально возможное число кодонов равно приблизительно 1×10^9 . Учитывая приведенную оценку, можно предположить, что частота кодонной мутации, приводящей к замене одного определенного основания, составляет $2,5 \times 10^{-9}$. Чтобы охарактеризовать общую мутабельность на кодон,



выраженную через количество аминокислотных замен, это число надо умножить приблизительно на 7: каждое основание может быть замещено любым из трех других и приблизительно 75% всех нуклеотидных замен, главным образом в первых двух позициях кодонов, приводит к аминокислотным заменам. Отсюда следует, что общая частота мутаций равна $1,75 \times 10^{-8}$ на кодон. Умножая эту величину на 1×10^9 , получаем 17,5 мутаций на гаплоидный геном или одну половую клетку и 35 мутаций de novo на индивида (две половые клетки), принадлежащего к данной популяции.

Это число настолько велико, что вызывает определенный страх. Возникает вопрос: как же удастся человеческому роду продолжать свое существование? Даже если принять во внимание, что многие из известных мутаций гемоглибиновых генов оказывают слабое неблагоприятное влияние или совсем не оказывают вредного влияния на своих носителей, трудно допустить, что частота мутаций может иметь такую величину. Наиболее распространенный ответ состоит в том, что преобладающая часть ДНК человека не содержит структурных генов, кодирующих специфические белки, а имеет какую-то другую, менее специфическую, возможно регуляторную, функцию, или в том, что большие ее участки фактически лишены функции: они представляют собой, говоря словами Оно [1588], некий «хлам» или их функция имеет столь универсальный характер, что большинство замен отдельных пар оснований фактически не имеет никакого значения. Вспомним, например, что гетерохроматину приписывалась в порядке рабочей гипотезы функция «стража тела» [385]. Поразительно высокий уровень полиморфизма сайтов рестрикции, обнаруженный при изучении нетранскрибируемых участков ДНК (разд. 2.3.2.7), подкрепляет это предположение, так как он вряд ли мог бы поддерживаться, если бы это было сопряжено с риском для каких-то важных функций. Тем не менее Нил [1578] высказал мысль, что эта «молчащая» ДНК едва ли может быть свободной от влияния мутаций и – рано или поздно – от давления отбора. Он склоняется к предположению, что частоты мутаций разных кодонов могут обнаруживать сильные различия.

Фрагментарность информации, которой на сегодняшний день мы располагаем, не позволяет даже гипотетически решить эту

проблему. Наша цель состоит скорее в том, чтобы поставить вопросы, нежели в том, чтобы ответить на них [1510, 157, 1673]. Знакомство с результатами проведенного в последующие годы изучения структуры хроматина (разд. 2.3) позволяет надеяться, что на некоторые из этих вопросов скоро будет получен ответ.

5.1.4.3. Мутации в гемоглобиновых генах и генетический код

Аминокислотные замены в полипептидной цепи отражают соответствующие нуклеотидные замены в ДНК. Так как генетический код известен с начала 1960-х годов, изучение аминокислотных замен, особенно в гемоглобинах, позволило идентифицировать замены оснований в матричной РНК и, поскольку мРНК комплементарна транскрибируемой цепи ДНК, в самих генах. Это можно проиллюстрировать на примере гемоглобина с мутацией серповидноклеточности:

- 1)изменение биохимического фенотипа: НbА → НbS;
- 2)аминокислотная замена: глутаминовая кислота → валин;
- 3)кодоны:

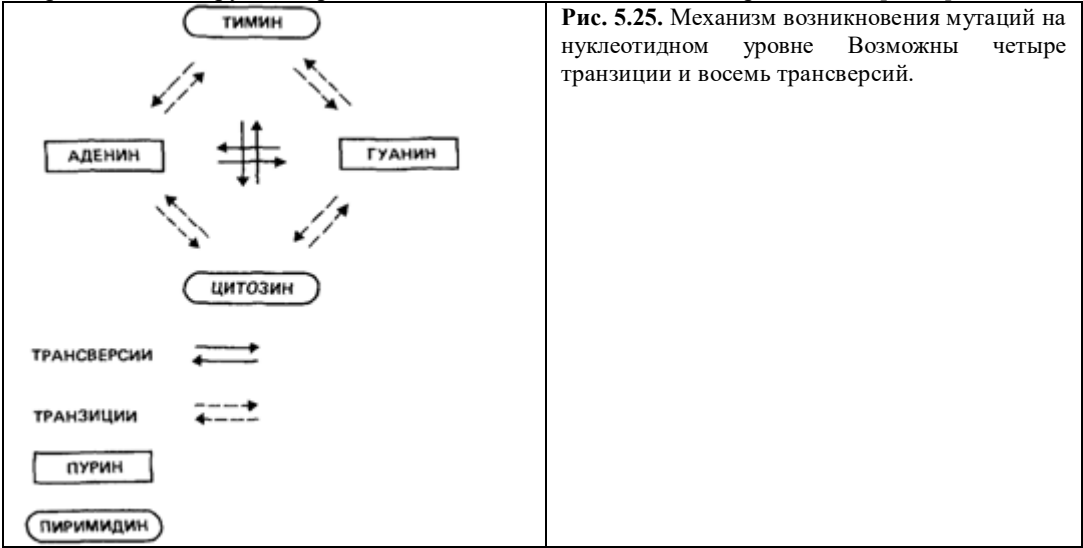
Глутаминовая кислота		Валин	
мРНК	ДНК	мРНК	ДНК
GAA	СТТ	GUA	САТ
GAG	СТС	GUG	САС
		GUU	СAA
		GUC	СAG

- 4) возможные замены оснований в случае, если в ДНК произошла только одна нуклеотидная замена:

СТТ →САТ СТС →САС;

- 5)замена основания в ДНК: Т (тимин) →А (аденин);
- 6)типы замены: пуриновое основание замещается пиримидиновым.

Этот тип замены называется «трансверсией». Замена пурина на другой пурин или пиримидина на другой пиримидин известна под названием «транзиции» [1457].



Транзиции происходят чаще, чем можно было бы ожидать, если бы замены оснований носили случайный характер. Любое нуклеотидное основание может заместиться в результате одной транзиции и двух трансверсий (рис. 5.25). Поэтому, если бы направление мутационного процесса было случайным, трансверсии происходили бы вдвое чаще, чем транзиции. Однако из-за вырожденности генетического кода не все нуклеотидные замены приводят к аминокислотным заменам. В табл. 5.16 приведены данные о наблюдавшихся транзициях и трансверсиях различных типов. Транзиции происходят значительно больше, чем можно было бы ожидать в случае, если бы направление мутаций было случайным [1681].

Этот результат нельзя объяснить смещением, обусловленным применением метода электрофореза, выявляющего только те аминокислотные замены, которые приводят к различиям по заряду. В действительности доля «полярных» (и обнаружимых) замен среди всех возможных трансверсий выше, чем среди транзиции. О повышенной частоте транзиции, происходящих в естественных условиях, свидетельствуют также результаты изучения amino-

Таблица 5.16. Замена оснований в разных типах гемоглобина человека [1681]									
		Все замены					Только те замены, которые приводят к потере функции		
		α-цепь	β-цепь	γ-цепь	δ-цепь	Всего	α-цепь	β-цепь	Всего
Транзиции	A→G	1	10	0	0	11	0	0	0
	G→A	4	4	0	0	8	0	0	0
	T→C	7	16	4	1	28	7	8	15
	C→T	13	24	3	2	42	9	17	26
Всего		25	54	7	3	89	16	25	41
Трансверсии	A→T	0	6	0	0	6	0	2	2
	T→A	2	4	0	0	6	2	3	5
	A→C	3	6	0	0	9	1	1	2
	C→A	4	5	1	0	10	2	2	4
	G→T	6	6	1	1	14	6	4	10
	T→G	4	10	1	0	15	2	6	8
	G→C	7	5	0	0	12	4	1	5
	C→G	9	6	0	0	15	6	3	9
Неустановленные трансверсии		8	13	0	1	22	0	0	0
Всего		43	61	3	2	109	23	22	45

кислотных замен при дивергенции белков, имеющих общее происхождение, и сравнения родственных форм РНК. Следовательно, вполне вероятно, что при спонтанном мутировании транзиции происходят чаще, чем можно было бы ожидать, если бы направление мутационного процесса было случайным. Этот результат не удивителен, если рассматривать его в свете данных о молекулярных механизмах индуцированных мутаций.

Исследования с использованием многих ферментов рестрикции, которые были предприняты для выявления полиморфных сайтов в уникальной ДНК человека, показали, что с особенно высокой эффективностью такие сайты выявляются с помощью ферментов, опознающих последовательность CpG [1382]. Цитозины в этой последовательности часто метилированы; вместе с тем имеются данные, полученные на других объектах, например, бактериях, свидетельствующие о том, что метилированный цитозин может быть горячей точкой спонтанных мутаций.

5.1.4.4. Мутации у микроорганизмов: их вклад в понимание механизма мутаций у человека

Мутации как ошибки репликации ДНК. Данные, полученные на человеке, свидетельствуют о существовании тесной связи между мутациями и клеточными делениями. Импульсом к изучению этой проблемы послужила гипотеза о механизме возникновения точковых мутаций Уотсона и Крика (рис. 5.26) [1347]. Важную роль в этом сыграли и ранние исследования на микроорганизмах, из которых следовало, что многие спонтанные мутации действительно возникают во время репликации ДНК в результате ошибочной вставки неправильного нуклеотида, приводящей к появлению в будущих клеточных поколениях новой, отличающейся пары оснований. В последние десятилетия получено до удивления мало новых данных о механизмах возникновения спонтанных мутаций, что очень сильно контрастирует с громадным объемом имеющихся в настоящее

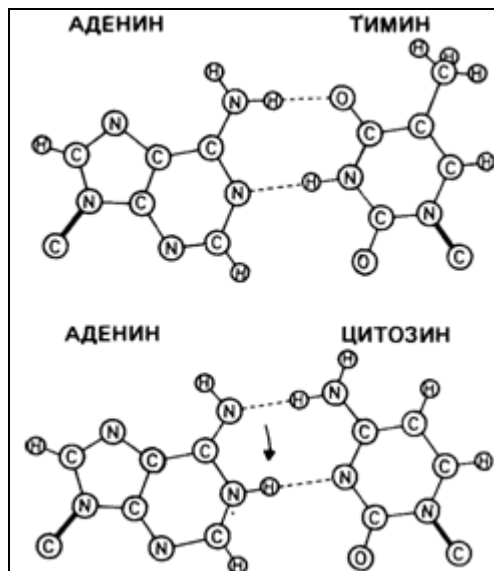


Рис. 5.26. Механизм возникновения точковой мутации в результате замены основания (в соответствие с моделью Уотсона -Крика). Предполагается, что любое основание на короткое время может принимать редкую таутомерную конфигурацию и образовывать пару не со своим обычным партнером, а с другим основанием, например аденин может спариться не с тиминном, а с цитозином. Ко времени следующего репликационного цикла оба основания примут свои наиболее вероятные конфигурации и образуют пары со своими обычными партнерами. Следовательно, две молекулы следующего поколения будут отличаться от своих предшественников, т. е. произошла точковая мутация [1347].

время материалов о механизмах индуцированного мутагенеза.

Учитывая важность спонтанных мутаций для эволюции (разд. 7.2.3) и для любых прогнозов биологического будущего человеческого вида, трудно понять, почему этих данных так мало. Наиболее очевидное объяснение состоит в том, что эволюционисты-теоретики обычно не принимают участия в планировании экспериментов по генетике микроорганизмов. Кроме того, изучение спонтанных мутаций в большинстве случаев отнимает намного больше времени, чем эксперименты по индуцированному мутагенезу. Тем не менее коекакими данными такого рода мы располагаем. Как и предполагалось, аминокислотные замены, возникшие в результате спонтанной точковой мутации в локусе триптофансинтетазы *A. E. coli*, обусловлены замещением одного основания точно так же, как и точковые мутации гемоглобина [1703].

Детальному анализу подверглись мутации в области *rII* бактериофага T4 [53]. Преобладающее большинство из них связано с репликацией и представляет собой сдвиги рамок считывания. Особенно часто такие мутации возникают в двух горячих точках. Если исключить из рассмотрения мутации, происходящие в них, отношение частот сдвигов рамок считывания к одиночным нуклеотидным заменам снижается с 3,3 до 1,6. Данные, свидетельствующие о том, что и у бактерий мутации зависят от репликации, представлены в работе Кондо [1524].

Таким образом, у микроорганизмов многие мутации, вероятно даже подавляющее большинство, связаны с репликацией. Часть из них вызвана заменой одного основания, в других случаях мутации – результат сдвига рамки считывания. Это означает, что объяснение эффекта отцовского возраста и различий по полу (разд. 5.1.3) ошибочным спариванием оснований в процессе репликации хотя и может быть правильным во многих случаях, не обязательно должно касаться всех мутаций.

В течение долгого времени возможность возникновения каких-либо репликационнонезависимых спонтанных мутаций казалась сомнительной. Было известно о накоплении мутаций в неделящихся гаметах *Drosophila*, в спорах *Neurospora* и у *E. coli* в стационарной фазе. Однако в этих случаях мог иметь место репаративный синтез ДНК. Определенный ответ в конце концов был получен в исследованиях на бактериофаге T4 [53]. В свободных фаговых частицах не происходит ни репарации, ни репликации, однако было обнаружено, что в определенных *rII*-мутантах с течением времени имеет место линейное накопление реверсий. Однако их частота была низкой по сравнению с частотой при репликации. В случае репликационно-независимых мутаций сдвиги рамок считывания были редки, а трансверсии происходили чаще, чем в случае репликационно-зависимых мутаций.

Гены-мутаторы. В 1937 г. Демерец [1435] описал «нестабильные» гены в определенных линиях *Drosophila melanogaster*. С тех пор стали известны многочисленные примеры генетически детерминированных, необычайно высоких мутационных частот как у эукариот, так и у прокариот. Причины этой повышенной мутабельности часто можно связать с «геном-мутатором». Анализ влияния таких генов дал ценную информацию о взаимодействии различных факторов (полимераз, ферментов репарации и т.д.) [53; 1439; 1558], участвующих в мутационном процессе. В случае точковых мутаций в половых клетках нет никаких данных, свидетельствующих о том, что такие гены-мутаторы действительно существуют. Было бы интересно провести тщательный поиск крайне редких человеческих семей с двумя мутациями. Однако при анализе мутаций в отдельных клетках гены-мутаторы были идентифицированы (см. ниже).

Происходят ли мутационно-подобные события под влиянием вирусов и транспозонов? До сих пор спонтанные мутации рассматривались в свете классических концепций (замена основания, делеция, рекомбинация). Однако при обсуждении новых результатов, касающихся структуры хромосом и ДНК у человеческих индивидов (разд. 2.3), мы упоминали также о транспозонах или «прыгающих генах». Фенотипически их проявления неотличимы от эффектов классических мутаций. Мы не знаем, играют ли транспозоны какую-либо роль при возникновении и передаче мутаций в половых клетках человека. Однако, поскольку они обнаружены не только у прокариот [520], но также и у некоторых эукариот (см. разд. 2.3.4), их присутствие у человека представляется вполне вероятным.

Латентные вирусы могут передаваться вертикально от поколения к поколению, не оказывая какого-либо вредного действия. Вместе с тем они могут влиять на физиологию своих хозяев. Все клубни картофеля сорта Кинг Эдуард несут вирус морщинистой курчавости листьев, не проявляя при этом симптомов заболевания, однако растения, не содержащие вируса, отличаются по внешнему виду от растений обычных линий и дают более высокий урожай. В системах *in vitro* было показано, что некоторые патогенные вирусы, например вирус немецкой кори, индуцируют хромосомные aberrации у человека [1386, 1479]. Такие aberrации можно также индуцировать в хромосомах клеток зародышевого пути (в 1-м мейотическом делении) самца мыши [1655]. Еще в 1963 г. Тейлор [1654] обнаружил, что фаг Mu *E. coli* индуцирует множество генных мутаций в различных сайтах. Впоследствии этот фаг был назван транспозоноподобным. Как выяснилось, многие спонтанные фаговые мутации имеют транспозонную природу. В последующем было обнаружено, что вирусы животных, например SV40 и вирус полиомы, способны индуцировать генные мутации в клетках млекопитающих (в клеточных линиях китайских хомячков и мышей) [1463]. Как уже отмечалось (разд. 5.1.3.3), частоты многих доминантных мутаций заметно растут с увеличением возраста отцов. Но в некоторых случаях эффект отцовского возраста настолько слабый, что невозможно решить, обусловлен ли он действительно возрастом отцов, матерей или и тех и других. Соответствующий пример приведен на рис. 5.19, где показано увеличение частоты ретинобластомы. К доминантным заболеваниям, проявившим лишь небольшое увеличение частоты, относятся нейрофиброматоз, туберозный склероз и полипоз кишечника. Все эти заболевания - опухолевые. Вирусная индукция опухолей в соматических тканях и роль онкогенов будут рассматриваться в разд. 5.1.6.5. Здесь выскажем только предположение, что в случае перечисленных выше болезней именно мобильные элементы или вирусы могут вызывать в клетках мутационноподобные события.

5.1.5. Изучение генных мутаций в отдельных клетках

В свете успехов генетического анализа микроорганизмов представлялось многообещающим изучение проблем генетики человека на отдельных клетках. Развитие этого подхода описано в разд. 4.2.2.1. Принимая во внимание низкую частоту спонтанных мутаций и методические сложности, затрудняющие изучение популяционных выборок, размер которых был бы достаточен для получения даже грубой оценки на уровне индивида, можно было предположить, что реализация подхода на уровне отдельных клеток увеличила бы разрешающую способность генетического анализа на несколько порядков.

*Попытка изучения мутаций *in vivo*.* Этвуд и Шейнберг [1378] разработали метод, позволяющий удалять из образца крови путем агглютинации с анти-А сывороткой все те клетки,

которые реагируют с этой анти-А сывороткой, оставляя в нем только не реагирующие клетки. У пробандов, имеющих группу крови АВ, было найдено некоторое количество клеток, неспособных к агглютинации. Согласно предложенной интерпретации, эти клетки потеряли антиген А, сохранив антиген В. Относительная частота этих клеток у различных индивидов изменялась от 0,5 до 10,9/1000 клеток. Согласно гипотезе, эти клетки являются соматическими мутантами. Однако масштабы феномена делают такую интерпретацию маловероятной. Кроме того, результаты дополнительного иммунологического изучения данной системы порождают серьезные сомнения в мутационном происхождении клеток, не способных к агглютинации. Несмотря на то что попытка изучения мутационного процесса *in vivo* успеха не имела, она по-прежнему представляет интерес.

Центральной проблемой мутационных исследований, проводимых на отдельных клетках, остается вопрос о том, действительно ли клетки, проявляющие aberrantный по биохимическим или иммунологическим признакам фенотип, являются мутантами *de novo* или только продуктами некоего вторичного изменения, не влияющего на генетический материал. Предпринятые недавно повторные попытки выявления гемоглобиновых вариантов в отдельных эритроцитах оказались успешными [1642].

Изучение мутантных клеток in vitro. Методы культивирования нормальных диплоидных клеток человека *in vitro* описаны в разделе 4.2.2.1 [1418]. Одна из главных трудностей, возникающих при изучении мутационного процесса в таких клетках, связана с его низкой эффективностью. Для выделения очень немногих мутантных клеток из гораздо большего числа нормальных требуются специальные методы селекции. Принцип, лежащий в их основе, описан в разд. 4.2.2.6 на примере синдрома Леша—Найхана, обусловленного дефектом фермента гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (HPRT). Вместо гипоксантина к исследуемым клеткам добавляют 8-азагуанин, который, связавшись с нормальным ферментом, обуславливает гибель клеток. Выживут только те из них, которые неспособны превращать это соединение из-за дефекта HPRT.

Имеются и другие селективные системы, применяемые, например, в случаях галактоземии, цитруллинемии и оротикацидурии. Предложен многообещающий подход, при котором эритроциты, содержащие гемоглобиновые варианты, возникшие в результате предполагаемой соматической мутации, идентифицируются с помощью специфических антител, полученных против определенных вариантных гемоглобинов.

Как отмечалось выше, вариант, выделенный в клеточной культуре, не обязательно возникает вследствие истинно генетического, наследуемого изменения. Для подтверждения мутационной природы требуются по крайней мере два критерия.

1. Доказательство стабильности селектированного фенотипа.
2. Положительные результаты флуктуационного теста Лурия и Дельбрюка [1538], основанного на принципе, согласно которому при сравнении большого числа микробиологических культур многочисленные мутантные клетки будут иметь лишь очень немногие из них (мутация произошла на ранних стадиях развития культуры), тогда как большинство культур будут содержать очень мало мутантных клеток (мутационное событие произошло на поздних стадиях). Во многих культурах мутантных клеток вообще не будет (рис. 5.27). Методы определения частоты спонтанных мутаций основаны именно на флуктуационном тесте; на рис. 5.27, В, например, каждая колония представляет собой мутантный клон, произошедший из одной клетки.

В табл. 5.17 приведены оценки частоты спонтанных мутаций для локуса HPRT. На первый взгляд эти частоты имеют тот же порядок, что и частоты мутаций в половых клетках человека, рассчитанные для наследственных болезней по фенотипическим признакам (табл. 5.8). Однако последние получены на смещенной выборке признаков, являющихся конечным результатом нескольких десятков клеточных делений. Поэтому сравнение с частотами мутаций в соматических клетках не имеет большого смысла.

В работе с использованием системы HPRT было обнаружено, что в фибробластах двух больных с синдромом Блума частота спонтанных мутаций выше (до $19 - 23 \times 10^{-6}$), чем в нормальных фибро-

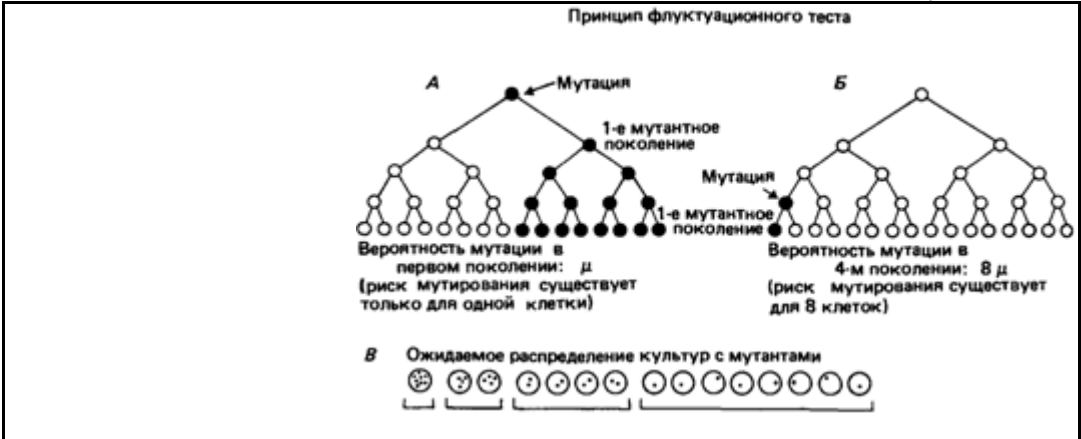


Рис. 5.27. Иллюстрация принципа, положенного в основу флуктуационного теста Луриа и Дельбрюка [1538]. Если клеточное деление носит дихотомический характер, в первом поколении после начала деления будет $2^1 = 2$ клетки; во втором – $2^2 = 4$ клетки; в третьем поколении $2^3 = 8$ клеток и т. д. Если все изучаемые культуры клеток берут начало от одной-единственной клетки и если частоты мутаций одинаковы во всех клеточных поколениях, можно рассчитать относительное число культур с 0, 1, 2, ... мутантными клетками, зависящее от того, в каком клеточном поколении произошла мутация. Например, если мутация возникла в первом делении, половина всех клеток будут мутантными (А). В этом случае риск мутирования существует только для одной клетки. С другой стороны, если мутация происходит в делении, непосредственно предшествующем изучению данной культуры, мутантной окажется одна-единственная клетка (Б). Однако в случае такой мутации риск мутирования существует для 2^{n-1} клеток, где n - число клеточных поколений. (В). Ожидаемое распределение мутантов в культурах.

бластах ($4,6 - 4,9 \times 10^{-6}$) [1688]. Синдром Блума представляет собой синдром хромосомной нестабильности; следовательно, соответствующий ген является одним из генов-мутаторов человека. Повышенная частота мутаций была выявлена в исследованиях *in vivo*.

Увеличение мутационной частоты нашло подтверждение при изучении лимфоцитов больных с синдромом Блума и с другими синдромами хромосомной нестабильности [1666; 1666a]. Вот соответствующие цифры:

Нормальные контрольные клетки:	2,0 — $4,4 \times 10^{-4}$
Синдром Блума (7 пациентов):	8,5 — $24,9 \times 10^{-4}$
Анемия Фанкони (2 пациента):	20,0 — $22,6 \times 10^{-4}$
Атаксия-телеангиэктазия	$8,5 \times 10^{-4}$ (1 пациент):

Таблица 5.17. Частота спонтанных мутаций устойчивости к 8-азагуанину в клетках человека и китайского хомячка [1683]

Клеточная линия	Уровень пloidности	Частота
А. Человек		
D98 ¹⁾	Анеуплоид	$4,9 \times 10^{-4}$
L54 ²⁾	Диплоид	$7,0 \times 10^{-5}$
Глен ²⁾	Анеуплоид	$7,0 \times 10^{-5}$
Фибробласты ³⁾	Диплоид	$4,1 \times 10^{-6}$
Б. Китайский хомячок		
237 ²⁾	Гиподиплоид	$4,0 \times 10^{-5}$
V5 ⁴⁾	Диплоид	$2,2 \times 10^{-5}$
V25 ⁴⁾	Тетраплоид	$4,7 \times 10^{-5}$
V68 ⁴⁾	Октаплоид	$1,9 \times 10^{-5}$
V79 ⁵⁾		$1,5 \times 10^{-8}$

¹⁾ Данные Шибальски и Смита.
²⁾ Данные Шапиро и др.
³⁾ Данные Де Марса и Хелда.
⁴⁾ Данные Харриса
⁵⁾ Данные Чу и др.

5.1.6. Соматические мутации

Мутации могут происходить и в половых, и в соматических клетках. Эффект соматической мутации обнаруживается у потомков мутантной клетки, такая мутация делает индивида мозаиком. Мозаик - это особь со смешанной клеточной популяцией. В простейшем случае популяция нормальных клеток и популяция мутантных клеток сосуществуют у одного индивида. Это доказано для фибробластов и для клеток других типов. Например, можно убедиться в том, что клетки из разных участков характеризуются разными маркерами, например разными типами G6PD.

5.1.6.1. Образование мозаиков по геномным мутациям

Мозаики по геномным мутациям встречаются довольно часто. Сообщалось, например, что в случае синдрома Дауна один мозаик приходится на 48 пациентов, имеющих стандартную трисомию. Исходя из оценки популяционной частоты синдрома Дауна, равной 1:650, получаем, что частота мозаиков составляет 1:31 000. Она также обнаруживает зависимость от материнского возраста, но в меньшей степени, чем частота простой трисомии по 21-й хромосоме [483].

Механизм образования мозаиков на ранних стадиях дробления. Анализ эффекта материнского возраста позволяет сделать некоторые выводы относительно механизма возникновения мозаиков при синдроме Дауна. Мозаик может развиваться из нормальной зиготы. В таких случаях нерасхождение должно происходить в одном из ранних (но не первом) делении дробления ¹⁾. Моносомный продукт этого деления обычно теряется. Мозаик может сформироваться также из трисомной зиготы. В этом случае одна клеточная линия должна потерять дополнительную хромосому вследствие анафазного отставания или же должно произойти нерасхождение в соматической клетке (вторичное нерасхождение; рис. 5.28). Можно оценить долю мозаиков, возникших в результате осуществления каждого из этих механизмов. Если они образуются из нормальных зигот, тенденция увеличения возраста матерей не должна проявляться. В случае их возникновения из трисомных зигот следует ожидать увеличения возраста матерей, сходного с тем, которое обнаружено при обобщенном изучении синдрома Дауна. Все мозаики вместе - результат реализации обоих механизмов; средний возраст матерей будет зависеть от доли мозаиков, возникших в результате действия каждой из указанных причин. Проведенный расчет показал, что из 40 мозаиков, описанных в литературе, 20% развились из нормальных зигот. Из этого расчета можно получить сравнительную оценку частоты определенных нарушений митоза, происходящих в нормальных и трисомных зиготах (табл. 5.18). Вычисления показали, что трисомные зиготы обнаруживают почти в 40 раз более сильную тенденцию к анафазному отставанию, чем нормальные клетки, а нерасхождение в первом случае происходит в 70 раз чаще, чем во втором. Однако данные оценки применимы только для мозаиков, развивающихся в индивидов с клинически диагностируемым синдромом Дауна. Вероятность этого намного выше для зигот, бывших первоначально трисомными, чем для зигот, которые при своем образовании были нормальными.

На более поздней стадии развития могут возникнуть трисомии с небольшой долей трисомных клеток. Фенотипически они часто бывают нормальными или проявляют лишь слабо выраженные признаки синдрома Дауна, например они могут иметь аномальную дерматоглифику. Они могут быть родителями детей с синдромом Дауна, если участок их яичника или семенника состоит из клеток, имеющих аномальный кариотип. Такие слабовыраженные мозаики, по-видимому, составляют значительную часть родителей детей с синдромом Дауна. 1%-й риск воспроизведения трисомного синдрома Дауна может быть связан с гонадной трисомией по 21 хромосоме того же типа.

¹⁾ Нерасхождение в первом делении дробления привело бы к образованию трисомного и моносомного продуктов деления и с потерей моносомной клетки - к возникновению стандартной трисомии

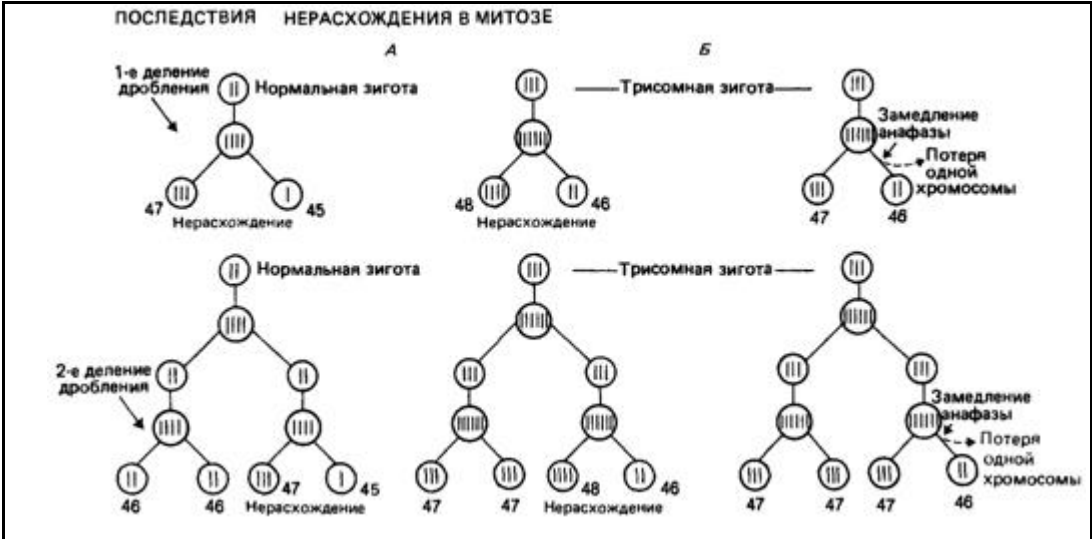


Рис. 5.28. Вторичное нерасхождение и анафазное отставание как механизмы возникновения мозаиков. *А.* Нормальная зигота, вторичное нерасхождение. *Б.* Трисомная зигота, вторичное нерасхождение, анафазное отставание. (На рис. вместо слов «замедление анафазы» следует читать «анафазное отставание».)

Таблица 5.18. Частота клинически диагностируемых мозаиков по монголизму, развившихся из зигот разного типа в результате различных нарушений митоза [483]

Нерасхождение при митозе в нормальной зиготе	Нерасхождение при митозе в трисомной зиготе				Нарушение митоза зиготы, имеющей структурную аномалию 21-й хромосомы (несбалансированные зиготы) ²⁾
Оценка основана на	Частоты	Оценка основана на:	Нерасхождение	Замедление анафазы	
относительной частоте мозаиков, возникших в результате нерасхождения при митозе в нормальной зиготе среди всех больных с синдромом Дауна;	1/250 ¹⁾	относительной частоте мозаиков, возникших в результате нерасхождения или замедления анафазы в зиготе с трисомией по 21-й хромосоме	1/2349	37/2349	3/55
частоте больных с синдромом Дауна в популяции;	1/650				
вычисленной частоте нарушений митоза в нормальных зиготах	$1/250 \times 1/650 = 1/160000$	вычисленной частоте нарушений митоза в зиготе с трисомией по 21-й хромосоме	1/2300	1/60	1/18

¹⁾ По данным о 2466 больных с синдромом Дауна
²⁾ По данным о 250 мозаиках. Транслокация G/G, по-видимому, увеличивает риск нарушений митоза.

5.1.6.2. Наследственные синдромы с повышенной нестабильностью хромосом [1465; 1464; 1634]

Анемия Фанкони (22765). Анемия Фанкони - это детская панмиелопатия, сопряженная с дефицитом костного мозга, приводящим к панцитопении. Больные, как правило, имеют скелетные аномалии, главным образом большого пальца и лучевой кости, и характеризуются гиперпигментацией; часто у них обнаруживают другие пороки развития. Заболевание наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Анализ возрастов начала болезни привел к предположению о ее генетической гетерогенности [1638]. Это предположение впоследствии подтвердилось. Было показано, что при слиянии клеток больных с различными клиническими формами патологии происходит взаимная коррекция хромосомной нестабильности [1707]. Существует более распространенная форма, при которой начало болезни приходится на первые годы жизни, и более редкая, когда заболевание возникает в подростковом возрасте. Изучение комплементации между больными, имеющими различные особенности системы репарации [1706] или различное этническое происхождение [1708], не выявило дополнительной генетической гетерогенности. Недавно в ходе исследований клеточной гибридизации были идентифицированы по крайней мере две различные формы этого заболевания.

Шредер и др., 1964 [1635] описали двух братьев с этой болезнью - 21 года и 18 лет. Их родители и младший брат (7 лет) были здоровы. У старшего брата обнаружены отклонения от нормального кариотипа: метафазы с множественными хромосомными aberrациями, например с ахроматическими повреждениями (пробелами), хроматидными разрывами; изохроматидными разрывами, ацентрическими фрагментами, дицентрическими хромосомами и хроматидными обменами; в 19 из 39 метафаз выявлено по крайней мере по одной, а в нескольких случаях многочисленные аномалии. Эндорепликация отмечена приблизительно в 10% всех метафаз. У среднего брата, не проявляющего клинических симптомов, обнаружено несколько меньшее число митозов с хромосомными aberrациями, однако спектр аномалий такой же, как и у старшего брата. Шесть лет спустя и у него развились клинические симптомы заболевания. В 32 года больной скончался от множественной геморрагии. При аутопсии у него был обнаружен клинически недиагностируемый рак легких [1634].

Это были первые опубликованные сведения о случаях хромосомной нестабильности при наследственном заболевании. Вскоре данный результат подтвердился при обследовании других больных (рис. 5.29).

Синдром Блума (21090). Синдром Блума характеризуется низким весом при рождении, задержкой роста, чувствительностью кожи к солнечному свету и поражением лица телеангиэктазией. Наследуется он по аутосомно-рецессивному типу. Большинство больных родилось в семьях евреев-ашкенази. Герман и др. [1466], просматривая метафазы в культурах крови семи пациентов, обнаружили у шести из них высокую частоту (4-27%) клеток с разорванными, а иногда и перестроенными хромосомами. При синдроме Блума выявляются и другие цитогенетические аномалии, описанные в случае анемии Фанкони. Отличительный признак синдрома Блума - симметричные четырехлучевые хроматидные обмены, никогда не встречающиеся при анемии Фанкони. По-видимому, они возникли вследствие хроматидных обменов между гомологичными хромосомами. В противоположность этому при анемии Фанкони обычны асимметричные четырехлучевые фигуры, возникшие в результате случайных разрывов негомологичных хромосом. При синдроме Блума частота обменов сестринских хроматид (разд. 2.1.2) была в десять раз выше, чем у здоровых людей или больных с анемией Фанкони. Хотя на первый взгляд эти болезни имеют что-то общее, основные механизмы, приводящие к возникновению синдрома Блума и анемии Фанкони, совершенно различны.

Атаксия-телеангиэктазия (20890) [1477]. Двумя постоянными клиническими признаками синдрома атаксии-телеангиэктазии (Луи-Бар) являются прогрессирующая мозжечковая атаксия и глазокожная телеангиэктазия. Атаксия обычно диагнос-

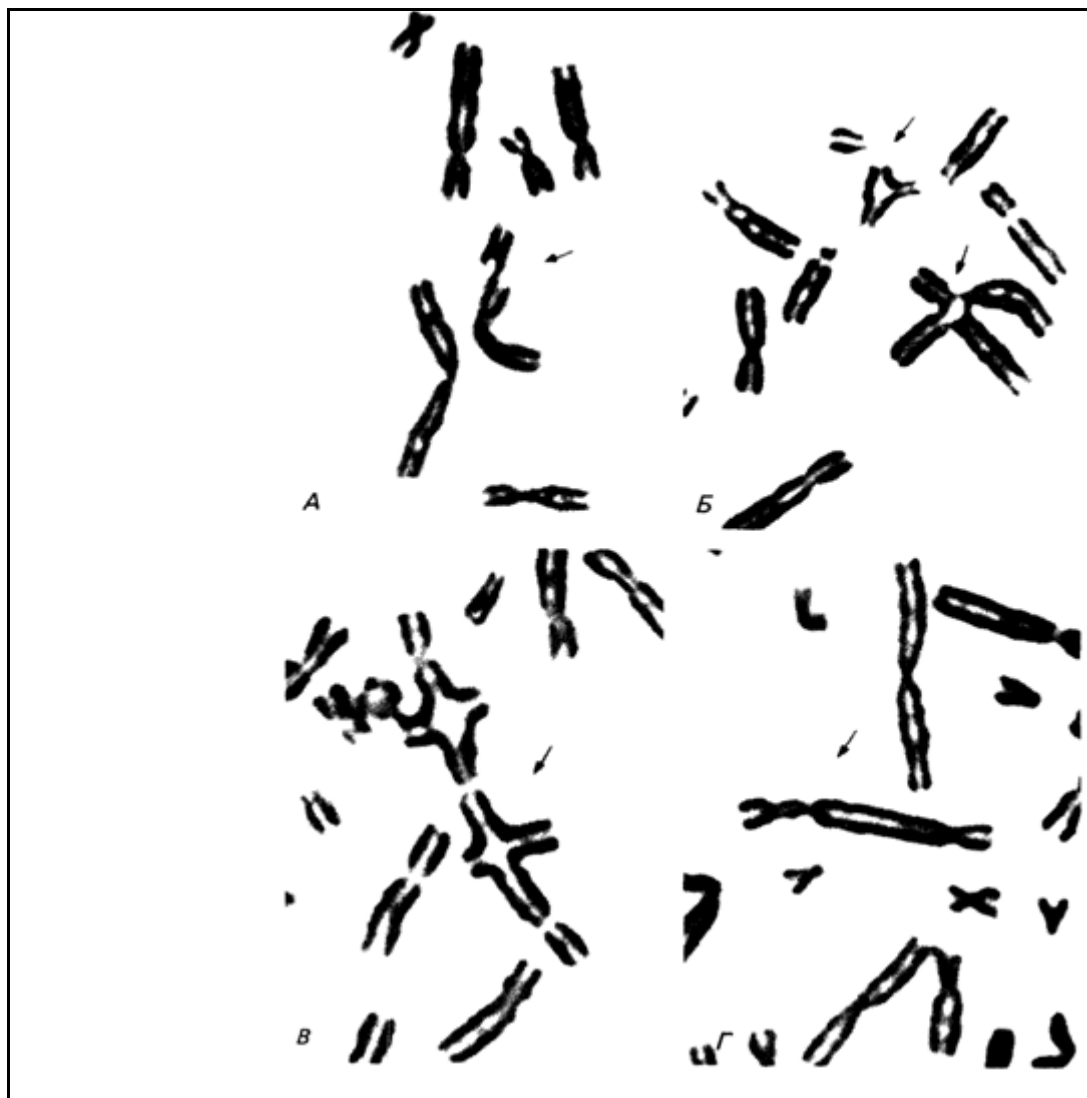


Рис. 5.29. Хромосомы больного с анемией Фанкони. *А* Хроматиновый разрыв. *Б*. Две фигуры хроматиновых обменов с участием негомологичных хромосом. *В*. Гексагональная фигура обменов, в которых участвуют три хромосомы. *Г*. Трицентрические хромосомы. (Courtesy of Dr. T. M. Schroeder.)

тируется в возрасте 12-14 месяцев; больной оказывается прикованным к инвалидной коляске еще до наступления юношеского возраста. Имеются сообщения о наличии у таких пациентов различных форм иммунодефицита. Самый распространенный дефект иммунной системы – низкий уровень или полное отсутствие IgA. Синдром наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Неоднократно публиковались сообщения о хромосомной нестабильности; число разрывов, по-видимому, меньше, чем при анемии Фанкони и при синдроме Блума [1396; 1469; 1485]. Разрывы, вероятно, случайны. Их частота нередко флуктуирует. Анализ хромосом усложняется тем обстоятельством, что фитогемагглютининовая стимуляция лимфоцитов как пра-

вило, ослаблена. Часто встречаются псевдодиплоидные клоны; характерной особенностью синдрома является транслокация длинного плеча 14 хромосомы.

При всех трех заболеваниях – анемии Фанкони, синдроме Блума и атаксии-телеангиэктазии – увеличение хромосомной нестабильности не артефакт, наблюдаемый *in vitro*, а феномен, имеющий место *in vivo*. Резонно предполагать, что клиническая симптоматология этих болезней непосредственно связана с хромосомной нестабильностью. Кроме того, хромосомы больных, страдающих любой из этих трех патологий, проявляют повышенную чувствительность к агентам, разрывающим хромосомы (кластогенным агентам).

Хромосомная нестабильность и рак. Пораженные любой из этих трех болезней подвержены сильному риску развития у них злокачественных новообразований. Многие больные с анемией Фанкони в детстве и юности склонны к кровотечениям и инфекциям, имеются сведения и о повышении у них числа неоплазий [1465]. До 1981 г. сообщалось о 45 таких случаях; 22 из них – острая лейкемия (не отмечено ни одной лимфатической формы этого заболевания); 16 – первичные опухоли печени, остальные – карциномы других органов. Все случаи зафиксированы в середине 1960-х гг. после введения стероидной терапии. Не вполне ясно, чем это обусловлено: продлевающим жизнь эффектом такой терапии или тем, что сама стероидная терапия *вызывает* рак у этих пациентов. Разнообразные злокачественные опухоли были найдены у больных атаксией-телеангиэктазией [1465]. Из 108 пациентов 48 страдали различными «неходжкинскими» лимфомами; 12 – болезнью Ходжкина; 26 – лейкемиями, главным образом лимфатическими, и 22 – другими формами рака (желудка, мозга, яичника, кожи и т. д.). Таким образом, преобладают лимфатические неоплазии. У 23 из 99 индивидов с синдромом Блума, о которых было известно до 1981 г., выявлено по крайней мере одно злокачественное новообразование. На основе данных об этих пациентах в молодости было вычислено, что они испытывают в 100 раз больший риск возникновения неоплазий, чем здоровые люди. В отличие от атаксии-телеангиэктазии при этом синдроме наблюдалось громадное разнообразие в распределении опухолей по типам и тканевой локализации.

Резонно предположить, что повышенный риск развития неоплазий при этих синдромах может быть прямо связан с повышенной частотой спонтанных хромосомных разрывов.

Такая хромосомная нестабильность приводит к появлению большого числа клеток с различными анеуплоидиями, возникшими вследствие разрывов хромосом. Большинство этих клеток гибнет сразу, некоторые претерпевают несколько делений. Однако иногда появляется клетка со структурным дефектом, дающим ей селективное преимущество, частота ее делений более не сдерживается. Такая клетка быстро образует клон генетически одинаковых клеток – первичные раковые клетки. Благодаря своему безудержному росту аномальный клеточный клон будет постепенно замещать нормальные клетки.

Если такой клеточный клон содержит хромосому со структурной аномалией, мы должны иногда обнаруживать в определенной части клеток пациентов, страдающих одним из трех синдромов с хромосомной нестабильностью, специфические хромосомные aberrации. Такие клеточные клоны действительно были найдены. На рис. 5.30 приведена фотография необычной хромосомы 1p-, маркирующей клон клеток пациента с анемией Фанкони, наблюдавшего-

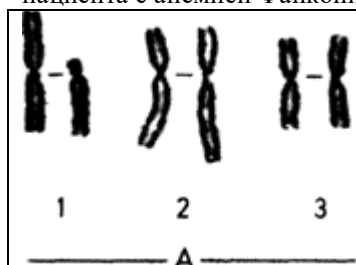


Рис. 5.30. Маркерная хромосома 1p-, обнаруженная в клоне клеток больного с анемией Фанкони. (Courtesy of Dr. T. M. Schroeder.)

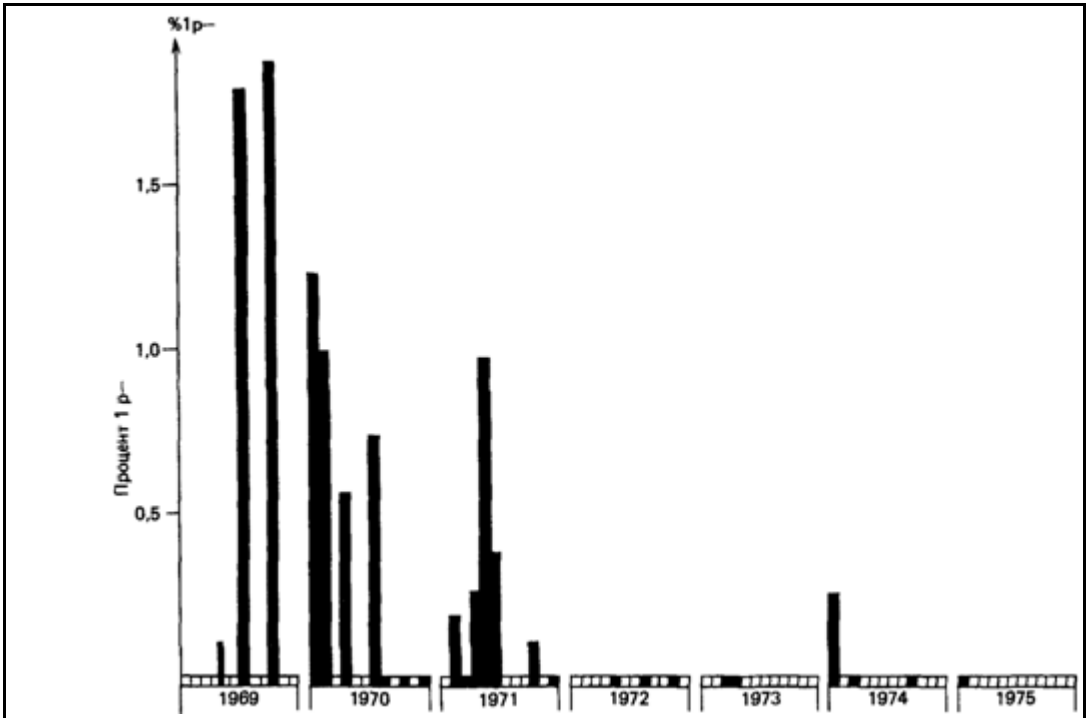


Рис. 5.31. Доля метафаз, в которых была обнаружена маркерная хромосома 1p- (см. рис. 5.30). Результаты исследований, проводившихся ежегодно в течение нескольких лет. (Courtesy of Dr.T.M. Schroeder.)

ся с 1974 г. [1636]. На рис. 5.31 проведено сравнение частот метафаз с этой маркерной хромосомой по годам. Этот клон, вероятно, имел определенное селективное преимущество, уменьшавшееся, однако, с течением времени. Аналогичные клоны наблюдались и в случае двух других болезней. В случае атаксии-телеангиэктазии наблюдалось полное развитие лейкемии в результате постепенного роста определенного клеточного клона [1485]. Возможные молекулярные механизмы злокачественной трансформации в связи с разрывами хромосом будут обсуждаться в разд. 5.1.6.5, посвященном онкогенам.

5.1.6.3. Молекулярные механизмы хромосомной нестабильности и образование опухоли, обусловленное соматической мутацией

Пигментная ксеродерма (27870-27875). Хромосомная нестабильность и существование маркерных хромосом при трех синдромах, с ней сопряженных, наводят на мысль, что повторный разрыв хромосом может приводить к образованию клеточных клонов, развивающихся в злокачественные опухоли. В связи с этим возникает вопрос о молекулярном механизме хромосомной нестабильности. Много информации на этот счет дало изучение другой наследственной болезни - пигментной ксеродермы.

После облучения ультрафиолетовым светом на коже больных с пигментной ксеродермой возникает эритема, которая сменяется атрофией и телеангиэктазией (разд. 3.1.3). Постепенно облученные участки становятся бородавчатыми, и на них развивается рак кожи. Из работ на микроорганизмах известно, что клетки имеют ферментативную систему, способную репарировать дефекты ДНК. Ферментативная репарация дефектов, индуцированных ульт-

Таблица 5.19. Распределение групп комплементации у больных пигментной ксеродермой [1450]									
Регион, страна	Частота больных в соответствующей группе комплементации								Число пациентов
	A	B	C	D	E	F	G	вариантная	
Северная Америка	3	1	5	5	0	0	0	2	16
Европа и Великобритания	10	0	14	8	2	0	2	5	41
Япония	21	0	1	1	0	3	0	14	40
Египет	7	0	12	0	0	0	0	5	24
Германия	2	0	7	5	0	0	0	9	23
Число обследованных больных	43	1	39	19	2	3	2	35	144

рафиолетовым светом, была хорошо изучена на молекулярном уровне в исследованиях на микроорганизмах. Больные пигментной ксеродермой характеризуются аномально высокой чувствительностью к ультрафиолетовому свету. Клэвер [1036, 1420] показал, что причиной этой болезни является нарушение системы репарации ДНК. Позднее было идентифицировано большое число различных ферментативных дефектов, приводящих к фенотипам, подобным тем, что бывают при пигментной ксеродерме (табл. 5.19).

Механизмы репарации ДНК. В исследованиях на микроорганизмах изучались три основных механизма репарации ДНК: фотореактивация, эксцизионная репарация и пострепликативная репарация (рис. 5.32) [220; 1458].

1. Фотореактивация. Сине-фиолетовый свет увеличивает вероятность выживания бактерии, облученной до этого ультрафиолетовым светом. Летальный эффект ультрафиолетового облучения объясняется образованием тиминовых димеров в ДНК, препятствующих ее репликации. Фотореактивирующий фермент эти димеры расщепляет и восстанавливает таким образом правильную структуру ДНК.
2. Эксцизионная репарация. Второй механизм репарации ДНК - эксцизионная репарация - в свете не нуждается. На первом этапе эндонуклеаза опознает димер и разрезает рядом с ним поврежденную цепь ДНК. Образовавшиеся свободные концы распознаются экзонуклеазами, которые расширяют брешь, отщепляя нуклеотиды. Помимо УФ-индуцированных димеров удаляется до 100 других нуклеотидов. Полимераза осуществляет ресинтез удаленного фрагмента цепи, используя в качестве матрицы неповрежденную сестринскую цепь. Наконец, лигаза «сшивает» вновь синтезированный фрагмент со старой цепью.
3. Пострепликативная репарация. Если фотореактивация и эксцизионная репарация по каким-то причинам невозможны, повреждение в цепи не будет исправлено и она не сможет функционировать как матрица в процессе репликации. Во вновь синтезированной комплементарной цепи ДНК останется брешь. Однако генетическая информация, искаженная образованием димеров, содержится в новой цепи ДНК, синтезированной по старой комплементарной цепи. Эта новая цепь и послужит матрицей, на которой образуется копия, замещающая поврежденную цепь ДНК. Точный механизм этого замещения пока неизвестен; по-видимому, он имеет сходство с нормальными рекомбинационными событиями. Одна неповрежденная цепь ДНК необходима в качестве матрицы как для эксцизионной, так и для пострепликативной репарации.

Ферментативные дефекты при заболеваниях, сходных с пигментной ксеродермой (27870-27880). Показано, что у культивируемых фибробластов больных пигментной

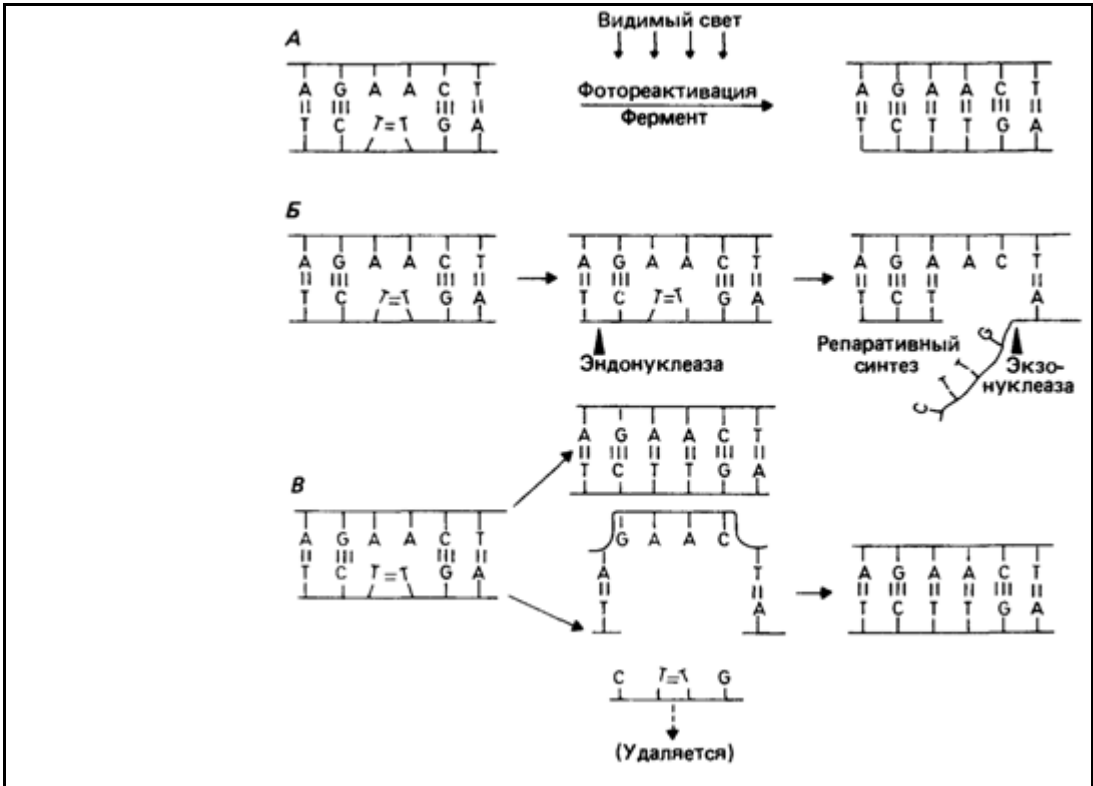


Рис. 5.32. Три механизма репарации ДНК. *А.* Фотореактивация; тиминные димеры расщепляются и восстанавливается водородная связь А-Т. *Б.* Эксцизионная репарация; полухроматидная последовательность, содержащая тиминный димер, вырезается и синтезируется новая полухроматида. *В.* Пострепликативная (рекомбинационная) репарация. Полухроматидная последовательность вырезается, репарация происходит после репликации с участием другого продукта деления.

ксеродермой (ПК) сокращается время жизни после ультрафиолетового облучения. Кроме того, выживаемость различных УФ-облученных вирусов, выращиваемых в ПК-клетках, меньше, чем вирусов, культивируемых в нормальных клетках. Отсюда следует, что в хозяйской клетке существует какой-то генетический дефект, не позволяющий ей исправить дефект вирусного генома. Возможно, у нее нарушен один из вышеупомянутых механизмов репарации. Такое предположение подтвердилось в ходе прямого изучения этих механизмов в ПКклетках. Было обнаружено, что клетки разных больных не способны осуществлять эксцизионную репарацию. У них нарушен начальный ее этап - вырезание димеров.

Генетическая гетерогенность [1420; 1421; 1450]. Система эксцизионной репарации включает несколько ферментов, а клинические различия между разными ПК-пациентами свидетельствуют о генетической гетерогенности болезни. Такая гетерогенность обусловлена, по-видимому, тем, что соответствующие мутации могут возникать либо в генах, кодирующих разные полипептидные цепи, либо в различных сайтах одного и того же гена. Один из методов изучения этой проблемы - проведение клеточной гибридизации (разд. 3.4.3) фибробластов от разных больных. Дочерняя клетка, образовавшаяся из двух слившихся клеток, сможет осуществлять эксцизионную репарацию, если ферментативные де-

фекты связаны с разными локусами. В этом случае один геном дает один неповрежденный фермент, а другой - второй фермент, т. е. происходит взаимная компенсация двух дефектов. Если ферментативные дефекты идентичны, то даже при повреждении разных сайтов одного гена, компенсация невозможна. С помощью этого метода было идентифицировано по крайней мере восемь групп комплементации (табл. 5.19). Между группами комплементации существуют клинические различия: так, дополнительные неврологические дефекты, например микроцефалию, прогрессирующую умственную отсталость, замедленный рост и половое развитие, глухоту, атаксию, хореоатетоз и арефлексию, имеют только пациенты групп А, В и D (де Санктис и Каккионе, 1932). Многие ПК-пациенты с неврологическими проявлениями не обнаруживают всего спектра симптомов. Даже внутри одной комплементационной группы может существовать удивительная гетерогенность по степени выраженности неврологических симптомов. У многих больных, которым был поставлен клинический диагноз ПК, эксцизионная репарация оказалась совершенно нормальной. Теперь считается, что они страдают определенной формой ПК. У этих пациентов выявлена недостаточность пострепликативной репарации. Дефекты фотореактивации пока не обнаружены. Кроме того, как показано в табл. 5.19, популяционное распределение этих форм очень неравномерно: например, тип А и вариантный тип распространены главным образом в Японии, тогда как тип С, обычный в популяциях европейского происхождения, в Японии редок.

Злокачественные новообразования у больных пигментной ксеродермой. У пациентов с ПК рано или поздно развиваются множественные злокачественные опухоли кожи. Облучение УФ-светом может приводить к перерождению клеток любого типа. При этом развиваются базальные и сквамозные клеточные карциномы, злокачественные меланомы, кератоакантомы, гемангиомы и саркомы. Образование опухоли можно предотвратить, либо сведя УФ-облучение к минимуму с помощью специальных средств защиты (например, мазей) либо вообще избегая солнечного света.

Повышенный риск возникновения рака у гетерозигот [1340]. Все три синдрома хромосомной нестабильности и пигментная ксеродерма (ПК) наследуются по аутосомно-рецессивному типу. Ферментативная активность у гетерозигот обычно составляет около половины той, что обнаружена у гомозигот по нормальному аллелю (разд. 4.2.2.8). Поэтому имело смысл проверить предположение о возможном увеличении риска возникновения рака у гетерозигот. Наилучшим его подтверждением, которым мы в настоящее время располагаем, могут служить результаты изучения атаксии-телеангиэктазии (А-Т) [1624; 1626]. Это исследование основано на материалах о 27 семьях, объединяющих 1639 близких родственников пробандов с А-Т. Данные о числе случаев рака в этой группе сравнивали с теоретически ожидаемыми для соответствующих контрольных групп (табл. 5.20). Определенное увеличение смертности от рака наблюдается в самой молодой возрастной группе родственников (0-44 года) у представителей разных полов, причем у женщин оно больше, чем у мужчин. Кроме того, у живущих родственников также была обнаружена повышенная частота злокачественных новообразований. При этом выявлено много форм новообразований; как и в случае гомозигот, особенно часто встречались опухоли лимфатической системы, а также карциномы желудка и яичника.

Согласно полученной оценке, частота гомозигот по атаксии-телеангиэктазии равна приблизительно 1:40000; соответствующая частота гетерозигот составляет $\approx 1\%$. В этом случае, как показали расчеты, «гетерозиготы по гену А-Т могут включать более 5% всех индивидов, умирающих от рака в возрасте до 45 лет, и около 2% тех больных, которые умирают от него между 45 и 75 годами». Помимо увеличенного риска возникновения рака, гетерозиготы по гену А-Т могут также иметь несколько повышенную предрасположенность к диабетам, тяжелому сколиозу и дефектам нервной трубки [1624].

Другое исследование предрасположенности к раку проводилось на близких родственниках больных с пигментной ксеродермой. *Общего* увеличения смертности от рака у них не обнаружено. Однако у этих гетерозигот была повышена частота (не приводящих к смерти) немеланомных опухолей кожи [1316]. Это исследование обобщало данные о 2597 близких родственниках ПК-пациентов из 31 семьи, проживающей в США. Представляется довольно интересным, что увеличение частоты случаев заболевания тс-

Таблица 5.20. Смертность гетерозиготных индивидов от злокачественных опухолей [1624]				
Возрастные группы	Атаксия-телеангиэктазия		Пигментная кератодерма	
	Наблюдаемое	Ожидаемое	Наблюдаемое	Ожидаемое
Мужчины				
0-44	6	2,14	38	35,4
45-74	21	19,02		
75+	4	5,22		
Все возрасты	31	26,38		
Женщины				
0-44	9	2,97	30	33,2
45-74	23	18,34		
75+	4	5,00		
Все возрасты	36	26,31		
Оба пола и все возрасты	67	52,7	68	68,6

ми или иными формами рака кожи обнаружено только у жителей южных штатов США, где много солнечного света. Этот факт вместе с отрицательными результатами, полученными для всех других форм рака, кроме карцином кожи, свидетельствует о специфическом дефекте системы репарации УФ-повреждений в эпителиальных клетках, проявляющемся только тогда, когда кожа подвергается сильному облучению солнечным светом, то есть отмеченное увеличение частоты является, так сказать, экогенетическим феноменом (разд. 4.5.2).

С другой стороны, в случае анемии Фанкони тщательный анализ имеющихся данных не выявил сколько-нибудь заметного повышения риска возникновения рака у гетерозигот.

Молекулярные механизмы синдромов с повышенной хромосомной нестабильностью. Образование тиминовых димеров происходит только в одной из двух сестринских цепей ДНК. Поэтому оно не приводит к немедленному появлению хромосомной брешы или разрыва. Однако если димер не может быть вырезан, цепь, в которой он находится, не будет функционировать в качестве матрицы в ходе следующей репликации, комплементарная ей цепь ДНК окажется неполной и во втором цикле репликации появится видимый разрыв (рис. 5.33). Следовательно, если брешь в двойной цепи ДНК связана с видимыми в микроскоп хромосомными разрывами, следует ожидать большего увеличения числа хромосомных разрывов после облучения ПК-клеток, чем нормальных клеток. Такое увеличение действительно было описано. С другой стороны, в необлученных ПК-клетках нестабильности хромосом не наблюдалось. Этим они отличаются от клеток больных с анемией Фанкони, синдромом Блума и атаксий-телеангиэктазией. Эти заболевания всегда сопровождаются спонтанной хромосомной нестабильностью. Следовательно, молекулярные дефекты, лежащие в их основе, различны. Разумно, однако, предполагать, что определенные нарушения механизмов репликации и репарации ДНК также могут быть в числе факторов, приводящих к возникновению этих синдромов. Некоторые данные подтверждают сделанный вывод.

Однако, несмотря на все предприни-

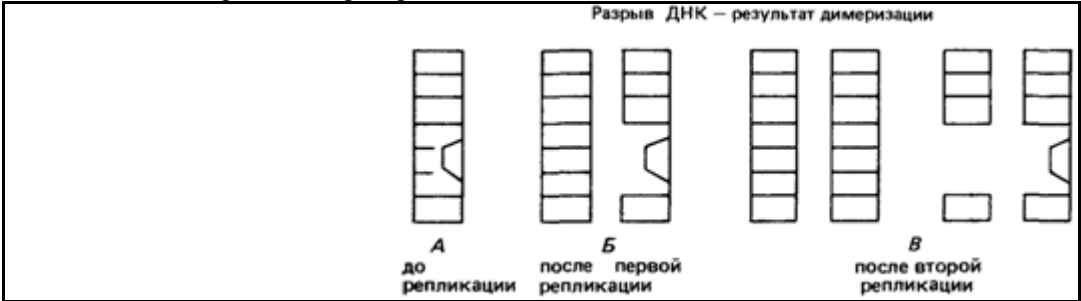


Рис. 5.33. Дефект эксцизионной репарации. Если тиминовые димеры, образовавшиеся в результате облучения УФ-светом, не вырезаны, такие цепи не могут функционировать в качестве матриц в следующем репликационном цикле. Это приводит к разрыву хромосомы. А. Образование димера. Б. В ходе первой репликации встраивание комплементарных оснований против тиминового димера не происходит. В. Вторая репликация: ее результатом является разрыв структуры ДНК в одном из продуктов деления.

мавшие усилия, глубоко разобраться в молекулярных основах этих синдромов до сих пор не удалось. Для их объяснения предложено много разных механизмов. Их связывают с дефектами различных ферментов репарации, пониженным содержанием кофакторов ферментов, аномальным транспортом ферментов, необходимых для репликации ДНК (например, топоизомеразы) через ядерную мембрану или недостаточными энергетическими запасами. Были установлены некоторые интересные факты, по-видимому, важные в функционировании такого механизма, например замедление роста цепи ДНК при синдроме Блума. Однако главные, определяющие дефекты пока неизвестны. Их выявление имело бы важное значение, так как эти синдромы служат моделями как при выяснении молекулярных механизмов спонтанных мутаций вообще, так и молекулярных механизмов соматических мутаций, связанных с новообразованиями, в частности. *Цепь событий при образовании злокачественных неоплазий, возникающих в результате соматической мутации* [1633]. Цепочка событий, приводящих к образованию неоплазий, обусловленных соматической мутацией, изображена на рис. 5.34. Первый этап - повреждение ДНК. Оно может быть вызвано или внутренними факторами, например нарушением механизмов репликации или репарации, или внешними, например ионизирующей радиацией, химическими мутагенами или вирусами. Повреждение ДНК способно полностью вывести из строя репликацию и поэтому может быть летальным. Другая возможность заключается в том, что повреждение будет репарировано, но с ошибкой. Здесь не имеет принципиального значения, какого типа мутации при этом образуются. На-

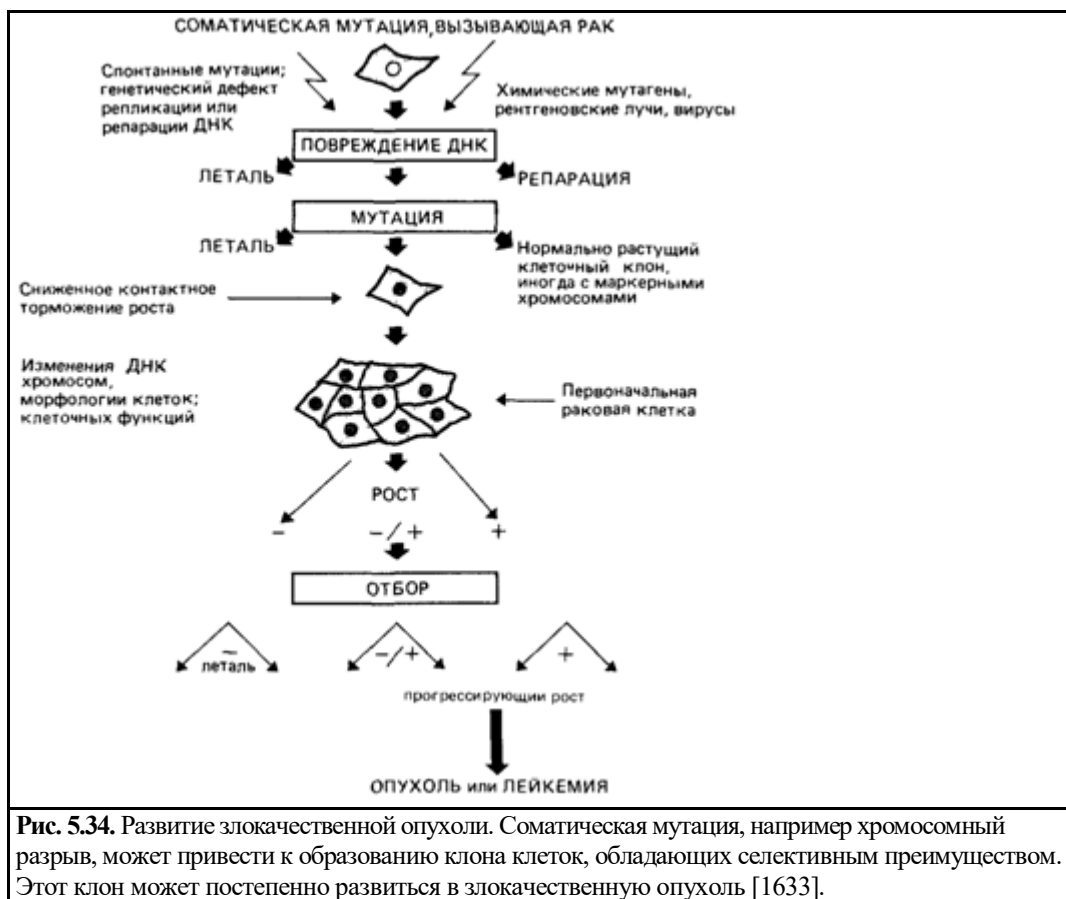


Рис. 5.34. Развитие злокачественной опухоли. Соматическая мутация, например хромосомный разрыв, может привести к образованию клона клеток, обладающих селективным преимуществом. Этот клон может постепенно развиваться в злокачественную опухоль [1633].

пример, это может быть точковая мутация, возникшая в результате замены одного основания, или видимая хромосомная аномалия. Мутация может оказаться летальной и привести к гибели несущий ее клеточный клон. Другая возможность заключается в том, что клетки, содержащие мутацию, будут расти нормально; в этом случае единственным индикатором мутаций окажется маркерная хромосома. Наконец, не исключена вероятность того, что новый клеточный клон будет обладать селективным преимуществом, обусловленным генетическими дефектами нормальных механизмов торможения и регуляции роста. В этом случае развивается рак. Причиной возникновения опухоли могут быть и вторичные генетические процессы, например образование дополнительных анеуплоидий. В некоторых случаях они вызывают гибель клеток, а иногда приводят к появлению клонов, имеющих селективное преимущество. Неконтролируемый рост новообразования продолжается до тех пор, пока больной не погибнет от нарушения нормальной жизнедеятельности. Мысль о том, что хромосомы могут играть какую-то роль в возникновении опухолей, высказывалась еще в начале нашего века Бовери (1914, см. [77]). Доказать эту гипотезу удалось лишь после появления тонких цитогенетических методов.

5.1.6.4. Другие факты, свидетельствующие о роли соматической мутации в механизме канцерогенеза [1520]

История мутационно-соматической гипотезы возникновения рака. Наследственные синдромы с повышенной хромосомной нестабильностью и дефектами репликации и репарации ДНК можно рассматривать в качестве модели для изучения молекулярных механизмов соматической мутации и образования опухоли. Гипотеза о том, что рак может быть обусловлен соматической мутацией, появилась гораздо раньше работ, посвященных изучению этой проблемы. Еще фон Ханзман (1890) [1475] на основании результатов собственных исследований митоза постулировал, что клетка злокачественной опухоли представляет собой клетку с аномальным содержанием хроматина [77]. Бовери (1914) конкретизировал эту идею, выдвинув предположение о неравном распределении хромосом определенной клетки между ее потомками. Однако он подчеркнул, что здесь существенна аномальная хроматиновая конституция как таковая, а не механизм ее возникновения. В течение последующих десятилетий гипотеза соматических мутаций разрабатывалась многими авторами и обсуждалась в различных аспектах. Наиболее четкие формулировки самых важных следствий из нее дал Бёрнет (1957, 1974) [1408]:

- 1) новообразования должны быть моноклональными, то есть они должны происходить от одной единственной клетки;
- 2) их частота может повышаться при действии химических агентов или вирусов, взаимодействующих с ДНК;
- 3) в отдельных клетках из большой популяции пролиферирующих раковых клеток могут возникнуть дополнительные мутации, обуславливающие дополнительные селективные преимущества; субклоны, ведущие начало от этих клеток, будут быстро перерастать скопления других опухолевых клеток;
- 4) мутационная гипотеза объясняет также увеличение частоты большинства форм рака с возрастом, если возникновение соматических мутаций можно в качестве первого приближения считать процессом, зависящим от времени. Кроме того, клиническому проявлению клонов должно предшествовать несколько лет их роста.

Мы не будем больше рассматривать здесь индукцию рака химическими веществами, реагирующими с ДНК. Достаточно отметить, что многие мутагены (раздел 5.2.2) оказались и сильными канцерогенами. Злокачественные неоплазии обычно состоят из субклонов, имеющих разные кариотипы, что свидетельствует о множественных аномалиях митозов во время пролиферации опухоли. Увеличение частоты новообразований с возрастом - хорошо известная общая закономерность биологии рака. В настоящее время мы располагаем

многочисленными данными, доказывающими моноклональное происхождение опухолей. Известно, например, что один В-лимфоцит продуцирует легкие цепи углобулина только одного специфического типа - λ или κ . Однако разные В-лимфоциты синтезируют легкие цепи, отличающиеся по «вариабельной» части аминокислотной последовательности (разд. 4.4). С другой стороны, при миеломатозе - одном из раковых заболеваний - все эти клетки продуцируют легкие цепи с идентичными вариабельными участками. У женщин, гетерозиготных по двум вариантам гена G6PD, сцепленного с X-хромосомой (разд. 2.2.3.3), мышечная ткань матки является мозаичной: разные клетки экспрессируют разные варианты фермента, как это и ожидалось на основе предположения о случайной инактивации X-хромосом. С другой стороны, фиброидные опухоли матки всегда содержат один и тот же вариант во всех клетках. Аналогичные факты известны также и для других опухолей [1519]. Большинство опухолей действительно имеют моноклональное происхождение. Некоторые наследственные опухоли, например нейрофибромы, имеют мультиклональное происхождение, из чего следует, что тенденция к пролиферации свойственна каждой клетке [1449].

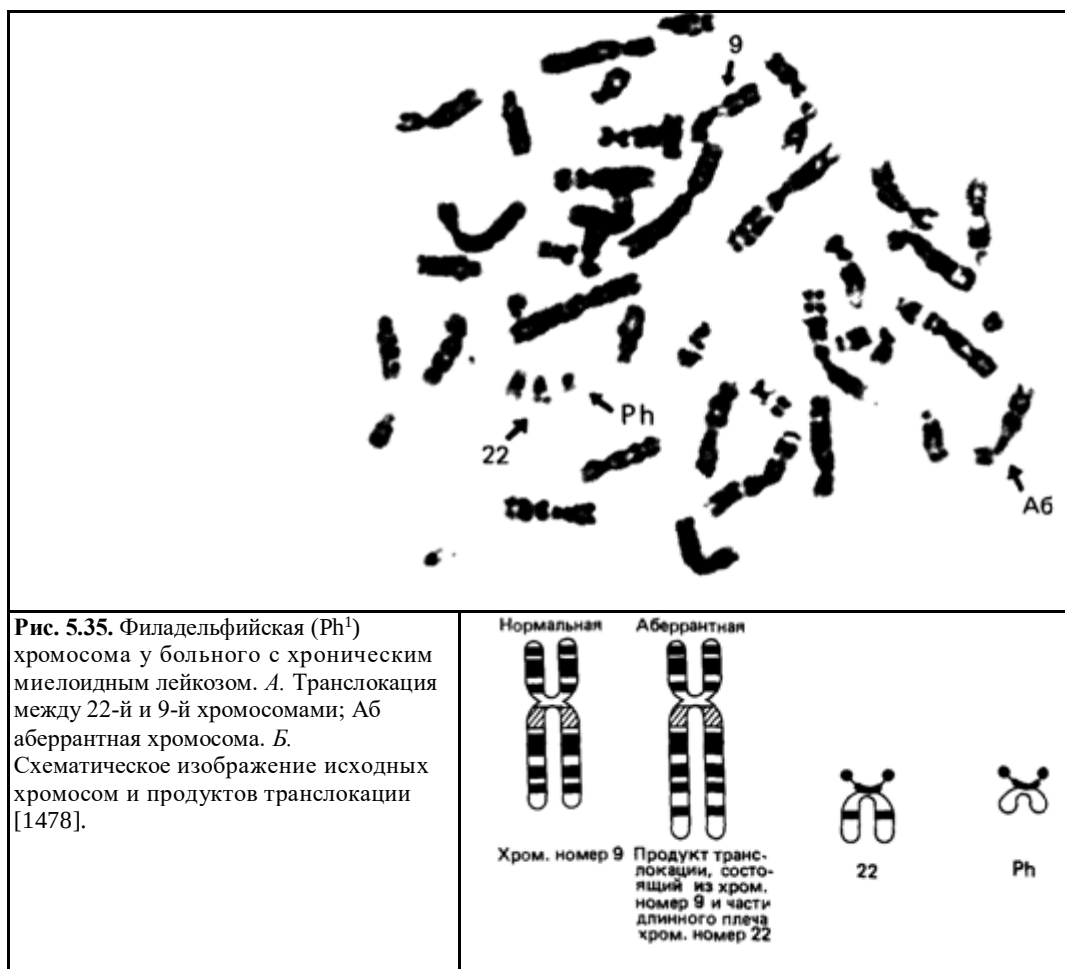
Вирусная этиология или соматическая мутация? В настоящее время существует много наблюдений, сделанных главным образом на животных, из которых явствует, что причиной возникновения опухолей могут быть вирусы. Резонно предполагать, что некоторые опухоли человека также имеют вирусное происхождение. Эта гипотеза не противоречит гипотезе соматических мутаций. Вирусы часто бывают сайт-специфическими и могут индуцировать в хромосоме то или иное мутационное событие. Поэтому процесс образования опухоли, следующий за вирусным повреждением, возможно сходен с аналогичным процессом, описанным в случае соматических мутаций любого типа.

Неоплазии, сопряженные с определенными хромосомными aberrациями. Существование единственной специфической хромосомной aberrации, имеющейся только в опухолевой ткани, было описано еще много лет назад для некоторых неоплазий. Классическим примером такой aberrации является филадельфийская (Ph^1) хромосома, которая почти всегда наличествует у больных хроническим миелоидным лейкозом [1584]. При этом заболевании обычно обнаруживают транслокацию почти всего длинного плеча 22-й хромосомы на 9-ю [1478] (рис. 5.35). Такие пациенты имеют нормальные хромосомы во всех тканях, за исключением системы гематопоэза. Фактически же специфическая аномалия хромосом оказывает влияние на все клетки - предшественницы клеток крови, включая мегакариоцитные и эритропоэтические клетки. К аналогичным выводам привело исследование, в котором в качестве биохимического маркера использовали варианты G6PD. Однако клинические и гематологические последствия этой транслокации проявляются только в гранулоцитарных элементах крови; это свидетельствует о том, что данная «мутация», несмотря на ее присутствие в клетках нескольких типов, может влиять на характер роста лишь одной дифференцированной ткани.

В некоторых, составляющих исключение семьях от хронического миелоидного лейкоза умирало по несколько человек, а в одной семье [1488] несколько ее младших представителей имело в своих гематопоэтических клетках Ph^1 -хромосому, не проявляя клинических признаков лейкоза. В этой семье склонность к разрыву 22-й хромосомы наследуется по аутосомнорецессивному типу.

Менингиомы – это опухоли одной из трех оболочек мозга. Они гистологически доброкачественны и в большинстве случаев состоят из гиподиплоидных клеточных линий, в которых отсутствует или имеет делецию одна из хромосом 22. На последующих стадиях образования субклонов возникают изменения других хромосом [1709-1711; 1545].

Разработка нового, высокоразрешающего метода дифференциального окрашивания хромосом (разд. 2.1.2.3), усовершенствование методов приготовления хромо-



сомных препаратов из отдельных клеток твердых опухолей позволили обнаруживать специфические хромосомные aberrации во все большем и большем числе других неоплазий [1704]; в большинстве случаев были идентифицированы или делеция полосы (субполосы) или реципрокная транслокация между двумя хромосомами. В табл. 5.21 перечисляются опухоли, для которых идентифицированы специфические транслокации и точки разрыва. Вполне возможно, что aberrации имеются и в тех случаях, когда их не нашли. Просто они могут быть так малы, что не будут выявляться даже с помощью дифференциального окрашивания. Почему же, однако, к селективному преимуществу клетки приводят лишь определенные хромосомные aberrации и почему это преимущество является тканеспецифическим? В последние годы молекулярным биологам удалось найти частичный ответ на первый из вопросов (разд. 5.1.6.6). Но, прежде чем рассказывать об этих результатах, мы рассмотрим один пример, касающийся солидной опухоли.

Ретинобластома (18020). Ретинобластома представляет собой детское офтальмологическое раковое заболевание. Ретинобластома может иметь наследственную и ненаследственную природу [1669; 1676].

210 5. Мутации

Таблица 5.21. Опухоли, сопряженные с известными хромосомными дефектами (по [1704])

Заболевания	Хромосомный дефект	Разрывы или делеции
Лейкозы		
Хронический миелоидный лейкоз	t (9; 22)	9q34.1 и 22q 11.21
Острый нелимфоцитарный лейкоз		
М1 (острый миелоидный лейкоз)	t (9; 22)	9q34.1 и 22q 11.21
М2 (острый миелоидный лейкоз)	t (8; 21)	8q22.1 и 21q22.3
М3 (острый промиелоцитарный лейкоз)	t (15; 17)	15q22 и 17q11.2
М4 (острый миело-моноцитарный лейкоз)	inv 16	p13.2 и q22
М4, М5 (острый нелимфоцитарный лейкоз)	t(9; 11)	9p22 и 11q23
М1, М2, М4, М5, М6 (острый нелимфоцитарный лейкоз)	del 5q	5q22q23
	del 7q	7q33q36
	+ 8	
	+ 12	
Хронический лимфолейкоз	t (11; 14)	Hq13 и 14q32
Острый лимфолейкоз		
L1-L2	t (9; 22)	9q34.1 и 22q 11.21
L2	t(4; 11)	4q21 и 11q23
L3	t (8; 14)	8q24.13 и 14q32.33
Лимфомы		
Беркитта, состоящая из небольших неразделившихся клеток	t (8; 14)	8q24.13 и 14q32.33
Фолликулярная, состоящая из небольших разделившихся смешанных и крупных клеток	t (14; 18)	14q32.3 и 18q21.3
Мелкоклеточная лимфоцитарная	+ 12	
Мелкоклеточная лимфоцитарная, трансформировавшаяся в диффузные большие клетки	t (11; 14)	11 q 13 и 14q32
Карциномы		
Нейробластома, рассеянная	del 1p	1p31p36
мелкоклеточная карцинома легкого	del 3p	3p14p23
Папиллярная цистаденокарцинома яичника	t (6; 14)	6q21 и 14q24
Конституциональная ретинобластома	del 13q	13q14.13
Ретинобластома	del 13q	13q14
Аниридия; опухоль Вилмса	del Up	11p13
Опухоль Вилмса	del 11p	11p13
Доброкачественные солидные опухоли		
Смешанная опухоль околоушной железы	t (3; 8)	3p25 и 8q21
Менингиома	-22	22

Наследственная форма является аутосомно-доминантной с приблизительно 90%-ной пенетрантностью; в разных семьях пенетрантность варьирует [1548]. Приблизительно 68% всех случаев наследственной формы заболевания носят билатеральный характер, остальные - унилатеральный. В некоторых билатеральных случаях во втором глазу обнаружено более одной первичной опухоли [1519-1522]; в унилатеральных случаях, как наследственных, так и ненаследственных, множественное возникновение опухолей обычно не наблюдалось.

Многие пациенты, страдающие ретинобластомой, являются спорадическими больными, т.е. они первые и единственные пораженные в своих семьях. У этой категории больных билатеральное поражение встречается только в ~ 20-25% случаев. Спорадические больные принадлежат к одной из двух групп: первая включает тех, болезнь которых обусловлена доминантными мутациями de novo и 50% потомков которых страдает той же патологией, а вторая - больных ненаследственной формой заболевания. Все спорадические больные с билатеральным поражением появились в результате мутаций de novo; сегрегационное отношение для их потомков не

намного ниже 50% [1628]. Из спорадических случаев с унилатеральным поражением около 10-12% возникли вследствие мутаций *de novo*, а остальные - больные ненаследственной формой. В одной из работ описан ряд следствий для генетического консультирования, вытекающих из этой ситуации [1676] (см., например, приложение 8).

Две мутационные стадии при наследственной форме заболевания. Предполагается, что становление наследственной формы болезни происходит в два этапа. На первом этапе мутирует половая клетка. Эта мутация приводит к таким изменениям хромосомной структуры, которые увеличивают риск возникновения соматической мутации. Мутация в соматической клетке трансформирует одну или несколько измененных клеток в клетки ретинобластомы.

Для возникновения ненаследственной ретинобластомы необходимы, как принято считать, две соматические мутации: на первой стадии клетка может превратиться в потенциальную клетку ретинобластомы; в результате ее состояние может теперь стать идентичным состоянию любой клетки наследственной ретинобластомы. Это означает, что опухоль развивается только в том случае, если за первой стадией следует вторая, возможно эквивалентная одному из этапов, необходимых для становления наследственной формы заболевания.

Еще в 1963 г была описана делеция 13q. Ее обнаружили во всех клетках пациента с билатеральной ретинобластомой и не очень значительными конституциональными аномалиями [1531]. В последние годы, особенно после введения дифференциального окрашивания высокого разрешения, выявлено большое число таких пациентов; у многих из них делетирован или вовлечен в реципрокную транслокацию лишь очень небольшой участок длинного плеча 13-й хромосомы (рис. 5.36). Сравнивая множество подобных фактов, можно установить, что делетированный сегмент приурочен к 13q14 (или даже к 13q14.13; рис. 5.36). «Ген» ретинобластомы (если мы назовем данный участок хромосомы геном) тесно сцеплен с геном эстеразы D (ESD).

В ходе исследований возник другой вопрос: может ли вторая стадия, обуславливающая развитие злокачественного клеточного клона, заключаться в делении хромосомного сегмента в районе 13q14. В этом случае такая делеция должна выявляться во всех опухолевых клетках. По методическим причинам, изучение хромосом опухолевых клеток долгое время представляло определенные трудности; кроме того, клетки солидных опухолей основательно перемешаны с клетками соединительной ткани. Именно этим можно объяснить тот факт, что данные одной старой работы, в которой сообщалось об изменении сегмента 13q в опухолевых клетках, вскоре после ее появления были опровергнуты. Впоследствии однако вывод о важной роли участка

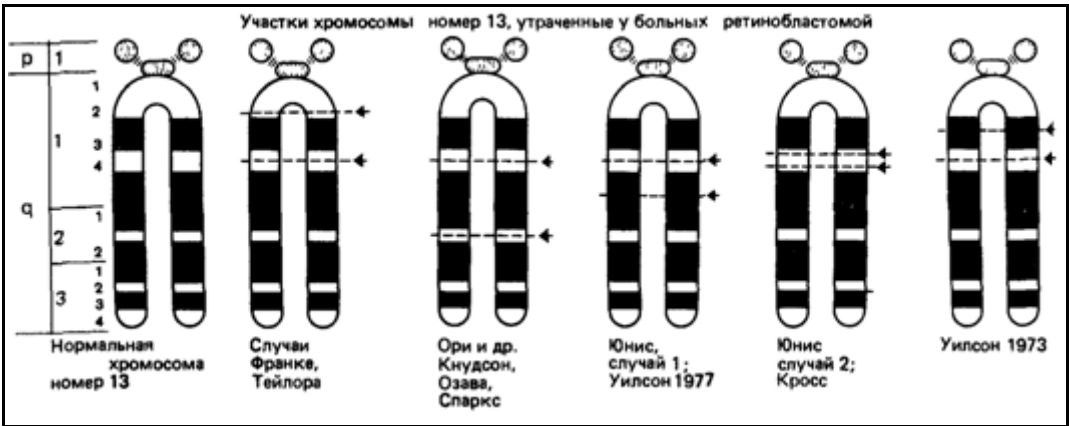


Рис. 5.36. Делеции у больных с ретинобластомой [1676].

13q14 подтвердился в ходе изучения многих клеток пациентов с наследственной и ненаследственной формами заболевания [1380].

Даже если бы этот вывод оказался справедливым для большинства случаев, это не решило бы проблему проявления мутации лишь в немногих клетках из тех, что ее содержат. Какую-то ясность в этот вопрос могут внести молекулярно-биологические исследования (разд. 2.3) [1389; 1414; 1476] с использованием полиморфизма рестрикционных фрагментов ДНК, тесно сцепленных с геном ретинобластомы. Согласно полученным данным, решающая стадия протекает в гомологичной хромосоме, несущей нормальный аллель. Иногда рестрикционные маркеры, унаследованные от одного из родителей, в раковых клетках полностью отсутствовали, что свидетельствует об исчезновении хромосомы, полученной от этого родителя, и ее замещении второй копией хромосомы, несущей мутантный ген ретинобластомы; в других случаях к тому же следствию - переводу мутации в гомозиготное состояние - приводят рекомбинационные события, в которых принимает участие только часть нормальной хромосомы (рис. 5.37, 5.38). Значение этого результата, по-видимому, выходит за рамки частного случая, при изучении которого он был получен. Такие события, как нерасхождение или рекомбинация, возможно, происходят в соматической ткани гораздо чаще, чем до сих пор предполагалось. С их помощью можно объяснить различные особенности фенотипов и даже механизм возникновения болезней. В частности, его можно использовать для объяснения других аутосомнодоминантных опухолевых заболеваний.

Генетические синдромы, сопряженные с опухолями. У пациентов с ретинобластомой часто возникает остеосаркома. У таких больных, как и у всех пациентов с ретинобластомой, обнаружена гомозиготность по тому же локусу 13-й хромосомы [1525]. Таким образом, гомозиготность по одному и тому же сайту может быть причиной как ретинобластомы, так и остеосаркомы. В опухоли Вилмса, как и предсказывал Кнудсон, сходные механизмы привели к гомозиготизации одного сайта на 11-й хромосоме, а именно 11p13. У этих больных обнаружен редкий аутосомнодоминантный синдром, характеризующийся аниридией, мочеполовыми аномалиями (гонадобластомой, недифференцированными гениталиями) и умственной отсталостью. Тот же локус, по-видимому, участвует в форми-

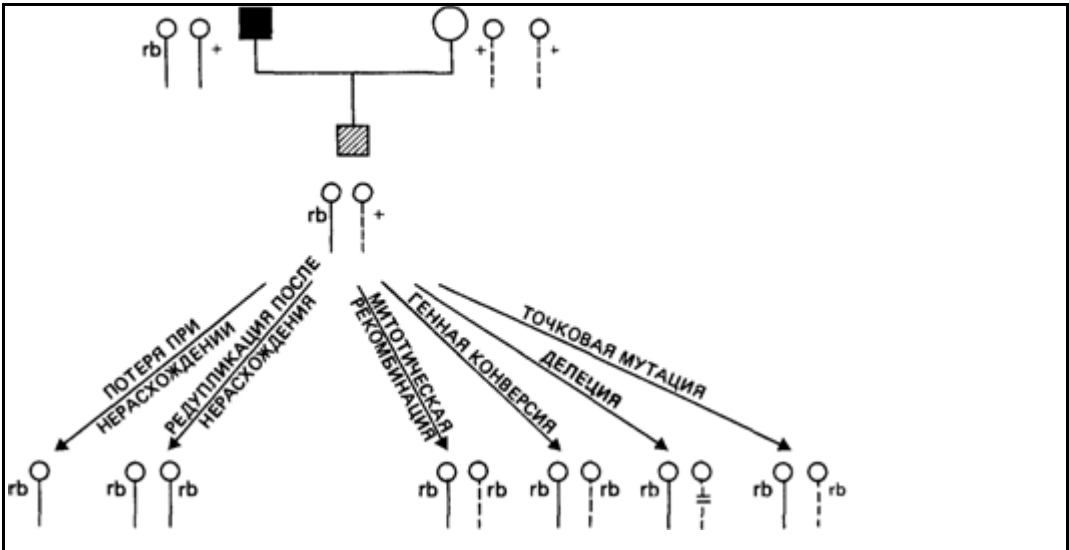
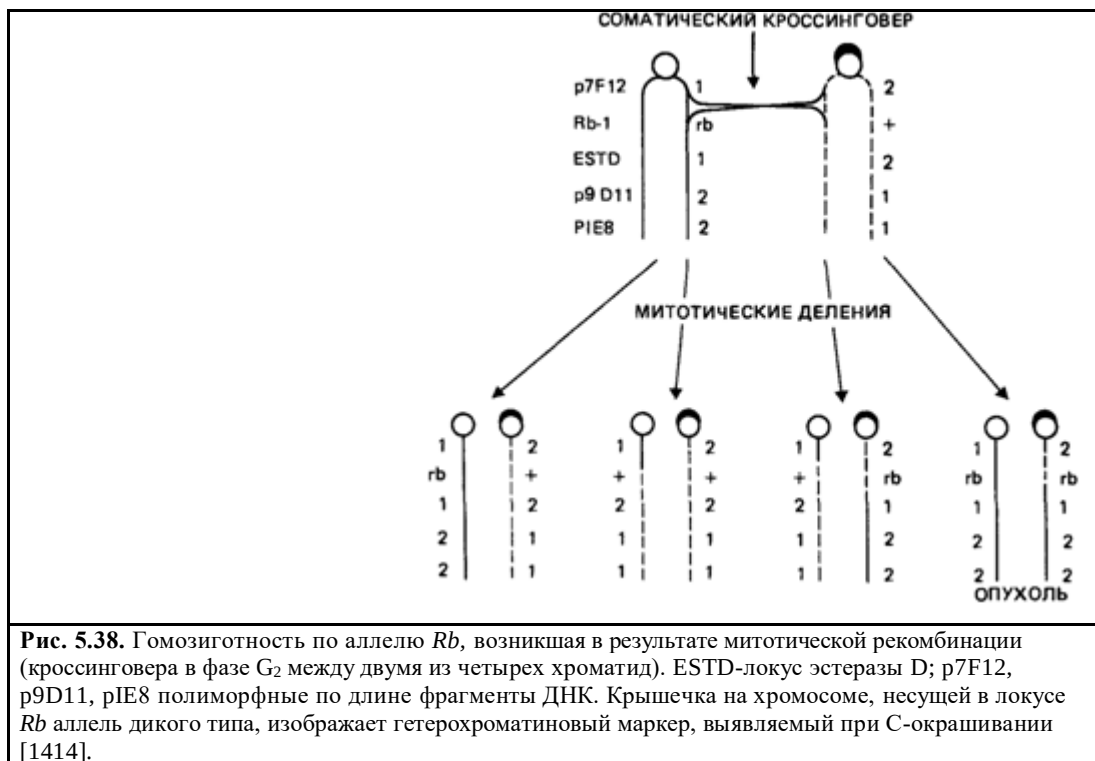


Рис. 5.37. Хромосомный механизм, который мог бы привести к гомозиготности по аллелю ретинобластомы (*Rb*) в соматической ткани гетерозиготы по этому аллелю [1414].



ровании синдрома Беквита - Видемана, который сопряжен с различными эмбриональными опухолями (табл. 5.22). Общий механизм возникновения этих разных опухолей также включает соматическую гомозиготизацию в сайте 11-й хромосомы [1525]. Предполагается, что этот аллельный сайт наследуется от одного из родителей. Опухолевые заболевания бывают как ненаследственными с возникновением единичных опухолей, так и наследуемыми по доминантному типу с образованием множественных опухолей. Хорошо известно, что такая ситуация имеет место в случае опухолей кожи [1631]: одиночные опухоли обычно ненаследственны, тогда как множественные опухоли того же гистологического типа - доминантно наследуемый признак. В качестве примеров такого рода можно привести нейрофиброматоз и одиночные нейрофибромы, множественные и одиночные липомы, множественные и спорадические кожные лейомиомы, множественные и спорадические клубочковые опухоли, а также синдром базальноклеточного невуса и одиночные базальноклеточные невусы [1391].

Кнудсон представил аналогичные эпидемиологические и статистические данные, свидетельствующие о том, что сходные механизмы могут действовать при образовании многих других опухолей у детей, например нейробластомы и феохромоцитомы. Постулируется существование как спорадических, так и наследственных случаев этих заболеваний. Наследственные случаи чаще носят семейный характер, часто бывают билатеральными, приурочены к более раннему возрасту и характеризуются тем, что опухоль возникает более чем в одном месте (так, например, при нейробластоме - в обоих надпочечниках) [1519; 1522; 1549]. В будущем можно будет локализовать гены, ответственные за возникновение различных сопряженных с опухолями генетических синдромов, путем идентификации хромосомных сайтов, в которых в процессе онкогенеза происходит специфическая по-

Таблица 5.22. Некоторые наследственные синдромы, сопряженные с опухолями		
Наследственный синдром	Опухоль	Хромосома
Синдром	Гепатобластома	
Беквита - Видемана	Рабдомио- саркома	11p
	Опухоль Вилмса	
	Адренальная карцинома	
Аниридия, мочеполовые аномалии, умственная отсталость	Опухоль Вилмса	11p13
Нейрофиброматоз	Астроцитомы	
	Саркомная трансформация	
Множественная эндокринная неоплазия (тип II)	Медуллярный тиреоидный рак	
Синдром базальноклеточного не- вуса	Медуллобластома	
	Астроцитомы	
	Рак яичника	
	Гамартома	

теря конституциональной гетерозиготности. Несколько примеров таких генетических синдромов с указанием сопряженных с ними опухолей дается в табл. 5 22.

«Раковые семьи» известны и в случае других злокачественных опухолей. Данные о карциноме пищевода в семьях, характеризующихся специфическим типом кератодермии ладоней и подошв, обсуждаются в разд. 3.6 (рис. 3.68). Этот пример, как и другие случаи доминантного наследования предрасположенности к возникновению неоплазий, показывает, что в раковых семьях проявляется тенденция к более раннему формированию опухолей в жизни больных, чем при более распространенной спорадически возникающей разновидности того же ракового заболевания. Часто обнаруживается выраженная тенденция к множественному образованию опухолей у одного индивида. Кроме того, эти факты свидетельствуют о генетически детерминированной и доминантно наследуемой повышенной вероятности злокачественной трансформации.

5.1.6.5. Онкогены [1686; 1690, 1691, 1696]

Основные принципы. Выполненные в последние годы молекулярно-биологические исследования и особенно открытие так называемых онкогенов способствовали пониманию молекулярных механизмов канцерогенеза. В ранних работах по слиянию клеток (разд. 3.4.3) было показано, что важную роль в злокачественной трансформации могут играть мутации в определенных локусах и обработка клеток хомячка ДНК вируса полиомы С другой стороны, со времени появления работ Эллермана и Бэнга (1908) и Рауса (1911) стало известно о способности некоторых РНК-вирусов - ретровирусов - индуцировать опухоли у животных. Эти и полученные позднее результаты побудили многих исследователей заняться поиском ретровирусов, которые могли бы вызывать опухоли у человека. До конца 1970-х г. эти поиски были безуспешными. Однако внедрение в практику исследований молекулярно-биологических методов позволило получить в последние годы очень важные результаты.

Показано, что геном ретровируса состоит из одноцепочечной РНК. Он включает следующие информационные последовательности (от 5'- к 3' концу): 5'-регуляторную последовательность; гены, кодирующие белки, необходимые для формирования внутренней структуры; ген обратной транскриптазы; гены поверхностных гликопротеинов; 3'-регуляторную последовательность. Как только вирусная частица проникает в клетку, обратная транскриптаза осуществляет синтез двухцепочечной ДНК-копии одноцепочечной РНК. Затем ДНК-копия встраивается в хромосомную ДНК клетки; интеграция может происходить во многих сайтах генома хозяина. Эта ДНК вызывает в клетке синтез новой вирусной РНК и белков, необходимых для синтеза новых вирусных частиц.

Помимо этой минимальной информации геномы онкогенных ретровирусов несут дополнительный ген, являющийся специфическим фактором, вызывающим злокачественную трансформацию хозяйских клеток. Этот ген называется ретровирусным онкогеном (*v-onc*). В исследованиях по

Таблица 5.23. Локализация протоонкогенов на хромосомах человека [1694]

Прото-онкоген	Локализация	Прото-онкоген	Локализация
N-ras	1cen-p21	<i>mos</i>	8q22
B-lym	1p32	<i>myc</i>	8q24
<i>ski</i>	1q12-qter	<i>abl</i>	9q34
N-myc	2p23-pter	H-ras-1	11p15
<i>raf-1</i>	3p25	<i>ets</i>	11q23-q24
<i>raf-2</i>	4	K-ras-2	12p12-pter
<i>fms</i>	5q34	<i>int-1</i>	12q14-qter
K-ras-1	6p23-q12	<i>fos</i>	14q21-q31
<i>myb</i>	6q22-q24	<i>fes</i>	15q25-q26
<i>erb-b</i>	7	<i>erb-A</i>	17
<i>met</i>	7p11.4-7qter	<i>src</i>	20
		<i>sis</i>	22q12-q13
		H-ras-2	X

гибридизации (разд. 2.3) с использованием ДНК-зондов на основе генов *v-onc* было показано, что такие гены гомологичны генам, находящимся в различных сайтах хозяйского генома. Однако при нормальных условиях они не приводят к злокачественной трансформации. Эти гены называются протоонкогенами или клеточными онкогенами (*c-onc*). В недавно опубликованном обзоре [1696] упомянуто несколько генов *c-onc*, которые расположены в различных аутосомах человека (табл. 5.23; см. также табл. П9.5). В настоящее время полагают, что эти гены были интегрированы вирусным геномом на каком-то этапе эволюционного процесса. Однако совершенно неизвестно, почему они вызывают злокачественную трансформацию при переносе в клетку в результате вирусной инфекции и не вызывают таковой, когда передаются как нормальные клеточные компоненты. Три разных гена *c-onc* расположены в 3, 15 и 20-й хромосомах человека и кодируют три тирозинспецифические протеинкиназы, давая гомологичные по аминокислотным последовательностям генные продукты. Эти протеинкиназы фосфорилируют белки и таким образом влияют на их биологическую активность, что в конечном итоге

приводит к трансформации в результате, например, изменения свойств клеточной поверхности (контактного торможения?). Протоонкогены могут кодировать нормальные факторы роста или их рецепторы. Так, ген *sis* кодирует одну цепь матрицы, на которой синтезируется фактор роста, а *erb-b* - матрицу для синтеза рецептора эпидермального фактора роста [1437]. Таким образом, протоонкогены способны через различные факторы роста и их рецепторы контролировать нормальный рост клеток. Можно легко выяснить, как именно мутантные протоонкогены (см. ниже) стимулируют митоз и вызывают рост раковых опухолей. Особый интерес представляет фактор роста, синтезируемый на матрице [1437]. По-видимому, он участвует в образовании атероматозных очагов: предполагается, что они формируются в результате повышенного синтеза нормального фактора роста. Его мутантный аллель *sis* участвует в образовании неопластической саркомы. Обнаружение связи между генами, кодирующими нормальные факторы роста, и их мутантными аллелями, т. е. онкогенами, индуцирующими опухоли, имеет большое значение для биологии развития и биологии рака [1694]. Существуют структурные различия между *v-onc* и гомологичными им генами *c-onc*; так, например, гены *c-onc* состоят, подобно другим эукариотическим генам, из экзонов и интронов (разд. 2.3), тогда как соответствующие гены *v-onc* сохранили только экзоны.

Клеточная трансформация. Во многих случаях клеточные онкогены были выявлены путем прямого переноса от трансформированных клеток к нормальным. Обработка пренеопластических фибробластов мышей NIH/3T3 ДНК из опухолегенных клеточных линий в определенной части случаев приводит к появлению трансформированных опухолевых фенотипов в реципиентных клетках. Первый трансформирующий ген, охарактеризованный в трансформантах NIH/3T3 (*c-Ha-ras1*), был найден в клеточной линии EJ карциномы мочевого пузыря человека. Генетическое повреждение, приводящее к активации, т. е. к появлению трансформирующей способности

онкогена, представляет собой, как было установлено с помощью клонирования, единичную точковую мутацию, обуславливающую замещение одной аминокислоты. Кодон GGC замещается кодоном GTC; трансверсия G → T приводит при возникновении мутантного белка к замене глицина валином. Однако поиск этого протоонкогена у больных 29 формами рака в ходе анализа с применением ферментов рестрикции не привел к обнаружению случаев носительства; вероятно, данный протоонкоген редок и сопряжен лишь с немногими раковыми болезнями. Интересно, что у вирусной копии этого онкогена из вируса мышинной саркомы выявляется точковая мутация, возникающая в той же самой позиции. Были обнаружены другие случаи активации таких генов в результате единичной точковой мутации. Кроме того, некоторые онкогены, найденные в других опухолях, проявляли структурное сходство с геном *c-Ha-ras1*. Возможно, что мутантные аллели генов *ras* причастны к возникновению ≈ 15% опухолей человека.

Из клеточных линий лимфомы Беркитта был выделен трансформирующий ген, имеющий иную структуру (*B-lym*); продукт этого гена частично гомологичен трансферрину - белку, переносящему железо (см. разд. 6.1.2). В клеточных линиях лимфомы Беркитта обнаружена также перестройка другого гена - *c-myc*. Тот факт, что в опухоли одного типа найдено два различных онкогена, свидетельствует о том, что иногда для злокачественной трансформации, может быть необходимо возникновение мутаций более чем в одном локусе. Разные стадии канцерогенеза, вероятно, отражают последовательную активацию различных протоонкогенов, приводящую к качественным и количественным изменениям экспрессии генов. В настоящее время идет очень интенсивное изучение механизмов такой активации, поскольку их выяснение обещает прогресс в понимании молекулярных процессов, приводящих к злокачественной трансформации. Согласно исследованиям *in vitro*, кроме вышеупомянутых точковых мутаций, трансформирующий эффект оказывает присоединение генов *c-onc* к участкам ДНК, являющимся сильными промоторами или энхансерами, например в результате инсерции таких участков по соседству с генами *c-onc*. Однако вставка промотора (или энхансера) рядом с онкогеном, возможно, является только одним из необходимых условий трансформации, которая завершается в результате изменений в других протоонкогенах.

Участвуют ли онкогены в канцерогенезе, обусловленном хромосомными перестройками? При рассмотрении результатов изучения онкогенов (особенно данных о том, что инсерция онкогенов рядом с сильными промоторами приводит к их активации) возникает вопрос: может быть при хромосомных перестройках, специфичных для определенных неоплазий (раздел 5.1.6.4), решающую роль играют перемещения онкогенов в области, соседние с промоторно/энхансерными участками (и, возможно, в области, примыкающие к другим регуляторным генам)? Поэтому в настоящее время многие группы исследователей занимаются изучением онкогенов и их активности в опухолях при локализации в нормальных и перестроенных хромосомах (рис. 5.39). При лимфоме Беркитта, например, может происходить 20-кратное увеличение транскрипции гена *c-myc* [1704]. В плазмацитомах мышей обнаружена транслокация, сходная с той, которая у людей приводит к лимфоме Беркитта, между терминальным участком хромосомы 15, несущим *c-myc*, и хромосомой 12. Точка разрыва совпадает с константным участком гена тяжелой цепи иммуноглобулина. Сходная ситуация, по-видимому, имеет место в случае лимфомы Беркитта у человека. Онкоген *c-abl* человека локализуется в терминальном диске длинного плеча хромосомы 9 - в том самом диске, который расположен в точке разрыва, происходящего при транслокации 9:22 (она сопряжена с хроническим миелоидным лейкозом). Пока слишком рано делать окончательные выводы; однако предварительные данные свидетельствуют в пользу гипотезы о том, что активация онкогенов действительно может играть определенную роль в канцерогенезе, обусловленном хромосомными перестройками. Протоонкогены обнаружены также в виде

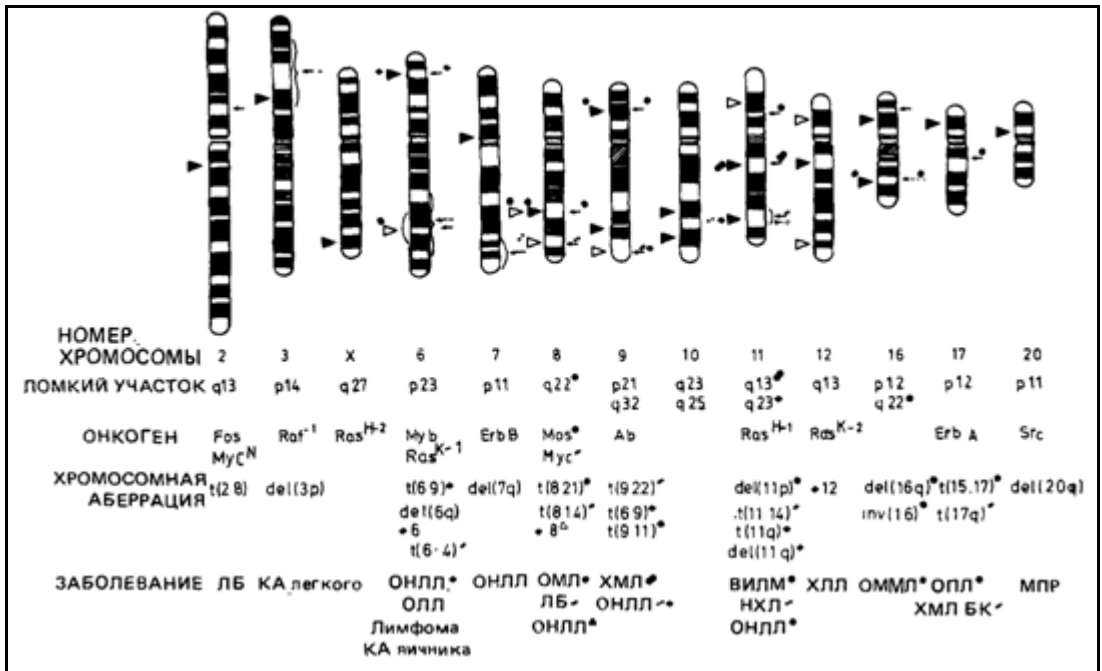


Рис. 5.39. Ломкие участки хромосом, места локализации онкогенов и локализация хромосомных разрывов при хромосомных aberrациях, приводящих к раку. Схематическое изображение хромосом, содержащих известные ломкие участки; под каждой из хромосом указаны ее номер, локализация ломких мест и онкогенов, типы хромосомных aberrаций и сопряженные с ними оаковые заболевания. Треугольники слева от хромосом указывают на диски, несущие ломкие участки () или клеточные онкогены (▷); стрелками справа от хромосом отмечены специфические диски, подвергающиеся транслокациям (←) или делециям (←---), обнаруживаемым у пациентов, страдающих перечисленными заболеваниями. Дополнительные обозначения (*, #, +) указывают на связь той или иной aberrации с определенной болезнью. ЛБ-лимфома Беркитта; К А - карцинома; ОЛЛ - острая лимфобластическая лейкемия; ОНЛЛ - острый нелимфоцитарный лейкоз; ОМЛ - острый миелоидный лейкоз; ХМЛ - хронический миелоидный лейкоз; ОММЛ - острый миеломоноцитарный лейкоз; ОМОЛ - острый монобластический лейкоз; БК - бластический криз; НХЛ - неходжкинская лимфома; ХЛЛ - хронический лимфолейкоз; ОПЛ - острая промиелоцитарная лейкемия; МНР - миелопролиферативное расстройство. Буквой Р обозначено короткое плечо, а q - длинное плечо хромосомы; t, del и inv - соответственно транслокация, делеция и инверсия [1705].

амплифицированных копий в опухолевых клетках [1694]. Цитологическим проявлением генной амплификации, имеющей место в раковых клетках, являются удвоенные мелкие хромосомы и одинаково окрашивающиеся участки. Онкоген *тус*, транслоцируемый при лимфоме Беркитта, обнаруживает повышенную экспрессию в случае карциномы легких, карциномы кишечника и промиелоидного лейкоза. Ген *N-тус* амплифицируется на поздних стадиях развития нейробластомы; высокие уровни фактора роста эпидермиса при сквамозноклеточных карциномах, по-видимому, объясняются амплификацией гена *erb-b*. Опухолевый *рост* может быть связан с активностью специфических онкогенов, поскольку в интенсивно растущих формах опухолей обнаруживаются определенные онкогены. Аналоги онкогенов или антионкогенные антитела в противоположность современной химиотерапии рака могут приостановить опухолевый рост без нарушения функционирования нормальных клеток.

Изучение онкогенов - по крайней мере тех, которые известны в настоящее вре-

мя, - конечно, не дает *полного* ответа на вопрос о механизмах канцерогенеза. Так, в большинстве опухолей человека активированные онкогены не найдены (может быть, потому, что не все онкогены еще известны). К тому же пока совершенно не решен вопрос о том, почему инфицирование ретровирусами, содержащими онкогены, как правило, приводит к злокачественному перерождению только одной определенной ткани. Такие гены должны проявлять строго тканеспецифическую экспрессию. Тем не менее открытие онкогенов было важным шагом на пути к пониманию природы злокачественной трансформации.

5.1.6.6. Рак у человека с точки зрения генетики

Разнообразные данные о раке у человека позволяют сделать некоторые обобщения. Менделевское наследование раковых заболеваний человека встречается редко, однако ряд опухолей, особенно доброкачественных, может наследоваться как менделевские признаки. К ним относятся нейрофиброматоз, множественный полипоз и различные синдромы с множественными опухолями эндокринных желез [1540; 1568]. При этом нередко происходит злокачественная трансформация. Вероятность злокачественной трансформации зависит от продолжительности цикла деления опухолевой клетки. Чем чаще клетки делятся, тем выше вероятность, что одна из них окажется злокачественной.

Другой механизм возникновения опухолей - гомозиготизация, обнаруженная в случае ретинобластомы, опухоли Вилмса и других эмбриональных опухолей, обусловлена сочетанием герминативной мутации и соматической мутации или перестройки, произошедшей в отдельной соматической клетке. Возможно, этот механизм более универсален и действует при образовании других опухолей (раздел 5.1.6.4).

В опухолевых клетках часто встречаются хромосомные аномалии, однако они редко бывают уникальными. Помимо транслокации при хроническом миелоидном лейкозе, были идентифицированы другие неслучайные хромосомные изменения (табл. 5.21), сопряженные с раком; повышенная частота таких перестроек впервые была зафиксирована при различных гематологических злокачественных новообразованиях. Как заметил Юнис, при изучении хромосом с помощью дифференциального окрашивания высокого разрешения можно показать, что фактически большинство опухолей характеризуется наличием специфических хромосомных дефектов [1705].

Явственная и особенно интересная связь опухолей с аутосомно-рецессивными синдромами, сопряженными с хромосомными разрывами, наблюдается в случае пигментной ксеродермы. Известно, что основные повреждения при этом заболевании идентифицируются как дефекты репарации ДНК, возникшие после облучения УФ-светом. Вполне возможно, что гетерозиготы характеризуются повышенной частотой заболеваний раком, однако эта гипотеза требует дополнительной проверки [1340]. Если часть случаев рака у человека действительно обусловлена состоянием носительства по генам различных синдромов, сопряженных с разрывами хромосом, громадное значение для практического здравоохранения имеет разработка простых тестов для диагностики носителей.

Различные генетические дефекты, влияющие на разрывы хромосом и репарацию, а также недостаточность иммунного надзора за канцерогенами среды, вероятно, приводят к возникновению неоплазий. Другие генетические факторы, проявляющиеся при воздействии канцерогенов окружающей среды, связаны с аномалиями метаболизма канцерогенных веществ. В свете результатов фармакогенетических исследований близнецов (разд. 4.5.1) представляется вероятным, что метаболизм большинства чужеродных веществ находится под генетическим контролем. Медленная биотрансформация или наличие ферментативных систем, превращающих проканцерогены в более сильные канцерогенные вещества, приведут к тому, что определенная часть популяции по генетическим причинам будет подвержена повышенному риску возникновения рака. Данные об уровнях гидроксилазы арил-углеводородов (превращающей полициклические углеводороды в

более канцерогенные соединения) и о дебрисохин-спартеиновой системе при раке легких у человека свидетельствуют о существовании таких механизмов (разд. 4.5.2). Накапливаются доказательства того, что большая часть опухолей возникает в результате соматических мутаций. Так, например, многие химические вещества, мутагенные в бактериальных тест-системах, демонстрируют канцерогенность в тест-системах с использованием животных. Данные о моноклональном происхождении большинства опухолей, полученные при использовании вариантов G6PD (см. выше), также свидетельствуют о том, что главная причина образования неоплазий - соматические мутации.

Однако не исключена и вирусная обусловленность возникновения опухолей человека; по-видимому, некоторые опухоли человека могут быть индуцированы вирусами. Вирусная природа опухолей человека наиболее очевидна в случае лимфомы Беркитта - опухоли, моноклональное происхождение которой не вызывает сомнений. Тот факт, что 14-я и 8-я хромосомы часто принимают участие в развитии лимфомы Беркитта, позволяет использовать эту опухоль в качестве модели для изучения вирусной обусловленности возникновения неоплазий, моноклонального происхождения опухолей, онкогенов и клональной эволюции хромосом.

Результаты, полученные недавно при изучении онкогенов, имеют очень большое значение. Во-первых, они продемонстрировали связь между цитогенетикой опухолей и их молекулярной биологией, доказав, что гены рака могут располагаться в непосредственной близости от точек разрывов, происходящих при опухолеспецифических хромосомных перестройках. Во-вторых, они показали, что онкогены могут быть «активированы» в результате классических точковых мутаций или вследствие перестроек, произошедших при пассажах через вирус, из нормальных и необходимых генов в гены, приводящие к возникновению рака.

Значительное накопление больных с опухолями в отдельных семьях наблюдалось только при различных наследственных опухолевых синдромах и изредка в так называемых раковых семьях, характеризующихся а) повышенным числом больных с аденокарциномами, главным образом кишечника и эндометрия, б) повышенной частотой множественных первичных злокачественных неоплазм, в) более ранним возрастом начала заболеваний и г) вертикальной передачей патологий, наследуемых по аутосомно-доминантному типу. При изучении многих опухолей, например карциномы молочной железы и карциномы желудка, обнаруживается умеренно выраженное скопление соответствующих больных в отдельных семьях. Часто считают, что эти данные согласуются с предположением о мультифакториальном наследовании, однако природа генетического предрасположения к таким заболеваниям неизвестна.

Изменение эпидемиологических характеристик некоторых опухолей, например повышение частоты рака легких и понижение частоты рака желудка в последнем поколении, недвусмысленно свидетельствует о том, что одни только генетические факторы не могут объяснить предрасположенности к этим раковым заболеваниям. Мы знаем, что рак легких связан с курением, и предполагаем, что понижение частоты рака желудка обусловлено исчезновением соответствующего канцерогена вследствие улучшения условий хранения пищевых продуктов. То, что рак легких развивается лишь у определенной части заядлых курильщиков, свидетельствует против простого объяснения, связывающего его возникновение с воздействием факторов окружающей среды. Вероятнее всего, специфические факторы среды, например углеводороды сигаретного дыма и другие раздражающие вещества, взаимодействуют со специфическими генетическими факторами, влияющими, например, на метаболизм углеводов, репарацию ДНК и иммунологический контроль канцерогенеза. В отдельных случаях определяющее значение, по-видимому, имеют или только факторы среды, или только генетические факторы. В большинстве же случаев появление опухоли, вероятно, обусловлено взаимодействием наследственности и среды. Поскольку возникновение различных форм рака, по-видимому, обусловлено

большим числом факторов окружающей среды и множеством генетических механизмов, поиски панацеи от всех раковых заболеваний бесперспективны. Есть надежда, что выявление популяционных подгрупп генетически предрасположенных индивидов с помощью простых лабораторных тестов станет возможным при достижении лучшего понимания различных механизмов, лежащих в основе генетической предрасположенности к разным формам рака.

5.1.6.7. Соматические мутации и старение

Старение и смерть. Люди - единственные живые существа, знающие о неизбежности смерти. Попытки примириться с этой мыслью нашли отражение в культах смерти, имеющих громадное значение в культурной эволюции от погребальных обрядов неандертальцев и весьма изощренных культур (например, египетской), почти исключительно посвященных заботам о покойнике, до теории рая и ада, проповедуемой некоторыми современными религиями. В давние времена большая часть людей умирала в сравнительно молодом возрасте. С развитием современной цивилизации и особенно современной медицины продолжительность жизни достигла нескольких десятилетий. Однако теперь мы стоим перед проблемой медленного угасания наших биологических способностей в процессе старения. Все большую и большую долю популяции, особенно промышленно развитых стран, составляют пожилые люди; в настоящее время одна из важнейших забот практического здравоохранения - гериатрическая медицина. Это привело к появлению множества новых социальных, биологических и медицинских проблем.

Близнецовые и семейные исследования на людях убедительно показали, что продолжительность жизни испытывает довольно сильное влияние генетических факторов [1508]. В ряде случаев обнаружено накопление пациентов с болезнью Альцгеймера - одной из форм старческого слабоумия - в отдельных семьях. Кроме того, доказано, что возникновение и протекание многих физических и психических заболеваний зависят от возраста. При некоторых болезнях мозга наблюдались характерные возрастзависимые изменения в специфических группах нейронов, которые, по мнению некоторых исследователей, могут служить простыми моделями нормального старения.

Изучение биологических механизмов старения на отдельных клетках [1513]. Гипотеза о том, что причины старения и смерти можно свести к свойствам отдельной клетки, впервые была высказана зоологом Вейсманом около ста лет назад. Он предположил, что причины «естественной смерти» лежат в ограниченной способности соматических клеток к воспроизведению. В одной из его публикаций мы читаем, что «смерть происходит оттого, что изношенная ткань не может обновляться вечно, поскольку способность к росту посредством клеточных делений утрачивается со временем» (Вейсман, 1891 [1693]). Вейсман был также первым, кто предположил, что слишком долгая жизнь многоклеточного организма после периода репродукции и заботы о потомстве принесла бы вред виду в целом.

Гипотеза Вейсмана о старении соматических клеток, казалось, была опровергнута Каррелом (1912), который утверждал, что соматические клетки можно бесконечно долго культивировать вне организма. Длительное время гипотеза «потенциального бессмертия» в целом считалась верной и принадлежала к числу наиболее известных «результатов» биологической науки. До проведения тщательных экспериментов Хейфлика, выполненных в начале 1960-х годов [1483; 1484] и показавших ошибочность утверждения Каррела, неудачи при попытках воспроизвести эти результаты объяснялись неадекватными условиями культивирования и другими причинами методического характера. Теперь получила широкое признание точка зрения, что нормальные диплоидные фибробласты млекопитающих могут претерпевать лишь ограниченное число клеточных делений; для фибробластов человеческих эмбрионов это число равно приблизительно 50 ± 10 . С другой стороны, гетероплоидные, транс-

формированные клетки, по-видимому, как правило, делятся неограниченно.

В ряде работ изучалась связь между старением организма донора и числом делений, которые претерпевают его соматические клетки *in vitro*. Если клетки прекращают делиться в культуре из-за того, что они «исчерпали» максимальное число делений, их способность к делению *in vitro* должна уменьшаться с увеличением возраста донора. В двух работах такая зависимость действительно была обнаружена [1547; 1630]. Другое следствие, которое можно было бы вывести из этой гипотезы, состоит в том, что клетки короткоживущих видов должны обладать способностью к меньшему числу делений, чем клетки долгоживущих видов. Это предположение подтвердилось при сравнении людей (максимальная продолжительность жизни которых равна ≈ 110 годам) и мышей (3,5 года). Мышинные фибробласты *in vitro* могут претерпевать только 14-28 делений. Однако при анализе других видов связь между видоспецифической продолжительностью жизни и способностью клеток к делению не прослеживается. Отметим также, что клетки, взятые даже у очень старых людей, сохраняют способность пройти примерно 20 делений.

Значение цитологических подходов к изучению проблемы старения возросло, когда было обнаружено [1547], что клетки больных с синдромом Вернера обладают заметно сниженной способностью к делению в клеточной культуре. Основные клинические симптомы этого аутосомно-рецессивного синдрома - катаракты, подкожная кальцификация, преждевременное поседение, преждевременный атеросклероз, изменения кожи, сахарный диабет, повышенная частота злокачественных опухолей, хромосомная нестабильность и преждевременно постаревшее лицо (рис. 5.40). Ожидаемая продолжительность жизни значительно снижена [1442, 1613]. Иногда синдром Вернера рассматривают как генетическую модель преждевременного старения. Однако, если некоторые из описанных клинических и патологических симптомов этого синдрома сходны с теми, что наблюдаются в ходе процесса нормального старения, то многие другие его симптомы такого сходства не обнаруживают.

Молекулярные и хромосомные механизмы. В последнее время проводится много исследований, посвященных изучению молекулярных и хромосомных механизмов клеточного старения. Однако какой-либо последовательной и общепринятой теории этого процесса пока не существует. При сильно упрощенном подходе можно выделить две группы гипотез. Одна из них подразумевает, что прекращение клеточных делений запрограммировано в биологическом механизме регуляции. Весомым аргументом в пользу этих гипотез служит то, что трансформированные клетки способны к неограниченному делению. Согласно другой версии, клетки теряют способность к делению вследствие накопления

Рис. 5.40. Американка японского происхождения с синдромом Вернера в юности и в возрасте 48 лет У нее было восемь детей, двое из которых тоже имели синдром Вернера [1613]



«ошибок», препятствующих их делениям. Такие ошибки могут иметь место на трансляционном или посттрансляционном уровне; они могут также происходить на уровне ДНК, проявляясь в виде соматических мутаций. Последняя из упомянутых гипотез, впервые предложенная Сциллардом в 1959 г. [1627] и развивавшаяся Бернетом в 1974 г. [1409], подкрепляется данными о повышении частоты определенных соматических мутаций *in vitro* [1459] и *in vivo* с возрастом: доля лимфоцитов с дефектом HPRT, делающим их устойчивыми к 6-тиогуанину, с возрастом увеличивается [1559]. Однако теория соматических мутаций не объясняет всех явлений клеточного старения; вполне реальным представляется также предположение о накоплении ошибок на различных посттрансляционных уровнях [1490].

Каким же образом трансформированная клетка избегает последствий накопления таких ошибок? Судя по всему эта проблема до сих пор не нашла своего решения. Рассматривается несколько возможных механизмов [1513] и, в частности, реактивация в норме супрессированных механизмов коррекции и более быстрая селективная элиминация клеток, содержащих такие ошибки. В заключение отметим, что соматические мутации, вероятно, играют какую-то роль в процессах нормального старения и канцерогенеза. Однако насколько велик их вклад, в настоящее время почти неизвестно.

5.2. Мутации, индуцированные облучением и химическими мутагенами

Общественный интерес к индуцированным мутациям. В предшествующих разделах говорилось о спонтанных мутациях. Определение «спонтанный» означает, что эти мутации происходят без какой-либо известной причины, даже если мы знаем, что определенные обстоятельства, например возраст родителей, могут повышать вероятность мутации. Эта вероятность увеличивается под воздействием такого фактора, как радиация высоких энергий, и в присутствии многих химических веществ. Поскольку люди в повседневной жизни подвергаются воздействию множества факторов окружающей среды, изучение индуцированных мутаций привлекает все большее внимание широкой общественности. Эти работы хорошо субсидируются. Люди ждут от ученых конкретных предложений относительно мер защиты. Всемирная организация здравоохранения, Международная комиссия по защите от радиации (МКЗР), Национальная академия наук США и ряд других влиятельных организаций образовали экспертные группы и с их помощью получили и опубликовали оценки генетического риска. В нашем знании до сих пор существует множество пробелов, особенно в том, что касается воздействия на людей низких доз облучения, однако в последнее время складывается довольно полная картина радиационной опасности. Относительно мало известно о возникновении индуцированных мутаций под влиянием химических веществ, имеющих в окружающей среде.

В научных кругах существует изрядная путаница в оценках степени химической опасности, а также в вопросе о том, какую информацию и какого рода рекомендации должны представить ученые [1489; 212]. Одна из причин этой путаницы заключается в том, что проблема химического мутагенеза несомненно сложнее проблемы возникновения мутаций под действием радиации. Другая причина может быть связана с тем, что исследования проводятся в относительно узких областях. Подобные исследования требуют изобретательности в выявлении и точной формулировке проблем, которые ограничены определенными рамками и могут быть решены с помощью адекватных методов. Такой подход обычно не требует познаний во множестве различных областей науки. В естественных науках барьеры между специальностями затрудняют свободное использование информации, полученной при изучении разных уровней организации. Следовательно, ученые, которые, как считается, способны дать, основываясь на своих глубоких познаниях в данной конкретной области, экспертную рекомендацию, часто могут и не иметь сбалансированной точки зрения на ту или иную сложную проблему. Они смотрят на

такие проблемы главным образом через призму своей собственной специальности. Традиционные каналы научной коммуникации - научные общества, конгрессы, журналы - до сих пор не обеспечили преодоления трудностей, возникших при изучении мутагенеза, вызванного факторами окружающей среды. Координация работ по химическому мутагенезу такими международными организациями, как ВОЗ, оказалась менее эффективной, чем в области радиационного мутагенеза. Некоторое прояснение ситуации было достигнуто благодаря ряду публикаций, в которых основной акцент сделан на методах исследований [1489; 212]. Вероятно, необходимое здесь решение будет заключаться в создании новых институтов, организующих научный поиск на всех уровнях. К сожалению, до сих пор успешное проведение мобилизации широких научных сил такими институтами удавалось только при соблюдении двух условий:

- 1)если цель была четко определенной и чисто технологической;
- 2)если имелась сильная и непосредственная политическая мотивировка. На память приходят такие примеры, как Манхэттенский проект, предпринятый во время 2-й мировой войны, а также американский и советский проекты изучения космического пространства.

В последующем мы изложим нашу точку зрения на эти проблемы. Возможно, знакомство с ней поможет другим исследователям осознать всю сложность вопроса и пробудит у них желание участвовать в его решении.

5.2.1. Мутации, индуцированные радиацией

5.2.1.1. Основные факты и проблемы, поставленные в ходе их анализа

Способность радиации индуцировать мутации. То, что радиация может индуцировать мутации, предполагалось с давних пор, но первые доказательства в пользу этого предположения были получены Мёллером (1927) [1567] на *Drosophila melanogaster* и Стадлером (1927-1928) на ячмене. До этого Мавор (1924) обнаружил радиационную индукцию нерасхождения [1552]. Открытие Мёллера стало возможным благодаря разработке им метода для подсчета мутаций и особенно деталей, сцепленных с X-хромосомой дрозофилы. Результаты классического эксперимента Мёллера приведены в табл. 5.24. В данном случае доза t_4 вдвое выше дозы t_2 . Удвоение дозы облучения приводило к приблизительно удвоению числа индуцированных мутаций. Однако масштабы этого эксперимента слишком малы для того, чтобы можно было выявить спонтанные мутации в контроле.

В последующие два десятилетия происходило развитие классической радиационной генетики. Ее основные положения были изложены в книгах Ли и Кэтчсайда (1942) [1528], Тимофеева-Ресовского и Циммера (1947) [1656], Холландера [97] (1954-1956).

Несколько специальных замечаний о радиации. Следует рассмотреть два типа радиации высоких энергий: электромагнитные волны и корпускулярное излучение. Зависимость биологической активности электромагнитных волн от длины волны изображена на рис. 5.41. Для получения мутагенного эффекта необходимо, чтобы энергия радиации была по крайней мере достаточной для перемещения электрона с внутреннего на внешний уровень, переводящего атом в нестабильное состояние и увеличивающего его склонность к участию в химических реакциях. УФ-излучение имеет подходящие для этого параметры и поэтому при воздействии на ДНК производит мутагенный эффект. Наиболее известная химическая реакция, вызываемая этим излуче-

Таблица 5.24. Результаты классического эксперимента Мёллера, в котором были получены доказательства индукции мутаций рентгеновскими лучами [1567]. (Доза t_4 вдвое выше дозы t_2 .)				
Опыт	Число обследованных хромосом	Число обнаруженных мутаций		
		Петали	Полулетальные мутации	Визуально наблюдаемые мутации
Контроль	198	0	0	0
X-лучи (t_2)	676	49	4	1
X-лучи (t_4)	772	89	12	3

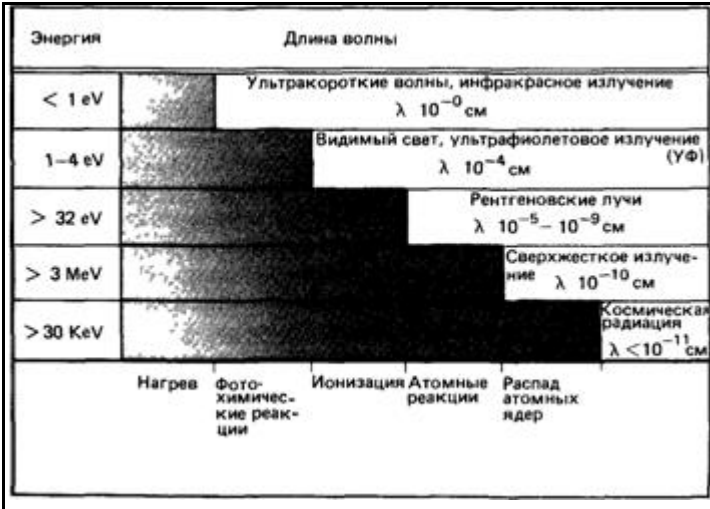


Рис. 5.41. Зависимость биологической активности электромагнитных волн от их длины и энергии.

нием, - димеризация двух соседних молекул тимина. Она препятствует их спариванию с аденином. Поэтому, хотя фотоны УФ-излучения и вызывают точковые мутации, они редко приводят к появлению структурных дефектов. Для половых клеток человека УФ-лучи не опасны, так как они поглощаются эпидермисом. Однако УФ-облучение может индуцировать соматические мутации в клетках кожи и вызывать рак кожи (разд. 5.1.6). Излучение фотонов высоких энергий (X- и γ -лучей) может выбивать электроны с внешнего уровня, превращая атом в положительный ион. Эти электроны в свою очередь могут взаимодействовать с другими атомами, превращая их в отрицательно заряженные ионы. Ионы обоих типов вместе со свободными радикалами образуют материал для вторичных химических реакций. Корпускулярное излучение состоит не из фотонов высокой энергии, а из частиц. Они могут, подобно электронам и протонам, быть заряжены, а могут, подобно нейтронам, и не иметь заряда. Их физическое действие зависит от их кинетической энергии. Продукты ионизации, индуцированной нейтронами, плотно сконцентрированы вдоль трека частицы, тогда как электромагнитные волны (X- и γ -излучение) производят менее плотную ионизацию.

Биологическое действие радиации всех типов зависит от локализации источника (внутри или вне организма), типа излучения (электромагнитные волны, заряженные или незаряженные частицы), энергии излучения и свойств (плотности, содержания воды и т. д.) поглощающего материала.

Облучение любого типа вызывает не только прямые, но и косвенные эффекты. Например, нейтроны могут включаться в атомные ядра, а могут передавать свою кинетическую энергию, скажем, ядрам водорода (протонам). Эти протоны ускоряются и вступают во множество вторичных реакций с другими молекулами.

Дозу энергии излучения обычно измеряют в греях (Гр): 1 Гр равен дозе энергии, поглощаемой при передаче 1 Дж энергии ионизирующей радиации веществу массой 1 кг в определенных постоянных условиях. Она соответствует 100 радам (в старых единицах) и, как правило, 100 рентгенам (Р), однако последняя единица определяется через число ионов, возникающих при ионизации. Другая важная мера радиации — это эквивалентная доза, измеряющая (вредный) биологический эффект определенной дозы излучения. Она вычисляется путем умножения энергетической дозы на множитель, изменяющийся при изменении вида излучения в зависимости от особенностей процесса выделения энергии; например, при плотной ионизирующей радиации он больше, чем при рассеянной. Она измеряется в Дж/кг (Дж джоуль). Старой единицей ее измерения является рэм (1 рэм = 1/100 Дж/кг). В этой книге часто цитируются данные, приводящиеся в старых работах. При этом мы используем новую систему единиц, принимая, что 1 Гр = 100 мГр = 100 рад = 100 Р. Возможно, это не всегда будет удовлетворять требованиям специалистов по радиационной физике; однако для целей данной книги это, вероятно, вполне приемлемо.

Результаты и основные положения классической радиационной генетики [1528, 1656, 97].
Наиболее важные результаты и положения классической радиационной гене-

тики можно суммировать следующим образом.

1. Для индукции мутаций в определенной клетке необходимо, чтобы эта клетка (например, половая) подверглась прямому воздействию радиации. Данное утверждение не является таким уж совершенно самоочевидным, как это может показаться. Нельзя исключить аргументы и возможные опосредованные влияния, например в результате индукции соответствующего химического вещества, доставляемого к гонадам током кровообращения; в работах последнего времени действительно было выявлено несколько случаев такого непрямого воздействия. Однако для всех практических целей данное положение тем не менее служит хорошим приближением к реальной ситуации. Этот принцип имеет большое значение при изучении последствий облучения человеческих индивидов, так как высокий уровень поглощения некоторых видов радиации (УФ-излучения или рентгеновских лучей очень низкой энергии) предотвращает их опасное воздействие на половые клетки. Тем не менее они могут представлять известную опасность, приводя к возникновению соматических мутаций и вызывая рак.
2. Радиация не порождает каких-либо новых биологических феноменов; она лишь увеличивает вероятность возникновения различных мутаций и клеточных событий, которые время от времени происходят спонтанно. Мутации, индуцированные радиацией, по существу не отличаются от спонтанных мутаций. Этот принцип нашел подтверждение и в случае мутаций, индуцированных химическими веществами. Однако не все типы спонтанных мутаций увеличиваются в числе под воздействием всех мутагенных факторов в одинаковой степени. Наоборот, существуют определенные различия в относительных частотах как разных типов спонтанных мутаций, так и мутаций, индуцированных радиацией и химическими веществами. Тот факт, что индуцируемые мутации любого типа могут также возникать спонтанно, создает трудную статистическую проблему при попытках доказать, что увеличение частоты мутаций в популяции человека обусловлено воздействием мутагенных факторов. Это можно пояснить на примере из области тератологии человека: талидомид, применяемый в качестве снотворного, при неоднократном употреблении или даже при однократном приеме во время ранней беременности оказывал тератогенное действие. Комбинация уродств, вызванных этим лекарством, отличается чрезвычайным своеобразием; сочетание коротких деформированных конечностей (фокомелия) с пороками развития ушей, глаз и внутренних органов прежде почти никогда не наблюдалось. Именно это своеобразие в первую очередь и навело врачей на мысль о несомненной новизне данного феномена и побудило их заняться поиском возможного тератогенного фактора. Однако, если бы это лекарство вызывало появление новорожденных с расщепленной губой и небом или с дефектами нервной трубки, а не с фокомелией, то весьма вероятно, что оно по-прежнему считалось бы вполне пригодным снотворным с превосходными показаниями для применения во время беременности. Из сказанного следует, что любой мутагенный фактор, неумышленно введенный в нашу окружающую среду и вызывающий такие же по величине повреждения, как талидомид, наверняка остался бы невыявленным.
3. Третья, часто обсуждаемая проблема — это проблема зависимости частоты мутаций от дозы. В случае мутаций, для возникновения которых необходимо только одно первичное событие, было показано, что график зависимости доза-эффект представляет собой просто прямую линию:

$$M = \mu + kD$$

(M - число мутаций; μ - частота спонтанных мутаций; D - доза, k - частота мутаций/единица дозы). Такая линейная зависимость эффекта от дозы радиации имеет место только тогда, когда индукци-

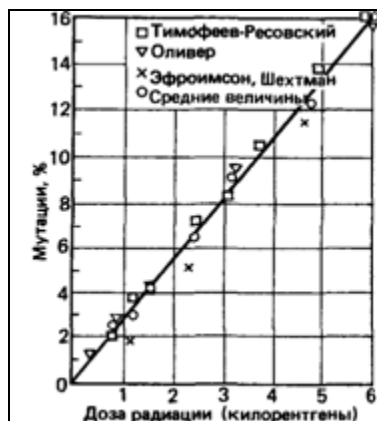


Рис. 5.25. Линейное увеличение частоты мутаций в случае точковых мутаций и хромосомных разрывов у *Drosophila melanogaster*. Обратите внимание на линейность зависимости эффекта от дозы [1656]

рованные мутации содержатся в небольшой части всех облученных клеток. При более высоких мутационных частотах проявляется определенный «эффект насыщения», приводящий к выходу графика на плато. В этом случае данная функция более адекватно описывается экспоненциальным уравнением. Пример рассматриваемой зависимости, в котором использованы данные, полученные на *Drosophila melanogaster*, приведен на рис. 5.42. Здесь применялись довольно большие дозы облучения; исследования при более низких дозах подтверждают существование линейной зависимости. Для интервала доз, включающего эти относительно низкие величины, подобные материалы выглядят не слишком убедительно, поскольку для совмещения графика зависимости доза-эффект с реальными данными требуются очень большие выборки.

Эти результаты интерпретировались на основе теории мишени. Каждое мутационное событие происходит в результате однократного попадания в определенную восприимчивую структуру, и вероятность поражения этой структуры растет линейно с увеличением дозы. Эффект насыщения при очень высоких дозах (более высоких, чем те, что были использованы в экспериментах, результаты которых отражены на рис. 5.42) обусловлен тем, что в данном случае одна и та же структура поражается более одного раза.

4. Эта теория предсказала нелинейную зависимость эффекта от дозы радиации в случае мутаций, для возникновения которых необходимо осуществление более одного первичного события. Для появления многих транслокаций требуется возникновение двух разрывов в течение довольно короткого временного интервала и воссоединение разорванных хромосом примерно за такое же время. Однако эти два разрыва не обязательно должны осуществляться в результате двух отдельных попаданий. Они могут быть индуцированы одной частицей или фотоном, особенно при очень высокой плотности ионизации, например при использовании нейтронов. В этом случае ожидается зависимость доза-эффект, состоящая из линейной (одноударной) и квадратической (двуударной) компонент.

$$M = \mu + k_1D + k_2D^2.$$

Такие зависимости эффекта от дозы действительно были обнаружены во многих экспериментах. На рис. 5.43 приведена в качестве примера соответствующая кривая, построенная по данным, полученным на *Drosophila melanogaster*.

5. В случае одноударных событий эта теория позволяет сделать еще одно предсказание, имеющее громадное практическое значение. Число попаданий, очевидно, зависит от дозы радиации, а не от времени, в течение которого она воздействует. Следовательно, здесь не имеет значения, дается ли одна и та же доза за очень короткое время (большая «мощность дозы») или распределяется по гораздо более длительному временному интервалу (малая «мощность дозы»). Первые эксперименты на *Drosophila* казалось подтверждали это предсказание (рис. 5.44). Однако последующие результаты, полученные на мышах [1611], вызвали серьезные сомнения в правильности сделанных из них выводов. В настоящее время общепринятым

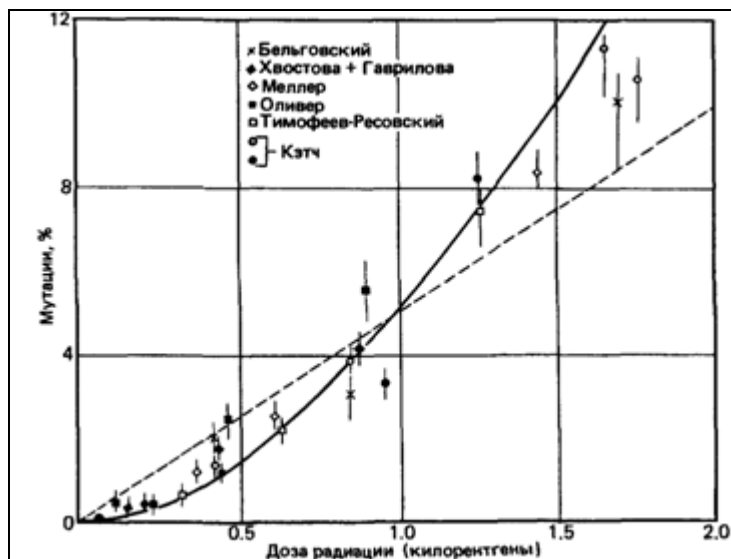


Рис. 5.43. Возникновение хромосомных aberrаций (события с двумя разрывами) в зависимости от дозы радиации (в 10 Гр). Двуударная кривая (сплошная линия) лучше соответствует существующим данным, чем одноударная зависимость (пунктирная линия). Данные получены разными авторами. На рисунке нанесены экспериментальные точки и их стандартные отклонения [1656].



Рис. 5.44. Облучение *Drosophila melanogaster* дозами радиации в 35 Гр при разных мощностях дозы. Различия по частоте мутаций, по-видимому, отсутствуют (горизонтальная линия). См., однако, текст [1656].

считается представлением о том, что определенная доза, примененная при относительно низкой мощности, приведет к меньшему числу мутаций, чем та же доза при более высокой мощности.

Подтверждение и дополнение этих результатов. Громадное число исследований с использованием других материалов помогло подтвердить и дополнить эти выводы. При этом учитывалась стадия развития облученной половой клетки; используя различные (например, биохимические) фенотипы, исследователи выявили химические реакции, которые обуславливают возникновение мутаций, индуцированных радиацией.

Влияние химической среды и содержания O_2 в облученной ткани. Одним из вторичных последствий облучения является образование высокоактивных радикалов, например пероксидов. Для их образования необходим кислород. Поэтому неудивительно, что высокое содержание кислорода в облученной ткани усиливает индукцию мутаций. Этот эффект сильно выражен, например при облучении рентгеновскими лучами. Он почти или полностью отсутствует в случае плотно ионизирующей радиации, например при облучении α -частицами.

Молекулярные эффекты радиации [1660]. В классической радиационной генетике мутагенные эффекты выявлялись на фенотипическом уровне. Однако уже на ранней стадии ее развития были предприняты морфо-

логические исследования хромосом, особенно у растений вроде традесканции, и было показано, что многие мутационные изменения можно объяснить индукцией морфологически различных хромосомных разрывов и их последствиями, например транслокациями.

В течение длительного времени не было известно, может ли ионизирующая радиация индуцировать мутации. Многие исследователи считали это вполне вероятным, однако нельзя было исключить возможность, что все мутации, индуцированные радиацией, являются небольшими делециями или хромосомными перестройками. Недавно этот вопрос был решен с использованием фага фХ174, имеющего только одну цепь ДНК. В этих экспериментах регистрировали реверсии, возникновение которых нельзя объяснить каким-либо иным механизмом, кроме единичной точечной мутации. У бактерий индукция генных мутаций, в том числе транзиций, обнаружена в триптофановом локусе *E.coli* [1660].

Первой эукариотической системой, в которой наблюдались генные мутации, индуцированные радиацией, была *Neurospora crassa* [1544; 1618]. 42% выявленных мутаций оказались транзициями, 37% – вставками или делениями отдельных пар оснований, а остальные имели различное происхождение, причем часть из них, вероятно, были трансверсиями.

Основные положения радиационной генетики нашли подтверждение в исследованиях на хромосомах лимфоцитов человека [1395; 1387]. Большинство работ по классической радиационной генетике выполнено на организмах, находящихся лишь в отдаленном родстве с человеком, например на *Drosophila*. Эксперименты по облучению хромосом проводили главным образом на растениях. Исследования на человеке начались вскоре после разработки метода получения хромосомных препаратов из лимфоцитов (разд. 2.1.2.2). Методические детали и классификация структурных хромосомных aberrаций обсуждаются в разд. 2.2.2. Особенно хорошим индуктором хромосомных разрывов оказались дицентрические хромосомы. На рис. 5.45 изображена соответствующая зависимость эффекта от дозы облучения. Она носит более или менее линейный характер, но при сравнительно высоких дозах проявляет тенденцию к увеличению крутизны. Такие зависимости доза-эффект имеют место в том случае, если одни первичные события являются одноударными, а другие - двуударными. Для образования дицентрика необходимы два разрыва в хромосомах, находящихся в близком соседстве. Если наши теоретические посылки правильны, эти разрывы

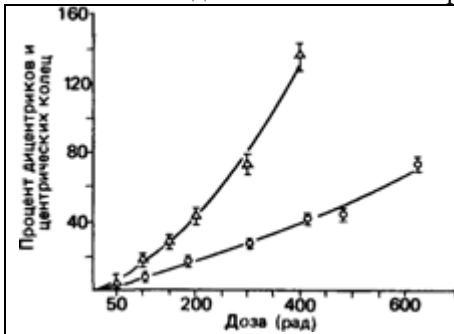


Рис. 5.45. Кривые зависимости эффекта от дозы для дицентрических и кольцевых хромосом после облучения лимфоцитов человека *in vitro*. Δ - острое и O - хроническое облучение. Для каждой точки указаны стандартные ошибки [1400].

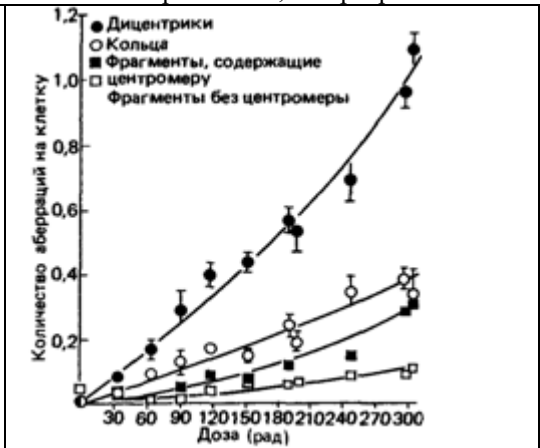


Рис. 5.46. Кривые зависимости эффекта от дозы при остром облучении *in vitro* лимфоцитов человека, культивируемых *in vitro*, для дицентриков, кольцевых хромосом, фрагментов, содержащих центромеру и ацентрических фрагментов [1395].

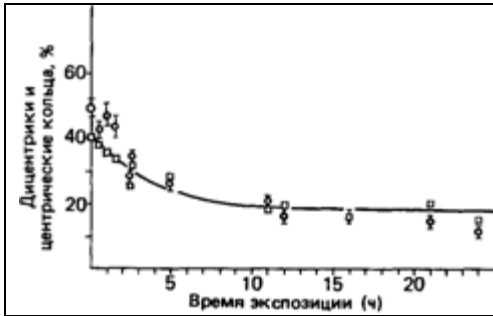


Рис. 5.47. Доля метафаз с дицентрическими хромосомами (□) и кольцевыми хромосомами (○) после облучения *in vitro* 2 Гр рентгеновских лучей. Уменьшение эффекта с увеличением времени экспозиции и понижением мощности дозы (= увеличением времени экспозиции) [1400].

могут быть вызваны как одним, так и двумя попаданиями. Следовательно, найденная зависимость эффекта от дозы не противоречит этим соображениям. На рис. 5.46 приведены также данные, касающиеся образования кольцевых хромосом и фрагментов.

На рис. 5.47 показано уменьшение числа дицентрических и кольцевых хромосом при понижении мощности дозы. Эти данные подтверждают существование эффекта мощности дозы, обнаруженного на других организмах, в частности на мышах. Приведенные результаты убедительно свидетельствуют о том, что основные феномены радиационной генетики могут в принципе быть продемонстрированы и на хромосомах человека.

Человеческая популяция подвергается воздействию ионизирующей радиации, излучаемой множеством источников. Общество ждет от генетиков информации о масштабах возможной опасности. Как мы ответим на эти волнующие людей вопросы?

5.2.1.2. Проблема оценки генетического риска, обусловленного радиацией и другими мутагенными факторами окружающей среды

Проблема оценки степени риска для человеческой популяции, обусловленного радиацией и всеми другими мутагенными факторами, включает следующие вопросы:

- 1) Каким образом данный фактор действует на генетический материал?
- 2) Насколько широко подвергается человеческая популяция воздействию этого фактора?
- 3) Каково вероятное увеличение частоты мутаций по сравнению с частотой «спонтанных» мутаций?
- 4) Каковы долговременные последствия увеличения частоты мутаций для популяции?

В идеале на эти четыре вопроса должны отвечать ученые-естественники. Существует, однако, пятый вопрос, при подготовке ответа на который роль ученых-естественников может заключаться только в сборе данных. Ответ на него должно дать общество в целом.

- 5) Какова та степень увеличения числа мутационных повреждений, которую мы готовы терпеть в обмен на такие блага, как диагностическое и терапевтическое применение рентгеновских лучей, использование ядерной энергии, некоторых лекарств и др.

Принципы тестирования на мутагенность. Вопрос относительно механизма действия мутагенов на генетический материал очень сложен. Его можно подразделить на ряд более конкретных вопросов.

1. Какие типы мутаций индуцируются в данном конкретном случае — геномные, хромосомные или геновые?
2. Где преимущественно они возникают: в половых клетках или в соматических?
3. Если они индуцируются в половых клетках, то
 - а) На какой стадии развития половых клеток происходит первичное поражение?
 - б) Передаются ли эти мутации следующему поколению или они элиминируются, скажем, в процессе мейоза?
 - в) Если они передаются, то какие фенотипические изменения можно ожидать у потомков?
4. Если мутации индуцируются в соматических клетках, то

а) Какие клетки особенно подвержены такой опасности?

б) Каковы последствия их возникновения для индивида?

Все эти вопросы должны изучаться в ходе выполнения комплексной программы тестирования на мутагенность. Какие организмы должны при этом использоваться? С теоретической точки зрения ответ очевиден. Нас интересуют люди; поэтому было бы лучше всего, если бы мы изучали эти проблемы на человеке. Однако экспериментальные исследования на человеке невозможны по этическим соображениям. Мы можем изучать только ситуации, складывающиеся естественным образом; возникающие при этом обстоятельства обычно столь сложны, что у нас нет надежды на получение четких ответов. Поэтому во многих исследованиях, посвященных генетике человека, используются экспериментальные животные. Эти животные должны удовлетворять трем основным условиям.

1. Они должны быть достаточно близки к человеку, чтобы можно было осуществлять имеющие смысл экстраполяции. Неизбежные различия между экспериментальными видами животных и людьми должны иметь такой характер и порядок величины, чтобы они поддавались при проведении сравнения теоретическому или экспериментальному анализу.
2. Смена поколений должна быть быстрой, чтобы генетические эксперименты могли проводиться за разумное время.
3. Подопытные животные должны быть такими, чтобы их можно было содержать в большом числе на умеренные средства.

Единственным животным, удовлетворяющим всем этим условиям, является мышь (*Mus musculus*). Поэтому радиационная генетика млекопитающих представляет собой главным образом радиационную генетику мыши. Другие виды, такие как крысы, китайские хомячки или обезьяны-мармозетки, используются лишь эпизодически. По этой причине последующие разделы будут посвящены в основном мутагенезу у мышей, хотя они и содержат определенные выводы, касающиеся человека. Для сравнения приводятся имеющиеся данные о человеке и о других видах.

Тест-системы для идентификации различных мутаций in vivo в половых клетках мыши. Тест-системы с использованием этого животного можно подразделить на системы in vivo и in vitro и на системы для идентификации мутаций в половых и соматических клетках.

Существующие тест-системы для выявления мутаций в половых клетках представлены на рис. 5.48. Предположим, что мутация индуцирована в сперматогонии. Если эта мутация является хромосомной, она может быть идентифицирована сразу в процессе митотических делений сперматогониев. В течение первого и второго мейотических делений можно наблюдать влияние мейоза на индуцированные аберрации. Гаплоидная фаза сперматогенеза до сих пор была недоступна для изучения (см., однако, [431, 432]). Последующие митотические деления происходят во время раннего эмбрионального развития особей поколения F_1 . На этой стадии эмбриогенеза можно вымывать зиготы из фаллопиевых труб и изучать их хромосомы.

При приготовлении препаратов ооцитов из яичников можно наблюдать первые мейотические деления женской половой клетки. Регулируя время между копуляцией и умерщвлением животного, можно изучать или стадию ооцита, или стадию ранней зиготы. Культивирование ооцитов позволяет продлевать дробление на значительное число делений.

Имплантация зиготы в матку происходит на 9-й день беременности; в это время зигота находится на стадии бластоцисты. Несколькими днями позже становится возможным выявление имплантированных эмбрионов. Признаком, по которому выявляют места имплантации эмбрионов, погибших вскоре после имплантации, служат так называемые децидуомы.

Визуальному обнаружению поддаются некоторые эмбрионы, погибшие на более поздней стадии, а также здоровые

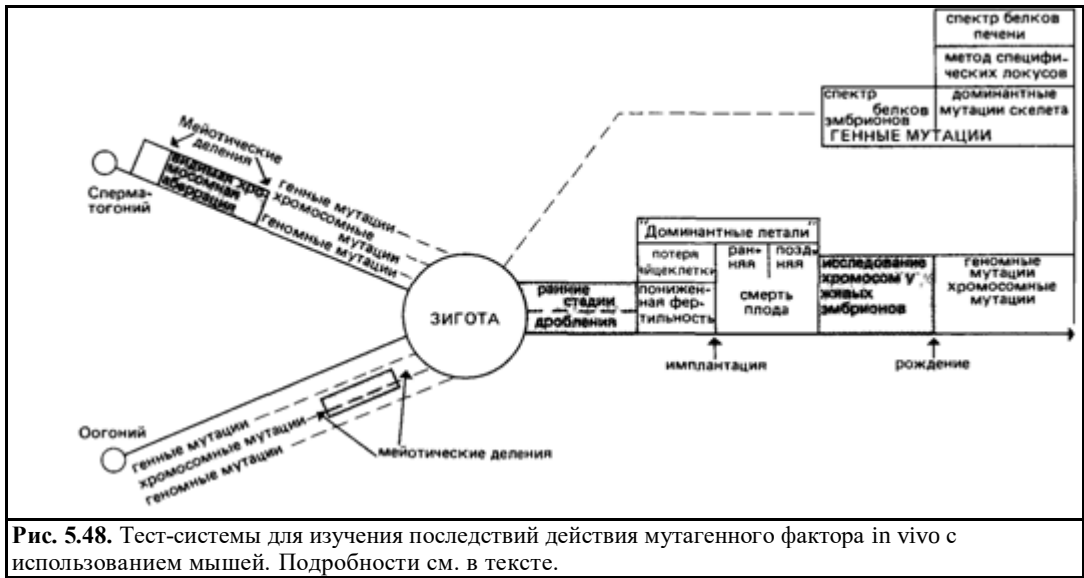


Рис. 5.48. Тест-системы для изучения последствий действия мутагенного фактора in vivo с использованием мышей. Подробности см. в тексте.

эмбрионы. Децидуомы вместе с эмбрионами, погибшими позднее, представляют собой следствие постимплантационных потерь зигот. Из различия между числом желтых тел в яичниках и общим числом имплантаций можно сделать вывод о существовании предимплантационных потерь. Предимплантационные и постимплантационные потери зигот обычно связывают, если не показано, что они обусловлены негенетическими факторами, с «доминантными деталями». Несмотря на существование более современных методик, метод доминантных деталей все еще остается стандартным при тестировании на мутагенность [1603]. Эмбрионы на поздней стадии развития могут проверяться на наличие у них хромосомных аномалий.

Все методы, применявшиеся при исследованиях животных, доживающих до этой стадии поздней беременности, - это методы цитогенетические. В настоящее время хромосомные и геномные мутации, индуцированные на ранних стадиях развития половых клеток, можно выявлять на всех этапах вплоть до формирования новорожденного животного. Идентификация митотических хромосом в соматических тканях после рождения животного не вызывает никаких затруднений.

Для выявления точковых мутаций необходимо дожидаться рождения животного. Существуют методы идентификации ряда доминантных и рецессивных мутаций при рождении. К доминантным принадлежат мутации, влияющие на скелет. Один из таких методов описан в разделе 3.6.2.5. Индуцированные мутации скелета обнаруживают неожиданно высокую степень неполной пенетрантности и варьирующую экспрессивность.

Метод множественных рецессивных мутаций. Метод выявления рецессивных мутаций был одним из первых, разработанных для исследований в области радиационной генетики. Он позволяет с большой точностью выявлять мутации в небольшом числе локусов. Многие из основных результатов в области радиационной генетики мыши получены с использованием этого метода. В этом случае самцов дикого типа скрещивают с самками тестерной линии, гомозиготной по семи аутосомно-рецессивным мутациям. Если индукции мутаций не произошло, все животные F_1 гетерозиготны и имеют нормальный (дикий) фенотип (рис. 5.49). Однако если в отцовской половой клетке индуцирована какая-либо из этих семи мутаций, животное F_1 будет гомозиготно по данной мутации и проявит соответствующий фенотип. Мутации для тестерной линии выбираются таким образом, чтобы



Рис. 5.49. Принцип метода множественных рецессивных мутаций. Самца дикого типа (*вверху слева*) облучают и скрещивают с самкой из тестерной линии (*вверху справа*). Если индукции мутаций не происходит, потомство будет гетерозиготным по тестерным локусам и, следовательно, будет иметь нормальный (дикий) фенотип (*внизу слева*). Если один из сперматозоидов в одном из семи локусов несет индуцированную мутацию, одно из животных потомков окажется гомозиготным по этому локусу и будет иметь мутантный фенотип.



Рис. 5.50. Мышь, имеющая мутантный фенотип по одному из семи тестируемых локусов (*пегость*), вместе со своим отцом дикого типа, матерью из гестерной линии (*белая*) и гетерозиготными сибсами дикого типа. (Courtesy of Dr. U. Ehling, Neuherberg.)

каждую гомозиготу можно было легко идентифицировать. В качестве примера на рис. 5.50 приводится фотография гомозиготы по одному из этих генов (гену пегости).

Оба метода, использовавшиеся для скрининга генных мутаций, - метод скелетных мутаций и метод множественных локусов - позволяют проводить анализ действия генов на уровне количественных фенотипических признаков (разд. 3.6). Следовательно результаты, важные для количественной оценки генетических эффектов у млекопитающих, не подходят для анализа механизмов индукции мутаций. Кроме того, они дают информацию только об ограниченном числе генных локусов. Однако один из результатов этой работы свидетельствует о том, что частоты мутаций, индуцированных в разных генах, могут обнаруживать значительные различия.

С появлением электрофоретических методов анализа белков, предпринималось большое число попыток применить их для тестирования на мутагенность. С теоретической точки зрения этот подход безупречен. С его помощью можно проводить идентификацию индуцированных мутаций на молекулярном уровне, причем в настоящее время имеются электрофоретические методики для очень многих локусов (разд. 6.1.2). Трудность, с которой встречается исследователь, применяя этот подход, на практике заключается в том, что он требует проведения большого числа соответствующих анализов. Наши, возможно

неточные, оценки частот кодонных мутаций дают величины порядка 10^{-8} – 10^{-9} на кодон или на аминокислотную замену (разд. 5.1.4.1). Даже если бы частота спонтанных мутаций, выявляемых электрофоретическими методами, на ген составляла 10^{-6} – 10^{-7} , для обнаружения очень небольшого числа мутантов потребовалось бы громадное количество тест-анализов. Эту проблему можно назвать ключевой

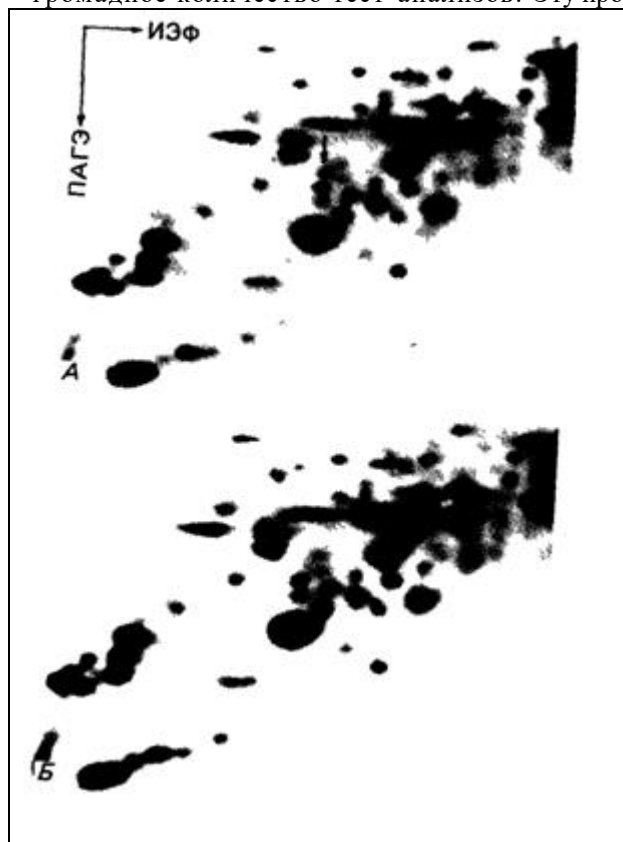


Рис. 5.51. Двумерное электрофоретическое разделение растворимых белков из печени плода мыши; часть белкового спектра. Электрофорузу подвергали пробу белков супернатанта после гомогенизации и центрифугирования индивидуальной печени. Разделение белков проводилось в полиакриламидном геле посредством изоэлектрического фокусирования (ИЭФ) в одном направлении и электрофореза (ПАГЭ) во втором. *А.* Часть белкового спектра печени плода после обработки самца мутагеном (метилнитрозомочевинной) Необычное белковое пятно отмечено стрелкой. *Б* Нормальный белковый спектр печени плода из той же самой инбредной линии мышей. (Courtesy of Dr J. Klose, Berlin.)

при создании методик скринирования человеческих популяций на увеличение частоты мутаций. Существует ли какой-нибудь способ преодоления этой трудности в экспериментах на животных, кроме приобретения громоздкого и дорогостоящего оборудования для проведения тест-анализов?

Перспективный метод для подобных экспериментальных исследований - двумерное разделение белков с электрофокусированием в одном направлении и электрофорезом в другом, к которому мы вернемся в разд. 6.1.2 [1516]. Высокостабильные спектры, состоящие из нескольких сотен белковых пятен, можно получить, используя экстракты печени инбредных мышей. Точковая мутация может приводить к легко обнаруживаемому сдвигу одного «пятна» (рис. 5.51). Насколько нам известно, при проведении радиационных экспериментов этот метод еще не применялся.

Тест-системы для соматических мутаций. Для выявления соматических мутаций используют анализ хромосом в культурах лимфоцитов или в костном мозге. Лимфоцитарная система довольно часто применяется в исследованиях на человеке. Это действительно единственная система, позволяющая изучать группы людей, подверженных высокому риску, при минимальных отрицательных последствиях от генетических эффектов, вызванных воздействием мутагенных факторов.

Еще более простая тест-система основана на анализе хромосом, облученных *in vitro*. При таком тестировании в большинстве случаев использовались культуры лимфоцитов человека. Именно на этой системе было показано, что общие правила индукции мутаций, сформулированные в экспериментальной генетике, применимы и к хромосомам человека (разд. 5.2.1.1). Для некоторых биохимических маркеров разработаны методы выявления точковых мутаций в отдельных клетках, культивируемых *in vitro* (разд. 5.1.5). Этот метод может быть использован для тестирования на мутагенность. С теоретической точки зрения он представляется очень изящным.

Его разрешающая способность на несколько порядков выше разрешающей способности методов обнаружения генных мутаций *in vivo*, так как в данном случае объектом (единицей) экспериментального изучения является не особь, а отдельная клетка. Кроме того, мутанты можно клонировать и подвергать всевозможным биохимическим исследованиям. Однако на практике этот метод пока встречается с определенными трудностями. Так, например, селективные системы созданы только для очень небольшого числа биохимических маркеров; некоторые варианты клетки могут возникать не в результате мутаций, а по каким-то иным причинам; экстраполяция же величин, полученных для очень искусственных условий эксперимента *in vitro* на ткани живого организма, всегда представляет трудную задачу.

5.2.1.3. Результаты изучения мутагенного действия радиации на млекопитающих [1377]

Основные эффекты, вызванные воздействием радиации на половые клетки млекопитающих. Развитие половых клеток у людей обоего пола описано в разд. 5.1.3. В принципе оно сходно с таковым у всех млекопитающих; небольшие межвидовые различия имеют важное значение для планирования экспериментов по изучению мутагенеза, но здесь рассматриваться не будут. У мышей наблюдались следующие основные эффекты воздействия радиации на развитие половых клеток.

Острое облучение мужских половых клеток 2-4 Гр убивает большинство сперматогониев, в то время как более зрелые половые клетки (сперматоциты и клетки, находящиеся на всех постмейотических стадиях) выживают. Следовательно, в течение первых шести недель после облучения происходит небольшое понижение фертильности. На протяжении этого периода все половые клетки, уже достигшие стадии сперматоцита, превратятся в зрелые сперматозоиды. За ним следует период бесплодия продолжительностью 2—3 месяца в зависимости от дозы радиации. По прошествии этого периода плодовитость восстанавливается. При этом семенные каналы снова заполняются клетками, популяция которых берет начало от очень небольшого количества сперматогониев А.

Самки даже при низких дозах облучения после короткого лаг-периода становятся навсегда стерильными. При облучении рентгеновскими лучами дозой 5 Гр самки мышей приносят до наступления бесплодия, обусловленного разрушением ооцитов, тричетыре помета. При приближении к овуляции ооциты становятся более устойчивыми, и непосредственно перед овуляцией частота их гибели не отличается от контрольной. Высокая чувствительность ооцитов затрудняет проведение экспериментов по мутагенезу. Эти различия в радиационной чувствительности половых клеток у особей разного пола и на разных стадиях развития следует иметь в виду при рассмотрении результатов экспериментов, посвященных изучению мутагенности такого фактора, как радиация.

Хромосомные мутации в мужских и женских половых клетках мышей [1454]. При просмотре митотических пластинок сперматогониев после острого облучения обнаруживается высокая частота хромосомных aberrаций (разрывов, фигур воссоединения, дицентрических хромосом). Такие aberrации можно выявить, изучая первые деления мейоза.

Имеются аналогичные экспериментальные данные, полученные на мужчинах [1401]

¹⁾ Материал для исследования был взят путем биопсии семенников у девяти мужчин-добровольцев, половые железы которых были облучены высокими дозами рентгеновских лучей (0,78, 2 и 6 Гр). Интервал между облучением и взятием проб изменялся в зависимости от дозы. Для сравнения проводилось облучение сходными дозами и при сопоставимых условиях самцов животных различных других видов (табл. 5.25). Дозы, применявшиеся в этих исследованиях, варьировали от 100 до 600 рад. Наибольшее увеличение выхода реципрокных транслокаций с увеличением дозы радиации было у мармозеток, а второе по величине — у

¹⁾ Использование людей для таких экспериментов нам кажется совершенно недопустимым. Исследователи утверждали, что они работали только с теми заключенными-добровольцами, которые не планировали в будущем иметь детей. Однако такие планы могут измениться, и, кроме того, существует возможный риск канцерогенного эффекта этой процедуры.

Таблица 5.25. Сравнение коэффициентов линейной регрессии «b», вычисленных для различных видов млекопитающих при индукции реципрокных транслокаций в сперматогониях	
Животное	$b \cdot 10^{-4} \pm \sigma/10^{-4}$
Макак-резус	$0,86 \pm 0,04$
Мышь (разные линии)	между
	$1,29 \pm 0,02$
	и $2,90 \pm 0,34$
Кролик	$1,48 \pm 0,13$
Морская свинка	$0,91 \pm 0,18$
Мармозетка	$7,44 \pm 0,95$
Человек	$3,40 \pm 0,72$
Коэффициенты линейной регрессии (b) для всех видов вычисляли с использованием данных, полученных рядом авторов при дозах, дающих наибольший выход транслокаций	

людей. В различных работах, выполненных на мышах, а также на кроликах, эффект составлял около половины того, который был обнаружен у людей; в экспериментах на морских свинках и макаках-резусах получены еще более низкие величины. С другой стороны, недавний анализ таких данных привел к до некоторой степени удивительному результату, состоящему в том, что ионизирующая радиация (почти?) не индуцирует робертсоновские транслокации [1453].

Реципрокные транслокации могут быть индуцированы и при облучении самок мышей; в этом случае частота мутаций варьирует в зависимости от условий эксперимента (например, в зависимости от интервала времени между облучением и овуляцией).

Прямое доказательство возникновения индуцированных хромосомных aberrаций. Против половых клеток и зигот, содержащих хромосомные aberrации, действует сильный отбор. Так, например, после облучения самок мышей довольно высокими дозами радиации число транслокаций, обнаруженных у потомства F_1 оказалось очень небольшим. После облучения такой высокой дозой, как 3 Гр, у 1735 потомков (самок и самцов) было найдено всего восемь транслокаций: около половины того числа, которое появилось после облучения самцов [1377]. Проведено детальное изучение этого отбора в разные периоды развития эмбрионов путем прямого анализа хромосом на ранних эмбриональных стадиях после облучения самок мышей [1597a]. Уменьшение числа зигот с хромосомными aberrациями после обработки ооцитов в течение преовуляторной фазы изучалось на четырех стадиях: второго мейотического деления; бластоцисты; гибели во время эмбрионального периода, обнаруживаемой с помощью теста на доминантные летали; у выживших эмбрионов доля хромосомных aberrаций определялась на поздней стадии эмбрионального развития. Около 88% всех мейотических (II) клеток содержали числовые или структурные хромосомные aberrации. К поздней стадии эмбрионального развития все клетки, в которых были обнаружены хромосомные aberrации, элиминировались. В итоге число эмбрионов, несущих aberrацию, оказалось не выше, чем в контроле. Согласно оценке, приведенной в отчете UNSCEAR за 1977 г., до рождения доживает 6% всех плодов с индуцированными хромосомными aberrациями. В упомянутом выше исследовании показано, что это очень приблизительная оценка; на самом деле доля выживающих плодов, вероятно, ниже. То же самое справедливо в случае мутаций, индуцированных сильным химическим мутагеном - цитостатическим медикаментом тренимоном [1386a]. Как уже отмечалось, у людей громадное большинство эмбрионов с хромосомными aberrациями также элиминируется до рождения (разд. 2.2.4). Резонно предположить, что такая ситуация характерна для преобладающего большинства индуцированных aberrаций.

Радиационная индукция геномных и хромосомных мутаций, чувствительность определенных клеточных стадий. Используя X-сцепленные генетические маркеры мыши, можно различать животных с генотипом XO и XX и выяснять, какое происхождение имеют X-хромосомы особей XO - отцовское или материнское. С помощью этого метода было показано, что частота спонтанного возникновения животных с гено-

типом ХО колеблется от 0,1% до 1,7% в зависимости от линии, на которой проводится исследование. Обычно одиночная Х-хромосома имеет материнское происхождение. Отцовская хромосома, очевидно, теряется за то время, которое проходит между оплодотворением и первым делением дробления [1609; 1612; 213].

В течение этого, довольно длительного периода - около 4,5 часов - отцовский и материнский геномы не сливаются друг с другом (разд. 2.1.24); они образуют «пронуклеусы». Именно в это время может произойти утрата отцовской Х-хромосомы. Риск утраты может повышаться при воздействии радиации, особенно если животное облучают в период между оплодотворением и первым делением дробления, т.е. на стадии пронуклеуса. Облучение на этом этапе приводит к появлению животных ХО и не дает генотипов ХХУ. Следовательно, причиной хромосомного дефекта в данном случае является именно утрата Х-хромосомы, а не нерасхождение хромосом.

Нерасхождение, по-видимому, усиливается при облучении сперматозоидов самцов, главным образом на стадии прелептотены, что было показано при изучении метафаз 2-го деления. Результаты, полученные при облучении ооцитов, пока носят дискуссионный характер.

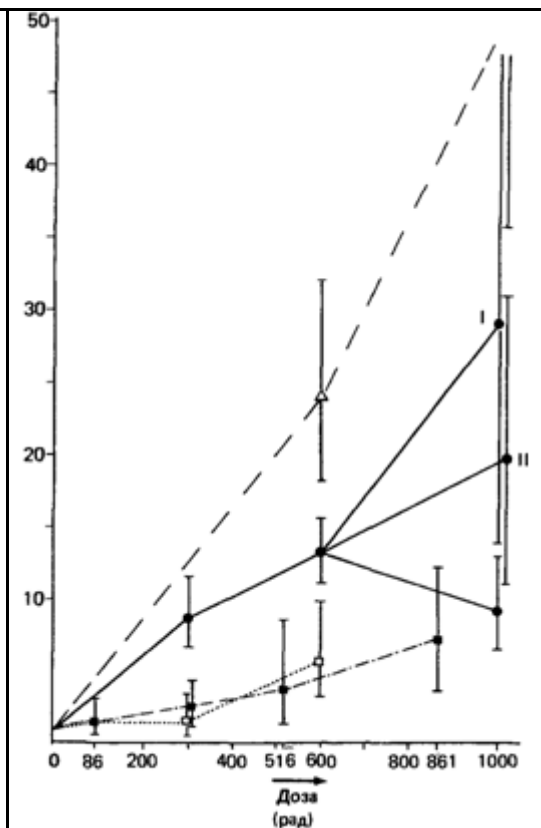
Потеря Х-хромосомы через короткое время после оплодотворения - в течение первых делений дробления - часто происходит также и у людей. По-видимому, именно она служит наиболее частой причиной образования зигот ХО. С использованием маркеров (групп крови Хg) показано, что в большинстве случаев утрачивается Х-хромосома, полученная от отца. Таким образом, феномен утраты Х-хромосомы характерен и для человека, и для мыши. Поэтому можно с уверенностью заключить, что хромосомы в преовуляторном ооците и очень ранней зиготе человека могут теряться, могут индуцироваться нерасхождения и структурные повреждения.

Радиационная индукция генных мутаций в мужском зародышевом пути. Методы исследования хромосом не входили в арсенал радиационной генетики млекопитающих в наиболее плодотворный для нее период 1950-х гг. В то время большинство исследователей было занято изучением индукции генных мутаций. Наиболее широко использовался для этого многолокусный тест на визуально обнаружимые рецессивные мутации. Число тестируемых животных исчислялось несколькими миллионами. Полученные в тот период данные свидетельствовали о заметном превышении уровня индуцированного мутагенеза над уровнем спонтанного мутагенеза у особей обоих полов. Согласно полученным оценкам, частота мутаций у самцов составила около 30×10^{-8} , а у самок - $18,5 \times 10^{-8}$ на рентген и на локус. Частота индуцированных мутаций в значительной степени зависит от условий облучения. Каковы же эти условия?

Эффект мощности дозы. В противоположность упомянутым выше данным по дрозофиле доза, полученная однократно (высокая мощность дозы), дает гораздо более сильный эффект, чем та же доза, распределенная в интервале времени (низкая мощность дозы) [1611]. На рис. 5.52 приводятся кривые дозового эффекта, построенные по результатам серии экспериментов, проведенных на самцах мышей, с использованием высоких и низких мощностей дозы. Эффект мощности дозы очевиден из сравнения двух верхних кривых (острое облучение рентгеновскими лучами) с двумя нижними, которые иллюстрируют результаты хронического γ -облучения при крайне низких мощностях дозы. Несмотря на громадное число исследованных животных, 90%-ный доверительный интервал для всех мутационных частот оказался довольно широким. Облучение с высокой мощностью индуцировало примерно в три раза больше мутаций, чем облучение той же дозой при низкой мощности.

Такой эффект мощности дозы был продемонстрирован также и на половых клетках самок; он объясняется особенностями процессов репарации, протекающей более

Рис. 5.52. Кривые доза-эффект и эффект мощности дозы после облучения самцов мышей во время постстерильной фазы (облучение сперматогониев). Подсчитывалось число наблюдаемых мутантов на 100000 генных локусов. Для всех экспериментальных точек показаны границы 90%-ного доверительного интервала. Три разные точки для 10 Гр отражают результаты облучения единовременной острой дозой (нижняя точка) и двух опытов с использованием фракционированных доз. $\triangle$ --- $\triangle$ две дозы, применявшиеся с интервалом в 24 ч. $\blacksquare$ - - - $\blacksquare$ хроническое γ -облучение (0,9 мГр/мин). $\square$... $\square$ хроническое γ -облучение (0,1 мГр/мин) [1609].



эффективно, когда повреждающий фактор действует в течение более продолжительного периода времени. Эффект уменьшения в случае единовременного облучения дозой 10 Гр обусловлен предшествующей элиминацией сильно поврежденных клеток. Такие парадоксальные зависимости эффекта от дозы нередко описываются в работах по механизму мутагенеза; мутагенный фактор может повреждать клетку на двух уровнях. Он может оказывать вредное воздействие, нарушая последующие клеточные деления, а может оставить клетку неповрежденной, затронув только генетический материал. Анализируя мутагенную активность на фенотипическом уровне, мы рассматриваем только повреждение генетического материала, неявно предполагая, что выживаемость клетки остается неизменной. Если относительно низкая доза оказывает только мутагенный эффект, а более высокая доза отрицательно сказывается на выживаемости клеток, то в результате мы можем получить парадоксальную зависимость эффекта от дозы.

Другой фактор, влияющий на частоту мутаций - стадия развития половых клеток, на которой происходит облучение. У самок мышей, например, облучение, произведенное более чем за 7 недель до спаривания, не вызывало какого-либо увеличения частоты мутаций. У самцов облучение достаточно зрелых клеток (сперматоцитов) приводило к повышению частоты мутаций.

Ионизирующая радиация индуцирует главным образом структурные повреждения хромосом и лишь относительно небольшое число точковых мутаций [1607; 1608]. Более основательное изучение множества индуцированных мутаций, произошедших в семи локусах

мыши, показало, что эти мутации также чаще всего обусловлены хромосомными абберациями. Большинство из них представляло собой небольшие делеции.

Помимо рецессивных мутаций, изучались также доминантные мутации, особенно те, которые влияют на скелет или приводят к катарактам хрусталика [212; 1377]. Крайне изменчивая экспрессивность и неполная пенетрантность таких мутантов обсуждались в разд. 3.6.2.5.

Удваивающая доза. При обсуждении проблемы генетического риска, связанного с радиацией, для человека часто рассматривают так называемые удваивающие дозы [1537]. Представление об удвоенной частоте мутаций совершенно произвольно. Оно было выбрано в качестве удобного ориентира при подборе такой дозы радиации, которая при облучении ею человеческой популяции удвоила бы естественную частоту мутаций. *В свете упомянутых выше дискуссий очевидно, что никакой единственной удваивающей дозы быть не может.* Удваивающая доза будет изменяться с изменением типа мутации, стадии развития половой клетки, на которой проводилось облучение, специфического типа радиации и мощности дозы. Поэтому использование единственной удваивающей дозы для всех типов воздействия облучения на человека лишено смысла. Еще более бессмысленны удваивающие дозы для специфических ситуаций, например удваивающая доза острого облучения или удваивающая доза хронического облучения. Согласно данным, полученным в экспериментах на мышах, удваивающая доза равна 18-52 рэмам в случае острого облучения и ≈ 100 рэмам в случае хронического облучения. Резонно предположить, что удваивающие дозы для людей имеют приблизительно такой же порядок величины, хотя существуют данные, свидетельствующие о большей радиоустойчивости человека (см. разд. 5.2.1.5).

Популяционные эксперименты на мышах и других млекопитающих. Обсуждавшиеся экспериментальные результаты имеют отношение только к первому из пяти вопросов, поставленных в разд. 5.2.1.2: каким образом радиация воздействует на генетический материал? Однако некоторые опыты на животных спланированы с учетом четвертого вопроса: каковы отдаленные последствия увеличения частоты мутаций, вызванные облучением, для популяции?

Некоторые эксперименты с длительным облучением искусственных популяций животных продолжались в течение многих поколений. Дозы радиации имели величину порядка нескольких сот рентгенов на поколение; некоторые дозы применялись при высоких мощностях дозы, а другие - при низких. Общий эффект оказался удивительно слабым: величина помета обычно уменьшалась, число имплантаций мертвых зигот (доминантных деталей) увеличивалось. (В некоторых опытах увеличивалось число бесплодных животных.) Потомство, полученное после продолжавшегося в течение многих поколений облучения предков, по продолжительности жизни в отдельных случаях даже превосходило необлученный контроль [213].

В одном эксперименте с крысами [1579; 1580] изучали поведенческий признак — обучаемость при поиске выхода из лабиринта. Потомки облученных родителей в среднем проявили несколько меньшие «способности», чем контрольные животные.

Результаты этих популяционных экспериментов могут получить оптимистическую и пессимистическую интерпретацию. Оптимист может заключить, что даже длительное облучение очень высокими дозами не вызывает большого числа генетических повреждений. Почти все индуцированные мутации элиминируются во время мейоза или приводят к смерти зигот и эмбрионов на ранних стадиях развития. Однако такие эффекты не должны иметь очень большого значения для популяций человека. Пессимист может возражать против экстраполяции данных, полученных на животных, приносящих более одного детеныша в помете, на людей. Он может доказывать, что случаи смерти эмбрионов и новорожденных, зафиксированные в этих экспериментах, свидетельствуют о том, что облучение человеческих популяций приве-

дет к высокой частоте мертворождений и ранней гибели уродливых детей. В общем такие эксперименты на животных могут быть подвергнуты критике как не позволяющие осуществить корректную экстраполяцию на человека.

Большинство из этих долговременных популяционных исследований на мышах проводилось в конце 1950-х и начале 1960-х гг. Вероятно, очень немногие, если вообще какие-либо работы этого типа заслуживают продолжения, так как их полезность для объяснения ситуации в популяции человека, по-видимому, очень невелика.

Одно исследование было проведено на популяции грызунов, подвергающихся высокому уровню естественного облучения на территории штата Керала в Южной Индии. В среднем, доза γ -облучения составляла 16 мГр в год. Это в 7,5 раза выше уровня радиации на местности, использовавшейся в качестве контроля. Никаких отличий по частоте скелетных аномалий от животных, обитающих в других районах, не обнаружено.

Выводы относительно генетической опасности облучения для человека, вытекающие из результатов, полученных при изучении радиационной генетики мыши. В разд. 5.2.1.2 было сформулировано несколько вопросов, ответить на которые могут помочь радиационно-генетические исследования.

1. Какого типа мутации индуцируются радиацией? Ионизирующая радиация, по-видимому, главным образом индуцирует хромосомные мутации. Имеются также надежные доказательства индукции геномных мутаций, особенно анеуплоидий. Многие из индуцированных мутаций затрагивают только один функциональный ген; пока еще не установлено, сколько из них могут считаться генными мутациями в строгом смысле. Результаты всех этих исследований, вероятно, можно экстраполировать на человека.
2. Где преимущественно индуцируются мутации - в половых клетках или в соматических? Имеются надежные доказательства, что мутации индуцируются во всех облучаемых клетках - и в половых, и в соматических. Можно предполагать, что ответы на эти два вопроса справедливы также и в отношении человека.
3. На какой стадии развития половых клеток происходит первичное поражение? У самцов поражение может происходить на всех стадиях развития половых клеток, однако мейоз действует как эффективный фильтр, особенно для хромосомных aberrаций. На постмейотических стадиях, до и включая стадию оплодотворения, риск поражения, по-видимому, выше, чем для премейотических половых клеток. Экстраполяция этого результата на человека тоже представляется вполне обоснованной. У самок мышей ооциты под действием радиации могут мутировать и потерять хромосомы только в том случае, если облучение производилось в течение последних 7 недель перед овуляцией. Ооциты, находящиеся на стадии диктиотены и не претерпевающие на протяжении многих лет клеточных делений, устойчивы к индукции мутаций. Этот результат, полученный в многолокусных экспериментах на мышах, в значительной степени подтверждается цитогенетическими данными. Оптимист сделал бы вывод, что человеческие ооциты также устойчивы к радиации на протяжении большей части их жизни. Пессимист, с другой стороны, указал бы на возможные видоспецифические отличия. Мы склоняемся к точке зрения оптимиста. Ооциты в интервале от нескольких дней перед овуляцией и до нескольких часов после оплодотворения особенно подвержены риску потери хромосом (главным образом X-хромосом), индукции структурных aberrаций и, возможно, нерасхождений в мейозе. Очевидной контрмерой может служить надежная противорадиационная защита в течение нескольких недель до и после зачатия. Можно ли считать, что оогонии тоже восприимчивы к радиационной индукции мутаций? Исследования показали, что оогонии млекопитающих чувствительны к радиации только в период эмбрионального раз-

вития; поэтому для получения эффекта следует облучать беременных самок, а потом проводить скрещивания с их дочерьми. Данные, имеющиеся на сегодняшний день, свидетельствуют о том, что в оогониях транслокации индуцируются с частотой, вдвое меньшей, чем в сперматогониях. Тем не менее, прежде чем делать выводы, есть смысл подождать появления новых результатов, так как в экспериментах с химическим мутагеном (алкилирующим соединением тренимоном) обнаружена высокая чувствительность оогониев.

3В. Передаются ли индуцированные мутации следующему поколению или же они подвергаются элиминации? Имеющаяся по этому вопросу информация касается главным образом хромосомных aberrаций. В данном случае мейотическое деление действует как хороший фильтр. Однако многие aberrации проходят через этот фильтр, а другие индуцируются во время и после мейоза у самок. По крайней мере 90% индуцированных aberrаций элиминируются в течение эмбрионального развития: более половины из них еще до имплантации в матку, а большинство остальных в короткий период времени после имплантации. Меньшинство, 5% или меньше, выживают, давая потомство с транслокациями или превращаясь в анеуплоидов. Ввиду высокой частоты хромосомных аномалий у спонтанных абортусов человека (разд. 2.2.4) представляется весьма вероятным, что большинство индуцированных хромосомных aberrаций у людей должно элиминироваться таким же образом. Точнее, результаты экспериментов свидетельствуют о том, что у человека потеря зигот до имплантации может быть по крайней мере такой же высокой, как и после имплантации. Значительное число индивидов с aberrациями должно выживать, увеличивая число детей с анеуплоидиями и сбалансированными или несбалансированными хромосомными aberrациями.

3В. Какие фенотипические изменения можно ожидать у потомков? Потеря зиготы до имплантации в матку, вероятно, должна проходить большей частью незамеченной, приводя только к небольшой задержке менструации. Потеря зигот после имплантации должна проявляться главным образом в виде спонтанных абортусов, причем доли ранних и поздних выкидышей, возможно, близки к соответствующим долям в отсутствие облучения. Анеуплоидии и несбалансированные структурные аномалии должны приводить к возникновению хорошо известных хромосомных синдромов. Фенотипически сбалансированные транслокации у потомства облученных родителей, как правило, не проявляются, однако они должны обуславливать появление несбалансированных зигот в последующих поколениях.

Доминантные генные мутации могут приводить к определенному увеличению частоты хорошо известных доминантных фенотипов. Частота таких признаков в человеческой популяции поддерживается за счет равновесия между мутациями и отбором (разд. 5.1.3.1). Однако данные о скелетных мутантах мыши свидетельствуют, что другие (возможно, встречающиеся гораздо чаще) доминантные мутации могут приводить к менее выраженным и более вариабельным фенотипическим изменениям, таким как небольшие аномалии скелета, соединительной ткани или иных систем органов. При этом наши экстраполяции оказываются гораздо более сомнительными, чем в случае визуально обнаружимых хромосомных аномалий.

4. Если мутации индуцируются в соматических клетках, то какие клетки особенно подвержены воздействию облучения и каковы последствия возникновения мутаций для индивида? В принципе риск мутирования существует для соматических клеток всех типов. Однако особенно высок он для клеток, которые делятся. Эти клетки могут давать начало клонам, имеющим се-

лективное преимущество по сравнению с другими клетками того же типа и в конечном итоге злокачественным новообразованием. Такие новообразования, вызванные облучением, действительно обнаружены в популяциях человека (см. ниже).

Достижения радиационной генетики мыши полезны для получения оценки риска, которому подвергаются облучаемые люди. Результаты, полученные на мышах, помогли нам составить представление об индукции и передаче геномных и хромосомных мутаций. Что касается генных мутаций, то данные о них не столь основательны, однако в принципе, нам известно, что такие мутации индуцируются радиацией и передаются потомству.

Влияние пренатального и постнатального мутационного повреждения на человека. Рассматривая влияние мутаций на человеческие популяции, важно проводить различие между пренатальным и постнатальным эффектами. Присутствие мутагенных факторов, приводящих к ранним выкидышам, может даже остаться незамеченным, поскольку проявится только в слабой задержке менструального периода. Их влияние равно нулю. Выкидыши в течение первого триместра, конечно, будут замечены, но окажут относительно слабое влияние. Преждевременные роды во время последнего триместра беременности редки, а мертворождения, хотя и приносят семье горе, однако меньшее, чем различные наследственные болезни у ребенка. Точно так же генетические дефекты, которые сопряжены с относительно ранней смертностью, вызывают меньше моральных, социальных, медицинских и семейных проблем, чем болезни, связанные с длительными страданиями пациента и его семьи. Известно, что большинство мутагенных факторов оказывает также канцерогенное действие, т. е. вызывает образование опухолей.

5.2.1.4. Облучение популяции человека ионизирующей радиацией

Насколько сильно облучается современная человеческая популяция ионизирующей радиацией? Это второй вопрос, на который должен ответить ученый, желающий оценить величину потенциального вреда, причиняемого людям радиацией. Здесь будут обсуждаться лишь очень немногие его аспекты и небольшая часть соответствующих данных. Вначале мы расскажем о естественном фоне радиации, а затем о его увеличении, вызванном факторами современной цивилизации, включая облучение, применяемое в целях медицинской диагностики.

Естественный фон радиации. Все люди испытывают постоянное воздействие естественных источников облучения. Средняя доза, получаемая в течение года за счет космической радиации, зависит от высоты над уровнем моря и географической широты. Земная радиация в районах с выходами первичных пород выше, чем на аллювиальных почвах. Общее среднее облучение, полученное гонадами людей, проживающих в районах, низко расположенных над уровнем моря, за 30-летний период (время одного поколения) оценивается величинами от 3 до 4 рэм (табл. 5.26). Оценки последнего времени оказались несколько выше; в старых работах не учитывали дополнительную радиационную нагрузку, обусловленную радоном, содержащимся в воздухе.

Дополнительное облучение, связанное с факторами, введенными современной цивилизацией. Некоторые оценки облучения для Западной Германии и Соединенных Штатов приведены в табл. 5.26. Основной вклад вносит медицинская диагностика и терапия. Из большой группы рентгенодиагностических процедур главным источником радиационной опасности служит обследование брюшной полости и таза. Усовершенствование методики рентгеновских обследований, а также введение строгих правил их проведения намного уменьшили эту опасность. Однако некоторые диагностические процедуры повышают вероятность возникновения мутаций; всякое облучение должно быть обосновано и проводиться с обеспечением максимальной защиты. Польза такого облучения для индивида должна быть

242 5. Мутации

Таблица 5.26. Средняя радиационная нагрузка на человеческие популяции [1385] '				
Источники	Европа		США	
	мрэм/год	$\frac{1}{100}$ Дж/кг/30 лет	$\frac{1}{100}$ мДж/кг/год	$\frac{1}{100}$ Дж/кг/30 лет
Естественный фон радиации				
Космическое излучение	(30) – 50(–120)			
Средняя земная радиация	60			
Поглощение радиоактивных элементов	20			
	≈130	≈3,9	≈100	≈3,06
Дополнительная радиация, обусловленная факторами современной цивилизации				
Медицинская диагностика и терапия				
1958	20	0,6	73	2,2
1971	50	1,5		
Профессиональная деятельность (без предприятий, использующих ядерную технологию)	<1	<0,03	0,8	0,024
Ядерная технология	<1	<0,03	0,003	0,0001
Выбросы (испытания атомных бомб)	8	0,24		
Слабые источники (телевизоры; часы)	<2	<0,06	2	0,06
Воздушный транспорт	<1	<0,03	0,4	0,120
Суммарная величина дополнительного облучения	≈60	≈1,8	≈80	≈2,4
Суммарная величина естественного фона и дополнительного облучения	190	5,7	180	5,4
¹⁾ Приведенные цифры не включают радиацию, полученную общей популяцией в результате работы атомных электростанций В условиях нормального функционирования облучение общей популяции является минимальным Рабочие, занятые в атомной энергетике, получают дозу, равную 0,006-0,008 Дж/кг/год.				

очевидной и требует сопоставления с потенциальным вредом, грозящим этому человеку и будущим поколениям. Наибольшие дозы генетически эффективного облучения получают больные раком, нуждающиеся в радиационной терапии органов таза (эти дозы значительно выше применяемых при лечении других пациентов). Многие такие больные через короткое время вступят в пострепродуктивный возраст или умрут от своей болезни. Однако, если они все же хотят иметь детей, результаты радиационно-генетических исследований на млекопитающих могут помочь минимизировать генетический риск. Таким людям следует избегать зачатия во время и в течение нескольких недель после лечения. Атомные электростанции представляют особую проблему, активно обсуждаемую во всех индустриальных странах. Фактическая величина облучения варьирует в зависимости от типа реактора и других

условий и, как говорят, в большинстве случаев намного ниже допустимого предела. Однако это утверждение справедливо только при отсутствии непредусмотренных выбросов в результате технической ошибки, аварий или саботажа. Вероятность такого инцидента не поддается оценке, однако высказывается мнение, что она должна быть очень низкой. С другой стороны, специалисты утверждают, что энергетические потребности не могут быть удовлетворены без атомной энергии и что благосостояние и даже сама жизнь будущих поколений зависят от обеспеченности энергией. Генетики могут только надеяться, что рано или поздно ученые приложат большие усилия для разработки альтернативных технологий получения экологически чистой энергии.

Из всех источников, вносящих вклад в облучение людей, наиболее существенный - медицина. Ее доля в дополнительной радиационной нагрузке самая большая. В некоторых случаях облучение неизбежно. Например, медицинские сестры, осуществляющие терапевтические процедуры с использованием радиевой установки, непременно получают определенную дозу облучения. Однако во многих случаях радиационная нагрузка может поддерживаться на минимальном уровне. В тех видах деятельности, где нельзя избежать сильного облучения, следует брать на работу только тех, кто вышел из детородного возраста, или тех, кто по каким-то иным причинам скорее всего не будет иметь детей. Вопрос о том, столкнемся ли мы с увеличением воздействия радиации в будущем, остается открытым. С одной стороны, наблюдается бесспорное увеличение облучения, связанное с широким использованием радиации и радиоактивных веществ и с распространением атомных электростанций. С другой стороны, соответствующие методики так сильно усовершенствовались, особенно в медицине, что можно ожидать определенного снижения уровня облучения. Как видно из табл. 5.26, средний уровень радиации от всех источников, имеющихся в современной цивилизации, за исключением атомных электростанций, по существу не достиг естественного фона.

5.2.1.5. Насколько может увеличиться частота возникновения спонтанных мутаций⁹

Как рассчитать возможность увеличения частоты спонтанных мутаций? Это третий вопрос, на который надо ответить, если мы хотим получить оценку возможного генетического повреждения, вызванного радиацией. Для этого нужна информация по трем вопросам.

1. Какую дозу облучения получит средний индивид?

2. Сколько будет индуцировано дополнительных мутаций на единицу дозы?

Ответив на эти два вопроса, мы узнаем, насколько увеличится частота мутаций по отношению к частоте их спонтанного возникновения. Для перевода этой относительной оценки в абсолютную надо ответить на другой вопрос.

3. Сколько мутаций должно возникать «спонтанно», т. е. без дополнительного облучения, обусловленного факторами современной цивилизации?

Ответ на первые два вопроса может быть получен из разд. 5.2.1.3 и 5.2.1.4, а также материалов некоторых дополнительных, прямых обследований людей. Третий вопрос оказывается самым трудным и потребует специального обсуждения. Данные, приведенные в табл. 5.26, показывают, что среднее облучение индивида за время одного поколения, равное 30 годам, увеличится от 0,03-0,04 Гр («естественное» облучение) до 0,07 Гр, т. е. факторы современной цивилизации приблизительно вдвое повысят фоновую радиацию. Такое удвоение ни в коем случае не надо путать с дозой облучения, удваивающей частоту мутаций. Эта доза гораздо выше 0,03 Гр. Таков ответ на первый вопрос. Ответ на второй вопрос несколько сложнее и требует более развернутого обсуждения.

Сколько будет индуцировано дополнительных мутаций в расчете на дозу? Мутации разных классов следует рассматривать по отдельности, принимая во внимание мощность дозы и пол индивида (разд. 5.2.1.3). Большинство людей испытывают воздей-

ствие очень низких доз хронического облучения при весьма низких дозовых мощностях; только очень немногие подвергаются воздействию высоких доз при очень высоких дозовых мощностях.

Сначала мы обсудим имеющиеся в нашем распоряжении прямые данные об облученных популяциях человека, а потом сравним эти данные с материалами, полученными в обсуждавшихся выше экспериментах на мышах и других млекопитающих. Такой подход позволит нам количественно оценить частоту возникновения различных типов мутаций, выраженную в долях от частоты спонтанного мутирования.

Фенотипические характеристики облученных популяций человека. Кроме сомнительных с этической точки зрения экспериментов на добровольцах, прямая оценка генетических эффектов радиации может быть получена только при облучении людей либо с терапевтическими целями, либо в результате аварии. В случае лечебных процедур оценки доз, как правило, довольно точны, однако число облучаемых индивидов невелико и отбираются они в результате обнаружения у них различных заболеваний. При терапевтическом воздействии радиация обычно применяется в виде нескольких очень высоких доз, а профессиональное облучение характеризуется низкими дозовыми мощностями. В случае аварий оценка дозы может быть очень неточной, однако дозы и дозовые мощности, как правило, высоки.

Оставшиеся в живых жертвы атомной бомбардировки Хиросимы и Нагасаки [1639; 1640; 1573; 1576]. После взрывов атомных бомб в Хиросиме и Нагасаки американские и японские ученые под эгидой Комиссии по изучению последствий атомной бомбардировки (КПАБ; англ. ABCC-Atomic Bomb Casualty Commission) еще в 1946 г. организовали продолжающееся с тех пор генетическое обследование уцелевших жителей, которое с 1975 г. проводится под покровительством Фонда по исследованию радиационных эффектов (ФИРЭ; англ. RERF-Radiation Effects Research Foundation). Это единственная попытка организации в рамках «большой науки» долговременного проекта по генетике человека.

1. Есть ли какие-нибудь различия между детьми, зачатыми после облучения родителей в результате взрыва атомной бомбы, и детьми необлученных родителей?

2. Если такие различия существуют, то чем они объясняются?

Сбор данных облегчался существованием в послевоенной Японии системы нормирования пищевых продуктов, при которой беременных женщин обеспечивали дополнительным питанием. Когда женщины обращались с просьбами о добавочном пайке, им давали заполнить анкету с вопросами об их прошлых беременностях, точном местонахождении в момент взрыва бомбы и любых симптомах, которые могли бы свидетельствовать о радиационной болезни. Когда рождался ребенок, в анкету вписывали соответствующие данные о родах и состоянии здоровья новорожденного; каждый ребенок обследовался врачом из комиссии КПАБ. Около одной трети этих детей через 9 месяцев проходили повторный осмотр. В последующие годы методы обследования и регистрации изменились. Стали фиксироваться следующие параметры:

- а) соотношение полов при рождении;
- б) врожденные пороки развития;
- в) мертворождения;
- г) вес тела при рождении;
- д) смертность в первые 9 месяцев жизни и смертность в детские и юношеские годы;
- е) антропометрические характеристики;
- ж) результаты аутопсии.

Критически настроенный читатель может спросить, почему не учитывались самые важные показатели генетического повреждения-хромосомные aberrации в соматических и половых клетках и доминантные или сцепленные с X-хромосомой рецессивные мутации *de novo*. Ответ прост: методы анализа хромосом человека появились только через 10-15 лет, а доминантные или сцепленные с X-хромосомой генные мутации так редки, что нельзя ожи-

дать наличия их достаточного числа в изучаемой популяции.

Каждый родитель был отнесен к одной из пяти групп в соответствии с полученной дозой облучения: группа, получившая самую низкую дозу, состояла из людей, отсутствовавших в городе во время бомбардировки; группа, подвергшаяся наибольшему облучению, включала лиц, страдавших в последующие месяцы от симптомов лучевой болезни (потери волос; петехии; гингивита). Учитывалось кровное родство родителей и возраст матерей для того, чтобы избежать смещений, обусловленных этими факторами.

Сдвиг соотношения полов обусловлен Хсцепленными летальными мутациями? Результаты этих исследований можно суммировать очень кратко. Независимо от степени воздействия излучения не было найдено никаких различий по числу пороков развития, частоте мертворождений или по какому-либо другому из изучавшихся параметров, за исключением одного лишь соотношения полов. Если материнская половая клетка содержит Х-сцепленный рецессивный летальный ген, он перейдет незамеченным к ее гетерозиготной дочери. Однако мужская зигота будет гемизиготной и элиминируется. Следовательно, индуцированные облучением Х-сцепленные рецессивные летали сдвинут соотношение полов в пользу дочерей. С другой стороны, Х-сцепленные доминантные летали при их индукции в женских половых клетках приведут к одинаковой гибели мужских и женских зигот и не окажут влияния на соотношение полов. При индукции у отцов Х-сцепленные доминантные мутации вызовут гибель только женского потомства, так как Х-хромосома отцов передается только дочерям. Х-сцепленные рецессивные летали, индуцированные у отцов, совсем не повлияют на соотношение полов у их детей. Поэтому в противоположность радиационному эффекту при облучении матерей облучение отцов сдвинуло бы соотношение полов в пользу мальчиков.

Проведенный анализ основывался на данных о 46 752 детях, родившихся в течение 10 лет после облучения матери (27 057), отца (7525) или обоих родителей (12170). Для всех категорий соотношение полов сдвигалось в ожидаемом направлении [1639]. После облучения матерей больше рождалось девочек, а после облучения отцов - мальчиков. При облучении обоих родителей материнский эффект, по-видимому, превышал отцовский. Как показало применение соответствующих тестов, эти результаты не являются статистически достоверными. Однако в 11 из 12 сравнений прослеживался эффект, имевший ожидаемое направление.

Подтверждение вывода о сдвиге соотношения полов, полученное при обследовании людей, облученных рентгеновскими лучами. Сходный сдвиг соотношения полов наблюдался у детей родителей, подвергавшихся рентгеновской терапии при лечении анкилозирующего спондилита, анального и вульварного зуда, а также других заболеваний. Два исследования, одно из которых было выполнено во Франции [1530], а другое -- в Нидерландах [1632], вместе охватили несколько сот пациентов, облученных высокими дозами, иногда составлявшими несколько сотен рентген. Соотношение полов у детей, зачатых после облучения, отклонялось в ожидаемом направлении, и эти отклонения были статистически значимыми.

Облучение в терапевтических целях и облучение в результате взрыва атомных бомб характеризуются высокими дозами и высокими дозовыми мощностями. С другой стороны, лица, подвергающиеся профессиональному облучению, обычно получают сравнительно низкие дозы и при низких дозовых мощностях. Вызывают ли и эти дозы сдвиг в соотношении полов? Исследование, проведенное в Японии, дало положительный ответ: обнаружено не только изменение соотношения полов у их детей, но и, по-видимому, более частое, чем в общей популяции, проявление бесплодия [1653].

Второе исследование, проведенное в Хиросиме и Нагасаки: отсутствие сдвига в соотношении полов [1640]. Через несколько лет после первого сообщения были

опубликованы дополнительные данные о беременностях, протекавших в интервале между 1956 и 1962 гг. Анализ производился таким же образом, хотя методика сбора данных в некоторых деталях отличалась от той, что применялась в случае первой выборки. Эта выборка включала несколько меньшее число детей облученных родителей. В данном исследовании не удалось выявить каких-либо различий в соотношении полов.

Всю совокупность полученных в Хиросиме и Нагасаки сведений о соотношении полов можно интерпретировать одним из трех способов: 1) можно предположить, что отклонения в соотношении полов, обнаруженные в выполненном ранее исследовании, случайны, а дозы радиации, полученные оставшимися в живых жертвами атомной бомбардировки, не индуцировали X-сцепленных леталей в количестве, достаточном для того, чтобы произвести сдвиг в соотношении полов; 2) можно допустить, что соотношение полов в действительности не свидетельствует о возникновении X-сцепленных мутаций, иными словами приведенная выше аргументация носит слишком упрощенный характер; 3) наконец, третья возможность заключается в том, что эффект, наблюдавшийся на изучавшейся ранее выборке, был вполне реальным, но за 10-15 лет, прошедших со времени облучения до зачатия детей, вошедших во вторую выборку, половые клетки, содержащие летальные мутации, были элиминированы. Результаты исследований, проведенных в Европе [1530; 1632], в которых были обнаружены сдвиги в соотношении полов у детей лиц, облученных с медицинскими целями, свидетельствуют в пользу последнего объяснения.

Однако факт остается фактом: соотношение полов является неудовлетворительной мерой генетических эффектов радиации, поскольку испытывает влияние множества других переменных, таких как возраст родителей и общие условия жизни. Данные исследований по изучению последствий облучения, несмотря на громадные затраты времени и человеческих сил, дали хотя и наводящие на размышления, но не вполне убедительные свидетельства радиационной индукции X-сцепленных леталей.

Пересмотр прежних представлений с учетом новых данных и методов [1572; 1615; 1641] (табл. 5.27). Цитогенетическое изучение детей уцелевших жертв атомной бомбардировки началось в 1968 г. Следовательно, уже не было возможности зафиксировать аберрации, приводящие к тяжелым порокам развития и ранней смерти, так как за прошедшее время эти дети умерли. В середине 1970-х гг. началось качественное и количественное изучение изменчивости белков крови (поиски редких электрофоретических вариантов). Кроме того, на основе информации о 70 082 родах была произведена переоценка данных о «неблагоприятных исходах беременности», под которыми подразумеваются и мертворождение, и(или) грубый врожденный дефект, и(или) смерть в течение первой недели после рождения. Дополнительно

Таблица 5.27. Генетические эффекты у детей оставшихся в живых жертв атомной бомбардировки в Хиросиме и Нагасаки [1572; 1641; 1615]

а) Белковые мутанты (30 генных локусов)		
	Облучение	Контроль
Число изученных локусов	543 664	386 706
Число подтвержденных мутаций de novo	3	0
Частота мутаций $5,4 \times 10^{-6}$		
б) Гonosомные хромосомные аберрации		
Число изучавшихся детей	5762	5058
Число гonosомных аберраций (XXX, XXY, XYY)	16	13
в) Неблагоприятные исходы беременности		
Число изучавшихся родов	30625	39457
Число неблагоприятных исходов	1498	1846
	(4,80%)	(4,64%)
г) Смертность до 17 лет		
Число детей	27 925	22 764
Число смертей в возрасте до 17 лет	1833	1398
	(6,56%)	(6,14%)

была включена в рассмотрение смертность в возрасте до 17 лет. Ни один из параметров не обнаружил статистически достоверных отличий от соответствующих величин для необлученной популяции. Однако при обработке этих данных была изменена стратегия получения оценок. В старых работах облученных индивидов делили на подгруппы в зависимости от того, на каком расстоянии от эпицентра взрыва они находились и наличия или отсутствия у них лучевой болезни. После этого проводилось тестирование на отклонение от нулевой гипотезы (генетический эффект полностью отсутствует). В новых исследованиях для каждого облученного индивида определялась на основе более полного знания о типах радиации, излучавшейся при взрывах этих бомб, величина дозы облучения и учитывалась вся имеющаяся информация, например данные о расстояниях от эпицентра, о местонахождении в укрытиях и т. д. *Средняя* доза на организм, полученная всеми, кто действительно подвергся облучению (т.е. находился менее чем в 1600 м от эпицентра), немного превышала 10 рад, а доза, полученная гонадами, составляла около половины этой величины. Однако колебания доз, полученных облученными индивидами, чрезвычайно велики; некоторые люди получили дозы, превышающие 100 рад. После вычисления индивидуальных доз авторы уже не проводили проверки нулевой гипотезы. Свое решение они обосновали так: поскольку известно и общепризнано, что ионизирующая радиация индуцирует мутации, любое увеличение эффектов, которые можно с достаточными основаниями связать с мутациями, является ли оно статистически достоверным или нет, вероятно, вызывается дополнительными индуцированными мутациями. Поэтому они рассчитывали регрессии величины роста вредных эффектов по величине облучения. Эти регрессии вместе с определенными предположениями об участии мутаций *de novo*, объясняющем «спонтанное» появление изучаемых событий, использовались для оценки удваивающих доз. Например, предполагалось, что 1 из 400 новорожденных, страдающих из-за неблагоприятного исхода беременности, появляется в результате возникновения новой мутации. Полученные удваивающие дозы составляли 535 рэм для числовых аномалий половых хромосом, 69 рэм для неблагоприятных исходов беременности и 147 рэм для смертности в детском возрасте. Кроме того, было обнаружено небольшое статистически недостоверное увеличение частоты редких электрофоретических вариантов; в данном случае получение оценки удваивающей дозы невозможно, так как в контроле мутантов *de novo* нет. При сравнении с оценками удваивающих доз, основанными на данных о мышах - 40 рэм для острого и 100 рэм для хронического облучения (разд. 5.2.1.3), - с учетом того, что облучение людей было острым, эти оценки, казалось, свидетельствовали, что люди более радиорезистентны, чем мыши. Однако вряд ли эти данные сопоставимы. Даже такой четко определяемый генетический параметр, как частота хромосомных aberrаций, не пригоден, поскольку в то время исследователи еще не располагали цитогенетическими методами. Это исключает использование не только большинства хромосомных aberrаций, но и большей части трисомий по аутосомам. Приведенная оценка целиком основана на материалах о числовых aberrациях X-хромосом, а для этой категории экспериментальные данные об увеличении соответствующих частот скудны даже в случае мышей, если исключить данные о потерях отцовских X-хромосом после облучения оплодотворенных ооцитов на стадии пронуклеуса. Неблагоприятный исход беременности и смерть в возрасте до 17 лет зависят от столь многих различных факторов окружающей среды, что любая оценка генетических эффектов будет крайне грубой. Это остается верным даже при доскональном учете таких важных факторов, как кровное родство и социоэкономический статус. Метод, применяемый для поиска мутантных электрофоретических вариантов белков, не выявляет делеций, которые индуцируются радиацией с большей вероятностью, чем точковые мутации, по которым (почти) никаких различий не обнаружено.

Суммируя результаты изучения детей

ущевших жертв атомной бомбардировки Хиросимы и Нагасаки, можно сказать, что атомный взрыв не привел к генетической катастрофе среди потомства довольно сильно облученных лиц, переживших эту трагедию. Напротив, у потомков первого поколения вообще трудно обнаружить какие-либо генетические эффекты радиации. Мы покажем, что это, вероятно, справедливо также и в отношении будущих поколений. Ужас атомной катастрофы связан с сильнейшим кратковременным воздействием облучения на индивидов и в меньшей степени с мутациями в соматических тканях, проявляющимися в последующей жизни в виде, например, злокачественных новообразований, в случае которых латентный период составляет 10-40 лет.

Облучение родителей по медицинским показаниям и трисомия по 21-й хромосоме у их детей. Сообщения о частотах трисомии по 21-й хромосоме (синдром Дауна) у детей матерей, проходивших рентгеновскую диагностику или терапию, противоречивы. Зиглер и др. (1965) [1620] провели сравнение доз радиации, полученных 216 матерями детей с синдромом Дауна с дозами, которые получили 216 других матерей того же возраста и социального происхождения. Дозы были явно выше в случае матерей детей-трисомиков. Ушида и др. (1968) [1663] сравнили частоту анеуплоидии среди детей облученных и необлученных женщин. Несмотря на то, что другие изучавшиеся параметры не проявили никаких различий, среди потомков облученных женщин оказались десять детей с анеуплоидиями, у восьми из которых был синдром Дауна, а у двух - трисомия по 18-й хромосоме. В контроле обнаружен только один ребенок с синдромом Дауна; различие оказалось статистически недостоверным. Однако дозы радиации, полученные гонадами этих матерей, были очень низкими, составляя от 0,007 до 0,126 Гр. Имеются другие работы, свидетельствующие в пользу предположения о повышенной частоте анеуплоидий у детей, появившихся после радиационного облучения их матерей. За прошедшее время исследователи часто возвращались к этой проблеме (см. обзор [1377]); в большинстве работ не обнаружено никакого радиационного эффекта. Некоторые старые работы носили ретроспективный характер, то есть факт облучения устанавливался в них уже после рождения детей.

Такая методика исследований может приводить к смещению оценок, если изучение радиационных доз проводится (что вполне понятно) более основательно в случае матерей, имевших ребенка с синдромом Дауна, чем в контрольной группе. С другой стороны, в работе Ушиды реализован проспективный подход. В ней сравнивали исходы беременностей у матерей, подвергавшихся и не подвергавшихся воздействию радиации. Среди работ, давших отрицательные результаты, были как ретроспективные, так и проспективные исследования.

Из обсуждавшихся в разд. 5.2.1.3 данных, полученных на мышах, можно было бы сделать вывод, что облучение женщин низкими дозами радиации задолго до оплодотворения не должно вызывать повышения частоты нерасхождений в ооцитах. Кроме того, можно предположить, что женщины, нуждающиеся в рентгеновском обследовании, отличаются от прочих женщин по состоянию здоровья, что и влияет на риск нерасхождения. Следовательно, весьма вероятно, что в данном случае мы имеем дело с ложной корреляцией. Недавно были представлены доказательства того, что облучение человеческих лимфоцитов *in vitro* малыми дозами может увеличивать частоту нерасхождений в соматических клетках [1664].

Повышается ли частота структурных хромосомных аномалий и больных с синдромом Дауна в человеческих популяциях, обитающих в регионах с высоким естественным уровнем радиации? В некоторых районах Бразилии и Южной Индии (штат Керала) имеется высокий фон радиации (в 10100 раз превышающий нормальный уровень), обусловленный присутствием в монацитовых песках почвы таких радиоактивных элементов, как торий и радий. В Бразилии было проведено исследование хромосом 12 000 жителей, подвергающихся

хроническому облучению. Оно выявило значимое, хотя и на грани статической достоверности, увеличение в культурах лимфоцитов таких хромосомных aberrаций, как делеции, дицентрики и кольцевые хромосомы [1381]. Среди 12 918 жителей штата Керала (Южная Индия) было обнаружено 12 субъектов с синдромом Дауна, еще 12 с тяжелой умственной отсталостью и пороками развития и 11 с тяжелой умственной отсталостью без дополнительных пороков развития, тогда как среди 5939 контрольных индивидов не оказалось ни одного больного с синдромом Дауна и были лишь один пациент с тяжелой умственной отсталостью и пороками развития и два с сильной умственной отсталостью без каких-либо иных клинических симптомов. Кроме того, проверка хромосом в культурах клеток крови облученных индивидов выявила небольшое увеличение числа хроматидных и хромосомных aberrаций [1523]. В то время как увеличение частоты хромосомных aberrаций в соматических клетках, о котором сообщалось в обоих исследованиях, вероятно, действительно имело место, повышение частоты случаев синдрома Дауна, зафиксированное во втором исследовании, легко могло быть вызвано смещением при определении частот или другими различиями между тестируемой и контрольной популяциями, поскольку в контроле синдром Дауна встречался крайне редко. Необходимы дальнейшие исследования.

В Китае было предпринято изучение популяции численностью 80 000 человек, проживающей в двух высокорadioактивных районах Янцюаньского округа. Оказалось, что в этих районах фон радиации примерно в три раза выше, чем в контрольной местности. Как правило, изучавшиеся семьи проживали в этих районах в течение шести и большего числа поколений; никаких существенных различий по общим условиям жизни между высокорadioактивными и контрольными районами не было. Эти исследования не выявили в указанной популяции какого-либо увеличения смертности от рака или доли детей, страдающих от определенных генетических дефектов и болезней, по сравнению с контролем. Небольшое увеличение числа пациентов с синдромом Дауна можно объяснить большим средним возрастом матерей в группе, подвергающейся воздействию повышенного фона радиации. Частота хромосомных аномалий в лимфоцитах индивидов, живущих в условиях высокого радиационного фона, была немного, но достоверно повышена [1416; 1427; 1436; 1487; 1535].

Данные о соматических хромосомных мутациях, возникающих под воздействием радиации.

Медицинская терапия. Таф и др. (1960) [1659] первыми описали структурные aberrации в хромосомах двух пациентов, облученных при лечении анкилозирующего спондилита. С тех пор выполнено немало исследований, посвященных изучению радиационной чувствительности хромосом в соматических клетках человека [1387, 1395]. Здесь можно упомянуть некоторые из полученных результатов.

1. В течение определенного промежутка времени после терапевтического облучения ~25-35% клеток (в основном лимфоцитов) содержали структурные хромосомные aberrации.
2. Чем больше промежуток времени между облучением и цитогенетическим анализом, тем меньше число клеток, содержащих дицентрические хромосомы, кольцевые хромосомы и ацентрические фрагменты (особенно заметно уменьшение в первые 2 года после облучения). Тем не менее даже через 10 лет такие аномалии все еще встречались у них примерно в четыре раза чаще, чем в контроле. С другой стороны, число реципрокных транслокаций через 10 лет не намного меньше, чем сразу после облучения (рис. 5.53). После комбинированной рентгеновской и радиевой терапии гинекологических опухолей структурные дефекты хромосом обнаруживаются в лимфоцитах даже спустя 25 лет. Сходные aberrации наблюдались у пациентов, лечившихся с применением радиоизотопов, например ^{131}I или ^{32}P .

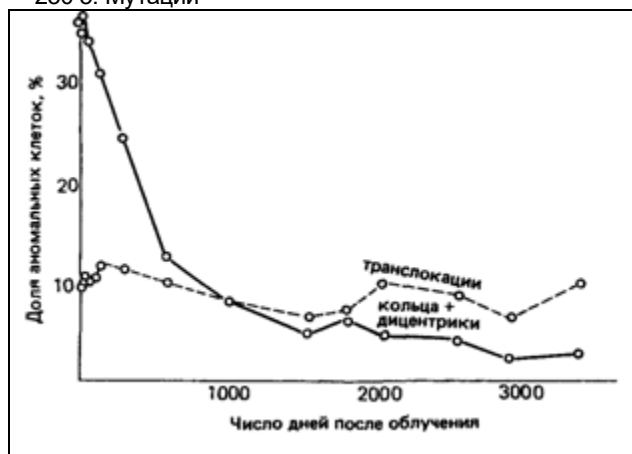


Рис. 5.53. После терапевтического радиационного облучения женщин с гинекологическими опухолями доля клеток, содержащих дицентрические и кольцевые хромосомы, за годы, следующие за облучением, понижается (О-О-О). С другой стороны, число транслокаций (О — О — О) остается более или менее постоянным [1387].

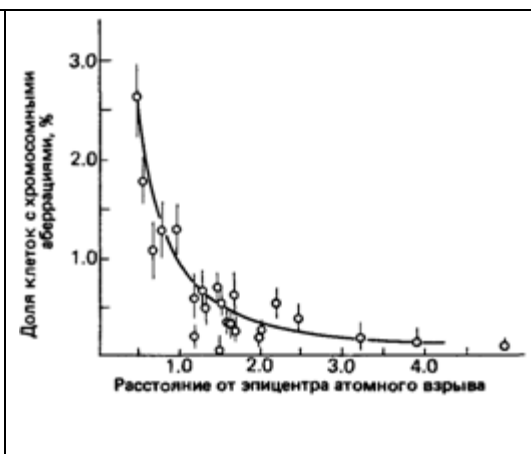


Рис. 5.54. Частота клеток (лимфоцитов) с хромосомными aberrациями в зависимости от того, на каком расстоянии от эпицентра атомного взрыва находился обследуемый [1614].

Профессиональное облучение. Сообщения о хромосомных aberrациях у индивидов, подвергающихся, в силу своей профессии, хроническому облучению, появляются довольно часто. Спонтанно клетки с кольцевыми или дицентрическими хромосомами возникают очень редко (1/2000 клеток после 48 ч культивирования лимфоцитов и 1/8000 после 72 ч). Поэтому они служат хорошими индикаторами воздействия радиации. Однако и простые хромосомные разрывы при облучении тоже увеличиваются в числе [1387]. Облучаемые группы включают рабочих, наносящих фосфоресцирующие вещества на циферблаты часов, персонал, обслуживающий атомные реакторы, и лиц, попавших в аварии, приводящие к утечке радиации. Появилась даже возможность оценить по величине цитогенетических изменений дозы радиации, полученные индивидами. Такая биологическая дозиметрия является полезным тестом, применяемым в радиобиологии человека.

Оставшиеся в живых жертвы атомной бомбардировки. Сасаки и Мията [1614] обследовали 51 человека, перенесшего атомную бомбардировку, приблизительно через 22 года после этого события и сравнили их с 11 необлученными контрольными индивидами. Было проанализировано не менее 83 506 клеток. В облученной выборке частота дицентрических и кольцевых хромосом составляла 0,0027 на клетку (201 на 73 996 клеток). В контроле она была равна 0,0002 (2 на 9 510 клеток). Число клеток с устойчивыми симметричными транслокациями также увеличивалось. Обнаружена четкая зависимость между расстоянием от эпицентра взрыва и числом aberrантных клеток (рис. 5.54).

Другая работа, приведшая к сходным результатам, была проведена Блумом и др. [1395]. У четырех сильно облученных индивидов, получивших дозы радиации от 2,07 до 6,42 Гр, обнаружено развитие клонов с aberrантными клетками. В разд. 5.1.6 при обсуждении синдромов, сопряженных с повышенной нестабильностью хромосом, объяснялось, что образование клона свидетельствует о селективном преимуществе

клеток, имеющих данную хромосомную aberrацию. Клеточные клоны, обладающие таким преимуществом, могут легко развиваться в злокачественные новообразования.

Заболееваемость раком среди жертв атомной бомбардировки. Дополнительные обследования пациентов, получивших значительные дозы облучения, и людей, переживших атомный взрыв в Хиросиме или Нагасаки, показали, что у них повышена частота различных раковых заболеваний. Список этих болезней включает лейкемию [1393, 1557] (рис. 5.55), рак молочной железы [1377; 1555], рак легких [1497], рак щитовидной железы [1434; 1557] и рак пищеварительной системы. Данные результаты согласуются с мутационной теорией возникновения рака (разд. 5.1.6) и поэтому не были совершенно неожиданными. «Латентный» период между воздействием радиации и диагностикой злокачественной опухоли обычно очень продолжителен (более 10 лет), особенно в случае солидных опухолей. Дальнейшее изучение слабой радиации как возможного фактора, способствующего возникновению рака у человека, имеет громадное значение для здравоохранения. Не исключено, что клеточный механизм репарации может исправлять повреждения, произведенные радиацией низкого уровня. До тех пор пока этот вопрос не выяснен в ходе специального исследования, предположение о существовании некоего порога для соматического повреждения, вызванного радиацией, лишено оснований. Проблемы канцерогенеза, обусловленного соматическими мутациями, индуцированными радиацией, имеют непосредственное значение для нынешнего поколения. Между тем эффект

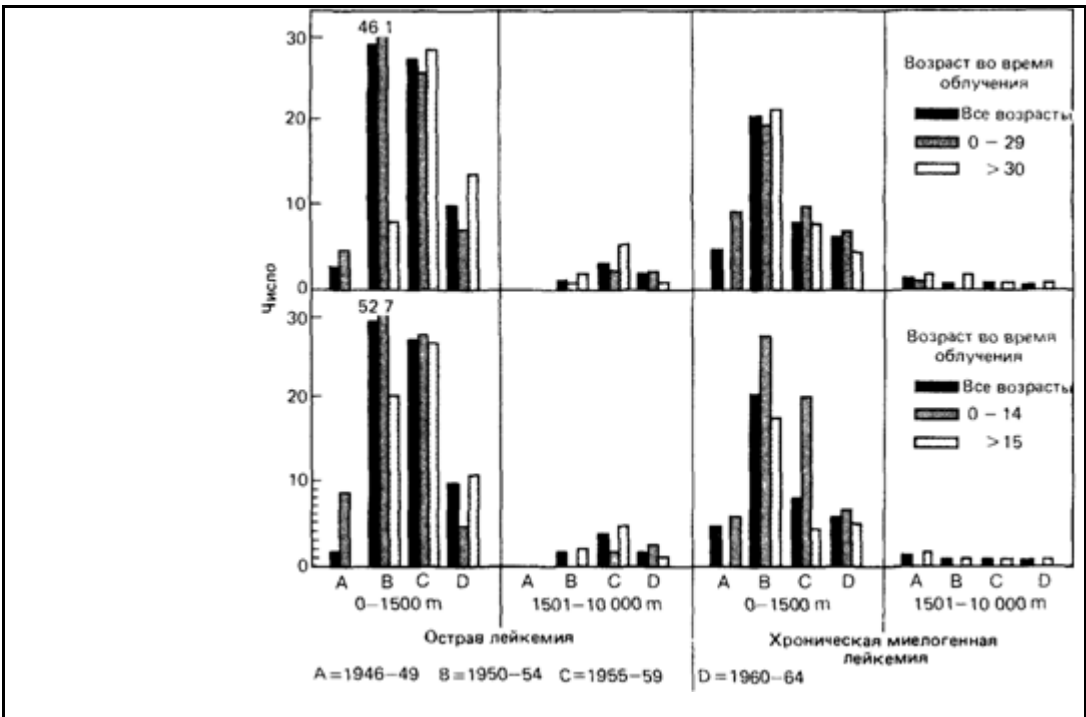


Рис. 5.55. Увеличение числа лейкозов после облучения при атомной бомбардировке. Средняя годовая частота на популяцию численностью 100 000; гистограмма основана на данных о 326 больных острым или хроническим лейкозом, находившихся во время бомбардировки на расстоянии до 10 000 м от эпицентра. Больные разделены на группы в соответствии с их возрастом во время бомбардировки (ВВБ) [1393].

мутаций в половых клетках может быть отсрочен.

Высказывались опасения относительно возможности повышения риска развития злокачественных опухолей у детей, подвергавшихся воздействию взрыва атомной бомбы в утробе матери, однако исследования по этой проблеме не дали никаких свидетельств увеличения такого риска [1499].

Как отмечалось в разд. 5.1.6.7, отдельные изменения, сопутствующие процессу нормального старения, могут быть обусловлены соматическими мутациями. Некоторые эксперименты на животных свидетельствуют об определенном сокращении продолжительности жизни после облучения особи [1377].

Прогнозируемое количество дополнительных мутаций на дозу. Сколько будет индуцироваться дополнительных мутаций по отношению к частоте спонтанных мутаций? При ответе на этот вопрос направляющей нитью служит информация, почерпнутая из генетики животных, особенно из генетики мыши. Ввиду возможных межвидовых различий в радиационной чувствительности мы, конечно, предпочли бы вычислять все оценки риска на основе данных о человеке, однако такие данные настолько скудны, что не позволяют получить какой-либо обоснованной количественной оценки. Однако они могут служить в качестве контроля и в некоторых случаях помогают квалифицировать оценки, полученные на животных. Мы рассмотрим ожидаемые относительные частоты в момент рождения и, кроме того, выскажем свое мнение относительно ожидаемой потери зигот до рождения. Разные группы мутаций будут рассматриваться по отдельности.

Геномные мутации. Сформулировать здесь какие-либо количественные выводы, повидимому, невозможно. Слишком много в данном случае неопределенных факторов. Мы не знаем, увеличивает ли ионизирующая радиация частоту нерасхождений при облучении на различных стадиях развития половых клеток и если да, то какого увеличения следует ожидать? Доказывают ли данные, полученные на человеке, что радиация индуцирует нерасхождения, или существует другое возможное объяснение фактов, о которых шла речь раньше (возможное увеличение анеуплоидии по X-хромосоме среди детей лиц, переживших атомную бомбардировку; возможное увеличение числа детей-трисомиков в потомстве матерей, облученных в диагностических целях).

В отличие от нерасхождения потеря хромосом, вызванная облучением матерей за несколько недель до или через несколько часов после зачатия, - хорошо установленный факт. Сильный эффект мощности дозы свидетельствует, что опасность сопряжена главным образом с острым облучением высокими дозами, тогда как хроническое облучение при очень низких мощностях дозы, возможно, не увеличивает частоты мутаций. Количественный эффект для человека предсказать трудно, так как большинство спонтанно возникающих зигот XO у людей abortируется. Исследования на пациентах с кариотипом XO ясно показывают, что большинство из них обязаны своим происхождением потере одной половой хромосомы в результате задержки анафазы или митотическому нерасхождению во время раннего деления дробления. Заманчиво предположить, что abortированные зиготы XO являются результатом нерасхождения в мейозе, поскольку мы уверены, что нерасхождение X-хромосом действительно происходит (об этом свидетельствует существование генотипов XXУ и XXX). Неизвестно, приводит ли потеря хромосом в период после зачатия до первого деления дробления к жизнеспособным зиготам XO у человека, однако появление зигот с таким генотипом даже в отсутствие радиации свидетельствует о повышенном общем риске потери хромосом в ходе первых делений. Вот почему необходимо считать недели, к которым приурочено оплодотворение, периодом особой чувствительности к повреждениям. В это время и в течение нескольких недель после облучения высокими дозами радиации при высоких дозовых мощностях следует избегать зачатия.

Структурные хромосомные aberrации. В данном случае мы находимся в лучшем положении. Наиболее важной группой структурных aberrаций, с которыми доживают до рождения, являются транслокации. Они могут быть сбалансированными или несбалансированными, приводя или к появлению индивида с синдромом, обусловленным частичной трисомией (или частичной моносомией), или к рождению здорового носителя транслокации. Как показали обследования новорожденных, большинство носителей транслокаций фенотипически нормальны, а транслокации у них сбалансированы. Однако для носителей транслокаций *de novo*, выглядящих сбалансированными, возможно, немного повышен риск стать умственно отсталыми (разд. 2.2.2). Громадное большинство несбалансированных зигот умирает на эмбриональной стадии. У людей несбалансированные транслокации вызывают выщепление несбалансированных зигот в последующих поколениях. У экспериментальных животных соответствующий феномен называется полустерильностью, так как носители транслокаций имеют меньшее число здоровых потомков, чем нормальные животные. Несбалансированные зиготы гибнут в матке. Люнинг и Сирл [1537] получили оценку удваивающей дозы (разд. 5.2.1.3) для полустерильности, равную 0,31 Гр, после облучения сперматогониев самцов мыши. Это эквивалентно увеличению, равному $0,34 \times 10^{-2}$ на Гр на гамету. Прямые данные, полученные на людях-добровольцах и на обезьянах-мартышках, свидетельствуют о более высокой (в 2-3 раза) по сравнению с мышами чувствительности их сперматогониев к индукции транслокаций, визуально обнаруживаемых в первом мейотическом делении. Как уже отмечалось, частота элиминации транслокаций до появления на свет высока как у мышей, так и у людей, однако неизвестно, не компенсирует ли более высокая частота элиминации у людей более высокую частоту индукции, что было показано в процитированных выше работах. Поэтому разумно предполагать, что для людей удваивающая доза для индукции транслокаций равна приблизительно 0,15 Гр, а частота индукции транслокаций – $0,7 \times 10^{-2}$ на Гр на гамету.

Установлено, что робертсоновские транслокации *не* (или почти не) индуцируются [1453]. Постмейотические мужские половые клетки, особенно сперматиды, более чувствительны к индукции транслокаций, чем сперматогонии. Однако при низких мощностях дозы транслокаций в сперматогониях образуется меньше.

У самок мышей, по-видимому, радиационной чувствительностью обладают половые клетки за несколько недель до оплодотворения и оогонии эмбрионов. Для оогоний была получена оценка соответствующего увеличения, равная $0,16 \times 10^{-2}$ на Гр на гамету. Эта оценка составляет около половины величины, полученной для сперматогониев.

Для других структурных aberrаций, особенно делеций, достоверные данные на мышах отсутствуют. Однако известно, что частота делеций у новорожденных человеческих индивидов мала (разд. 5.2.1, табл. 5.3). Делеции неизменно приводят к синдромам с тяжелыми пороками развития и обычно к ранней смерти. В качестве первого приближения увеличение количества радиационно-индуцированных делеций можно считать сходным с увеличением количества транслокаций, поскольку основным событием и в случае делеций, и в случае транслокаций является хромосомный разрыв.

Точковые мутации. Здесь мы находимся на более твердой почве, особенно когда имеем дело с единичными аутосомно-рецессивными мутациями. Люнинг и Сирл (1971) [1537] установили, что удваивающая доза при остром облучении мышинных сперматогониев равна 0,32 Гр, а оценка для индуцированных мутаций составляет $2,45 \times 10^{-5}$ на Гр на рентген на локус. Имеет место сильный эффект мощности дозы; в случае хронического облучения с очень низкими дозовыми мощностями удваивающую дозу можно оценить по крайней мере в 1 Гр, что соответствует увеличению количества мутаций, равному $\approx 0,8 \times 10^{-5}$ на Гр на локус.

Частота мутаций в мужских постмейо-

тических половых клетках приблизительно в два раза выше, чем в сперматогониях, при наличии очень небольшого эффекта мощности дозы. Это свидетельствует о том, что удваивающая доза равна 0,16 Гр независимо от дозовой мощности. Такая ситуация вполне реальна и для людей. Следовательно $\approx 6-8$ нед, предшествующих зачатию, следует считать особенно опасными. В течение этого времени необходимо избегать острого облучения и рентгеновского обследования тазовых органов, прямо воздействующих на гонады. С другой стороны, опасность хронического облучения будет очень небольшой, так как индивидуальные половые клетки пребывают на наиболее опасной для них стадии развития в течение лишь нескольких недель.

Чувствительность ооцитов к индукции монолокусных мутаций пока неизвестна. Ооциты приблизительно до 7 нед перед оплодотворением, по-видимому, устойчивы; никаких сообщений об увеличении частот мутаций после острого или хронического облучения не появлялось. В течение 7 нед, предшествующих оплодотворению, частота мутаций была оценена равной $1,85 \times 10^{-5}$ на локус (облучение одной дозой в 2 Гр) и 18 на Гр на дозу, когда 2 Гр даются 20 порциями [1541]. Отсюда, считая частоту спонтанных мутаций равной $4,9 \times 10^{-6}$ на локус (раздел 5.2.1.3), получаем, что удваивающая доза при остром облучении равна $\sim 0,25$ Гр. При фракционировании дозы удваивающая доза была бы гораздо выше и, проявляя сильный эффект мощности дозы, возможно, еще намного выше в случае хронического облучения.

Практический вывод из этого состоит в том, что следует избегать зачатия в течение нескольких недель после облучения. Неизвестно, устойчив ли ооцит человека, подобно ооциту мыши, к индукции точковых мутаций на протяжении большей части его существования.

Резонно предполагать, что соответствующие эффекты сопоставимы с эффектами, обнаруженными в случае рецессивных мутаций.

Сколько естественно возникающих «спонтанных» мутаций индуцируется естественным фоном радиации? Рассмотрение удваивающих доз и числа индуцированных мутаций на Гр на локус помогает в получении оценок частоты естественно возникающих мутаций, индуцированных естественным фоном радиации. Эта радиация оценивается величиной, составляющей от 0,03 до 0,04 Гр за 30 лет (табл. 5.26). Мощность дозы крайне низка. Поэтому оценка удваивающей дозы для мутаций в сперматогониях в 1 Гр, вероятно, вполне приемлема. Дополнительное облучение, сходное по величине с фоновой радиацией, увеличило бы частоту спонтанных мутаций на 3-4% и такая же доля частоты спонтанных мутаций, возможно, обусловлена естественным фоном радиации.

Сколько мутаций возникло бы спонтанно, если бы не было дополнительного облучения, обусловленного факторами современной цивилизации. Все полученные выше для точковых мутаций оценки являются относительными. Они представлены или в виде удваивающих доз или в виде числа новых мутаций на рентген и на локус. Чтобы перевести их в абсолютные оценки, необходимо знать число локусов, подвергающихся риску. Проблема общей частоты точковых мутаций в геноме человека обсуждалась в разд. 5.1.4.2 при рассмотрении частот спонтанных мутаций для отдельных генов. Из этого обсуждения видно, что экстраполяция частот отдельных мутаций на весь геном человека зависит от предположений о числе локусов, подвергающихся риску, числе мутаций внутри одного локуса, приводящих к идентифицируемому фенотипу и об эффектах, если они есть, мутаций в последовательности ДНК, не кодирующих полипептидных цепей. На все эти вопросы так трудно ответить, что мы просто не в состоянии прямо оценить, насколько может увеличиться частота возникновения точковых мутаций после воздействия данной дозы радиации.

Некоторые из этих трудностей можно обойти, если вопрос поставить несколько проще: какого увеличения частоты генетически детерминированной болезни можно ожидать вследствие данного увеличения уровня радиации? Чтобы ответить на этот

вопрос, мы должны знать частоту генетически детерминированного заболевания в отсутствие дополнительного облучения, долю генетических болезней, поддерживаемых в популяции мутациями *de novo* и увеличение частоты возникновения мутации, приходящуюся на данную дозу радиации. Предварительные ответы на последний вопрос получены в предшествующих разделах. К сожалению, у нас нет необходимой информации относительно частоты генетически детерминированных болезней человека.

Имеется только одна группа наследственных аномалий, для которых возможно получение относительно достоверной абсолютной оценки, — структурные aberrации хромосом, главным образом транслокации. Согласно Джекобсу (1972) [1501], у 43 558 новорожденных выявлено 82 эуплоидных структурных aberrаций аутосом, 20% которых возникли в результате мутаций *de novo*. Дополнительно в той же выборке обнаружена 21 анеуплоидная aberrация, одна треть которых возникла вследствие мутаций *de novo*. Удваивающая доза для транслокаций была равна 0,31 Гр при остром облучении [1537] и 0,93 Гр при хроническом облучении. Это приводит к следующей оценке частоты индуцированных мутаций на 0,01 Гр на гамету при объединении эуплоидных и анеуплоидных зигот:

$$\mu = \frac{\text{Число индивидов, несущих мутацию de novo}}{2 \times \text{Численность обследованной популяции}}$$

$$= \frac{23}{2 \times 43\,558} \times \frac{1}{93} = 2,8 \times 10^{-6}.$$

Дополнительная радиация в 0,01 Гр на поколение увеличила бы частоту половых клеток с вновь возникшими aberrациями этого типа на 2,8 в расчете на 1 миллион половых клеток и, поскольку индивид образуется в результате слияния двух половых клеток, на 5,6 индивидов с такой aberrацией на 1 миллион. Эта оценка, вероятно, может быть сильно заниженной (в 2-4 раза), если сперматогонии человека действительно более чувствительны к радиации, чем сперматогонии мыши.

Для трисомий расчет увеличения их числа на грей невозможен. Частота трисомий известна и точно в два раза больше частоты мутаций, так как каждый трисомик является мутантом *de novo*. Но в данном случае мы не располагаем оценкой ее увеличения на грей и на гамету. Однако, основываясь на данных о мышах, есть веские основания предполагать, что это увеличение, возможно, меньше, чем в случае структурных aberrаций.

Получение оценок для генных мутаций представляет гораздо большую сложность, так как ни количество генетически детерминированных болезней в отсутствие облучения, ни доля болезней, поддерживаемых в популяции мутациями *de novo*, неизвестны.

Количество генетических болезней в популяции неизвестно. Многим читателям может показаться удивительным, что определение частоты наследственных болезней в человеческих популяциях никогда не производилось. Были предприняты две серьезные попытки выявления всех случаев наследственных заболеваний в хорошо изученных популяциях Северной Ирландии [1649] и Британской Колумбии (Канада) [1661]. Полученные данные использованы экспертами ООН в качестве основы для оценок риска. Однако критическое изучение таблиц, опубликованных в этих работах, показывает, что авторы не провели персональных обследований и генетической классификации больных, а вынуждены были полагаться на диагнозы, поставленные большим числом практикующих врачей, и иногда даже на их заключения относительно способов наследования. Диагнозы редких болезней часто бывают ошибочными, что вносит путаницу в классификацию многих наследственных болезней и не позволяет судить об их генетической и средовой гетерогенности. Для этого необходимо проведение обширных клинических и лабораторных исследований. Между тем диагностическая практика, принятая в медицине, часто не требует (и не должна требовать) детального анализа (см. разд. 3.8.14). Для генетиков-клиницистов несостоятельность этих сообщений очевидна. Почему же доклады ООН в значительной степени ос-

Таблица 5.28. Частота наиболее распространенных доминантных и Х-сцепленных болезней, диагностированных в момент рождения (число больных на 1000 новорожденных) [1412]	
Число больных	Болезни
Число живорожденных (порядок величины)	
2,0	Моногенная семейная гиперхолестеринемия
1,0	Доминантный отосклероз
0,8	Поликистоз почки у взрослых, Х-сцепленная умственная отсталость
0,5	Множественные экзостозы
0,4	Хорея Гентингтона
0,2	Наследственный сфероцитоз, нейрофиброматоз, мышечная дистрофия Дюшена
0,1	Наследственный полипоз, доминантная форма слепоты, доминантная форма глухоты, проявляющейся в раннем детстве, несовершенный дентиногенез, гемофилия А, доминантный ихтиоз
0,04	Несовершенный остеогенез, синдром Марфана
0,03	Наследственная ретинобластома, гемофилия В
0,02	Ахондроплазия, острая перемежающаяся порфирия, Х-сцепленная глухота, глазной альбинизм, нистагм
0,01	Туберозный склероз, синдром Элерса-Данлоса, остеопетроз (уплотнение костной ткани), перемежающаяся порфирия, расщепление губы и (или) нёба со слизистыми кистами губы, Х-сцепленный anus imperforatus (заращение ануса), Х-сцепленный стеноз лимфатического протока, гипогаммаглобулинемия, гипофосфатемические рахиты, ангидротическая эктодермальная дисплазия, несовершенный амелогенез

нованы на этих данных? Да потому, что ученые, которые готовят эти доклады, являются в основном специалистами в области экспериментальной генетики и не имеют медицинского образования.

Распространение доминантных и Х-сцепленных болезней. Попытки определения общих частот наследственных болезней в человеческих популяциях до сих пор терпели неудачу. Однако для многих заболеваний с доминантным или Х-сцепленным типом наследования проведены исследования, выполненные врачами - специалистами по соответствующим болезням. Во всех случаях для постановки и проверки диагноза использовали современные методы. Результаты таких исследований должны дать правильное представление о порядке величин, характеризующих распространение этих болезней. В табл. 5.28 приводятся сведения о наиболее часто встречающихся заболеваниях этого типа [1412]. Распространенные болезни, как правило, начинаются в зрелом возрасте. Собственно, они получили распространение именно потому, что репродуктивная приспособленность таких больных относительно высока; болезнь часто проявляется уже после того, как пациент обзавелся потомством. Наибольшее распространение имеет моногенная семейная гиперхолестеринемия. Ошибка метаболизма при этой болезни рассматривалась в разд. 4.6.4. Гетерозиготные мужчины подвержены 50%-му риску проявления к 50 годам коронарной недостаточности и 50%-му риску умереть от ишемической болезни сердца к 60 годам. Среди других заболеваний этой группы - хорея Гентингтона, нейрофиброматоз, множественные экзостозы и поликистоз почки. Общая частота аутосомных доминантных болезней, включая те, которые встречаются редко и не приведены в табл. 5.28, составляет приблизительно 7/1000.

Анализ результатов исследований, касающихся Х-сцепленных рецессивных болезней, дал оценку равную ~ 1/1000.

Известна поразительная этническая и географическая изменчивость по аутосом-

Таблица 5.29. Приблизительные доли пациентов с аутосомно-доминантными заболеваниями, обусловленными мутациями de novo. [По Goldstein, Brown (1977) с изменениями.]

Заболевание	Доля (в %)
Синдром Аперта (акроцефалосиндактилия)	>95
Ахондроплазия	80
Туберозный склероз	80
Нейрофиброматоз	40
Синдром Марфана	30
Миотоническая дистрофия	25
Болезнь Гентингтона	1
Поликистоз почки	1
Семейная гиперхолестеринемия	<1

но-рецессивным болезням, которая будет обсуждаться в разд. 6.1.3. Частота аутосомно-рецессивных патологий имеет лишь очень отдаленную связь с частотой соответствующих мутаций (разд. 5.1.3). Поэтому предсказания частот этих болезней в будущем на основе предположений об увеличении частот мутаций невозможно. Любое увеличение частоты мутаций будет лишь очень медленно (по прошествии многих поколений) приводить к росту количества гомозиготных больных индивидов. Этот вопрос мы обсудим в разд. 6.2.1.

Однако даже в случае аутосомно-доминантных и X-сцепленных рецессивных патологий, оценки частот могут быть использованы для прогнозирования частоты больных в будущем при возникновении соответствующих индуцированных мутаций (если эта частота поддерживается посредством равновесия между мутациями и отбором). Любое увеличение частоты мутаций в конце концов приведет к новому равновесию, при котором частота заболеваний увеличится в той же пропорции, что и частота мутаций. Однако относительно некоторых из доминантных болезней, приведенных в табл. 5.28, и особенно в случае наиболее часто встречающихся неизвестно, действительно ли они поддерживаются в результате равновесия между мутационным процессом и отбором. Например в случае хореи Гентингтона, Вендт и Дром [941] не смогли найти у нескольких тысяч пациентов с этим заболеванием даже одну бесспорную мутацию de novo. Возможно, в прежние века соответствующий ген обладал селективным преимуществом, например из-за повышенной сексуальной активности его носителей на начальных стадиях болезни.

Частота мутаций de novo в случае аутосомно-доминантных болезней и биологическая приспособленность. Индивиды с доминантными заболеваниями, влияющими на выживаемость, имеют меньшую вероятность оставить после себя потомство. Вот почему можно ожидать, что многие случаи таких болезней представляют собой результат мутаций de novo у родителей, не страдающих этой патологией. Чем ниже биологическая приспособленность, тем выше будет доля случаев, обусловленных новыми мутациями. При болезни, приводящей к ранней смерти или исключаящей репродукцию, большинство больных будут мутантами de novo. Приблизительные доли пациентов с аутосомно-доминантными заболеваниями, болезнь которых обусловлена новыми мутациями, приведены в табл. 5.29. В случае болезней, не нарушающих репродукцию благодаря позднему их началу (таких как поликистоз почек и хорея Гентингтона), мутантами de novo оказываются очень немногие больные или же таковые вообще отсутствуют. Кроме того, такие болезни будут чаще встречаться в популяции.

Несмотря на эти критические замечания, в следующем параграфе мы будем придерживаться предположения, что частоты доминантных мутаций, приведенные в табл. 5.28, поддерживаются в результате равновесия между отбором и мутациями и что увеличение скорости мутирования рано или поздно приведет к увеличению их частоты. Это наиболее осторожное предположение; оно предсказывает самое высокое увеличение частоты за счет индуцированных мутаций.

Некоторые гипотезы относительно неполной пенетрантности и мультифакториальных болезней. Для большого числа болезней, имеющих по крайней мере частичную генетическую детерминацию, не удастся ни

выявить соответствующую хромосомную aberrацию, ни установить какой-либо простой способ ее наследования. Вывод о наличии генетической компоненты может быть сделан на основании более высокой, чем в общей популяции, частоты больных среди родственников пробандов и из более высокой конкордантности пар монозиготных близнецов по сравнению с дизиготными. Генетический анализ таких данных можно осуществить только на фенотипическом уровне с применением биометрико-статистических подходов. Такие биометрические модели часто используются для сравнения очень общих гипотез мультифакториального наследования с более конкретными генетическими моделями, например с моделью аутосомно-доминантного наследования со сниженной пенетрантностью (разд. 3.1.2). Три основных класса внутри этой группы патологий составляют врожденные пороки развития, «распространенные» болезни вроде диабета и гипертонии и психические заболевания, например шизофрения и маниакально-депрессивный психоз.

Для большинства этих болезней мультифакториальная генетическая модель с пороговым эффектом дает довольно адекватное описание типа наследования (разд. 3.6). Однако тщательный анализ фенотипов и родословных во многих случаях привел к выделению редких типов заболеваний с простыми способами наследования. Примеры таких болезней (к ним относится, скажем, X-сцепленная умственная отсталость) приведены в табл. 5.28. Наши знания об индуцированных радиацией доминантных скелетных мутантах мыши свидетельствуют о том, что доминантные главные гены с очень неполной пенетрантностью и крайне вариабельной экспрессивностью встречаются гораздо чаще, чем это до сих пор предполагалось (разд. 3.6.2.5). Болезни этой категории несомненно поддерживаются в популяции новыми мутациями, и число больных может поэтому увеличиваться с ростом частоты возникновения соответствующих мутаций.

С другой стороны, изучение ассоциации болезней с системами генетического полиморфизма, например с антигенами HLA и группами крови (разд. 3.7), показало, что эти системы имеют отношение к генетической детерминации некоторых наследственных болезней. Однако, поскольку частоты генов полиморфных систем поддерживаются не мутациями, а, вероятно, балансирующим отбором (разд. 6.2.1.3), увеличение скорости мутирования не должно влиять на частоты полиморфных генов и, следовательно, на частоты таких мультифакторных заболеваний (разд. 3.6).

Влияние мутаций на частоту врожденных дефектов оценить трудно. Очень немногие из таких дефектов являются явно моногенными. Но вот влияние главных генов на некоторые из них не исключено. Лишь немногие врожденные дефекты полностью обязаны своим возникновением окружающей среде. Поразительные различия в популяционных частотах индивидов с дефектами нервной трубки могут объясняться невыявленными средовыми воздействиями. Для большинства врожденных дефектов предполагается взаимодействие между множественными генетическими и пока неизвестными средовыми факторами. Эффекты мутаций должны зависеть от природы лежащей в основе заболеваний генетической изменчивости. Если значительная часть генетической изменчивости, предрасполагающей к врожденным дефектам, обусловлена системами генетического полиморфизма, поддерживаемыми отбором, мутации должны иметь небольшое влияние или вообще не влиять на их частоты. Продолжая анализировать этот вопрос, можно предположить, что, например, врожденные пороки сердца обусловлены случайными или стохастическими процессами, не испытывающими влияния ни генетических, ни средовых факторов, поскольку конкордантность по таким сложным врожденным дефектам органогенеза у идентичных близнецов низкая [2348].

В табл. 5.30 приведена оценка дополнительного числа индивидов, имеющих наследственные дефекты, на 0,01 Гр дополнительного облучения. Она взята из доклада UNSCEAR и основана на экспертных оценках, представленных рабочей группой Международной комиссии по радиационной защите. В согласии с отчетом за

Таблица 5.30. Дополнительное число индивидов с наследственными дефектами среди 1 миллиона новорожденных следующего поколения и после установления нового равновесия на 0,01 Гр добавочной радиации/поколение [1377]				
Тип мутации	Число больных в популяции	Число дополнительных больных/0,01 Гр в первом поколении	Увеличение в расчете на 0,01 Гр в первом поколении, %	Новая равновесная величина
Аутосомные доминантные и Х-сцепленные моногенные болезни	10000	15	0,15	10100
Аутосомные рецессивные болезни (гомозиготы)	10002 500	Очень мало		Очень медленное увеличение
Несбалансированные транслокации (и другие структурные aberrации хромосом)	400	23	5,75	430
Трисомии и ХО	5 000	Вероятно, очень мало		
Врожденные уродства и пороки развития, проявляющиеся в более позднем возрасте; конституциональные болезни ¹⁾	90000	4,5	Вероятно, очень мало	
¹⁾ Оценки основаны на данных о распространении наследственных болезней в Британской Колумбии [1661]. Обратите внимание на критику этих данных в тексте.				

1982 г., приведенные здесь оценки *ниже* тех, что публиковались раньше. Причины этого в росте наших знаний о некоторых проблемах. Например, раньше предполагалось, что риск возникновения робертсоновских транслокаций равен риску возникновения реципрокных транслокаций. Теперь известно, что он намного меньше (если вообще существует). Понижение оценок риска показывает, что таким комитетам свойствен консерватизм в том смысле, что в сомнительных случаях они всегда принимают более высокие величины риска.

С другой стороны, эти оценки касаются только наследственных дефектов; возможная изменчивость нормы здесь не рассматривалась. Например, в случае рецессивной болезни число *гомозигот* будет увеличиваться лишь очень медленно. Однако, если *гетерозиготы* по генам некоторых рецессивных болезней, таких как фенилкетонурия, имеют слегка пониженный IQ, увеличение средней гетерозиготности, обусловленное дополнительными мутациями, могло бы повлиять на изменчивость IQ в нормальной популяции. Поверхностное рассмотрение этой таблицы может создать впечатление, что в отсутствие ионизирующей радиации или других мутагенных факторов частота генетических аномалий по прошествии поколений осталась бы той же самой. Это предположение, однако, не подтверждается; например, аутосомно-рецессивные болезни в индустриальных странах имеют в настоящее время чрезвычайно низкую частоту, поскольку в течение нескольких последних поколений произошло быстрое снижение частоты кровнородственных браков (разд. 6.3.1.2). Следовательно, частоты гомозигот будут очень медленно в течение сотен поколений увеличиваться до достижения нового равновесия. Частота доминантных и Х-сцепленных заболеваний, с другой стороны, будет испытывать отрицательное влияние ослабления естественного отбора, обусловленного усовершенствованием терапии, а также положительное влияние, связанное со все более эффективным генетическим консультированием и пренатальной диагностикой. Даже если бы увеличение частоты наследственных заболеваний и (или) врожденных дефектов было обнаружено в ходе тщательного мониторинга, было бы

трудно, если не невозможно, выделить в качестве причины такого увеличения какой-либо один фактор, скажем облучение.

В другом источнике, с которым мы рекомендуем ознакомиться, приводится еще более низкая оценка для доминантных и Х-сцепленных мутаций [1417].

Для уточнения этих оценок необходимы более основательные знания: 1) о генетических факторах, лежащих в основе мультифакториальных заболеваний и о соответствующих доминантных генах с низкой пенетрантностью; 2) о частоте и распространенности наследственных заболеваний (т.е. нужны тщательно спланированные, широкомасштабные эпидемиологические исследования, в которых медико-статистическая информация объединяется с результатами изучения отдельных больных); 3) о взаимодействии между мутациями и естественным отбором, особенно в случае тех болезней, для которых существование равновесия между мутационным процессом и очень сильным отбором не является очевидным фактом.

В разделе 5.2.1.2 были поставлены четыре вопроса:

1. Каким образом данный фактор действует, если он вообще действует, на генетический материал?
2. Насколько сильно подвергается человеческая популяция воздействию этого фактора?
3. Сколь значительного увеличения частоты «спонтанных» мутаций следует ожидать?
4. Каковы его долговременные последствия для популяции?

Длинная цепь аргументов привела нас к ответу на вопрос 3. Хотя рассуждения, касающиеся ответа на четвертый вопрос не так громоздки, пока мы не узнаем, какую долю всех мутаций составляют вредные, ответить на самую существенную часть этого вопроса, мы не сможем. Популяционные исследования на облученных популяциях мыши могли бы привести нас к довольно оптимистическим выводам относительно последствий для человеческих популяций, но люди не мыши, и экстраполяция этих результатов может вводить в заблуждение. Обсуждение проблем популяционной генетики (разд. 6) покажет, где со временем могут быть найдены ответы на вопрос о долговременных тенденциях.

При внимательном рассмотрении проблема генетического риска, обусловленного ионизирующей радиацией для человеческих популяций, оказалась неожиданно сложной. Однако путь к решению этой проблемы хоть и пролегает через густой лес, перерезаемый глубокими оврагами, более или менее ясен. Совершенно другая ситуация имеет место в случае генетического риска, вызываемого химическими мутагенами. Здесь мы встречаемся с еще более сложными проблемами, и едва ли можно сказать, что научное сообщество уже приступило к их решению.

5.2.2. Химически индуцированные (мутации)

5.2.2.1. Суть проблемы

История [1384; 1385]. То, что химические вещества индуцируют мутации, предполагалось еще на заре генетики. В своей первой публикации о радиационно-индуцированных мутациях, Мёллер (1927) [1566] писал;

«Уже не раз сообщалось, что герминативные изменения, предположительно мутационного характера, могут индуцироваться рентгеновскими лучами или излучениями радия, однако, как и в случае публикаций, касающихся других факторов (алкоголя, свинца, антител и т. д.), работа была выполнена таким образом, что значение этих данных, если их проанализировать с точки зрения современной генетики, представляется в лучшем случае весьма спорным; более того, эксперименты, давшие, как казалось, наиболее четкие данные, при их повторении привели к отрицательным или противоположным результатам».

После публикации Мёллера произошел крен в сторону радиационной генетики, и интерес к каким-либо другим мутагенным факторам в течение длительного времени был незначительным. В 1941 г. Мёллер опять высказал свои соображения о попытках воздействовать на генетический материал химическими веществами (симпозиум в Колд Спринг Харбор):

«Но, хотя предпринято множество попыток применения разных сильнодействующих средств (убивающих большинство обрабатываемых организмов), ни одна из них не имела до сих пор заметного успеха, не получила должной проверки и эффективность воздействия не была подтверждена независимыми исследователями...

Ввиду надежной защиты, обычно предоставляемой генам клеткой, которая их несет, ... не следует ожидать, что химические вещества, сильно влияющие на мутационный процесс, но оставляющие клетку жизнеспособной, будут легко обнаружены нашими довольно неточными методами. Однако поиск таких веществ, равно как и изучение более мягких, «физиологичных» влияний на мутационный процесс должны продолжаться, поскольку они ведут нас к пониманию событий, происходящих внутри гена, и к разработке мер контроля за ними...»

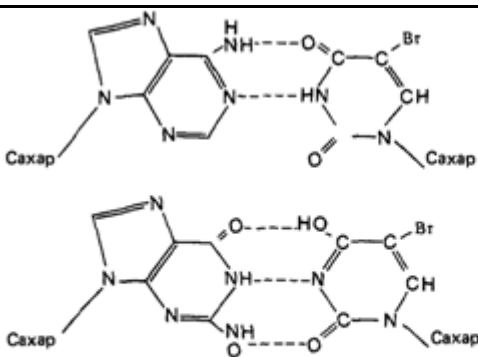
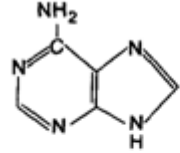
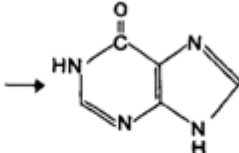
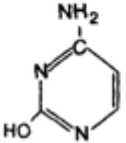
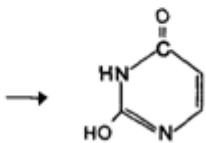
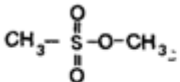
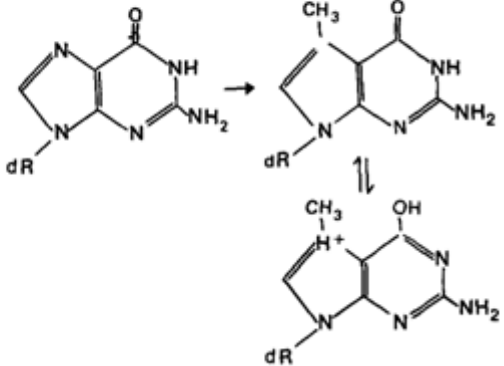
В 1942 г. Ауэрбах и Робсон из Великобритании получили неопровержимые положительные результаты, индуцировав с помощью азотистого иприта (отнюдь не «мягкого» агента) мутации у *Drosophila*. По соображениям военной секретности эти результаты не публиковались до послевоенного времени (1946, 1947) [1379]. Поводом для тестирования этого специфического вещества на мутагенность послужило сходство между повреждениями кожи, вызванными азотистым ипритом, и поражением кожи под воздействием высоких острых доз радиации.

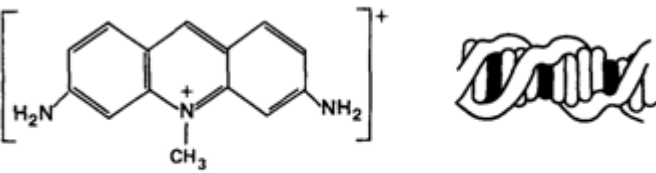
Независимо от них Олкертс (1943) [1585] из Германии получил положительные результаты на *Oenothera*, в частности при применении уретана-широкоиспользовавшегося медикамента, который считался хорошим снотворным для детей и у которого впоследствии были обнаружены канцерогенные свойства. Олкертс интересовали только фундаментальные исследования. В публикации не содержится никаких сведений об особых причинах побудивших избрать именно уретан в качестве тестируемого вещества. Рапопорт (1946) [1593] из СССР описал мутагенное действие карбонильных соединений.

После этих первых открытий новая область исследований быстро расширялась, однако дискуссий, посвященных практическим перспективам или касающихся генетического здоровья человечества, было очень мало или они совсем не проводились. Первые сдвиги в этом направлении можно найти в лекции Люэрс (1955) [1536] и в обзорной статье Бартельмесса (1956) [1383]. В 1961 г. Конен и Лански [1422] впервые описали хромосомные aberrации в лимфоцитах индивидов, подвергшихся воздействию азотистого иприта. С начала 1960-х годов - примерно 20 лет спустя после первого описания химических мутагенов - научное сообщество постепенно стало осознавать возможную угрозу человеческой популяции со стороны химических мутагенов. Рёрборн (1965) [1600] первым обобщил все данные и ясно поставил ряд важных вопросов. Это направление стало очень быстро развиваться. Вскоре было основано Общество по изучению мутагенов окружающей среды (ОМС) и опубликованы соответствующие монографии [1489; 213; 1622]. По данной теме регулярно проводятся конференции, на которых определяется круг вопросов, требующих незамедлительного решения [1375; 1376; 1425].

Мутагенные соединения в окружающей среде человека. Мутагенные эффекты наблюдались для очень большого числа соединений при тестировании на самых разнообразных организмах. Генетическое значение большинства из этих эффектов - например, геномных мутаций, хромосомных разрывов и перестроек, точковых мутаций - очевидно. Значение других, вроде «липкости» хромосом или хромосомных «пробелов» (разд. 2.2.2), оценить трудно. Некоторые вещества нарушают функцию системы микротрубочек, необходимой для образования веретена во время митоза. В общем, генетические эффекты химических веществ более разнообразны, чем генетические эффекты радиации.

В табл. 5.31 приводится ряд соединений, известных в качестве мутагенов, и изображены механизмы мутагенеза. Самыми сильными из обнаруженных до сего дня мутагенов считаются алкилирующие агенты, к которым относятся азотистый иприт, этилениминовые соединения и эфиры метилсульфоновых кислот. Многие из этих веществ используются при лечении злока-

Таблица 5.31. Молекулярный механизм точковых мутаций	
Пример мутагена	Механизм
Аналоги оснований: (5-бромурацил) включение в процессе деления	 Сахар Сахар 1. БУДР включается в ходе репликации вместо тимина 2. БУДР претерпевает таутомерный сдвиг чаще, чем тимин 3. Перейдя в енольную форму, он спаривается с гуанином
Азотистая кислота: в покоящейся ДНК	 Аденин гипоксантин  Основание спаривается по типу гуанина  Цитозин урацил  Основание спаривается по типу тимина
Алкилирующие агенты: метил- метан- сульфонат	 Алкилирование гуанозина в 7-й позиции с последующим таутомерным сдвигом (внизу справа)  dR dR

	Продолжение табл. 5.31
Пример мутагена	Механизм
Гидроксиламин	 1. Гидроксиламины реагируют с цитозином, образуя производные, N-гидроксилированные в 4-, 6- или в обоих этих положениях 2. Эти производные находятся в другой таутомерной форме, чем цитозин. Они могут спариваться с аденином вместо гуанина
Акридиновые красители (триафлавин)	 1. Молекула акридина встраивается в спираль ДНК 2. Это растягивает транскрибируемую цепь ДНК, приводя к мутации сдвига рамки считывания

чественных опухолей или в ситуациях, когда необходимо подавить иммунную реакцию или процесс пролиферации клеток. Другая группа мутагенов, применяемых в терапевтических целях, включает антиметаболиты нуклеиновых кислот и акридиновые соединения.

Одно из самых распространенных веществ, воздействующих на человека и проявивших мутагенность на микроорганизмах, - кофеин. Нитриты - широко применяемые, «модельные вещества» для выяснения молекулярных механизмов точковых мутаций [1457] - используются в качестве консервантов мяса, одновременно придающих ему «свежий» красный цвет. Этих двух примеров достаточно, чтобы убедиться, что химический мутагенез представляет потенциальную опасность.

Молекулярные механизмы химического мутагенеза [1458; 1602]. Подобно облучению, химические мутагены могут вызывать нарушения мейоза, приводящие к нерасхождению, хромосомным разрывам и точковым мутациям. О точных механизмах нерасхождения известно мало, так как события, приводящие к нему, происходят на хромосомном уровне. Лучше обстоит дело с информацией о действии химических веществ на молекулу ДНК. Некоторые точковые мутации можно объяснить на уровне молекулярных механизмов; эти же механизмы, вероятно, играют важную роль при индукции хромосомных разрывов. С другой стороны, наши знания о вторичных реакциях, приводящих к воссоединениям хромосом, пока еще недостаточны (разд. 2.2.2).

Удобно различать два типа химически индуцированных изменений, нарушающих функцию ДНК как генетического материала. Это 1) инактивирующие повреждения и 2) мутагенные повреждения.

Наиболее важные типы инактивирующих повреждений изображены на рис. 5.56. Они часто приводят к гибели клеток. Однако клетки могут выживать, если, например, тиминный димер или поврежденное основание удаляются репаративным механизмом, если разрывы хромосом восстанавливаются и если продукт восстановления не мешает осуществлению митоза.

Мутагенные повреждения определяются как изменения, не нарушающие репликацию ДНК, но изменяющие последователь-

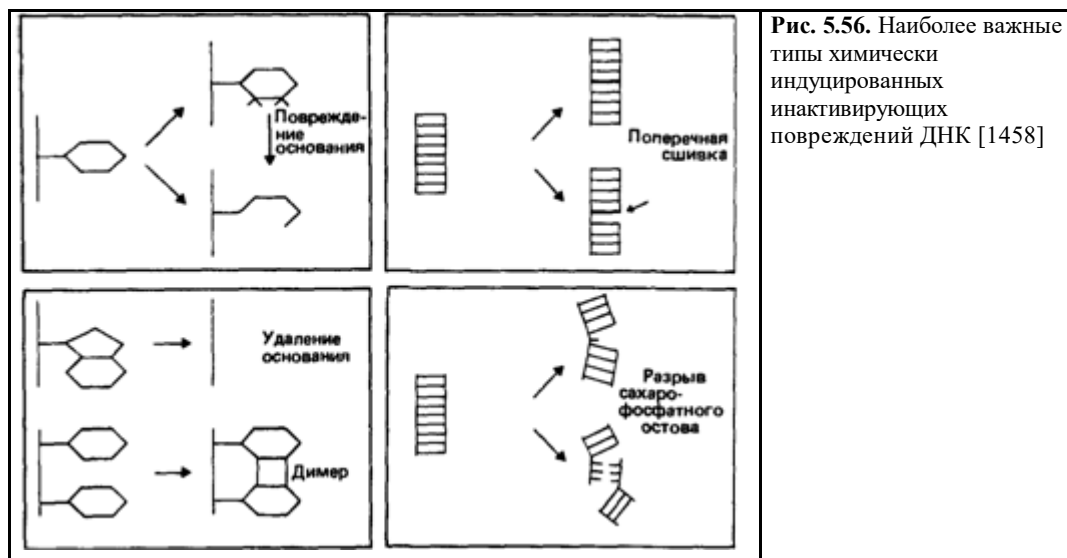


Рис. 5.56. Наиболее важные типы химически индуцированных инактивирующих повреждений ДНК [1458]

ность оснований. Некоторые мутагены вроде БУДР действуют только на реплицирующуюся ДНК, так как они должны включиться в нее. Другие, подобно азотистой кислоте, влияют и на покоящуюся ДНК. Большинство химических веществ, индуцирующих мутагенные повреждения, способны также индуцировать инактивирующие повреждения. С другой стороны, некоторые инактивирующие агенты не индуцируют точковых мутаций.

Обратите внимание, что точковые мутации, вызванные изменением одного основания, затрагивают лишь одну из цепей ДНК. Поэтому они передаются только одному из двух продуктов деления (рис. 5.56). Этого же следует ожидать в случае спонтанных мутаций, обусловленных таутомерным превращением нормальных оснований (разд. 5.1.3.5). Действительно, существуют некоторые полученные на людях данные, свидетельствующие о том, что такие мутации, если они происходят в половой клетке в течение или после последнего митотического деления, приводят к появлению особого типа мозаиков, у которых половина клеток тела содержит мутации [676]. С другой стороны, радиационно-индуцированные точковые мутации обычно передаются обоим продуктам деления; это показывает, что первичный дефект в этом случае, возможно, инактивирующего типа (рис. 5.56), а выживаемость клеток обеспечивается репаративными процессами.

Есть химические соединения, которые не влияют на саму ДНК, но нарушают репаративные процессы. Наиболее широко известен среди них - кофеин. Это вещество не индуцирует каких-либо хромосомных аномалий у млекопитающих, согласно результатам, полученным в тест-системах *in vivo*, однако в его присутствии в культурах лимфоцитов человека обнаруживаются хромосомные бреши и разрывы. Вероятно, условия культивирования приводят к значительным повреждениям ДНК, которые в норме репарируются, а в присутствии кофеина - нет. Доказательство, что кофеин действительно является ингибитором репарации, получено в исследованиях на низших организмах [1419; 1604]. При применении вместе с алкилирующим мутагеном кофеин увеличивал число хромосомных разрывов и транслокаций в клетках костного мозга китайского хомячка. Такие синергические эффекты мутагенных агентов легко могут пройти незамеченными и могут иметь важное значение для людей, подвергающихся воздействию разнообразных потенциальных мутагенов.

Трудности, связанные с выработкой стратегии выявления генетической опасности химических мутагенов. Как показано в

разд. 5.2.1.2, оценка генетической опасности ионизирующей радиации - сложный, многоэтапный процесс. Чтобы оценить риск, обусловленный химическими мутагенами, необходимо провести еще более сложный анализ.

1. Несмотря на существование различных источников, общие биологические эффекты радиации разных типов (рентгеновских и γ -лучей, нейтронов и т. д.) очень сходны. В противоположность этому бесчисленное множество химических мутагенов по-разному взаимодействует с молекулой ДНК. Спектры их биологического действия различны, хотя и обнаруживают частичное перекрывание.

2. Радиация частично поглощается тканью, покрывающей облучаемые клетки (например, половые), однако ее качество не изменяется. Химические мутагены проходят через метаболическую систему организма и самыми непредсказуемыми путями превращаются в другие соединения. При этом они могут потерять свою мутагенную активность, а могут приобрести такие мутагенные свойства, которые отсутствовали у исходного соединения. Особую опасность представляют немутагенные химические вещества, которые, включившись в метаболизм, превращаются в мутагены. Эта опасность связана с тем, что они могут легко уйти от обнаружения современными методами скринирования (разд. 5.2.1.2). В качестве примера приведем циклофосамид - широко используемый цитостатик. Это соединение само по себе не мутагенно, но в организме млекопитающих превращается в высокомутагенные соединения [212].

Изменение свойств соединений в организме - только одна из встречающихся здесь сложностей. Другие трудности связаны с поглощением, распределением по разным системам органов и выделением или, если выделение невозможно, накоплением этих веществ. В каждом случае необходимо проанализировать все эти фармакокинетические аспекты и для самого соединения, и для его метаболитов.

Экстраполяция на людей данных, полученных на экспериментальных животных, и данных об одном человеке на другого человека. Токсикологические исследования обычно проводятся на лабораторных млекопитающих, например на мышах и крысах. Работая с такими объектами, мы используем в наших интересах филогенетическое родство всех видов млекопитающих, которое обуславливает сходство основных метаболических путей, позволяющее проводить корректные экстраполяции. Однако это сходство вовсе не является всеобъемлющим. В то время как основные, главные пути метаболизма обладают межвидовым сходством, существуют многочисленные небольшие различия в метаболических путях разных млекопитающих [1697]. Даже внутри человеческого вида обнаружен генетический полиморфизм, влияющий на метаболизм химических веществ; изучение этого феномена входит в задачи фармакогенетики (разд. 4.5.1). В качестве примера приведем полиморфизм ацетилтрансферазы, обуславливающий быстрое или медленное выведение противотуберкулезного препарата изониазида у разных индивидов, и генетические различия в действии арилгидрокарбогидроксилазы, влияющей на метаболизм канцерогенных ароматических углеводородных соединений. Следовательно, результаты токсикологических исследований на экспериментальных млекопитающих не могут быть непосредственно экстраполированы на человека.

Различия между химическими мутагенами и ионизирующей радиацией и между различными классами химических мутагенов по способности индуцировать геномные и хромосомные мутации. До сих пор все наши рассуждения были теоретическими и основывались на общих сведениях о метаболизме лекарств или же носили косвенный характер, основываясь главным образом на экспериментальных результатах, полученных в молекулярной биологии. Существуют ли прямые данные, свидетельствующие о различиях между классами мутагенов по их действию на клетки, особенно - половые клетки млекопитающих?

Такие данные, действительно, сущест-

вуют. Достаточно привести два примера. Тест на доминантные летали описан в разд. 5.2.1.2. Для изучения индукции доминантных деталей на разных стадиях сперматогенеза у мышей самцов обрабатывают мутагеном и в течение трех последующих дней скрещивают с девственными самками. Самок забивают примерно на 15-й день беременности и производят подсчет мертвых и живых имплантаций. Все мертвые имплантации причисляются к доминантным деталям. Этот эксперимент позволяет проводить тестирование относительной чувствительности к мутагену на разных стадиях развития половых клеток. Потомство самок, скрещивавшихся сразу после воздействия на самцов, получило отцовские хромосомы, обработанные на стадии зрелых сперматозоидов. Потомки от скрещиваний, состоявшихся приблизительно через 50 дней после воздействия мутагеном, произошли в результате оплодотворения сперматозоидами, обработанными на стадии сперматогониев.

Характер чувствительности половой клетки варьирует. В то время как акридиновое производное *трипафлавин* воздействует на половые клетки всех стадий приблизительно в одинаковой степени, *тренимоном* из этилениминовых соединений -индуцирует доминантные летали почти исключительно на постмейотических стадиях развития половых клеток; *митомицин С* и этилнитрозомочевина дают максимальный эффект перед мейозом [1376]. Различие между тренимоном и трипафлавином вполне объяснимо. Из экспериментов на бактериях известно, что трипафлавин, будучи акридиновым соединением, индуцирует в основном мутации сдвига рамки считывания (табл. 5.31), проходящие через мейотический фильтр, тогда как тренимон вызывает числовые и структурные хромосомные aberrации, эффективно «уничтожаемые» мейозом. Что касается различия между эффектами митомицина С и тренимона, то мы не можем предположить никакого удовлетворительного объяснения. Этот пример показывает возможный порядок величины специфичности клеточных стадий. Большинство алкилирующих веществ проявляют максимальное мутагенное действие на мужские половые клетки на постмейотических стадиях. Эти вещества используются в медицине главным образом как цитостатики. Поэтому, если пациент мужского пола хочет иметь детей, следует избегать зачатия в течение первых трех месяцев после окончания лечения.

5.2.2.2. Исследовательские стратегии при оценке генетического риска, обусловленного химическими мутагенами

На какие вопросы мы должны попытаться получить ответ? Ранее мы упомянули, что перед нами поставлены четыре вопроса: как данный фактор действует на генетический материал; насколько сильно воздействует этот фактор на человеческую популяцию; какого можно ожидать увеличения частоты «спонтанных» мутаций и каковы долговременные последствия этого увеличения - четвертый вопрос, ответить на который в настоящее время мы не можем. Он относится к любому типу роста частоты мутаций независимо от их источника. Поэтому последний вопрос далее не будет обсуждаться в этом контексте; мы сосредоточимся на пунктах 1, 2 и 3.

5.2.2.3. Каким образом химические мутагены действуют на генетический материал?

Планирование тестирующих программ. Из предшествующего обсуждения должно быть ясно, что на первый вопрос - действует ли и как действует определенный фактор на генетический материал - мы не можем отвечать абстрактно. В некоторых случаях химический состав соединения помогает нам сформулировать более конкретные гипотезы. Например, можно ожидать, что акридиновое соединение индуцирует главным образом мутации сдвига рамки считывания, а этиленимин и азотистый иприт производят алкилирующие эффекты и индуцируют геномные, хромосомные и генные мутации. Часто вещество разлагается столь быстро, что опасность мутагенного эффекта оказывается очень небольшой. Химический состав соединений может вообще не давать никакого намека на их мутагенные свойства, и тем не менее эти соеди-

нения могут оказаться способными индуцировать мутации с помощью какого-нибудь неизвестного механизма. Поэтому любое новое вещество, используемое людьми, должно проходить проверку на мутагенность.

Наличие громадного числа веществ, уже применяемых в качестве фармацевтических препаратов, пестицидов, косметических средств и для многих других целей, а также огромное число соединений, постоянно вводимых в окружающую среду, создает трудности при их проверке. Можно предложить два довольно простых правила, которые помогают в выработке приемлемых решений [1684]:

1. Определите точно, что вы хотите узнать. Проводите как можно меньше экстраполяции.

Если вы вынуждены экстраполировать, отдавайте себе полный отчет в существовании проблем, возникающих на каждом шаге экстраполяции.

2. Планируйте свою программу проверки так, чтобы получить ответ на конкретные вопросы.

Определите точно, что вы хотите узнать. Экстраполяции, осуществляемые в программах тестирования на мутагенность, это экстраполяции данных, полученных с использованием других тест-систем на людей, данных о мутациях одного типа на мутации иного типа, данных об одних тканях на другие ткани и результатов, полученных при высоких дозах на ситуации, связанные с воздействием низких доз.

Мы не можем проводить эксперименты на половых клетках человека. Поэтому экстраполяции данных, полученных на других организмах, неизбежны. Эти организмы должны находиться в близком филогенетическом родстве с человеком, настолько близком, насколько это вообще возможно. По практическим соображениям работы следует проводить на лабораторных млекопитающих, используемых в радиационной генетике - мышах, китайских хомячках, крысах. Результаты, полученные на более отдаленных в филогенетическом смысле видах, таких как бактерии или *Drosophila*, дадут очень мало данных, применимых к человеку. Поэтому следует использовать любую представившуюся возможность для изучения популяционных групп людей, подвергающихся воздействию вероятных мутагенов. Ключ к решению проблемы могут дать исследования по выявлению в соматических клетках хромосомных aberrаций, сестринских хроматидных обменов [1482] и биохимических точковых мутаций. Обзор методов обнаружения мутаций у млекопитающих дается в разд. 5.2.1.2. Геномные и хромосомные мутации в настоящее время могут быть обнаружены почти на всех стадиях развития. В радиационной генетике возможно осуществление определенных экстраполяции на генные мутации, поскольку радиация индуцирует как хромосомные, так и генные мутации, а чувствительность присуща одним и тем же стадиям клеточного развития. Однако для многих химических мутагенов провести такую экстраполяцию гораздо сложнее. Некоторые соединения могут индуцировать генные мутации, но почти не индуцируют хромосомных мутаций. Поэтому здесь существует более настоятельная потребность в специальном поиске генных мутаций, чем в радиационной генетике. К сожалению, наш арсенал методов их обнаружения беднее, чем арсенал методов, применяемых для выявления геномных и хромосомных мутаций. Многолокусный тест, несмотря на свою пригодность с теоретической точки зрения, отнимает слишком много времени и слишком дорог для рутинного применения. Он, однако, очень полезен для тестирования небольшого числа веществ, относительно которых возникли на основании результатов, полученных более быстрыми, но менее надежными методами (см. ниже), подозрения, что они мутагенны. То же самое приложимо к индукции доминантных мутаций, приводящих к скелетным аномалиям или катарактам [1440]. Методы скринирования мутаций на ферментативном или белковом уровне все еще находятся в развитии. Биохимическая изменчивость, обнаруженная в отдельных клетках, не может быть с уверенностью идентифицирована как мутационная по происхождению. Можно было бы ожидать сосредоточения усилий на дальнейшем совершенствовании методов скринирования белков и фермен-

тов. Однако в действительности существует другая тенденция. Более легкий подход к решению проблемы обещают так называемые опосредованные хозяином тесты. Культуру бактерии или гриба выращивают в брюшной полости мыши. Химическое вещество вводится мышам путем инъекции или с пищей. Затем оно претерпевает ряд метаболических превращений в организме животного и вступает в контакт со штаммом, скринируемым на точковые мутации. На первый взгляд, этот метод представляется довольно изящным. Он учитывает метаболические изменения, которые химическое вещество может претерпевать в организме млекопитающего. Однако генетический материал, подлежащий тестированию, принадлежит бактерии, а опыт показал, что разные бактерии могут по-разному реагировать на одни и те же мутагены: у одних мутации возникают, у других не возникают [1592]. В последние годы приобрел популярность другой похожий подход. Большинство ферментов, метаболизирующих лекарства, обнаруживается в микросомальной фракции клеток печени. Поэтому тестируемое химическое вещество подвергается воздействию препаратов микросом *in vitro*, а затем проверяется на мутагенность в бактериальной тест-системе (тест Эймса). Эти методы могут давать кое-какую информацию, полезную для идентификации потенциальных мутагенов. Особенно ценным для скринирования огромного числа соединений оказался тест Эймса.

Тест Эймса для скринирования канцерогенов. В настоящее время появляется все больше и больше данных, свидетельствующих о том, что рак, по крайней мере во многих случаях, обусловлен возникновением соматических мутаций (разд. 5.1.6). Поэтому не удивительно, что многие мутагены одновременно являются канцерогенами и наоборот, многие соединения, известные как канцерогены, оказывают мутагенное действие. Сегодня тестирование на канцерогенность с использованием животных отнимает много времени и требует больших затрат. Необходимо было ввести в практику какой-либо быстрый метод тестирования на мутагенность. Именно таким методом является упоминавшийся выше тест Эймса, его и решили использовать в качестве скринирующего теста на потенциальные канцерогены. При изучении 300 различных соединений, канцерогенных и неканцерогенных, 157 из 175 канцерогенов проявили в этом тесте и мутагенность [1553, 1554]. Только очень немногие неканцерогены обнаружили мутагенную активность. Этот результат широко обсуждался в последние годы; бесспорно, что некоторые канцерогены, по-видимому, не поддаются обнаружению, поскольку они не осуществляют свое действие через повреждение ДНК. В общем, проблема экстраполяции с бактериального на человеческий геном и результатов опытов *in vitro* на условия *in vivo* сходна с проблемами, встретившимися при тестировании на мутагенность половых клеток. Можно надеяться, что этот метод окажется эффективным при тестировании на мутагенность химических веществ из окружающей среды, так как он позволяет в течение короткого времени проверить гораздо больше соединений, чем методы *in vivo*. Однако он не может заменить методов *in vivo*.

Метаболизм. Другой важный фактор, влияющий на вероятность мутагенеза и канцерогенеза, связан с генетически детерминированными различиями в метаболизме чужеродных веществ, включая лекарства и агенты окружающей среды (ксенобиотики). Современные данные показывают, что идентичные близнецы обнаруживают одинаковые скорости биотрансформации лекарств, несмотря на значительную изменчивость параметров биотрансформации в общей популяции (разд. 4.5). Таким образом, генетические факторы, по-видимому, имеют основное значение при разложении ксенобиотиков. Например, работы на мышах и на людях показали, что гидроксилаза арил-углеводородов играет важную роль в превращении полициклических углеводородов в эпоксиды. Эпоксидные соединения гораздо более канцерогенны, чем углеводороды. Говоря шире, небольшая часть популяции, объединяющая индивидов, медленно инактивирующих ксенобиотик или трансформирующих данный ксенобиотик в активный мутагенный агент, будет подвержена гораздо большему риску, чем популяция в целом. Никакая тест-система с использованием экспериментальных животных не может пролить свет на этот важный аспект мутагенеза, обусловленного факторами окружающей среды. Поэтому может оказаться полезным включение в тест Эймса (см. выше) человеческого кле-

точного материала от многих различных индивидов (образцов печени плода, взятых у абортусов) с целью нахождения возможных различий, обусловленных изменчивостью людей по метаболизму ксенобиотических веществ. Методы скринирования мутантов путем изучения полиморфизма ферментов и белков в человеческих популяциях позволяют непосредственно выявлять многие мутации, однако установить при этом факт участия специфического вредного агента окружающей среды намного сложнее (см. ниже).

Тканевые различия в индукции мутаций. Третья экстраполяция - это экстраполяция с одной ткани на другую. Хромосомные мутации, например, можно легко проанализировать в костном мозге мышей или китайских хомячков или в культурах лимфоцитов человека. Было бы заманчиво провести экстраполяцию с этих соматических клеток на половые клетки. Однако опыт, полученный в радиационной генетике, показал, что чувствительность половых клеток может очень отличаться от чувствительности других клеток (разд. 5.2.1.3). Для практических целей не так важно, обусловлены ли эти различия клеточным отбором или действительными различиями в индукции мутаций. Кроме того, у обоих полов отмечена неодинаковая чувствительность на разных стадиях развития половых клеток. По всем этим причинам проверка на мутагенность в соматических клетках не может дать информации, необходимой для вычисления оценок генетического риска. Однако методы цитогенетического тестирования *in vivo* очень ценны для получения оценок риска возникновения соматических мутаций, особенно тех из них, которые, возможно, приводят к раку.

При наличии генетического риска для потомства тестирование следует проводить на половых клетках млекопитающих. Если вещество оказывается мутагенным, необходимо учитывать возможные различия в метаболизме этого соединения между тестируемым животным и человеком, а также между индивидами внутри человеческой популяции.

Экстраполяция с высоких доз на низкие. Четвертая экстраполяция, часто бывающая необходимой, - это экстраполяция с высоких на низкие дозы химического вещества. Обычно в случае фармацевтических средств эта проблема не возникает, поскольку лекарства часто применяют в довольно высоких дозах. Такая проблема встречается главным образом, когда мы имеем дело с так называемыми мутагенами окружающей среды, то есть соединениями, которые воздействуют на многих людей в относительно низких дозах, но в течение длительного времени. В данном случае следует планировать эксперименты на животных, как можно лучше имитирующие реальную ситуацию, например подвергать их воздействию низких доз с течением 1-2 лет. Подобные опыты на мышах проводились с использованием кофеина и дали, к счастью для всех любителей кофе, отрицательные результаты [212]. Естественно, однако, что такие эксперименты дороги и отнимают много времени. Тем не менее их следует планировать для всех химических веществ, которые воздействуют на людей и которые проявили мутагенность при высоких дозах. Если мутагенные эффекты доказаны в случае приемлемо высоких доз, т. е. доз, не убивающих животное в результате другого, токсического воздействия, разумно считать это соединение мутагенным и при более низких дозах, если не доказано обратное.

Пороги в случае мутагенеза, вызванного факторами окружающей среды. При интерпретации результатов тестирования химических мутагенов следует рассмотреть концепцию порога. Обычно полагают, что появление случаев рака, обусловленных мутациями, прямо зависит от дозы. В этой концепции подразумевается, что в типичном токсикологическом исследовании осуществляется воздействие высоких доз вещества на относительно небольшое число животных. Если при высоких дозах развивается рак, эти результаты экстраполируют на низкие дозовые уровни (обычно и оказывающие влияние на человеческую популяцию) и предполагают, что это соединение канцерогенно. Такая экстраполяция пред-

ставляется приемлемой, если не существует никакого порога, при воздействиях ниже которого рак, вероятно, не развивается. Полное и неопровержимое с научной точки зрения доказательство того, что порогов не существует, потребовало бы использования для каждого тестируемого вещества непомерно большого числа животных. Поскольку никаких исследований такого рода не проводилось, в целях максимального обеспечения защиты человеческого вида следует принимать пороговую модель (т. е. проводить линейную экстраполяцию к низким дозам). Должно быть ясно, однако, что если порог существует, экстраполяции этого типа будут вводить в заблуждение. Наличие такого порога с биологической точки зрения вполне реально ввиду наличия ферментов, репарирующих мутационные повреждения. Все эти соображения относительно канцерогенеза в равной мере приложимы к индукции мутаций в половых клетках. Иногда можно избежать выполнения необходимой здесь сложной и дорогой тестирующей программы.

Планируйте свою программу тестирования так, чтобы получить ответы на конкретные вопросы. Не каждое химическое вещество надо проверять на все возможные генетические эффекты в половых и соматических клетках. Программа проверки зависит от целей, которым служит данное соединение. Например, противозачаточные пилюли, воздействию которых подвергаются многие представительницы нашего вида, должны пройти тщательное тестирование на любую мутагенную активность в ходе оогенеза, особенно в течение «чувствительного» периода до и вскоре после зачатия. Однако было бы неразумно тестировать противозачаточные пилюли на мутагенность в мужских половых клетках.

Недавно было достигнуто согласие между множеством комитетов, занимающихся разработкой принципов проверки предлагаемых для широкого применения веществ на индукцию мутаций: вначале используются быстрые и недорогие методы вроде теста Эймса на точковые мутации и микронуклеусного теста на хромосомные aberrации [212]. Если эти тесты выявляют мутагенность, применяются более «подходящие», но занимающие много времени тесты *in vivo* на млекопитающих [1425]. Эта процедура сопряжена с риском потери веществ, давших «ложные отрицательные результаты» в простых тестах. Этого риска можно отчасти избежать, если вещества, имеющие особенно широкое использование и (или) подозреваемые на мутагенность на основании их химической структуры, тестируются в более «подходящих» системах, несмотря на отрицательные результаты, полученные в простых тестах.

5.2.2.4. Насколько широким является воздействие агента на человеческую популяцию?

Важный, но часто игнорируемый вопрос. Вопрос о том, насколько широко человеческие популяции подвергаются воздействию данного агента - решающий при получении любой оценки генетической опасности, связанной с химическими мутагенами. Это соображение иногда упускают из виду в дискуссиях, посвященных химическим мутагенам. Здесь опять, как и в случае многих других проблем, наиболее правдоподобное объяснение можно найти, обратившись к социологии науки. Большинство научных работников, занимающихся проблемами химического мутагенеза, - это специалисты в области экспериментальной генетики с опытом изучения мутаций в определенных тест-системах, например на мышах, хромосомах человека или бактериях. Вполне понятно, что их основной заботой является эффективность методов тестирования. Токсикологи, работающие в фармацевтических компаниях, которые заимствуют эти методы в целях практического их использования, обычно не знакомы с генетическими специальностями. Эпидемиологи, с другой стороны, часто очень мало интересуются генетикой и не проявляют активного интереса к проблемам мутагенеза.

Проблему воздействия мутагена на популяцию можно решить, ответив на следующие вопросы.

1. Сколько людей подвергается воздействию определенного мутагенного агента?
2. Какие применяются дозы этого агента и на протяжении какого времени?
3. Способны ли к размножению (и если да, то в какой степени) индивиды, подвергающиеся воздействию агента? Не стра-

дают ли они заболеваниями, которые не позволяют им обзавестись детьми? 4. Обнаруживают ли их потомки признаки, указывающие на генетическое повреждение? На первые три вопроса можно дать приблизительные ответы, используя данные, содержащиеся в публикациях по статистике и по медицине.

Воздействие на популяцию часто употребляемых лекарств. Изониазид - это часто используемое лекарство для лечения туберкулеза - болезни, поражающей людей всех возрастных групп. Мутагенная активность изониазида неоднократно демонстрировалась на бактериях с использованием теста в хозяине-посреднике. При исследовании полинуклеотидов *in vitro* этот препарат ингибировал транскрипцию [1514], а в клетках китайского хомячка, культивируемых *in vitro*, снижал пострепликативную репарацию [1515]. С другой стороны, комплексная исследовательская программа с использованием многих различных тест-систем для хромосомных aberrаций на млекопитающих *in vivo* не дала четких данных, свидетельствующих об увеличении частоты спонтанных мутаций [1605]. Однако индукция точковых мутаций не может быть проверена в системах на млекопитающих *in vivo*. Лекарство этого типа несомненно заслуживает внимания с точки зрения его воздействия на популяцию.

Такое исследование было проведено в Западной Германии в 1970 г. Оказалось, что более 35% всей популяции принимающих это лекарство находилось в репродуктивном возрасте. Если исходить из предположения, что репродукция туберкулезных больных такая же, как и у их сверстников того же пола из популяции здоровых людей, следует, согласно полученной оценке, ожидать, что они будут производить 5600 детей в год. Это означает, что каждый 162-й ребенок испытывает риск как рожденный в браке, где один из супругов лечился от туберкулеза. Если это соединение мутагенно, наличие такой долиотягощенных детей свидетельствовало бы о существовании небольшого, но не пренебрежимо малого популяционного груза [1629].

Популяционный эффект высоко мутагенных лекарств. В случае цитостатических медикаментов ситуация совершенно иная. Здесь мутагенность бесспорна. Однако анализ не может быть достаточно точным, если используются только опубликованные или доступные статистические данные. Средняя вероятная продолжительность жизни в начале лечения обычно очень невелика. Кроме того, больные раком, лечившиеся с применением этих лекарств, обычно имеют плохое общее здоровье, так что их репродукция не может считаться такой же, как и воспроизведение популяции индивидов, не лечившихся цитостатиками. В анализ необходимо ввести дополнительный этап, на котором проводится специальное определение числа детей, рожденных пациентами после начала лечения. Это было сделано в другом популяционном исследовании, выполненном в Западной Германии [1680]. Полученные результаты показали, что у пациентов, лечившихся цитостатиками, рождается в среднем только 23 ребенка в год. Следовательно, лечение цитостатиками не приведет к заметному увеличению общей частоты мутаций в популяции. Однако этот вывод будет правомерен лишь до тех пор, пока терапия с помощью цитостатиков ограничена раковыми заболеваниями и небольшим числом других редких болезней. Появившаяся недавно тенденция расширить круг соответствующих показаний к лечению цитостатиками других пациентов может изменить эту картину.

Подобные исследования необходимы и в случае других химических веществ. Два процитированных исследования, выполненные в Западной Германии, показывают, что имеющаяся информация иногда дает возможность оценить добавочный груз мутаций, вызываемых определенными соединениями, если только это соединение оказалось мутагенным для человека. Результаты, касающиеся изониазида, с одной стороны, и цитостатиков, с другой, были по существу отрицательными, но по разным причинам. Мутагенность изониазида не могла бы найти подтверждения в использовавшихся до сих пор тест-системах на млекопитающих. Что касается генных мутаций, то вопрос

остается открытым. Хотя цитостатики бесспорно мутагенны, репродукция популяции подвергавшихся их воздействию индивидов осуществляется в столь малых объемах, что для всей популяции никакого генетического риска в сущности нет.

В тех случаях, когда данные свидетельствуют о мутагенности в соответствующих экспериментах *in vivo* на млекопитающих, величину дополнительного мутационного груза можно оценить путем экстраполяции величин, полученных в этих экспериментах. Пришло время получать подобные оценки для всех лекарств или химических веществ из окружающей среды, проявивших мутагенность. Таким способом можно рассчитать по крайней мере минимальную оценку дополнительного генетического груза, обусловленного химически индуцированными мутациями. Эта информация крайне необходима. Делая возможные выводы, мы должны всегда иметь в виду, что хотя воздействие любого конкретного соединения может быть слабым, совокупное действие огромного множества вероятных мутагенных соединений может оказаться вполне ощутимым.

В разд. 5.2.1.4 обсуждалось влияние на человеческие популяции ионизирующей радиации. Приведенные данные были отобраны из громадного количества материалов, систематически собиравшихся в течение длительного времени во многих странах и касающихся многих популяций. Пока объем работы, проделанной в этих направлениях для оценки воздействия химических мутагенов на человека, невелик.

5.2.2.5. Какого увеличения частоты спонтанных мутаций, обусловленного химическими мутагенами, следует ожидать?

Химически индуцированные мутации в сравнении с радиационно-индуцированными мутациями. В разд. 5.2.1.5 мы не могли дать четкого ответа на вопрос об увеличении частоты мутаций под воздействием ионизирующей радиации. Ожидаемый порядок величины можно было определить более или менее точно только для структурных aberrаций хромосом и (с некоторыми оговорками) для доминантных и Х-сцепленных генных мутаций. Эта неопределенность обусловлена главным образом нашим незнанием «базового уровня», т. е. общей частоты спонтанных мутаций у людей. Тот же элемент неопределенности затруднил бы любую попытку получить оценку увеличения частоты мутаций, вызванного химическими мутагенами. Однако в отличие от ситуации в радиационной генетике здесь не хватает также и другой, довольно существенной информации. Мы очень мало знаем о том, какова в действительности величина популяций, подвергающихся воздействию известных мутагенов. Наши знания о механизмах действия многих из этих соединений фрагментарны. Мы не имеем точных представлений о чувствительности разных клеточных стадий, о мутациях, индуцируемых в половых и в соматических клетках, об индукции геномных, хромосомных и генных мутаций и о соответствующей фармакокинетике. Для громадного числа соединений, воздействию которых подвергаются люди, неизвестно, мутагенны ли они для млекопитающих. Риск несколько выше, когда мутагенность вещества доказана на других организмах, например на бактериях, бактериофагах, грибах или *Drosophila*. Однако, как показал случай с кофеином, даже обнаружение хромосомных разрывов в культурах лимфоцитов человека не является доказательством мутагенной активности соединения в живом организме. Для многих веществ пока недостает достаточно удовлетворительных исследований *in vivo* на тест-системах с использованием млекопитающих.

По образному сравнению Грюнеберга [1470], риск, обусловленный радиацией, напоминает риск, которому мы подвергаемся, переходя улицу в потоке автомобильного транспорта: можно приближенно оценить повышенную частоту и в какой-то степени принять адекватные меры предосторожности. С другой стороны, риск, обусловленный химическими мутагенами, напоминает риск, сопряженный с ночной прогулкой в джунглях. Треск в нижнем ярусе тропического леса и таинственные звуки, возможно, сигнализируют о неизвестных скрытых опасностях.

Мониторинг человеческих популяций с целью обнаружения повышенных мутационных частот. Возникает весьма заманчивая идея: не организовать ли мониторинг больших популяций для поиска мутаций *de novo*? Мы сумели бы непосредственно наблюдать любое увеличение генных частот и могли бы попытаться связать его с радиацией, химическими мутагенами или другими возможными факторами.

Существуют различные возможные варианты отбора признаков, которые будут выявляться в ходе такого мониторинга. Можно, например, проводить скрининг на некоторые «сторожевые» мутации - доминантные мутации, дающие специфические фенотипы, для которых довольно хорошо известны частоты спонтанных мутаций (табл. 5.8). Однако число индивидов, которых необходимо обследовать, составляет несколько миллионов; мутации, приводящие к специфическому фенотипу, редки и их выявление вызывает трудности, связанные с диагностикой. Необходима высококвалифицированная медицинская экспертиза, чтобы исключить фенкопии. Хотя у нас есть возможность получить надежную оценку *порядка величины* частоты мутаций, получение достоверной оценки ее *увеличения* представляет большие трудности. Возможная альтернатива заключается в проведении скрининга на геномные и хромосомные мутации. Технически такая задача была бы намного проще, поскольку мутации указанных типов встречаются чаще, но этот подход не дает информации о генных мутациях.

Наиболее подходящий, но в то же время наиболее сложный в методическом плане подход - исследование популяционных выборок, в ходе которого идентифицируют генетически детерминированные варианты белков и ферментов крови и для каждого редкого варианта выясняют, получен ли он от одного из родителей (что обычно бывает) или представляет собой мутацию *de novo* [1577; 1578]. Мы только должны быть уверены в том, что изучаем редкие варианты, и не включать в анализ многочисленные, часто встречающиеся полиморфные варианты.

Исследования такого рода сопряжены с многими проблемами. Самые важные из них - статистические. Частоты спонтанных мутаций на уровне белков очень низки (разд. 5.1.4). Поэтому для достоверного обнаружения ощутимого увеличения частоты мутаций необходимы выборки больших размеров [1652; 1672; 1679].

Вопрос можно поставить так: насколько точно можно оценить истинное соотношение (t)

$$t' = \frac{\mu_2}{\mu_1}$$

между мутационными частотами в двух популяциях или временных периодах из наблюдаемого соотношения (t)

$$t' = \frac{x_2}{x_1},$$

если x_1 и x_2 наблюдаемые численности мутантов *de novo* в двух популяциях? Можно показать, что t' с вероятностью $P = 0,95$ заключено в определенных пределах, зависящих от фактического соотношения t .

$$t' = t \pm 2t \sqrt{\frac{3,8}{x_{1,2}}}; \quad \frac{|t' - t|}{t} = 2 \sqrt{\frac{3,8}{x_{1,2}}},$$

где $x_{1,2}$ размер выборки, состоящей из двух объединенных выборок x_1 и x_2 . На рис. 5.57 показаны доверительные интервалы для наблюдаемого соотношения t' (ордината), зависящие от совместного объема обеих выборок и фактического соотношения (абсцисса). Например, если фактическое соотношение t равно 1,3, т.е. если частота мутации во второй выборке в 1,3 раза больше частоты мутации в первой выборке, то для обнаружения увеличения требуется 500 мутантов *de novo* и в этом случае наблюдаемое соотношение t' было бы с 95%-ной вероятностью заключено между ~ 1,08 и ~ 1,52. Эти цифры следует сравнить с частотами спонтанных мутаций у человека, а именно с частотами возможных «сторожевых» мутаций человека (разд. 5.1.3, табл. 5.8), хромосомных и геномных мутаций (разд. 5.1.2, табл. 5.3), чтобы получить некоторое представление об истинном объеме проблемы. Коекакими данными мы располагаем. Среди 133 478 аллелей многих индивидов, изучавшихся в Гальтоновской лаборатории (Лондон), было найдено 77 редких биохимических вариантов, и каждый из этих биохимических вариантов, как выяснилось, был получен пробандом от одного из его родителей. Ни одной мутации *de novo* не обнаружено. Эти данные позволяют вычислить максимальную частоту мутаций для упомянутых биохимических вариантов, которая оказалась равной $2,24 \times 10^{-5}$ на ген на поколение [1788].

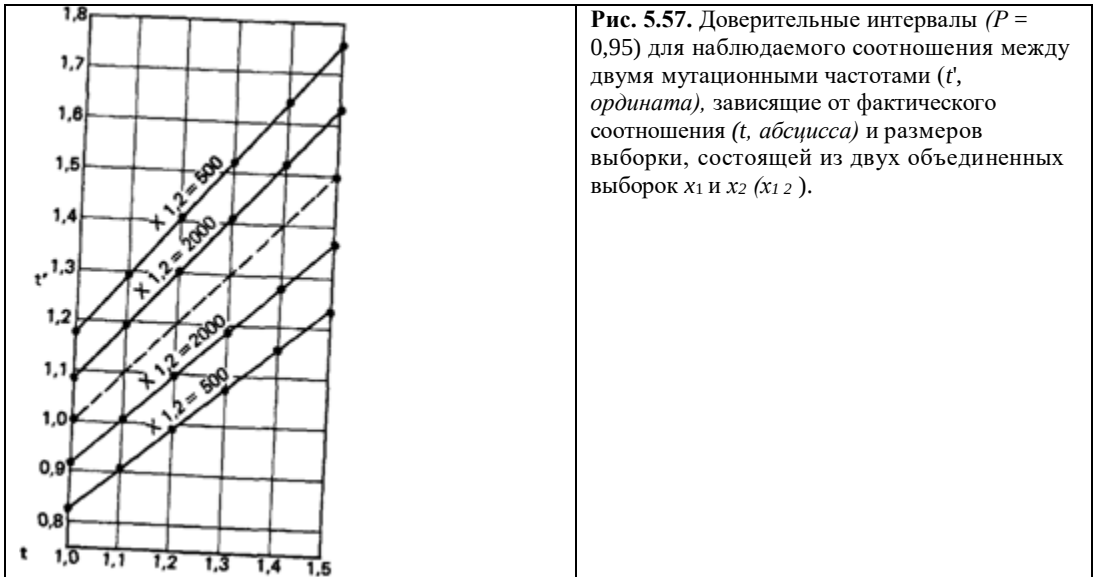


Рис. 5.57. Доверительные интервалы ($P = 0,95$) для наблюдаемого соотношения между двумя мутационными частотами (t' , ордината), зависящие от фактического соотношения (t , абсцисса) и размеров выборки, состоящей из двух объединенных выборок x_1 и x_2 ($x_1 + x_2$).

Геномные и хромосомные мутации часто происходят спонтанно. Для обнаружения значимого увеличения частоты мутаций в случае обычных доминантных генетических заболеваний необходимо на протяжении десятилетий проводить поголовный скрининг популяций больших стран. В случае мутаций, идентифицируемых на белковом уровне, большая и в высшей степени хорошо организованная программа будет успешной, если соответствующим образом увеличить число генов, проходящих скринирование [1577; 1575]. Предложено два различных подхода. В первом [1574; 1575] используют образцы пуповинной крови, отобранные из плаценты (детского места) сразу после родов. Одновременно производят отбор проб крови у обоих родителей. В этих образцах исследуют максимально возможное число систем электрофоретического полиморфизма и количественно оценивают активность некоторых ферментов. Такая программа нуждается в специальной организации для обеспечения взаимодействия с родителями и сбора крови. Вот почему данный метод может быть использован во всех ситуациях, когда относительно небольшие популяции подвергаются потенциально высокому риску и надо получить максимальное количество информации от небольшого числа индивидов. Однако при продолжительном мониторинге популяций, состоящих из миллионов людей, такие программы неосуществимы. В этом случае следует выяснить, нет ли подходящих биологических образцов, которые были собраны для других целей, но могут быть также использованы для мониторинга мутаций. Как отмечалось в разд. 4.2.2.7, новорожденные скринируются на фенилкетонурию (ФКУ) и другие наследственные болезни метаболизма. В случае ФКУ обычно применяют тест Гутри: анализируют пятна крови, высушенные на бумаге. Эти пятна можно проверять на варианты гемоглобина [1679] и на большое число других генных продуктов [1373]. Метод быстрый и дешевый, удобный не только методически, но и с точки зрения его материального обеспечения. Например, образцы нумеруются только во время проведения анализов; имена и адреса в тех немногих случаях, где был найден редкий вариант и требовалось провести исследование родителей (чтобы выяснить, не несет ли один из них этот вариант, нет ли здесь ложного отцовства и действительно ли этот вариант представляет собой мутацию *de novo*), можно легко восстановить по регистрационным книгам, в которых фиксируются результаты скрининга на ФКУ. Как отмечалось в разд. 5.1.4, в одном таком побочном исследовании, охватившем 25 000 новорожденных, была обнаружена одна новая мутация Hba. Прежде чем приступить к осуществлению этой программы в рамках широкомасштабного популяционного мониторинга, необходимо организовать такое взаимодействие внутри научного сообщества, чтобы каждый вариант, который может быть мутантом *de novo*, прошел тщательную проверку (включая проверку ложного отцовства) в лаборатории, имеющей опыт работы в области биохимической генетики человека. Особое внимание следует уделить проблеме отцовства. В западных странах ложное отцовство повсеместно регистри-

руется в небольшой части посемейных исследований, проводимых в рамках других программ. Мутации встречаются гораздо реже, чем ложное отцовство. Однако с увеличением числа систем генетического полиморфизма ложное отцовство может регистрироваться чаще. В конце концов человеческое общество будет располагать информацией о мутационных частотах и их изменениях с изменением условий окружающей, а также генетической среды. Статистические проблемы, связанные с регистрацией факта увеличения частоты мутаций просты, однако и здесь были предложены соответствующие методы [1561]. Важно помнить, что, даже если увеличение частоты мутаций выявлено, задача найти агент или агенты, которые вызвали это увеличение, оказывается крайне трудной.

Отношение современной общественности к тестированию на мутагенность. В настоящее время мало что делается для получения оценок риска, вызванного химическими мутагенами. Существует однако растущая осведомленность, что химические вещества, еще ждущие практического применения, например фармацевтические препараты или пестициды, должны тестироваться на мутагенность. Эта проблема выглядит сложнее в случае химических веществ, уже используемых в течение длительного времени, однако проверка по крайней мере наиболее важных из этих соединений начала проводиться. Следовательно, имеется согласие в том, что химические вещества должны проверяться на мутагенность. Путаница возникает в связи с вопросом о том, как их надо проверять. Изложенные выше принципы, хотя фактически и не оспариваются, далеки от того, чтобы быть принятыми научным сообществом. Кроме того, принцип минимальной экстраполяции требует применения тест-систем *in vivo* с использованием млекопитающих. Такие системы имеются для всех типов мутаций, происходящих в половых клетках и для большинства соматических мутаций, но они обычно требуют больших затрат времени и больших навыков, чем методы с использованием простых тестерных организмов вроде бактерий, плодовых мушек или культур лимфоцитов. Поэтому для лиц, делающих политику, было всегда соблазнительно прибегать к следующему аргументу. Поскольку генетики расходятся в своих рекомендациях и поскольку существует корреляция по индукции мутаций даже между самыми отдаленными в филогенетическом смысле видами, нет необходимости применять дорогие системы *in vivo* с использованием млекопитающих; вполне достаточны простые системы, которые и дешевле, и требуют меньше времени. Часто упускают из виду: что такая политика оставляет без ответа все важные вопросы, касающиеся фазоспецифичности, типа мутаций и большинства фармакокинетических и фармакогенетических проблем, даже если используются микросомы печени, проявляющие изменчивость метаболизма. Более того, различия, обычно обнаруживаемые даже между разными «простыми» системами, делают более чем вероятным то, что многие мутагены останутся невыявленными, даже если работать по следующей схеме:

- 1) проверить большое число соединений в какой-либо простой системе;
- 2) отобрать те из них, которые проявляют мутагенность, и проанализировать в «подходящей» системе *in vivo* с использованием млекопитающих.

Конечно, масштаб проблемы принуждает к компромиссам, и первый шаг, на котором производится быстрое тестирование большого числа веществ (например, на микробных тест-системах с использованием микросом печени млекопитающих), в некоторых случаях может быть неизбежным. Однако не следует упускать из виду возможности получения «ложноотрицательного» результата. Соединения, подозреваемые на мутагенность из-за химического состава или вещества, используемые большим числом индивидов репродуктивного возраста, должны проходить проверку на более адекватных системах, даже если скринирующие системы дали отрицательные результаты.

В настоящее время во многих странах в правительственных организациях, среди ученых, в химических и фармацевтических компаниях ведутся дискуссии относительно выбора стратегии проверки на мутагенность.

Медицинское и социальное значение мутаций различных типов. Для получения полной оценки влияния мутаций на человека необходим анализ типов болезней, обусловленных разными видами мутаций. Все аутосомные трисомии, кроме трисомии по 21-й хромосоме, детальны в раннем детстве; фактически большинство из них abortируется в первом триместре беременности. Наибольшее медицинское значение имеет поэтому синдром Дауна, встречающийся с частотой 1-2/1000. Эти больные страдают глубокой умственной отсталостью и требуют ухода дома или в специальных учреждениях. К гораздо менее тяжким медицинским и социальным последствиям приводят спонтанные выкидыши в результате возникновения хромосомных аномалий или летальных генов. Намного чаще встречаются анеуплоидии по X-хромосоме. Их общее значение для общества определяется главным образом наличием пациентов с кариотипом XXУ (синдромом Клайнфельтера), встречающихся с частотой 1/1000 новорожденных мальчиков. Средний интеллект таких мужчин несколько ниже среднего интеллекта контрольной популяции. Они характеризуются несколько повышенной социопатией и, как правило, бесплодием (раздел 2.2.3.2). Эта трисомия доставляет мало хлопот медицине, ее основное влияние сказывается в личностной и социальной сферах, что труднее оценить количественно. Женские плоды XO обычно abortируются. Если они выживают после рождения, личностные и медицинские проблемы связаны с уменьшенным ростом и бесплодием. Трисомия XXX не имеет явных клинических последствий, но иногда ассоциируется с умственной отсталостью.

Хромосомные мутации, например делеции и транслокации, обычно, если они несбалансированы, приводят к ранней гибели плода. Немногие субъекты с такими мутациями, выживающие после рождения, имеют серьезные пороки развития и требуют постоянного медицинского ухода, но большинство из них гибнет в начале своей жизни. Общее влияние точковых мутаций оценить труднее. Существует множество аутосомно-доминантных и X-сцепленных болезней, поддерживаемых в популяции явно в результате мутационного равновесия (разд. 5.1.3). Однако общая частота всех этих болезней составляет около 1%. Многие из них, как, например, хорea Гентингтона, передаются по наследству; соответствующих новых мутаций обнаружено очень немного или совсем не найдено. При других формах, таких как ахондроплазия, 80% всех случаев составляют мутации *de novo*. Увеличение частоты мутаций привело бы к существенному увеличению числа больных заболеваниями этой группы, в которой в настоящее время большинство больных представлено носителями новых мутаций. Определенная группа доминантных патологий, таких как семейная гиперхолестеринемия и, по-видимому, семейная гипертриглицеридемия, а также комбинированная гиперлипидемия [1109], довольно обычны. Маловероятно, что эти заболевания поддерживаются мутационным равновесием, ведущее значение в поддержании относительно высоких их частот, по-видимому, имеют факторы отбора. Поэтому мутации *de novo* оказывают слабое влияние на их частоту.

Новые мутации в случае аутосомно-рецессивных болезней обычно проявляются лишь в гомозиготном состоянии. Врачи их сумеют обнаружить только в потомстве от брака двух гетерозигот, т.е. влияние этой болезни на популяцию будет отсрочено на много поколений.

Группа мультифакториальных заболеваний включает многие врожденные дефекты, часто встречающиеся болезни среднего возраста, распространенные психозы (шизофрению и аффективные расстройства) и многие случаи умственной отсталости. Общее медицинское и социальное значение этих заболеваний намного выше, чем наследственных болезней в строгом смысле слова. Оценка влияния мутации зависит от генетической модели, отражающей наследственную обусловленность этих заболеваний. Если лежащий в их основе генетический механизм базируется на полиморфной генной изменчивости, примеры которой дают системы HLA и ABO (разд. 3.7), мутации будут малоэффективны, потому

что основной фактор, влияющий на полиморфные системы, - это отбор, а не мутационный процесс (разд. 6.2.1). Если эти патологии обусловлены действием нескольких редких мутантных генов или немногих главных генов, мутации имеют значительный эффект. При почти полном отсутствии точных знаний относительно природы большинства генетических систем, лежащих в основе распространенных заболеваний, мы *не* можем предсказать эффект повышения частоты мутаций.

Возможно, это приведет к широкому распространению заболеваний, которые медицинские генетики обычно не считают наследственными. Необходимы обстоятельные исследования, чтобы выяснить конкретный вклад генетических факторов в эти заболевания.

6. Популяционная генетика

Популяционная генетика отвечает на вопросы о том, как реализуются законы Менделя на уровне популяций, как влияют на генетическую структуру популяций такие факторы, как мутационный процесс, отбор, миграции, случайное изменение генных частот. Знание популяционной генетики необходимо для понимания эпидемиологии наследственных болезней, для планирования мероприятий по предупреждению неблагоприятного воздействия на генетический аппарат факторов окружающей среды. Еще одна сфера приложения популяционно-генетических исследований - теория эволюции, обоснование тенденций биологической эволюции человечества в связи с различными изменениями окружающей среды. Преимуществом популяций человека как «объекта» генетических исследований является то, что они описаны гораздо лучше и полнее, чем популяции любого другого вида.

В работах Р. А. Фишера, Дж. Б. С. Холдейна, С. Райта и их последователей были подробно разработаны теоретические основы популяционной генетики. Однако получение и интерпретация эмпирических данных по генетике популяций человека отстает от математических и теоретических разработок (Lewontin, 1977 [1808])¹⁾. Существует несколько прекрасных обзоров по популяционной генетике (Li, 1955 [124]; Li, 1976 [1810]²⁾; Crow, Kimura, 1970 [45]; Cavalli-Sforza, Bodmer, 1971 [36]; Jacquard, 1974, [103]; Hartl, 1980 [93a]; Ewens, 1980 [1757]). Поэтому мы не будем обсуждать теоретические вопросы в полном объеме, а обратим внимание читателей на эмпирические данные, полученные для популяций человека, и их интерпретацию.

Исследования в области популяционной генетики человека можно условно разделить на две группы: 1) описание популяций и их генетического состава; 2) анализ причин изменения генофонда человека. Эти два подхода тесно взаимосвязаны. Разработка конкретных гипотез и планирование исследований для их проверки невозможны без наличия данных об основах популяционной структуры. Но, поскольку число существующих популяций и известных наследственных признаков человека исключительно велико, охарактеризовать все популяции с генетической точки зрения невероятно трудно. Необходимо выделить наиболее важные задачи. Каковы же принципы их выбора?

Вообще говоря, планирование научных исследований в области популяционной генетики человека должно основываться на принципах, сходных с принципами планирования лабораторных экспериментов. Эмпирические данные, полученные без конкретной гипотезы, редко дают значимые результаты. Качество научной работы обычно зависит от глубины и характера принимаемой гипотезы. Конечно, не всегда сбор данных проводят, руководствуясь конкретной гипотезой. Однако работа, направленная только на сбор материала, оказывается обычно менее ценной с научной точки зрения, чем исследования, в которых пытаются найти ответ на поставленный вопрос. Существует множество источников первичных данных.

1. Обнаруживаются все новые случаи полиморфизма ДНК, ферментов и других белков. Определение частот соответствующих генов в популяционных выборках

¹⁾ Имеется перевод: Левонтин Р. Генетические основы эволюции.-М.: Мир, 1978.

²⁾ Имеется перевод: Ли. Ч. Введение в популяционную генетику.-М.: Мир, 1978.

ках дает сведения относительно этих вновь открытых признаков, позволяет проводить анализ по другим генетическим маркерам, получая таким образом данные для определения популяционной структуры.

2. Изучение популяций может проводиться в медицинских целях. Например, в настоящее время во многих странах стала обычной проверка новорожденных на фенилкетонурию, а иногда и на другие более редкие наследственные заболевания. Из этих данных можно извлечь ценную информацию по межпопуляционным различиям генных частот. Большой научный интерес могут иметь результаты семейного анализа в случае сомнительного отцовства.
3. Данные по генным частотам могут быть получены при проверке конкретной гипотезы. Они полезны даже в том случае, когда гипотеза отвергается или результаты исследования неоднозначны.

Определение частот полиморфных генов и наследственных заболеваний - это только первый шаг на пути изучения межпопуляционных различий генных частот. Для объяснения этих различий необходимо сформулировать соответствующую гипотезу.

Рассмотрим, например, гипотезу о том, что более высокая частота активности кишечной лактазы у взрослых людей белой расы по сравнению с таковой у негров и монголоидов обусловлена их селективным преимуществом в климатических условиях, обеспечивающих развитие дефицита витамина D и рахита, поскольку лактаза способствует усвоению кальция в кишечнике, а кальций уменьшает риск заболевания рахитом (разд. 7.3.1). Эта гипотеза имеет биологический смысл, конкретна и может быть легко опровергнута, если показать, что лактаза не повышает усвоения кальция. Формулировка гипотез такого рода весьма желательна. К сожалению, многие исследования в популяционной генетике человека остаются на описательном уровне.

6.1. Описание популяций

6.1.1. Закон Харди—Вайнберга: генные частоты

Закон Харди—Вайнберга в случае аутосомных генов [124]. Закон Харди—Вайнберга обсуждался в разд. 3.2. Пусть аллели A_1 и A_2 имеют частоты $A_1 = p$, $A_2 = q$; $p + q = 1$; предположим, что скрещивание происходит случайным образом. Тогда частоты фенотипов в популяции будут следующими: $p^2 A_1 A_1$, $2pq A_1 A_2$, $q^2 A_2 A_2$. Это правило можно обобщить следующим образом. Если частоты n аллелей $A_1, A_2, \dots, A_n$ равны $p_1, p_2, \dots, p^n$ и если скрещивание случайно по отношению к данному локусу, то частоты фенотипов определяются случайным попарным сочетанием этих аллелей:

$$(p_1 A_1 + p_2 A_2 + \dots + p_n A_n)^2 = \\ = \sum_{i=1} p_i^2 A_i A_i + \sum_{i < j} 2p_i p_j A_i A_j$$

В отсутствие возмущающих воздействий частоты генов и генотипов остаются постоянными от поколения к поколению. Для аутосомных генов такое состояние «равновесия Харди—Вайнберга» достигается в первом поколении случайного скрещивания. Однако в случае генов, сцепленных с полом, это не так.

Закон Харди—Вайнберга для случая генов, сцепленных с полом. Пусть аллели A_1 и A_2 встречаются в мужской части популяции с частотами p_M и q_M ($p_M + q_M = 1$), тогда фенотипы A_1 и A_2 будут также иметь частоты p_M и q_M . Пусть среди женщин частоты генотипов $A_1 A_1$, $A_1 A_2$ и $A_2 A_2$ равны r , $2s$ и t ($r + 2s + t = 1$). Тогда частоты аллелей A_1 и A_2 у женщин равны $p_F = r + s$ и $q_F = s + t$ соответственно. Эти женщины образуют ооциты типа A_1 и A_2 также с частотой p_F и q_F соответственно. Среди их сыновей аллели A_1 и A_2 встречаются в том же соотношении. Однако их дочери происходят от яйцеклеток, образовавшихся в результате слияния ооцитов ($p_F A_1 + q_F A_2$) и сперматозоидов, несущих X-хромосому ($p_M A_1 + q_M A_2$). Таким образом, следующее поколение будет иметь состав

$$\sigma\sigma : p_F A_1 + q_F A_2,$$

$$\varphi\varphi : p_M p_F A_1 A_1 + (p_M q_F + p_F q_M) A_1 A_2 + q_M q_F A_2 A_2.$$

Отсюда следует, что частоты аллеля A_2 у мужчин и женщин следующего поколения

равны

$$q'_M = q_F, \quad q'_F = \frac{1}{2}(p_M q_F + p_F q_M) + q_M q_F = \frac{1}{2}(q_M + q_F).$$

Это означает, что а) частота A_2 у мужчин каждого поколения равна частоте A_2 у женщин предыдущего поколения; б) частота A_2 у женщин каждого поколения равна средней частоте этого аллеля у мужчин и женщин предыдущего поколения; в) справедливо равенство

$$q'_M - q'_F = \frac{1}{2}(q_M - q_F).$$

Следовательно, если аллельные частоты у мужчин и женщин в данном поколении не равны, разность между ними в следующем поколении уменьшается вдвое. Кроме того, изменяется знак этой разности- если q_F выше q_M , то q'_M будет выше q'_F . Обе аллельные частоты q_F и q_M сходятся к общему значению $\bar{q}$, в то время как распределение генотипов у обоих полов стремится к равновесному состоянию:

$$\sigma\sigma: (1 - \bar{q}) A_1 + \bar{q} A_2,$$

$$\varphi\varphi: (1 - \bar{q})^2 A_1 A_1 + 2\bar{q}(1 - \bar{q}) A_1 A_2 + \bar{q}^2 A_2 A_2.$$

На рис. 6.1 показано, каким образом происходит приближение к состоянию равновесия. Из этого примера следует, что достижение равно ве-

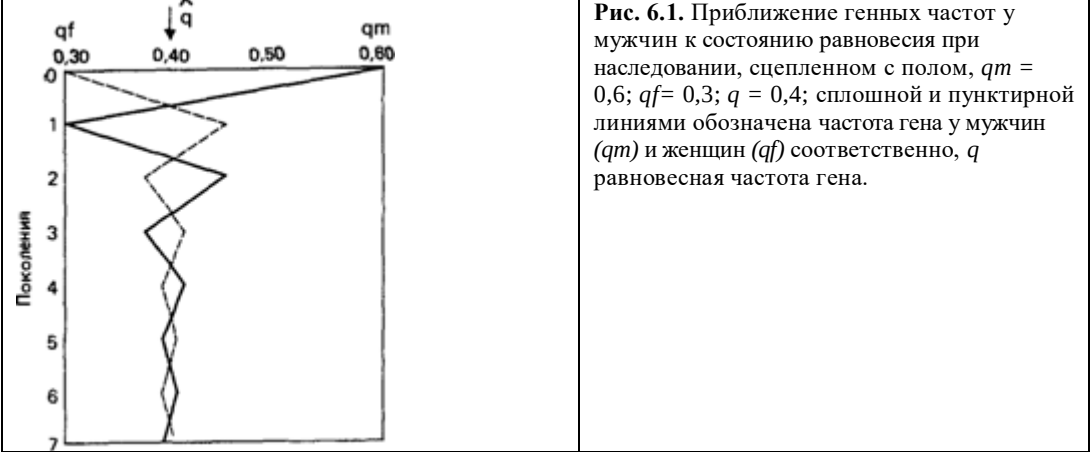


Рис. 6.1. Приближение генных частот у мужчин к состоянию равновесия при наследовании, сцепленном с полом, $q_M = 0,6$; $q_F = 0,3$; $q = 0,4$; сплошной и пунктирной линиями обозначена частота гена у мужчин (q_M) и женщин (q_F) соответственно, q равновесная частота гена.

сия Харди Вайнберга после одного поколения случайного скрещивания отнюдь не самоочевидно.

Другие ограничения закона Харди— Вайнберга перечислены в разд. 3.2. Разработке этого фундаментального принципа посвящена значительная часть популяционной генетики.

Генные частоты. Особей, составляющих популяцию, можно классифицировать в соответствии с их фенотипами. В некоторых случаях, особенно в случае генетического полиморфизма, эти фенотипы непосредственно соответствуют генотипам. Однако описание генетической изменчивости популяции на основе частот *генотипов* оказывается слишком громоздким. Закон Харди —Вайнберга позволяет характеризовать генетическую изменчивость, используя *генные частоты*. Введение понятия частоты гена упрощает дело; для системы с двумя аллелями вся необходимая информация содержится в одном числе (p или q). Методика определения генных частот в общем виде описана в разд. 3.2 и в приложении 1 (см. также [166; 144]).

6.1.2. Генетический полиморфизм

Определение и история вопроса. Полиморфным признаком называется менделевский (моногенный) признак, по которому в популяции присутствуют по крайней мере два фенотипа (и предположительно по крайней мере два генотипа), причем ни один из них не является редким, т. е. не встречается с частотой менее 1-2%. Часто в популяциях присутствует больше двух аллелей (и соответственно более чем два фенотипа) по данному локусу. Альтернативное полиморфизму явление — наличие редких генетических вариантов. Редкие генетические варианты условно определяются как моногенные признаки, присутствующие в популяции с частотой менее 1-2% (а обычно с гораздо более низкой частотой). Первый полиморфный признак - система групп крови АВ0 - был открыт Ландштейнером еще в 1900 г. [259].

До 1955 г. были известны только случаи полиморфизма по нескольким поверхностным антигенам эритроцитов, т. е. группам

крови. В 1955 г. Смитис [1307, 1308] описал методику электрофореза в крахмальном геле, при помощи которой можно разделять белки в поддерживающей среде не только в зависимости от их заряда, но и по молекулярной массе. Этот новый метод позволил Смитису выявить полиморфизм гаптоглобина - сывороточного белка, связывающего гемоглобин. Электрофорез с успехом использовали для обнаружения полиморфизма по сывороточным белкам, а затем в комбинации с методами определения специфической активности ферментов для выявления полиморфизма ферментов [78, 1769].

Высокий уровень полиморфизма продемонстрирован для многих сывороточных белков, а также для ферментов плазмы крови, эритроцитов и лейкоцитов. Во многих случаях генетическая детерминация полиморфизма проста: два аллеля определяют два варианта одного белка. Но есть и сложные полиморфные системы, например главный комплекс гистосовместимости (МНС). Множественные, взаимосвязанные локусы, составляющие эту систему, локализованы в 6-й хромосоме человека (разд. 3.5.5).

Ситуация в настоящее время. В табл. 6.1 приведены наиболее важные полиморфные признаки человека. Некоторые из них демонстрируют полиморфизм только в пределах одной основной расовой группы. Для нескольких случаев полиморфизма были выдвинуты гипотезы о механизмах их поддержания естественным отбором в популяциях человека. Более подробно эти гипотезы рассмотрены в разд. 6.2.1 и 6.2.1.8.

Биохимическое своеобразие по полиморфным белкам. В 1902 г. Гэррод [249] закончил свою статью об алкаптонурии следующими словами:

«Если в случае алкаптонурии и других рассмотренных заболеваний мы действительно имеем дело не с результатом метаболических процессов, а с индивидуальными особенностями метаболизма, естественно возникает мысль о том, что последние отражают химическую изменчивость, в незначительной степени присущую всем особям. Как не существует двух особей одного вида, абсолютно идентичных по своим внешним признакам, так и химические процессы в разных организмах совпадают не полностью.

Это биохимическое своеобразие поразительно, если рассматривать все случаи полиморфизма по группам крови. Предположим, к примеру, что некий житель северо-западной Европы имеет наиболее часто встречающиеся аллели каждой полиморфной системы, приведенной в табл. 6.1. Сколько других индивидов будут иметь тот же фенотип и генотип по всем этим маркерам? Соответствующая вероятность вычисляется путем перемножения относительных частот этих фенотипов в населении белой расы (табл. 6.2), что дает величину $3,1 \cdot 10^{-5}$, т.е. из 100000 мужчин только два или три будут иметь данный фенотип, несмотря на то что такое сочетание аллелей встречается наиболее часто. Все другие аллельные комбинации еще более редки.

В табл. 6.1 не вошли фенотипы по главному комплексу гистосовместимости (МНС) (разд. 3.5.5) и другие менее детально изученные полиморфные системы, а также многие системы ферментов, для которых выявлены только редкие варианты. Если включить в рассмотрение все эти системы, то можно показать, что любой человек на нашей планете, за исключением идентичных близнецов, генетически уникален. Физиологическая функция известна только для некоторых из перечисленных в табл. 6.1 полиморфных систем. Возможное значение полиморфных генов для предсказания риска заболевания в изменяющихся условиях среды обсуждалось в разд. 4.5.2.

Какова доля полиморфных локусов у человека? Сколько у человека полиморфных генов? Составляют ли полиморфные локусы небольшую часть генома человека или их доля высока? Группы крови могут быть идентифицированы только в том случае, если к определенным антигенам обнаружены антитела. Серологическое выявление генного локуса обычно заранее предполагает существование генетической изменчивости по данному локусу – наличия полиморфизма или редких вариантов. Выявление генетической изменчивости ферментов

Таблица 6.1. Некоторые важные полиморфные признаки человека

Название	Основные аллели	Примечания
<i>Поверхностные антигены эритроцитов (группы крови)</i>		
ABO	A ₁ , A ₂ , B, 0	Обсуждение в связи с заболеваниями см. в разд. 3.7.2; с естественным отбором – в разд. 6.2.1.8
Секретция АВН Диего (Diego)	Se, Se Di ^a , Di ^b	Взаимодействие с системой Lewis Аллель Di ^a присутствует только в популяциях американских индейцев и монголоидов (разд. 7.3.1)
Даффи (Duffy)	Fy ^a , Fy ^b , Fu	Аллель Fy распространен среди негроидов; обсуждение в связи с отбором см. в разд. 7.3.1
Келл (Kell)	K, k	Другие тесно сцепленные локусы, например Sutter (Js ^a)
Кидд (Kidd)		Очень малое число индивидов с Jk (a ⁻ b ⁻)
Льюис (Lewis)	Le ^a , Le ^b	Взаимодействие с локусом АВН-секретции
Лютеран (Lutheran)	Lu ^a , Lu ^b	
MNSs	MS, Ms, NS, Ns	Есть другие тесно сцепленные антигены: Hunter и Henshaw, особенно у негров
P	P ₁ , P ₂ , p	Аллель p встречается очень редко
Резус (Rhesus)	Комплексы генов CDe, cde, cDE, C ^w De, cDe, cdE, CDE и другие в различных комбинациях	Обсуждение несовместимости матери и плода в разд. 3.5.4; структура генного комплекса и неравновесие по сцеплению – в разд. 3.5.5
Xg	Xg ^a , Xg	Сцеплен с X-хромосомой
<i>Группы сывороточных белков</i>		
α ₁ -антитрипсин (ингибитор α ₁ -протеазы)	PI ^M ₁ , PI ^M ₂ , PI ^M ₃ , PI ^S , PI ^Z	Много редких аллелей. Обсуждение дефицита α ₁ -антитрипсина, особенно у гомозигот по аллелю PI ^Z , в разд. 3.7.4
Церулоплазмин	CP ^B , CP ^A , CP ^C	Большинство европейцев гомозиготно CP ^B /CP ^B ; частота аллеля CP ^A у негров равна 0,06
Компонент-3 системы комплемента	C3 ^S , C3 ^F	Кроме этих распространенных аллелей, есть несколько редких
Группоспецифический белок	GC ^{1F} , GC ^{1S} , GC ²	Описаны особые варианты, например GC ^{Chp} у индейцев чиппева, GC ^{Ab} у австралийских аборигенов; обсуждение естественного отбора в разд. 7.3.1
Гаптоглобин	HP ^{1S} , HP ^{1F} , HP ²	Известно много редких вариантов; встречается наследственная и ненаследственная агаптоглобинемия
Иммуноглобулины IGHG (gm)	G1m ³ , G3m ⁵ , G1m ¹ , G1m ^{1.2}	Это очень сложная система со многими особенностями и редкими гаплотипами; см. генетику образования антител, разд. 4.4
IGKC (Km)	Km ¹ , Km ³	Известны и другие аллели, но их обычно трудно выделить
Фактор пропердина В (богатый глицином β-гликопротеин)	BF ^S , BF ^F	Известны редкие аллели
Трансферрины	TF ^{C1} , TF ^{C2} , TF ^{C3} , TF ^B , TF ^D	Описаны различные варианты D и F; все они редкие. Вариант D в основном встречается у негров

Продолжение табл. 6.1.

Название	Основные аллели	Примечания
<i>Ферменты эритроцитов</i>		
Кислая фосфатаза-1	ACPI ^A , ACPI ^B , ACPI ^C	У хоизанидов обнаружен дополнительный аллель
Аденозиндезаминаза	ADA ¹ , ADA ²	Описаны редкие аллели ADA ³ и ADA ⁴
Аденилаткиназа-1	AKI ¹ , AKI ²	Известны другие, более редкие аллели
Эстераза-D	ESD ¹ , ESD ²	Известны также редкие варианты
Пептидаза A	PEPA ¹ , PEPA ²	Частота PEPA ² у негров равна около 0,07; у белых почти всегда встречается PEPA ¹ .
Пептидаза D (пролинди-пептидаза)	PEPD ¹ , PEPD ² , PEPD ³	Известны редкие варианты PEPD ³ распространена среди негров
<i>Фосфоглюкомутазы</i>		
PGM1	PGM1 ^{a1} , PGM1 ^{a2} , PGM1 ^{a3} , PGM1 ^{a4}	Известны редкие аллели
PGM2	PGM2 ¹ , PGM2 ² ,	Аллель PGM2 ² распространен только среди негров; другие аллели редки
PGM3	PGM3 ¹ , PGM3 ²	Ферменты лейкоцитов, плаценты, спермы. Сцепление с МНС; разд. 3.5.5.
Фосфоглюконат-дегидрогеназа	PGD ^A , PGD ^B	Известны редкие аллели
<i>Некоторые другие ферменты</i>		
Алкогольдегидрогеназа	ADH ¹ , ADH ²	Активность ADH2 наблюдается в различных органах, ADH ³ – в кишечнике
Холинэстераза (сыворо-точная)-1	CHE1 ^U , CHE1 ^D , CHE1 ^S	Обсуждается в разд. 4.5.1
Глутаматпируваттрансаминаза	GPT ¹ , GPT ²	Активность обсуждается в разд. 3.6.1.3
Ацетилтрансфераза печени	Быстрые и медленные инактиваторы	Обсуждается в разд. 4.5.1

производится иначе: в этом случае необходимо непосредственно идентифицировать фермент в электрофоретической среде. При наличии полиморфизма белки, контролируемые альтернативными аллелями, часто имеют разную электрофоретическую подвижность. Идентификация нормального фермента (дикого типа) и его мутантного варианта может быть достигнута только путем локализации фермент-специфичной биохимической реакции в поддерживающей электрофоретической среде, например в крахмальном геле. Для этого необходимо разработать такую тест-систему, которая позволяет визуально выявить положение фермента в геле. Например, кислая фосфатаза эритроцитов при pH6 расщепляет фенолфталейнфосфат на фенолфталейн и фосфат; свободный фенолфталейн окрашивает гель только в том месте, куда мигрировал фермент. Окрашенные участки располагаются на геле по-разному, что можно связать с соответствующими изменениями соответствующих генов (рис. 6.2).

Скрининг многих ферментов, проведенный аналогичными методами, позволяет получить несмещенную оценку доли полиморфных локусов. Такая оценка была получена Харрисом и Хопкинсоном в 1972 г. Эти авторы объединили данные электрофоретических исследований населения Европы примерно по 70 различным локусам, кодирующим ферменты. Число исследованных ферментов было меньше, поскольку один фермент может состоять более чем из одной полипептидной цепи и, следовательно, кодироваться более чем одним геном. Считается, что ген полиморфен, если частота

Таблица 6.2 Наиболее распространенный фенотип мужчины европейского происхождения по полиморфным системам, приведенным в табл. 6.1.

Фенотип	Приблизительная частота, %
Группы крови¹⁾	
AI	35
CdD _{ee}	33
Fy (a + b +)	48
Jk (a + b +)	50
K – k +	91
Lu (a – b +)	92
MNSs	23
P ₁	79
Se	78
Xg (a +)	66
Сывороточные и эритроцитарные белки²⁾	
ADA1	87
ACPIAB	39
AK11	93
BFS	61
C3S	61
GC1S	34
Gm (–1, –2, +3, +5)	45
GPT2-1	49
HP2-1	47
km (–1)	87
PGDA	96
PGM1 a1	39
PiM1	55
TFC1	57

Частота наиболее распространенного фенотипа
9,2 · 10^{–7}

¹⁾ По Race, Sanger (1975)

²⁾ По Hummel (1971, 1977, 1979)

Рис. 6.2. Различные электрофоретические варианты кислой фосфатазы эритроцитов. Три аллеля (A, B, C) составляют 6 фенотипов (CC не показан). (Courtesy of Dr. J. Greiner.)



его наиболее распространенного аллеля не превышает 0,99. Поскольку частота гетерозигот ($2pq$) приблизительно равна удвоенной частоте гена (q), по таким аллелям должно быть гетерозиготно около 2% популяции. Согласно этому определению, 20 из 71 (28,2%) локуса оказались полиморфными. Эта цифра не отражает всего числа полиморфных локусов, так как некоторые варианты могут не идентифицироваться электрофоретически, а обнаруживаться другими методами (например, псевдохолинэстераза) (разд. 4.5.1). Эти расчеты относятся только к полиморфизму, выявляемому методом электрофореза. Поскольку в некоторых случаях разрешающая способность этого метода недостаточна для того, чтобы ясно различить белковые варианты, оценка 28,2% почти наверняка занижена. По одному из исследованных ферментов - кислой фосфатазе эритроцитов, имеющей 3 распространенных аллеля, - более 50% популяции оказалось гетерозиготно. Уровень гетерозиготности других локусов был значительно ниже; средняя доля гетерозиготных особей, рассчитанная по 71 локусу, равнялась 6,7% на локус. Исходя из свойств генетического кода, можно сделать вывод, что только одна треть из всех возможных нуклеотидных замен приводит к полярным заменам аминокислот, т. е. к таким заменам, которые обуславливают изменение электрофоретической подвижности [1681]. Однако нет никакого основания априорно предполагать, что мутации, приводящие к неполярным заменам, возникают с меньшей частотой. Поэтому реальный уровень средней гетерозиготности на локус, вероятно, приблизительно в три раза выше и составляет около 20%. Сходные результаты, касающиеся повсеместного распространения генетического полиморфизма, были получены для всех исследованных биологических видов (рис. 6.3).

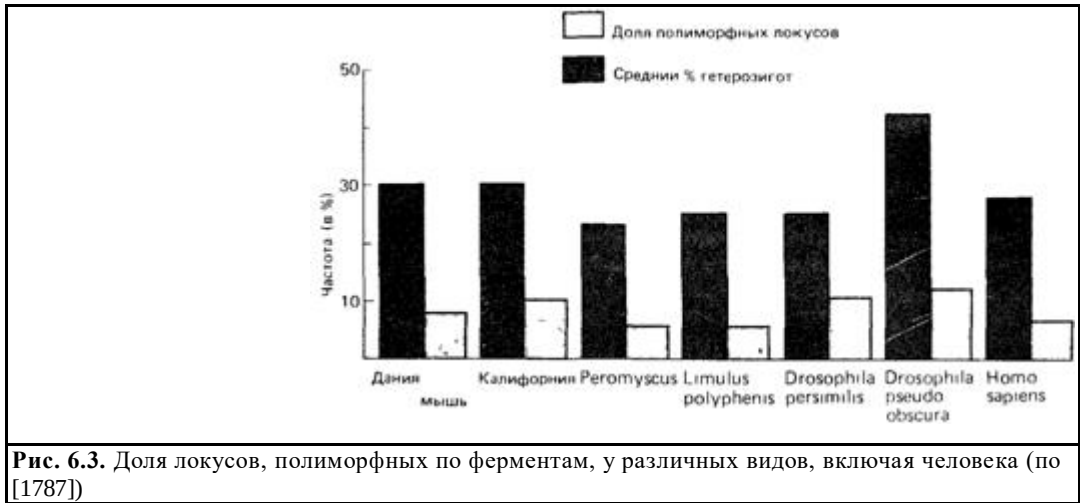


Рис. 6.3. Доля локусов, полиморфных по ферментам, у различных видов, включая человека (по [1787])

Таким образом, этот феномен не является уникальной особенностью человека, для которого он был впервые показан. Обсуждение причин высокой генетической гетерогенности, неудивительной для человека с его высокодифференцированными индивидуальными особенностями, вызвало значительные разногласия среди ученых и привело к возникновению теории недарвиновской эволюции, утверждающей, что большинство генов селективно нейтрально [1510; 1511] (см. разд. 7.2.3).

Редкие варианты. В работе Харриса [1787] лимитирующая частота наиболее распространенного аллеля, определяющая условие генетического полиморфизма, была принята равной 0,99. Однако для многих ферментов известны редкие варианты. Зачастую редкие варианты присутствуют в популяции наряду с распространенными аллелями, однако для многих локусов известны только редкие варианты, а распространенные аллели отсутствуют. Частота и распространение редких вариантов в европейских популяциях исследованы Харрисом [1788]. Вероятность выявления редких вариантов зависит от величины выборки; для этой цели необходимо проанализировать выборку из нескольких сотен особей. Такие выборки были исследованы для 43 локусов, кодирующих ферменты. Редкими считались варианты, частота которых не превышала 0,005.

Редкие аллели были найдены для 22 из 43 локусов (для 7 из 13 «полиморфных» и для 15 из 30 «неполиморфных» локусов) (рис. 6.4). Общее число редких аллелей составило 56. Большинство из них оказались очень редкими; 45 имели частоту менее 0,001. Влияние величины выборки на вероятность обнаружения редких вариантов видно из следующего факта. В тех случаях, когда были обнаружены редкие аллели, средний размер выборки составил 4023 индивида. Между тем для локусов, для которых редкие аллели выявить не удалось, средний размер выборки был равен только 1300. Важно отметить, что в этом исследовании редкие варианты были идентифицированы не для всех локусов, однако в других работах эту задачу удалось решить. Таким образом, можно предположить, что редкие варианты встречаются у всех ферментов.

Средняя гетерозиготность на локус определялась для редких аллелей таким же способом, как и для полиморфных вариантов:

$$\frac{\text{Число гетерозигот по редким аллелям по всем локусам (204)}}{\text{Число индивидов, проанализированных по каждому локусу (117755)}} = 1,76 \text{ на } 1000$$

Для одного из локусов (кодирующего плацентарную щелочную фосфатазу) был характерен особенно высокий уровень гетерозиготности, обусловленный наличием редких аллелей. Когда этот локус был

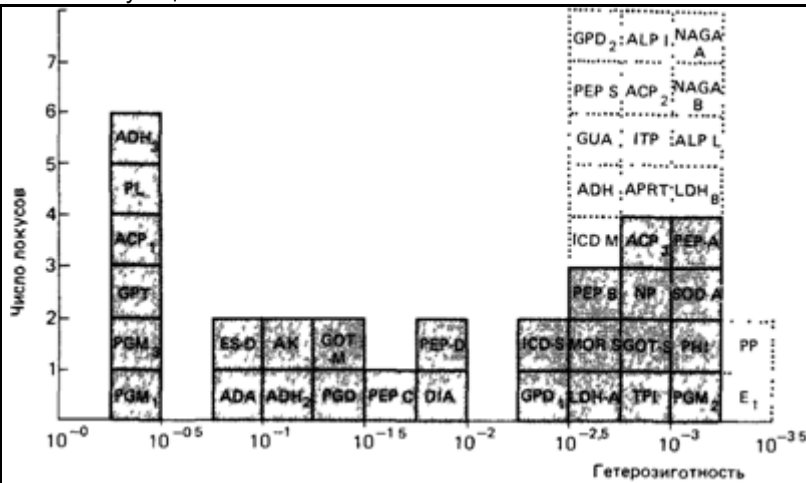


Рис. 6.4. Распределение частот гетерозигот по 43 генным локусам человека, по которым имеются варианты ферментов Квадраты, ограниченные пунктиром, - завышенные оценки, соответствующие случаю, когда в выборке, не содержащей гетерозигот, оказалась одна гетерозигота [1788]

исключен из анализа, общая оценка средней гетерозиготности составила 1,14 гетерозигот на 1000 индивидов на локус.

Подобные расчеты проводились и для других популяций. Например, показано, что частота редких аллелей 12 гликолитических ферментов равна приблизительно 2/1000 согласно объединенным данным по популяциям белой, черной и монголоидной рас [1891] и около 3/1000 по данным анализа 17 ферментных и белковых локусов в некоторых племенах индейцев Южной Америки.

В выборке из японской популяции частота редких аллелей составила 2/1000 для 25 полипептидов, 23 из которых были также проанализированы в выборке из популяции Великобритании Харрисом [1788]. Частота редких аллелей двух локусов PGM1 (фосфоглюкомутазы) и PHL (фосфогексоизомеразы) оказалась выше в японской популяции по сравнению с английской [1578].

Частота возникновения мутаций (скорость мутирования) может быть низкой. Для редких вариантов можно определить среднюю частоту возникновения мутаций [1788]. Точнее можно вычислить верхнюю доверительную границу μ . Чтобы решить эту задачу, Харрис выбрал 36 локусов, для которых имелись данные о генотипе родителей пробандов. По этим 36 локусам было в общей сложности изучено 109 209 человек, 126 из них несли редкий вариант. Оба родителя обследованы только в 77 из 116 случаев, и всегда у одного из них обнаруживали редкий вариант: новых мутаций выявлено не было. Эта группа из 77 носителей редких генов соответствует контрольной выборке проанализированных особей, величина которой равна

$$109\,209 \cdot \frac{77}{126} = 66\,739.$$

Поэтому можно утверждать, что в среднем в $2 \cdot 66 \cdot 739 = 133\,478$ родительских гаметах не возникло новых мутаций. Вероятность того, что в этих гаметах возникнет хотя бы одна новая мутация, равна $1 - e^{-n\mu}$, где n - число гамет, а e - основание натуральных логарифмов. Решение уравнения $1 - e^{-n\mu} = 0,95$ для μ дает величину $\mu = 2,24 \cdot 10^{-5}$ на ген на поколение как верхнюю доверительную границу реальной частоты возникновения мутаций. Это означает, что полученная оценка является завышенной по отношению к действительной скорости мутирования с вероятностью 95%.

Если принять несколько иные допуще-

нения этого факта было высказано вполне реальное предположение, что в результате взаимодействия структурных белков со многими другими белками на число мутаций, ведущих к допустимым конформационным изменениям, накладываются жесткие ограничения [1992]. В пользу этой гипотезы говорит также более высокий уровень изменчивости растворимых белков по сравнению с белками, связанными с клеточными структурами. Более высокий уровень количественной изменчивости по сравнению с качественной, возможно, свидетельствует о более высокой толерантности к мутациям нетранскрибируемой ДНК, поскольку считается, что такие мутации оказывают влияние на скорость синтеза белка (см., например, разд. 4.6.4, талассемия).

У лимфоцитов, стимулированных фитогемагглютинином, среди 200 различных пятен белков было найдено 3 полиморфных варианта, что подтверждено популяционными и семейными исследованиями [1782, 1783]. Все 3 варианта обнаружены в растворимой фракции. Возможно, что уровень полиморфизма лимфоцитов несколько выше, чем у фибробластов. На основании как этих работ, так и большого количества исследований других видов (мыши, дрозофилы) был сделан вывод, что полиморфизм встречается реже у структурных белков по сравнению с растворимыми белками крови. Однако следует избегать поспешных обобщений, поскольку в недавнем исследовании тромбоцитарных белков у человека, основной целью которого было обнаружение новых белковых вариантов, показан более высокий уровень генетической изменчивости [1838]. Уровень изменчивости, выявленный в этой работе, сравним с изменчивостью, показанной для растворимых белков плазмы и эритроцитов.

Полиморфизм ДНК. Для экспрессируемых продуктов генов, таких, как группы крови, белки тканей и крови, характерен высокий уровень полиморфизма, однако генетическая изменчивость, наблюдаемая на уровне ДНК, существенно выше. Поскольку значительная часть генома, вероятно, не принимает прямого участия в регуляции или кодировании продуктов генов, мутации в этих нерегуляторных и некодирующих участках ДНК не имеют фенотипического выражения и являются селективно нейтральными. Определение последовательностей нуклеотидов у различных индивидов и использование рестрикционных ферментов для картирования генома человека выявило необыкновенно высокую изменчивость на уровне ДНК. Семейный анализ показал, что варианты ДНК наследуются в соответствии с законами Менделя. Таким образом, теперь в распоряжении исследователей находится совершенно новый набор генетических маркеров.

Типы полиморфизма ДНК. Наиболее распространенный тип полиморфизма ДНК - рестрикционный полиморфизм. Если в сайте узнавания для какой-то рестриктазы происходит точечная мутация, фермент не распознает свой сайт и не разрезает ДНК (рис. 2.84). Имея под рукой специфические ДНК-зонды и рестриктазы, можно анализировать ДНК. Рестрикционные фрагменты ДНК (рестрикты) различаются по длине (полиморфизм по длине рестрикционных фрагментов). Они идентифицируются по различной подвижности после гибридизации по Саузерну (рис. 6.5). В настоящее время метод гибридизации по Саузерну включает радиоактивное мечение. Вероятно, в будущем появится возможность нерадиоактивного мечения фрагментов ДНК. Точечные мутации, заменяющие один нуклеотид на другой в некодирующем районе ДНК, встречаются очень часто. Немногие систематические исследования изменчивости ДНК проводились путем анализа с использованием большого количества рестриктаз в небольшой выборке особей (10-12). Результаты, полученные для хорошо изученных к настоящему времени областей генома (гемоглобина, альбумина и сегментов ДНК с неизвестной функцией из разных хромосом) [1143; 1742; 1959], свидетельствуют о том, что уровень нуклеотидной изменчивости приблизительно на порядок выше, чем наблюдаемый по структурным генам, кодирующим белки. Это означает, что разница между случайно выбранными хромосомами составляет в среднем $1/500 - 1/250$ нуклеотидов (гетерозиготность = $0,001 - 0,004$). Особенно подходят для выявления вариантов ДНК ферменты *MspI* и *TaqI*, узнающие метилированный динуклеотид *CpG*. Большинство вариантов по длине рестрикционных фрагментов диморфны, т. е. имеют только два «аллеля» - присутствие (+) или отсутствие (—) сайта рестрикции. Частота полиморфного ва-

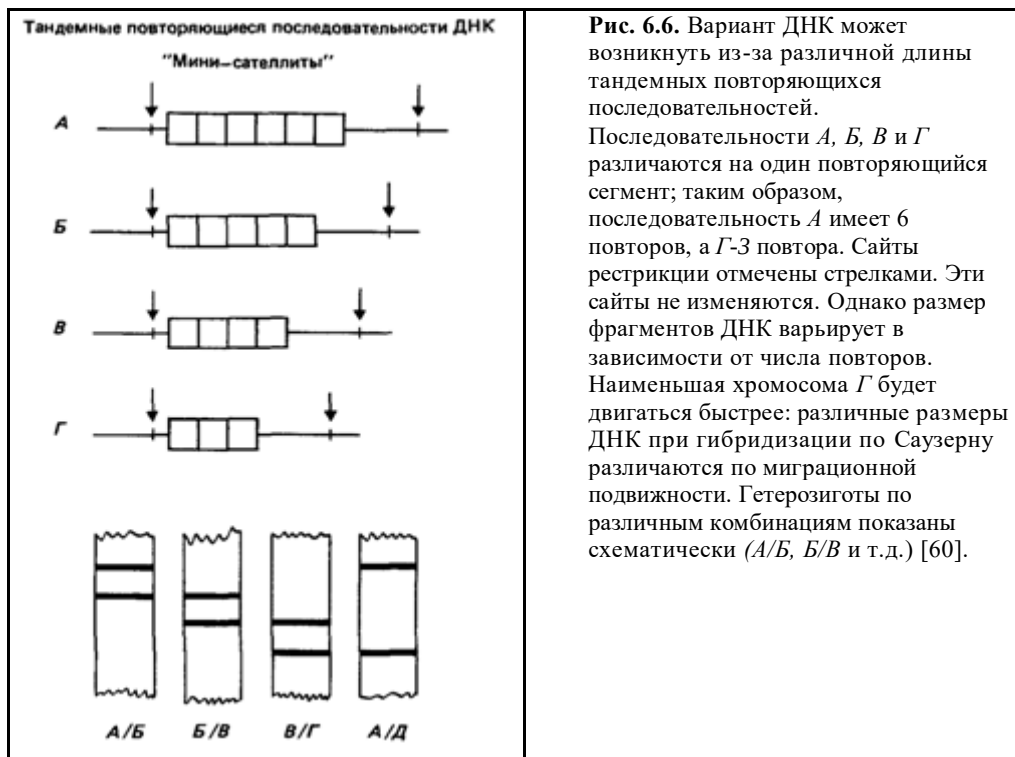
Рис. 6.5. Три индивида, два из которых (А, С) гомозиготны по различным ПДРФ-гаплотипам, а третий (В) гетерозиготен. Принципы анализа и результаты электрофореза в агарозном геле и гибридизации по Саузерну



рианта может изменяться от нескольких процентов до максимальной-50%.

Другой тип полиморфизма ДНК заключается в различном числе tandemных повторов, имеющих общую центральную часть из 10-15 пар оснований («мини-сателлиты») [1795]. Участок хромосомы может нести различное количество таких повторов. Возникновение полиморфизма этого типа облегчается благодаря идентичности последовательностей нуклеотидов в повторах, что приводит к делециям и дупликациям, возникающим в результате неравного кроссингвера (рис. 6.6). Длина рестрикционных фрагментов зависит от числа повторов. Такие гипервариабельные участки ДНК расположены около гена, кодирующего инсулин, и вокруг комплекса Hb β в хромосоме 11, встречаются они и в других хромосомах. Поскольку данный тип полиморфизма ДНК выражается в разном числе повторов, гетерозиготность по нему обычна, а гомозиготность встречается редко. Это свойство существенно для исследований с использованием ДНК-маркеров, поскольку почти во всех случаях варианты информативны.

На основе мини-сателлита интронной последовательности миоглобина Джеффри создал зонд, узнающий гипервариабельную ДНК [1795]. В разных хромосомах человека обнаружено много гипервариабельных участков. Уровень гетерозиготности в небольшой популяции, исследованной в это время, был весьма высоким и достигал почти 100%. Анализ инбредной родословной из 54 индивидов, относящихся к 4 поколениям, показал, что гетерозиготные полосы наследуются согласно законам Менделя. Интересно, что с помощью этого



метода каждый индивид из родословной легко отличается от любого другого. Дальнейшее совершенствование этой методики даст возможность различать по «отпечаткам пальцев» (fingerprint) даже родственников.

Заметим, что различие по длине рестрикционных фрагментов между родителями и детьми может возникать не только в результате точковых мутаций в сайте узнавания, но и в результате ошибки репликации или кроссинговера. Ожидается, что эти события происходят чаще, чем точковые мутации. Среди 27 индивидов, у которых проанализировано 240 полос, выявлена такая полоса, которой не было ни у одного из родителей, отсюда скорость мутирования составляет $1/240$, что по крайней мере на 4 порядка выше, чем скорость мутирования для точковых мутаций (разд. 2.3.3.9).

Использование ДНК-маркеров. Использование ДНК-маркеров значительно расширяет теоретические и практические возможности работ по сцеплению. Через несколько лет в распоряжении исследователей, вероятно, будет большое количество маркеров ДНК, равномерно распределенных по геному человека, что существенно расширит возможности пренатальной диагностики сцепленных с ними моногенных наследственных заболеваний (разд. 3.4) [946]. Возможно, с помощью ДНК-маркеров удастся точнее определить вклад различных генов в проявление широко распространенных заболеваний (менделевские признаки) путем обнаружения сайтов главных генов, не идентифицируемых по сцеплению. При дифференциации главных генов и полигенов возникают, однако, аналитические трудности (разд. 3.7). Варианты ДНК могут использоваться как маркеры в исследованиях по канцерогенезу [1685] и в анализе причин возникновения новообразований типа ретинобластомы, опухоли Вилмса и др. (разд. 5.1.6). Кроме того, станет возможной пренатальная диагностика наследственных форм этих опухолей. Поскольку новые полиморфные мини-сателлиты скорее всего несут рекомбинационные сигналы

[1795], с их помощью можно исследовать механизм рекомбинации. Вполне вероятно, что в будущем при помощи маркеров ДНК будут проводить установление материнства и отцовства, а также идентификацию пятен крови и спермы в судебно-медицинской практике. Открытие полиморфизма на уровне ДНК произвело революцию в генетике человека и медицинской генетике. Думаем, что довольно скоро геном человека будет картирован полностью. Использование этой карты в теоретических и практических целях - увлекательная задача.

Полиморфизм митохондриальной ДНК. Митохондрии передаются только по материнской линии всем потомкам; диплоидность, мейоз и рекомбинация в этом случае отсутствуют. Полиморфизм митохондриальной ДНК особенно важен для популяционной генетики, с его помощью изучают взаимодействие между популяциями и историю популяций [1792]. Вероятно, варианты митохондриальной ДНК не подвержены давлению отбора. Следовательно, сравнение наследующихся по материнской линии рестриктивных вариантов и РНК в группах популяций позволяет получить достоверную картину их мутационной истории.

6.1.3. Наследственные болезни

Доминантные и сцепленные с полом рецессивные заболевания. С точки зрения популяционной генетики доминантные и сцепленные с полом рецессивные болезни удобно разделить на две категории.

1. Болезни, при которых способность к размножению нарушена либо потому, что пораженные погибают в раннем возрасте, либо потому, что их дефекты настолько серьезны, что препятствуют вступлению в брак.
2. Болезни, при которых способность к размножению не нарушена, либо потому, что дефекты незначительны, либо потому, что проявляются они только после завершения репродуктивного периода.

Частота встречаемости и распространение заболеваний первой группы в основном определяются частотой возникновения соответствующих мутаций, т. е. скоростью мутирования: большинство мутаций такого рода исчезает из популяции через одно или несколько поколений. Этот вопрос обсуждался в разд. 5.1; данные по скорости мутирования для таких заболеваний свидетельствуют о сходстве этого показателя во всех изученных популяциях. Факторы отбора специфичны для каждой болезни и более или менее идентичны во всех популяциях, поэтому частота встречаемости заболеваний в них также сходна. Если в разных популяциях применяют методы лечения разной эффективности, частота заболевания в них также будет разной. Например, успешное лечение гемофилии приведет к увеличению числа гемофиликов в популяции.

Совершенно иная ситуация имеет место в случае болезней, не затрагивающих размножение. Частота их встречаемости в разных популяциях может быть совершенно различной в зависимости от размера популяции, ее истории и брачной структуры. Эти вопросы рассматриваются в разд. 6.4.2.

Аутосомные рецессивные заболевания. Различные факторы, определяющие частоты аутосомных рецессивных заболеваний в популяциях человека, в основном неизвестны. Поэтому невозможно точно определить, каким образом эти частоты будут меняться под влиянием современной цивилизации. Частота встречаемости большинства аутосомных рецессивных заболеваний неизвестна. При осуществлении обширных программ скрининга новорожденных недавно были получены оценки частоты нескольких врожденных нарушений метаболизма [1881].

Организаторы исследования, целью которого было определение частоты фенилкетонурии, выбирали для участия в нем те центры скринирования, которые применяют удовлетворительные методики и анализируют достаточное количество новорожденных. Данные учитывали только в том случае, если выборка обследованных составляла не менее 70000 новорожденных. Центры, обнаружившие региональные различия в пределах исследуемой популяции, должны были дать отдельные оценки для каждого района

Таблица 6.4. Частота фенилкетонурии и гиперфенилаланинемии в некоторых популяциях [1881]		
Область	Частота	
	ФКУ	Гиперфенилаланинемия
Варшава, Польша	1: 7782	1: 16885
Прага, ЧССР	1: 6618	1: 6303
ГДР	1: 9329	1: 52135
Восточная Австрия	1: 8659	1: 21982
Западная Австрия	1: 18 809	1: 18 809
Швейцария	1: 16644	1: 24106
Эвиан, Франция	1: 13715	1: 13 143
Гамбург	1: 9081	1: 61297
Мюнстер, ФРГ	1: 10934	1: 7997
Гейдельберг	1: 6178	1: 14 580
Дания	1: 11897	1: 40 790
Стокгольм, Швеция	1: 43 226	1: 22140
Финляндия	1: 71111	1: 71111
Лондон	1: 18 292	1: 50 304
Ливерпуль, Великобритания	1: 10215	1: 112362
Манчестер	1: 7707	1: 80925
Западная Ирландия	1: 7924	1: 68670
Восточная Ирландия	1: 5343	1: 32 594
Бостон, Массачусетс, США	1: 13914	1: 17006
Портленд, Орегон, США	1: 11620	1: 33 700
Монреаль, Канада	1: 69442	7
Окленд, Новая Зеландия	1: 18168	1: 95384
Сидней, Австралия	1: 9818	1: 22091
Япония	1: 210851	1: 70284
Израиль (ашкенази)	1: 180000	1: 15000
Израиль (не-ашкенази)	1: 8649	1: 7111

или группы популяций. Полученные данные приведены в табл. 6.4.

Фенилкетонурия (26160) и гиперфенилаланинемия.

1. Частота ФКУ в восточно-европейских популяциях выше, чем в популяциях запада и югозапада Европы. Различия между популяциями восточной и западной Австрии подчиняются той же закономерности.
2. В скандинавских, и особенно финских, популяциях частота ФКУ исключительно низка. Интересно, что Финляндия отличается от других европейских стран в отношении многих наследственных заболеваний (разд. 6.4.2).
3. В Ирландии ФКУ - довольно распространенное заболевание; различные частоты ФКУ, наблюдаемые в пределах Великобритании, например большое количество случаев в районе Манчестера, возможно, объясняются миграцией из Ирландии.
4. В США частоты ФКУ в Бостоне и Портленде (Орегон) вполне сравнимы с частотами в большинстве популяций Европы. Во франкоязычной области Канады - Монреале ФКУ встречается реже, чем в большей части Европы и двух упомянутых выше городах США, и гораздо реже, чем во Франции, откуда произошла эта популяция.
5. В Японии, единственной стране Дальнего Востока, где проводился скрининг врожденных аномалий, частота ФКУ оказалась особенно низкой, сравнимой только с частотами в популяциях Финляндии и евреев-ашкенази Израиля.
6. Частоты гиперфенилаланинемии (ГФА)- заболевания, не сопровождающегося умственной отсталостью, - изменяются в широких пределах и независимо от частоты ФКУ. Отношение ФКУ/ГФА также варьирует в удивительно широких пределах-от 0,51 до 12,0 (рис. 6.7).

Другие заболевания. В рассматриваемое исследование входят также галактоземия, обусловленная дефицитом трансферазы (23040) (разд. 4.2), гистидинемия (23580), болезнь кленового сиропа (24860) (разд. 4.2.2.4) и гомоцистинурия (23620) (разд. 4.2).

По данным большинства центров скрининга (Гамбурга, Вены, Окленда, Праги, Стокгольма, Цюриха), частоты галактоземии изменялись от 1:30000 и 1:65000. Таким образом, в большинстве популяций европейского происхождения это заболевание встречается со сходными частотами. Частоты в популяциях восточной и западной Австрии значительно отличались друг от друга.

Частота гистидинемии в центрах с наилучшими условиями скринирования варьировала в пределах 1:13 000 – 1:19 000. Гомоцистинурия, лейциноз и (за исключением Монреаля) тирозиноз встречались очень редко, с частотой приблизительно 1:100000 и 1:600000; в Монреале частота тирозиноза достигала 1:13 000, что можно объяснить

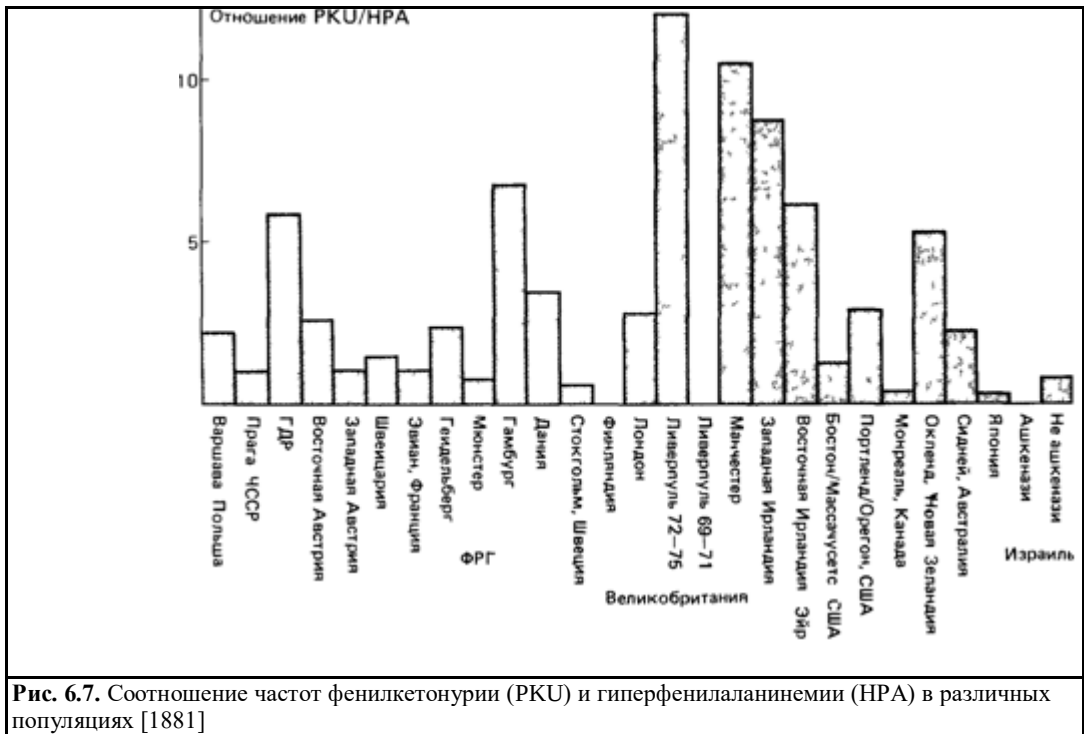


Рис. 6.7. Соотношение частот фенилкетонурии (PKU) и гиперфенилаланинемии (HPA) в различных популяциях [1881]

ся, а с расширением программ скрининга произойдет быстрое увеличение размера выборок. Возможно, что некоторые наблюдаемые в настоящее время межпопуляционные различия обусловлены малыми размерами проанализированных выборок, в то время как реальные различия могут пока оставаться невыявленными.

Интересно, что ФКУ более распространена в некоторых областях Восточной Германии (ГДР), чем в Западной Германии (ФРГ). Анализ происхождения семей, имеющих детей с ФКУ, показал, что эмигранты из ГДР составляют более высокий процент этих семей, чем ожидается случайно [1761a]. Вероятно, частота ФКУ уменьшается с востока на северо-запад Европы. Новые сведения относительно истории этих генов скорее всего будут получены в ходе молекулярнобиологических исследований [1363a].

Высокие частоты рецессивных заболеваний в некоторых популяциях. Ряд рецессивных заболеваний с высокой частотой встречается в определенных группах популяций. Мы уже упоминали тирозиноз в канадских популяциях французского происхождения, другой пример - болезни Тея—Сакса (27280), Ниманна—Пика (25720) и Гоше (23080) в популяции евреев ашкенази. В Финляндии несколько рецессивных заболеваний широко распространились благодаря определенной структуре и истории этой популяции (разд 6 4 2). Некоторые болезни обнаруживаются только в популяциях небольшого размера (изоляциях), где их частота высока, а в других популяциях они почти или совсем не встречаются. Другие заболевания, такие, как талассемия или серповидноклеточная анемия, имеют высокую частоту только в конкретных географических областях или расовых группах. В общем случае рецессивные заболевания, встречающиеся исключительно в определенной популяции малого размера, вызываются генами, не имеющими селективного преимущества в гетерозиготном состоянии, тогда как гены, вызывающие широко распространенные болезни, такие как талассемия и серповидноклеточная анемия, в прошлом имели селективное преимущество у гетерозигот. Однако появление метаболически связанных генных мутаций в популяции ашкенази (болезни Тея—Сакса, Ниманна—Пика, Го-

ше) предполагает наличие в этом случае селективных факторов. Подробно эти вопросы обсуждаются в разд. 6.4.

По мере развития генетического консультирования, распространения пренатальной диагностики, по мере развития методов лечения наследственных заболеваний все большее число стран будет проводить мониторинг наследственных болезней. Выполнение этих программ обогатит наши знания о частоте встречаемости соответствующей патологии.

6.2. Систематические изменения генных частот: мутации и отбор

Частоты генов в популяциях остаются неизменными только в отсутствие возмущающих воздействий (см. равновесие Харди—Вайнберга, раздел 3.2). Наиболее важными факторами, изменяющими генные частоты, являются

- а) вновь возникающие мутации;
- б) естественный отбор;
- в) миграция;
- г) случайные флуктуации. Спонтанный и индуцированный мутагенез у человека обсуждался в гл. 5; более полно мы рассмотрим этот вопрос в связи с влиянием других факторов. Действие отбора будет проанализировано подробно. Отклонение от равновесия Харди—Вайнберга возникает также в результате ассортативности скрещивания. Обсуждение кровнородственных браков и случайных изменений генных частот приведет нас к рассмотрению брачной структуры популяций с более общей точки зрения и подготовит к лучшему пониманию эволюции человека.

6.2.1. Естественный отбор

Дарвин считал отбор основной движущей силой эволюции. Теория эволюции Дарвина, которая в большой степени основывается на исследовании отбора и его роли в процессе видообразования, стала ведущей парадигмой биологии XIX в. Концепция «приспособленности» является центральной в этой теории. В начале нашего века теория отбора получила хорошее математическое обоснование; был также проведен анализ ряда эмпирических фактов.

6.2.1.1. Математические модели отбора: дарвиновская приспособленность

Область применения математических моделей в теории естественного отбора и их ограничения [124]. Обсуждая отбор, мы будем довольно широко использовать математические модели. В этих моделях делается ряд предположений относительно некоторых параметров, например генных частот и селективного преимущества или неблагоприятности отдельных генотипов. Мы рассмотрим влияние этих предположений на направление и степень изменения генных частот во времени. Математическое моделирование способствует пониманию последствий изменения популяционных параметров, создавая некоторую упорядоченность в очень сложном и на первый взгляд не поддающемся анализу комплексе генетических различий между популяциями человека.

Такая упорядоченность может быть искусственной: при построении моделей некоторые популяционные аспекты выделяются, тогда как другие намеренно не учитываются. Это упрощает вычисления, однако может явиться источником серьезных ошибок. К главным упрощающим предположениям относятся следующие.

1. Размер популяции предполагается бесконечно большим. Следовательно, в отсутствие других факторов частоты генов остаются постоянными. В действительности бесконечно больших популяций не существует; напротив, размер многих популяций человека оставался очень малым в течение длительных периодов времени, крайне важных для его эволюции. Поэтому все результаты, полученные при использовании математических моделей, должны критически анализироваться в свете теории популяций малого размера (разд. 6.4) и сведений о величине и брачной структуре популяций человека. К сожалению, эти сведения, особенно касающиеся ранних исторических периодов, относительно неполны. Поэтому в конкретных случаях выводы делать трудно или вообще невозможно.
2. Как правило, предполагается, что селективное преимущество или невыгодность

генотипа постоянны в течение длительных периодов эволюции. Однако более внимательное изучение биологических основ этих характеристик показывает, что их величина изменяется даже в пределах относительно коротких промежутков времени.

3. Предполагается, что поколения дискретны. В действительности воспроизведение популяций является непрерывным процессом и поколения сильно перекрываются. Впрочем, это не оказывает большого влияния на выводы, полученные путем математического моделирования. Анализ моделей с перекрывающимися поколениями см. в работах Жакара (Jacquard, 1974 [103]).

Детерминистические и стохастические модели: использование ЭВМ. Различные ограничения относятся в основном к моделям, где предполагается наличие функциональной связи между параметрами. Например, предполагают, что изменение генных частот в поколениях зависит от определенного вида отбора, такая модель называется «детерминистической». Однако в действительности все популяционные параметры – частота генов, давление отбора, скорость мутирования – подвержены случайным флуктуациям из-за того, что размер популяции является конечным. С появлением ЭВМ возникла возможность включения в расчеты случайных флуктуаций; таким образом были созданы стохастические модели. Изменение генных частот в популяциях моделируют, исходя из предположения, что популяция имеет какую-то определенную величину. В этом случае, например, кривая, отражающая изменение генных частот во времени, соответствует не идеальному результату, а только одному из возможных результатов, причем неизвестно даже, является ли данная кривая очень вероятной. Поэтому произвести расчеты для определенного набора параметров один раз недостаточно для того, чтобы получить при данных допущениях неискаженную картину; одни и те же расчеты необходимо повторить несколько раз. Этот метод дает лучшие результаты, чем применение детерминистической модели: кроме общей тенденции, выявляются также возможные отклонения от нее, обусловленные случайными флуктуациями. В следующем разделе мы в основном будем использовать детерминистические модели, однако иногда будут рассматриваться и стохастические модели.

Как использовать модели на практике? Для демонстрации общих закономерностей естественного отбора как в случае детерминистических, так и в случае стохастических моделей необходимо вводить упрощающие предположения. Однако при анализе конкретной ситуации нельзя забывать, что эти предположения в действительности являются упрощающими. Выводы, полученные при математическом моделировании, могут быть корректными с формальной точки зрения, однако часто упускается из виду возможность того, что они основываются на аспектах модели, не соответствующих реальности. Некритическая интерпретация формальных результатов, полученных на упрощенных моделях, наносит значительный ущерб развитию популяционной генетики человека.

Последовательность событий при моделировании должна быть такой:

- а) пусть существует некое генетическое явление, нуждающееся в теоретическом объяснении;
- б) формулируется гипотеза; разрабатывается относительно простая модель, включающая основной параметр (параметры) этой гипотезы;
- в) в рамках модели анализируется изменение частот генов и генотипов во времени или межпопуляционные генетические различия;
- г) проводится сравнение результатов моделирования с эмпирическими данными;
- д) регистрируется расхождение между теоретически ожидаемыми и наблюдаемыми результатами. Их критическая интерпретация может привести к отказу от гипотезы, изменению предположений относительно основных параметров модели или к уточнению модели.

Представление о том, что данная конкретная проблема требует тщательной разработки с использованием математическо-

го моделирования, может появиться с увеличением объема наших знаний. С другой стороны, вполне возможно, что, хотя модель, разработанная для решения этой проблемы, и будет адекватной с формальной точки зрения, она приведет к тривиальным или нереалистическим выводам.

Понятно, что идеальная последовательность событий при исследовании проблем популяционной генетики часто невозможна из-за технических и логистических ограничений. Однако необходимо подчеркнуть, что, по нашему мнению, исследования в области популяционной генетики, опирающиеся на принятую заранее гипотезу, дают больше для понимания популяционно-генетических процессов, чем описательные работы, даже если последние украшены самыми изящными и современными статистическими методами.

Концепция дарвиновской приспособленности. Дарвиновская приспособленность - это центральная концепция теории отбора. В конкретных условиях среды не все индивиды в популяции размножаются одинаково успешно. Эти различия обусловлены их генетическими особенностями. Данная проблема, очевидно, имеет много медицинских, социальных и генетических аспектов. Однако в связи с естественным отбором значение имеет только один ее аспект: различные скорости размножения особей, имеющих разный генотип. Если считать размер популяции бесконечно большим, так что случайными отклонениями можно пренебречь, к изменению генных частот во времени могут привести только репродуктивные различия. Репродуктивную способность определенного генотипа по сравнению с нормой часто называют дарвиновской приспособленностью этого генотипа. Понятие приспособленности можно определить и для одного аллеля, если этот аллель оказывает влияние на репродуктивную способность его носителя. Приспособленность генотипа может быть большей или меньшей по двум причинам.

1. Если генетическая конституция индивида уменьшает вероятность того, что носитель этого генотипа доживет до репродуктивного возраста. Такое снижение жизнеспособности часто вызывается наследственными болезнями.
2. Если генетическая конституция уменьшает вероятность того, что индивид с данным генотипом произведет потомство, т.е. уменьшает его плодовитость.

Однако эти причины мало влияют на конечный результат – изменение генных частот – и, следовательно, на определение дарвиновской приспособленности.

С точки зрения популяционной генетики, между геном, вызывающим спонтанный аборт, и геном, приводящим к стерильности человека, здорового в других отношениях, нет никакой разницы. С медицинской и социальной точек зрения между действием этих генов имеются значительные различия.

6.2.1.2. Отбор, приводящий к изменению генных частот в одном направлении

Используемые символы. Приспособленность генотипа определяется как его способность производить потомство. Она измеряется не в абсолютных, а в относительных единицах, причем приспособленность оптимального генотипа принимается равной единице. Отклонения от единицы обозначаются через s . Например, если приспособленность генотипа составляет 80% от приспособленности оптимального генотипа ($s = 0,2$), приспособленность этого генотипа равна $1 - s = 1 - 0,2 = 0,8$. Чтобы избежать путаницы со знаками, иногда удобно использовать непосредственную меру приспособленности $1 - s = w$. Иногда в литературе s определяется не относительно оптимальной, а относительно средней приспособленности популяции w . Такое обозначение не очень удачно, так как в этом случае приспособленность генотипа изменяется в зависимости от распределения генотипов в популяции. Поэтому мы будем определять приспособленность по отношению к «оптимальному» генотипу. *Элиминация гетерозиготного «доминантного» фенотипа.* Этот случай простой и встречается часто: какая-либо мутация изменяет фенотип ее носителя так сильно, что его размножение полностью прекращается. К таким последствиям у человека приво-

дят все нарушения числа хромосом, большинство хромосомных aberrаций и многие доминантные генные мутации (разд. 5.1.3). Хромосомные aberrации обнаруживаются прямым методом, однако вновь возникающие доминантные мутации можно выявить только в том случае, если они передаются потомству. Следовательно, доминантные мутации, приводящие к потере репродуктивной способности, невозможно обнаружить. О ее присутствии можно судить только на основании обследования тех немногочисленных индивидов, которые все же дали потомство, или по эффекту отцовского возраста. Возможно, что некоторые болезни и врожденные аномалии вызываются такими до сих пор не выявленными доминантными мутациями.

Частичная элиминация аутосомных доминантных мутаций. Большинство вызываемых доминантными мутациями заболеваний уменьшает среднюю репродуктивную способность их носителей. В отсутствие противодействующих факторов, таких как мутационный процесс, эта потеря генов приводит в каждом поколении к уменьшению генных частот на некоторую величину, которая зависит от интенсивности отбора против носителей мутации (рис. 6.8). Пусть p - частота доминантного аллеля A , а q — частота рецессивного нормального аллеля a . Пусть отбор идет с достаточно высокой интенсивностью, а скорость мутирования μ

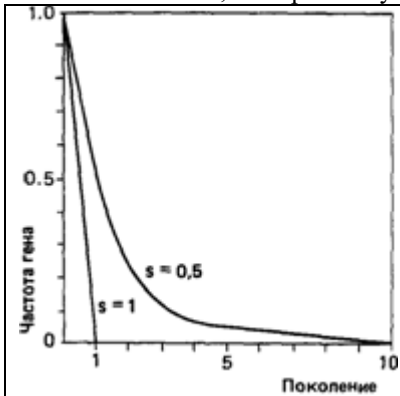


Рис. 6.8. Уменьшение частоты доминантного гена в отсутствие вновь возникающих мутаций при $s = 1$ и $s = 0,5$; s - коэффициент отбора.

низка (разд. 5.3.1). Тогда гомозиготами AA можно пренебречь, поскольку их частота p^2 очень низка. Частоты генотипов равны:

Генотип	Приспособлен- ность	Перед отбо- ром	После отбора
aa	$1 - (= w_{22})$	$q^2 \approx 1 - 2p$	$\frac{1 - 2p}{1 - 2ps}$
Aa	$1 - s (= w_{21})$	$2pq \approx 2p$	$\frac{(1 - s)2p}{1 - 2ps}$

Элиминация особей Aa из популяции на поколение равна приблизительно $2ps$. Поскольку только половина их генов - A , утрата генов A на поколение составляет $1/2(2ps) = ps$. Генетическое равновесие поддерживается, если эта утрата компенсируется возникновением мутаций:

$$ps = \mu(1 - p) \approx \mu.$$

Отсюда равновесная частота p

$$\hat{p} = \mu/s. \quad (6.1)$$

Интересны два крайних случая:

- 1) Гетерозиготы не размножаются, т. е. $s = 1$, $w_{21} = 0$. В соответствии с выводом, сделанным нами в предыдущем разделе, частота доминантного аллеля p будет равна скорости мутирования μ .
- 2) Ген не является селективно невыгодным (т. е. $s = 0$, $w_{21} = 1$). При таких условиях равновесие не возникает; частота доминантного аллеля монотонно возрастает: $\mu/s \rightarrow \infty$
- 3) наконец, рассмотрим промежуточный случай, когда доминантный ген испытывает некоторое давление направленного против него отбора, например $s = 1/3$, $w_{21} = 2/3$; конечная частота доминантного гена будет равна утроенной скорости мутирования.

Против большинства патологий действует отбор определенной интенсивности. Их частота в популяции определяется равновесием между мутационным процессом и отбором. Конечно, определяющим фактором здесь является скорость мутирования. Частота заболевания растет до тех пор, пока число пораженных индивидов не уве-

дичится настолько, что интенсивность направленного против них отбора уравнивает скорость мутирования и будет достигнуто генетическое равновесие. Это равновесие стабильно. Если число пораженных превысит равновесную величину, утрата неблагоприятного аллеля в результате отбора будет происходить быстрее его возникновения путем мутирования, и в следующем поколении его частота уменьшится. С другой стороны, если число больных станет ниже равновесной величины, мутационный процесс приведет к появлению большего числа неблагоприятных генов, чем то количество, которое отмечается естественным отбором, и частота гена будет увеличиваться, пока вновь не установится равновесие.

Ослабление отбора. Уравнение 6.1 можно использовать для определения последствий релаксации отбора. Предположим, что в результате медицинского вмешательства некоторые фенотипические проявления доминантной мутации были устранены, что привело к снижению селективной невыгодности аллеля с $s_1 = 1/2$ до $s_2 = 1/4$. Пусть $\hat{p}$ – равновесная частота для s_2 . Тогда из уравнения (6.1)

$$\hat{p} = \frac{\mu}{1/2} = 2\mu; \quad \hat{p}_2 = \frac{\mu}{1/4} = 4\mu; \quad \hat{p}_2 = 2\hat{p}_1.$$

Следовательно, новая частота равна удвоенной старой. Новое равновесие будет достигнуто через несколько поколений.

Ослабление отбора против ретинобластомы. Ретинобластома — это злокачественная опухоль глаза, поражающая детей раннего возраста. Подавляющее большинство случаев возникновения ретинобластомы в популяциях являются спорадическими. Однако заболевание часто встречается в семьях и имеет аутосомное доминантное наследование с 90%-ной пенетрантностью. Все билатеральные, но только 10-12% унилатеральных спорадических случаев обусловлены вновь возникающими мутациями.

В прежние время ретинобластома почти всегда приводила к фатальному исходу: больные погибали в детском возрасте. В 1865 г. ван Графе впервые применил энуклеацию пораженного глаза; позднее в практику были введены дополнительные терапевтические меры - рентгеновское облучение и коагуляция светом; в настоящее время около 90% больных с унилатеральным и 80% больных с билатеральным поражением могут вылечиться и иметь детей [1887]. Из всех вновь возникающих мутаций, определяющих наследственную форму ретинобластомы, 68% вызывают билатеральный и 32% унилатеральный тип поражения. Изменение частоты этого заболевания можно прогнозировать следующим образом.

Пусть X_0 -частота больных наследственной ретинобластомой в популяции; поскольку это заболевание очень редкое, частотой гомозигот можно пренебречь, а частоту нормального аллеля принять за $q \approx 1$; тогда X_0 почти равна частоте гетерозигот ($2pq \approx 2p$). Пусть перед релаксацией отбора $s_1 = 1$. После появления эффективных методов лечения давление отбора в случае унилатеральной формы стало $s_u = 0,1$ (только 10% больных унилатеральной формой ретинобластомы умирают в детском возрасте; 90% из них выживают и имеют потомство); давление отбора в случае билатеральной формы $s_b = 0,2$ (80% больных выживают и имеют потомство). Отсюда получаем следующую суммарную оценку s_2 (сохранившийся после релаксации отбор против ретинобластомы):

$$s_2 = s_u \times 0,32 + s_b \times 0,68 = 0,1 \times 0,32 + 0,2 \times 0,68 = 0,168.$$

Новый коэффициент отбора после ослабления его интенсивности равен 16,8% от прежнего (до релаксации) коэффициента отбора ($s=1$). Частота гетерозигот в $(n+1)$ -м поколении, X_{n+1} , получается из частоты гетерозигот в n -м поколении, X_n , путем применения следующей приближенной формулы:

$$X_{n+1} = X_n(1 - s_2) + 2\mu = X_n(1 - s_2) + X_0.$$

Из этой рекуррентной формулы можно получить общую формулу для X_n .

$$X_n = X_0[1 + (1 - s_2) + (1 - s_2)^2 + \dots + (1 - s_2)^n].$$

Таким образом, новая равновесная частота гетерозигот X представляет собой сумму членов геометрической прогрессии с начальным членом $X_0 = 2\mu$ и знаменателем $(1 - s_2)$:

$$\hat{X} = \frac{X_0}{1 - (1 - s_2)} = \frac{X_0}{s_2} = \frac{X_0}{0,168} = 5,95 \times X_0.$$

Этот результат может быть получен также из уравнения (6.1). Отсюда следует, что через несколько поколений после применения эффективного лечения наследственная ретинобластома станет встречаться примерно в 6 раз чаще. Используя реальные оценки, полученные для современных популяций (см. табл. 5.8), получаем $X_0 = 2\mu = 1,2 \times 10^{-5}$:

$$\hat{X} = \frac{1,2 \times 10^{-5}}{0,168} = 7,14 \times 10^{-5}.$$

Из этой величины можно вычислить суммарную частоту *всех* случаев ретинобластомы, включая ненаследственные случаи, если известна доля наследственных случаев среди всех случаев ретинобластомы в популяции перед ослаблением отбора. Общая частота ретинобластомы приблизительно равна 4×10^{-5} ; следовательно, около $2,8 \times 10^{-5}$ – частота наследственной формы. Отсюда получаем оценку равновесной частоты после ослабления отбора:

$$7,14 \times 10^{-5} + 2,8 \times 10^{-5} = 9,94 \times 10^{-5}.$$

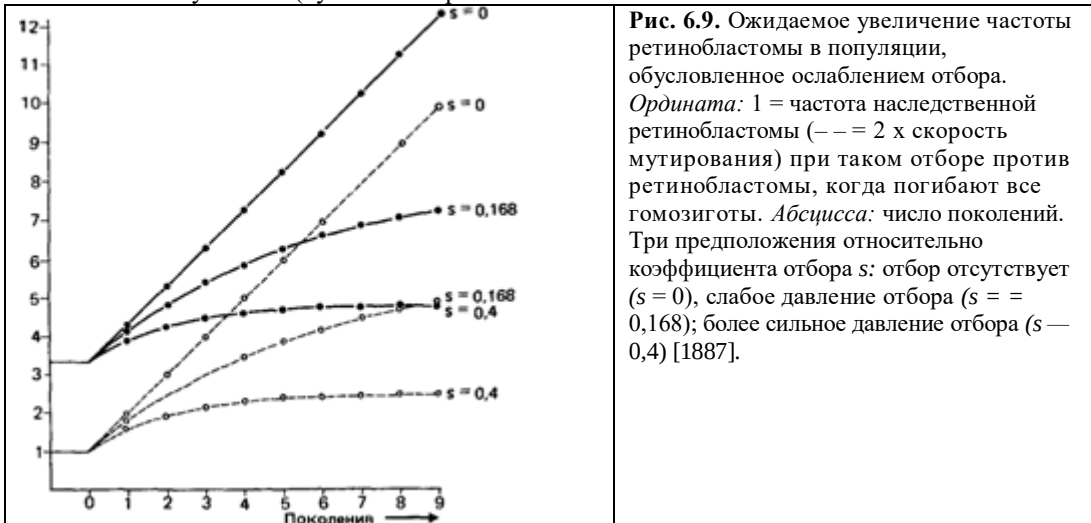
Это значит, что частота ретинобластомы возросла с $\approx 1:25000$ до $1:10000$, т.е. на 150%. Кроме того, до ослабления отбора наследственными являлись около 30% случаев, тогда как при новом состоянии равновесия наследственными окажутся уже $\approx 72\%$. Это равновесие устанавливается относительно быстро (рис. 6.9): через 9 поколений частота наследственной ретинобластомы увеличилась более чем в 4 раза по сравнению с соответствующей частотой до ослабления отбора (при равновесии $X = 5,95 X_0$). На рис. 6.9 приведены также расчеты для двух альтернативных случаев: $s_2 = 0,4$ и $s_2 = 0$, т.е. отбор отсутствует. В последнем случае частота возрастает линейно и равновесие не устанавливается. Можно все же надеяться, что теоретически рассчитанные частоты на станут фактическими, естественный отбор будет частично заменен искусственным, благодаря генетическому консультированию и добровольному контролю над рождаемостью, осуществляемому носителями данной мутации.

Отбор путем полной элиминации гомозигот. Гомозиготы по многим рецессивным аутосомным заболеваниям обычно не размножаются. Рассмотрим опять два аллеля А и а, имеющие частоты p и q . Однако пусть теперь против гомозигот aa действует отбор: $s = 1$; $w_{22} = 0$.

Частота зигот указана в таблице. В общем случае частоты генов в двух последовательных поколениях n и $n + 1$ связаны следующим образом:

$$q_{n+1} = \frac{q_n}{1 + q_n}. \quad (6.2)$$

Эта формула выражает рекуррентное соотношение между последовательными частичными суммами (суммами первых n



членов) гармонической последовательности¹⁾. Из нее можно получить общую формулу для генной частоты q_n через n поколений:

$$q_n = \frac{q_0}{1 + nq_0}. \quad (6.3)$$

Изменение частоты гена за поколение равно

$$\Delta q_n = \frac{q_n}{1 + q_n} - q_n = -\frac{q_n^2}{1 + q_n}. \quad (6.4)$$

Из уравнения (6.3) следует, что $q_n = q_0/2$, если $nq_0 = 1$. Следовательно, через $n = 1/q_0$ поколений частота гена уменьшится вдвое.

Рассмотрим важное практическое при-

¹⁾ Гармоническая последовательность — это такая последовательность, последовательные частичные суммы которой являются величинами, обратными соответствующим членам арифметической последовательности:

$$u_0 = \frac{c}{b}; \quad u_1 = \frac{c}{b+k}; \quad u_2 = \frac{c}{b+2k} \text{ и т. д.}$$

В данном конкретном случае $b = 1$; $c = k = u_0$.

300 6. Популяционная генетика

ложение полученных соотношений. Если размножение гомозигот по кистозному фиброзу будет полностью отсутствовать, как это повлияет на частоту данного гена? Коэффициент отбора против гомозигот $s = 1$.

	AA	Aa	aa	Частота аллеля, a
До отбора	p^2	$2pq$	q^2	
После отбора	$\frac{p^2}{p^2 + 2pq}$	$\frac{2pq}{p^2 + 2pq}$	0	$\frac{q}{1 + q}$

Частота гена, определяющего это заболевание, $q_0 = 0,02$, что соответствует частоте гомозигот в панмиктической популяции, равной $q_0^2 = 0,0004$, т. е. 4 больных на 10000 индивидов. Через $n = 1/0,02 = 50$ поколений q_0 уменьшится с 0,02 до 0,01. Принимая длительность поколения за 30 лет, такое уменьшение частоты гена в два раза потребует 1500 лет. В случае более редких заболеваний, таких, как галактоземия, $q_0 = 0,005$, $q^2 = 1:40\,000$; частота гена уменьшится вдвое за 200 поколений, или 6000 лет.

Таким образом, попытки снизить число рецессивных генов в популяции путем прекращения репродукции гомозигот крайне неэффективны. Более того, в этих расчетах даже не принимались во внимание вновь возникающие мутации.

Частичная элиминация гомозигот. При некоторых рецессивных заболеваниях гомозиготы не теряют репродуктивной способности полностью, однако их биологическая приспособленность сильно понижается. Предположим, что репродуктивная способность гомозигот снизилась на s ($1 > s > 0$). Частоты генов до и после отбора можно взять из таблицы 6.5. Они дают такую частоту рецессивного аллеля в следующем поколении:

$$q_1 = \frac{pq + q^2(1 - s)}{1 - sq^2} = \frac{q(1 - sq)}{1 - sq^2}. \quad (6.5)$$

Соотношение между частотами рецессивного аллеля в двух последовательных поколениях задается формулой

$$q_{n+1} = \frac{q_n(1 - sq_n)}{1 - sq_n^2}.$$

Таблица 6.5. Частичная элиминация гомозигот				
	AA	Aa	aa	Сумма
Перед отбором	P^2	$2pq$	q^2	1
Приспособленность	1	1	$1 - s$	
После отбора	P^2	$2pq$	$q^2(1-s)$	$1 - sq^2$

Вероятно, эта рекуррентная формула не имеет общего решения. Изменение частоты на поколение равно

$$\Delta q_n = q_{n+1} - q_n = - \frac{sq_n^2(1 - q_n)}{1 - sq_n^2}.$$

Δq зависит как от q_n , так и от $p_n = 1 - q_n$. Если одна из этих величин мала, Δq также мало. Например, для $s = 0,2$ q : 0,99 0,50 0,01 Δq : $-0,00244 - 0,0263 - 0,0000198$.

При очень малых значениях q , Δq аппроксимируется $-sq^2$.

Некоторые расчеты. Для того чтобы определить изменение q за большое число поколений, Δq можно заменить на

$$\frac{dq}{dt} = -sq^2(1 - q); \quad \frac{dq}{q^2(1 - q)} = -sdt.$$

Интегрируя обе части по n поколениям, получаем

$$\int_{q_0}^q \frac{dq}{q^2(1 - q)} = -s \int_0^n dt = -sn$$
$$sn = \left[-\frac{1}{q} + \ln \frac{1 - q}{q} \right]_{q_0}^{q_n} = \frac{1}{q_n} - \frac{1}{q_0} + \ln \frac{1 - q_n}{q_n} -$$
$$- \ln \frac{1 - q_0}{q_0} = \frac{q_0 - q_n}{q_0 q_n} + \ln \frac{q_0(1 - q_n)}{q_n(1 - q_0)}.$$

Вычисление числа поколений (n), необходимого для того, чтобы q изменилось на определенную величину (при $s = 0,01$ против гомозигот), дает следующие величины:

Уменьшение q	Число поколений
0,9999-0,9990	230
0,9990-0,9900	232
0,9900-0,5000	559
0,5000-0,0200	5189
0,0200-0,0100	5070

За это время могут произойти события, которые значительно сильнее повлияют на генетический состав популяции.

Гаметический отбор. До сих пор мы предполагали, что отбор действует на стадии зиготы. Однако отбор может происходить уже на стадии гаметы. Из-за своего генетического состава некоторые гаметы имеют меньшую вероятность оплодотворения по сравнению с остальными.

Если какая-нибудь мутация оказывает влияние на вероятность оплодотворения, по этой мутации будет наблюдаться отклонение от нормального расщепления. Предполагается, что именно этим объясняется аномальное расщепление, наблюдающееся при синдроме Алпорта и оптической атрофии Лебера (разд. 3.1.5). Для всех других заболеваний соответствие с менделевским расщеплением обычно считается очевидным. На самом деле это может быть не так, поскольку для демонстрации незначительных отклонений от менделевских соотношений необходимы большие выборки. Однако возникновение существенных отклонений маловероятно.

В случае гамет, несущих сбалансированные и несбалансированные транслокации, нарушение расщепления несомненно имеет место, однако его механизм еще не выяснен (разд. 2.2.2). Если относительный вклад гамет А и а в генофонд следующего поколения составляет 1 и 1 — s, а их частоты равны p и q, то их вклад в генофонд следующего поколения будет p и q(1 — s) соответственно. Тогда изменение генной частоты на поколение

$$\Delta q = \frac{q(1-s)}{1-sq} - q = \frac{-sq(1-q)}{1-sq}.$$

Все приведенные выше примеры на самом деле не очень просты. Поскольку отбор, вероятно, по-разному действует на зародышевые клетки разного пола, ситуация усложняется в случае таких аномалий, как например, транслокации.

С формальной точки зрения, гаметический отбор почти идентичен отбору против гомозигот и гетерозигот с промежуточным значением приспособленности (табл. 6.6).

Таблица 6.6. Коэффициент отбора 2s против гетерозигот и s против гомозигот				
	AA	Aa	aa	Сумма
Перед отбором	P^2	$2pq$	q^2	1
Приспособленность	1	1 - s	1 - 2s	
После отбора	p^2	$2pq(1-2s)$	$q^2(1-2s)$	$1-2sq$

6.2.1.3. Отбор, приводящий к генетическому равновесию

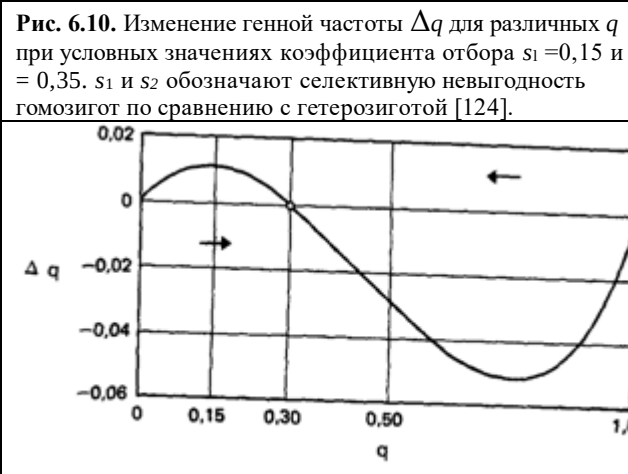
До сих пор мы рассматривали только случаи отбора, приводящего к увеличению частоты одного аллеля за счет уменьшения частоты другого. Равновесие и, следовательно, стабильность генных частот в поколениях в этом случае достигается только за счет действия внешнего фактора – возникновения мутаций. Однако существуют формы отбора, которые сами по себе приводят к достижению равновесия. Стабильное состояние популяции с отсутствием систематических изменений генных частот может возникнуть при отборе в пользу гетерозигот.

Отбор в пользу гетерозигот при селективной невыгодности обеих гомозигот. Гетерозис, являющийся биологической основой этого типа отбора, уже долгое время известен в экспериментальной генетике. Это явление исследовалось с теоретической точки зрения; широкое применение оно нашло и в практической селекции растений, особенно кукурузы [1744; 1755a; 1868; 1869].

Гетерозисом, или гибридной силой, называется явление, когда гетерозиготные особи превосходят соответствующих гомозигот по одному или нескольким признакам. Это фенотипический результат взаимодействия между аллельными генами [1754]. В генетике человека основное внимание уделялось гетерозису, обусловленному возникновением мутаций и генетических комбинаций, которые приводят к повышению приспособленности гетерозигот по сравнению с соответствующими гомозиготами.

Таблица 6.7. Отбор в пользу гетерозигот

	AA	Aa	aa	Сумма
Перед отбором	p^2	$2pq$	q^2	1
Приспособленность	$1 - s_1$	1	$1 - s_2$	
После отбора	$p^2(1 - s_1)$	$2pq$	$q^2(1 - s_2)$	$1 - s_1p^2 - s_2q^2$



Преимущество гетерозигот: формальные следствия. В табл. 6.7 приведены генотипы до и после отбора (отбор против фенотипов AA и aa с коэффициентами отбора s_1 и s_2). Используя соотношение $pq + q^2 = q$, получаем изменение частоты от предыдущего поколения к последующему

$$\Delta q = \frac{q - s_2q^2}{1 - s_1p^2 - s_2q^2} - q = \frac{pq(s_1p - s_2q)}{1 - s_1p^2 - s_2q^2}.$$

На рис. 6.10 показано Δq при различных значениях q для $s_1 = 0,15$ и $s_2 = 0,35$; Δq может быть положительным или отрицательным в зависимости от того, больше или меньше s_1p , чем s_2q . Если $s_1p = s_2q$, $\Delta q = 0$. Решение уравнения для p и q дает следующие равновесные значения частот:

$$\hat{p} = \frac{s_2}{s_1 + s_2}; \quad \hat{q} = \frac{s_1}{s_1 + s_2}. \tag{6.6}$$

Эти равновесные значения зависят только от s_1 и s_2 : они не зависят от частот генов в начале отбора. Равновесие является стабильным: Δq положительно, если $q < \hat{q}$, и отрицательно, если $q > \hat{q}$. При нарушении в результате случайных воздействий равновесие имеет тенденцию к восстановлению.

Главный пример преимущества гетерозигот у человека - селективный механизм, приводящий к высокой частоте гена серповидноклеточной анемии в некоторых популяциях человека. Подробно он рассматривается в разд. 6.2.1.6.

6.2.1.4. Отбор, приводящий к нестабильному равновесию

Отбор против гетерозигот. В популяции может установиться стабильное равновесие, если отбор идет в пользу гетерозигот и против гомозигот. Однако отбор может действовать и в пользу гомозигот против гетерозигот. Пусть приспособленности генотипов AA, Aa и aa равны 1, $1 - s$ и 1 соответственно. Изменение генных частот в этом случае показано в табл. 6.8. Отсюда

$$q' = \frac{pq(1 - s) + q^2}{1 - 2spq} = \frac{q - spq}{1 - 2spq} \text{ и } \Delta q = \frac{spq(2q - 1)}{1 - 2spq} \approx 2spq\left(q - \frac{1}{2}\right), \tag{6.7}$$

если s мало. На рис. 6.11 показано изменение Δq в зависимости от q .

Если $q = \frac{1}{2}$, $\Delta q = 0$. Это означает наличие генетического равновесия, однако в данном случае равновесие неустойчивое. Если $q > \frac{1}{2}$, Δq положительно. Частота гена стремится к 1. С другой стороны, если $q < \frac{1}{2}$, Δq становится отрицательным и q стремится к 0. Нестабильное равновесие само по себе неспособно поддержать-

Таблица 6.8. Отбор против гетерозигот				
	AA	Aa	aa	Сумма
Перед отбором	p^2	$2pq$	q^2	1
Приспособленность	1	$1 - s$	1	
После отбора	p^2	$2pq(1-s)$	q^2	$1 - 2spq$

вать в популяции полиморфизм; даже в условном примере, где две гомозиготные по двум разным аллелям популяции смешиваются в равных пропорциях, небольшие сдвиги генных частот, происходящие в результате случайных флуктуации, скоро приведут к нарушению состояния равновесия и частота гена начнет сдвигаться к 1 или 0.

Тем не менее такая маловероятная ситуация, возможно, имеет место. Для человека известно два случая, когда единственный селективный фактор, который пока установлен, - это отбор против гетерозигот. В одном из этих случаев, системе Rh (11170), аллельные частоты соответствуют нашему определению полиморфизма. В случае перичентрических инверсий гетерозиготы имеют полиморфные частоты и иногда встречаются гомозиготы.

Перичентрические инверсии. У гетерозигот по перичентрической инверсии спаривание гомологичных хромосом во время мейоза может произойти неправильно. Образующиеся в результате несбалансированные гаметы элиминируются перед оплодотворением или образуют нежизнеспособные зиготы. С другой стороны, у гомозигот по перичентрическим инверсиям нарушений мейоза не ожидается, у них спаривание гомологов должно проходить нормально. Действительно, в потомстве родителей, имеющих перичентрические инверсии, наблюдается высокий уровень репродуктивной потери [401a]; соответствующие популяционно-генетические исследования не проводились. Однако такие исследования необходимы, поскольку перичентрические инверсии играют важную роль в эволюции человека: по-видимому, они обеспечивают мощный механизм репродуктивной изоляции. Перичентрические инверсии не влияют на состояние здоровья гетерозиготных носителей, однако ухудшают их репродуктивную способность. Это классический (и, возможно, лучший) пример влияния плодовитости на приспособленность при отсутствии изменения жизнеспособности. Вероятно, этим и определяется значение перичентрических инверсий для эволюции и в особенности для видообразования (разд. 7.2.1).

Отбор против гетерозигот по Rh-фактору. Неустойчивое равновесие, возникающее при отборе против гетерозигот, было впервые открыто Холдейном (1942) [1777] для конкретного случая серологической несовместимости матери и ребенка по Rh-фактору. Этот случай несколько сложнее, чем рассмотренная выше ситуация с перичентрическими инверсиями. Угроза эритроblastоза и, следовательно, отбор против гетерозигот возникают, если Rh-отрицательная мать вынашивает Rh-положительный плод. Лocus *Rh* имеет сложную структуру. Однако для понимания принципа отбора по этому локусу достаточно рассмотреть только аллели *D* (положительный) и *d* (отрицательный), что сводит задачу к простой диаллельной системе. Дети с эритроblastозом рождаются у родителей $dd \times DD$ или $dd \times Dd$. В табл. 6.9 приве-

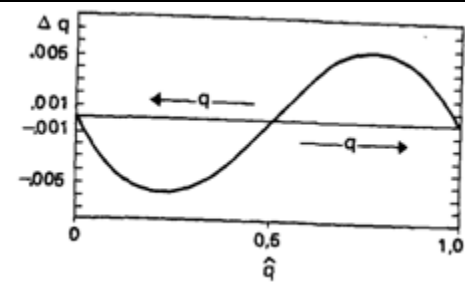


Рис. 6.11. Изменение генной частоты Δq . Отбор против гетерозигот с $s = 0,50$. Δq отрицательно, если $q < \frac{1}{2}$, и положительно, если $q > \frac{1}{2}$ [124].

Отцы → Матери	$DD \ p^2$	$Dd \ 2pq$	$dd \ q^2$
$DD \ p^2$	$p^4 \ DD$	$p^3q \ DD$ $p^3q \ Dd$	$p^3q^2 \ Dd$
$Dd \ 2pq$	$p^3q \ DD$ $p^3q \ Dd$	$p^2q^2 \ DD$ $2p^2q^2 \ Dd$ $p^2q^2 \ dd$	$pq^3 \ Dd$ $pq^3 \ dd$
$dd \ q^2$	$p^2q^2 \ Dd$	$pq^3 \ Dd$ $pq^3 \ dd$	$q^4 \ dd$

Таблица 6.9. Типы браков и классы потомства, против которых действует отбор, обусловленный Rh-несовместимостью

дены типы брачных пар; строчки, соответствующие детям, против которых действует отбор и для которых велик риск возникновения эритроblastоза, выделены цветом. Учитывая все типы браков, получаем следующую формулу для изменения частоты аллеля D:

$$\Delta q = \frac{p - \frac{1}{2}q^2(s_1p^2 - s_2pq)}{1 - q^2(s_1p^2 + s_2pq)} - p = \frac{p\left(p - \frac{1}{2}\right)q^2(s_1p + s_2q)}{1 - pq^2(s_1p + s_2q)}. \quad (6.8)$$

Здесь s_1 отражает отбор против детей, матери которых имеют генотип dd , а отцы – DD ; s_2 – отбор против гетерозиготных детей матерей dd и отцов Dd . Поскольку риск иммунизации возрастает с числом детей генотипа Dd , он ниже, если отец имеет генотип Dd (ведь в таком браке в среднем только каждый второй ребенок вызывает у матери иммунизацию), тогда как у отца с генотипом DD каждый ребенок гетерозиготен и может привести к иммунизации матери; следовательно; $s_2 < s_1$.

Легко показать, что $\Delta p = p' - p$ только в том случае, когда $p = 1/2$. Это означает, что уравнение (6.8) имеет ту же точку равновесия, что и уравнение (6.7). Здесь равновесие также нестабильно (рис. 6.12).

В современных популяциях Западной Европы аллель d встречается с частотой $q = 0,35$. Следовательно, его частота должна уменьшаться при отсутствии других селективных механизмов, противодействующих этой тенденции. С какой скоростью будет происходить это уменьшение частоты? На рис. 6.13 показано Δp для нескольких поколений, полученное при двух предположениях о начальных частотах p для D и q для d , и коэффициентах отбора s_1 и s_2 , изменяющихся в пределах, действительно наблюдаемых в популяциях человека. Перед введением профилактической терапии сывороткой анти-D у женщин из группы риска число пораженных детей зависело от среднего числа беременностей [1740]. Правдоподобной оценкой является 5% детей, пораженных эритроblastозом, от всех детей Dd матерей dd . В прежнее время, когда женщины имели больше беременностей, эта цифра, вероятно, была несколько выше.

Из рис. 6.13 видно, что изменение генных частот в этих условиях происходит очень медленно из-за того, что не все гетерозиготы подвержены отбору (табл. 6.9).

Отбор против гетерозигот может нарушаться другими, пока неизвестными формами отбора, даже если их интенсивность очень низка. Возможно, что время, в течение которого в популяциях происходило случайное скрещивание, недостаточно для проявления действия отбора против гетерозигот (имеется в виду время, прошедшее с

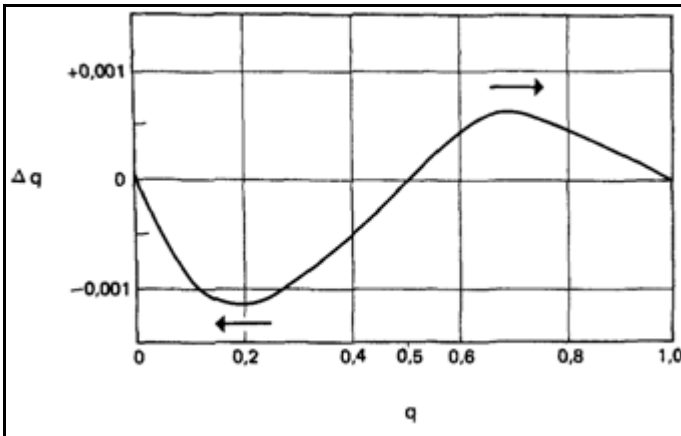
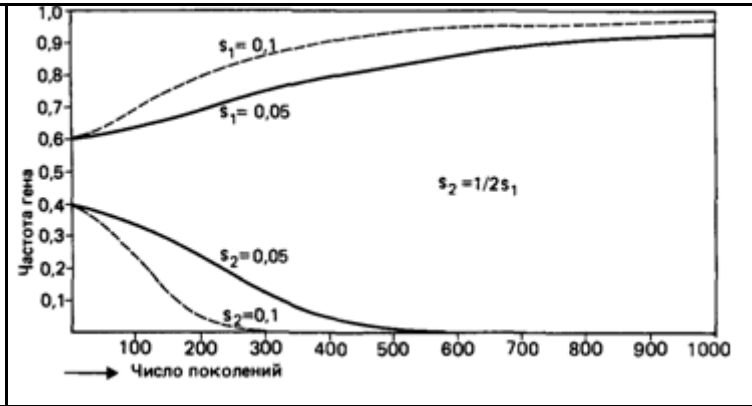


Рис. 6.12. Нестабильное равновесие при $p = q = 0,5$ в случае несовместимости матери и плода по резус-фактору, коэффициент отбора $s_1 = 0,05$ для гетерозиготных детей гомозиготных отцов DD ; $s_2 = 1/2s_1$ для гетерозиготных детей гетерозиготных отцов Dd .

Рис. 6.13. Изменение частоты одного из аллелей (p) при отборе, обусловленном несовместимостью мать - плод, p уменьшается, если в начале отбора $p < 0,5$; p увеличивается, если в начале отбора $p > 0,5$ [211].



того периода, когда случайные флуктуации в популяциях человека, состоящих из небольших сравнительно изолированных субпопуляций, создавали огромные межпопуляционные различия генных частот - разд. 6.4.1).

Исчерпывающее объяснение полиморфизма по Rh-фактору с точки зрения популяционной генетики остается загадкой ввиду высокой частоты аллелей системы Rh в очень многих популяциях. Предполагается, что в отборе по этой системе принимают участие другие пока неизвестные «силы».

Система групп крови ABO. Серологическая несовместимость матери и плода характерна также для системы групп крови ABO. В отличие от Rh-иммунизации здесь может быть затронут даже первый ребенок [211]. Эритробластоз в этом случае, как правило, выражен слабее, чем при Rh-несовместимости. Однако ABO-несовместимость может также привести к увеличению числа спонтанных аборт, хотя данные об этом противоречивы [211]. Очевидно, отбор идет в основном против детей АО и ВО матерей 0.

Соответствующие рекуррентные уравнения можно получить аналогично приведенным выше для двухаллельного случая системы Rh. Разница состоит только в том, что в системе ABO отбор против гетерозиготных детей гомозиготных и гетерозиготных отцов одинаков, поскольку в отличие от Rh-иммунизации первый ребенок с несовместимостью может быть уже пораженным. Изменение частоты аллеля A описывается следующей формулой:

$$\Delta p = \frac{p - \frac{s}{2}pr^2}{1 - sr^2(1-r)} - p = \frac{spr^2\left(\frac{1}{2} - r\right)}{1 - sr^2(1-r)} \quad (6.9)$$

Совершенно аналогичная формула может быть получена для Δq (изменение частоты аллеля B). Формула для Δr , изменения частоты аллеля 0, несколько отлична:

$$\Delta r = \frac{r - \frac{s}{2}r^2(1-r)}{1 - sr^2(1-r)} - r = \frac{sr^2(1-r)\left(r - \frac{1}{2}\right)}{1 - sr^2(1-r)} \quad (6.10)$$

Если $r = 0,5$, $\Delta p = \Delta q = \Delta r = 0$ независимо от соотношения между p и q . Это равновесие нестабильно по отношению к r и нейтрально по отношению к p и q . На рис. 6.14 показана скорость, с которой r приближается к 1, а p и q — к 0. Предполагается, что другие селективные механизмы не действуют; начальные аллельные частоты приняты равными соответствующим частотам в населении Западной Европы (A: $p = 0,3$; B: $q = 0,16$; 0: $r = 0,6$). Коэффициенты отбора получены на основе эмпирических данных. Изменение генных частот происходит гораздо быстрее, чем в случае Rh (рис. 6.13).

6.2.1.5. Другие формулы отбора

Частотно-зависимый отбор [103; 1739]. До сих пор мы считали, что селективные ценности генотипов постоянны. Однако они могут быть функцией частоты генотипов

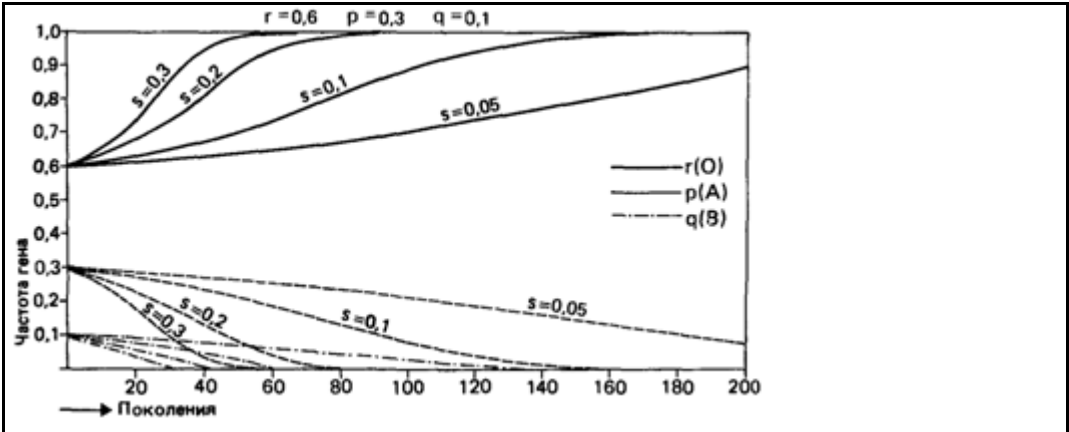


Рис. 6.14. Изменение частот генов по группам крови системы ABO, обусловленное отбором, направленным против детей АО и детей ВО матерей 0. p - частота аллеля А, q - частота аллеля В, r - частота аллеля 0, r стремится к 1, p и q стремятся к 0 [211].

или плотности популяции. Такой тип отбора известен как частотно-зависимый. Говоря конкретнее, при отрицательной корреляции между селективной ценностью генотипа и его частотой генотип с уменьшением его частоты становится более селективно ценным. В разд. 3.5.5 в качестве примера неравновесия по сцеплению по тесно сцепленным локусам, обусловленного селективным преимуществом некоторых комбинаций аллелей (гаплотипов), приведена бейтсовская мимикрия у бабочки *Papilio memnon*. Пример *Papilio memnon* иллюстрирует также частотно-зависимый отбор: селективная ценность мимикрирующей формы зависит от отношения ее частоты к частоте вида, который она имитирует (модели). Когда мимикрирующая форма имеет низкую частоту, хищники встречают несъедобную модель чаще, чем мимикрирующий вид. Поэтому они начинают избегать и модель, и мимикрирующую форму, что приводит к селективному преимуществу последней. Однако при увеличении частоты мимикрирующей формы хищники будут встречать ее чаще, чем несъедобную модель, и перестанут ее избегать. Если частота мимикрирующей формы намного превысит частоту модели, хищники станут связывать ее внешний вид со съедобностью. Тогда генотип станет селективно невыгодным.

Примем следующую простую модель частотно-зависимого отбора по доминантному гену:

Фенотип	Частота	Приспособленность
А	$1 - q^2$	$w_1 = 1 + s_1(1 - q^2)$
а	q^2	$w_2 = 1 + s_2q^2$

Тогда

$$\Delta q = q' - q = \frac{pqw_1 + q^2w_2}{\bar{w}} - q = \frac{pq^2(w_2 - w_1)}{\bar{w}}$$
$$\bar{w} = (1 - q^2)w_1 + q^2w_2 = 1 + s_1(1 - q^2) + s_2q^4.$$

Следовательно, условие равновесия

$$w_1 = w_2 \text{ или } q^2(s_1 + s_2) - s_1 = 0.$$

Данное уравнение имеет решение относительно частоты гена q тогда и только тогда, когда коэффициенты отбора s_1 и s_2 оба положительны или оба отрицательны. Это решение имеет вид

$$\hat{q} = \sqrt{\frac{s_1}{s_1 + s_2}}.$$

Величина приспособленности для соотношения равновесия

$$\hat{w}_1 = \hat{w}_2 = \hat{w} = 1 + \frac{s_1s_2}{s_1 + s_2}.$$

Можно показать, что это равновесие стабильно в том случае, когда s_1 и s_2

отрицательны (но не меньше —1). Это значит, что стабильное равновесие существует, если аллель А имеет селективное преимущество при низкой частоте (как в случае бейтсовской мимикрии).

В состоянии равновесия приспособленности всех генотипов одинаковы. В отсутствие доминирования, если приспособленности всех трех фенотипов различны, расчеты становятся более трудоемкими [103]. Однако можно показать, что и в этом случае частотно-зависимый отбор приводит к стабильному полиморфизму при отсутствии преимущества гетерозигот.

Указанный механизм может поддерживать полиморфизм даже при селективной невыгодности гетерозигот. Более того, в некоторых случаях существует более одной точки устойчивого равновесия. Возможно, что у человека взаимная адаптация паразита к хозяину и наоборот происходит путем частотно-зависимого отбора. Паразит (например, бактерия или вирус) может адаптироваться к наиболее распространенному биохимическому или иммунологическому типу хозяина; при этом более редкие типы будут иметь селективное преимущество [1779]. Паразит имитирует антигены хозяина, либо приобретая способность продуцировать его антигены, либо прямо, используя материал мембраны хозяина для синтеза собственной мембраны. Первый механизм (генетический) реализуют бактерии, содержащие АВН-подобный антиген [211] (разд. 6.2.1.8); второй механизм, возможно, встречается у некоторых вирусов. В обоих случаях иммунные защитные системы хозяина «обмануты» и паразит размножается успешнее, чем в том случае, если бы он не имел общих с хозяином антигенов. Отбор является частотно-зависимым, поскольку вирус в основном адаптируется к наиболее часто встречающемуся генотипу и более редкие генотипы имеют селективное преимущество.

Один из способов защиты хозяина от такой «стратегии» паразита – создание им высокополиморфной системы с большим разнообразием сочетаний антигенов на поверхности клеток. В этом случае паразит не сможет получить селективного преимущества, адаптируясь лишь к одному специфическому сочетанию антигенов. Такая высокополиморфная система возникла в случае главного комплекса гистосовместимости (МНС), который включает локусы HLA, а также другие локусы, участвующие в иммунном ответе (разд. 3.5.5).

Частотно-зависимый отбор в сочетании с неравновесием по сцеплению [1739]. Отбор может зависеть не только от относительных частот генотипов в популяции, но и от отношения абсолютного размера популяции к размерам ареала, т.е. от плотности популяции. Показано, что сбалансированный полиморфизм поддерживается отбором, зависящим от плотности, в широком диапазоне условий. В определенных обстоятельствах в полиморфной популяции может присутствовать большее число особей, чем в мономорфной. Еще важнее тот факт, что изменения плотности популяции могут привести к *генетическим пертурбациям*, которые имитируют эффекты генетического дрейфа (разд. 6.4). Изменения популяционной плотности имели большое значение для эволюции человека, например в неолите, когда он осваивал некоторые сельскохозяйственные приемы. Поэтому можно предположить, что отбор, зависящий от плотности, играл большую роль в эволюции нашего вида.

Родственный отбор. В последнее время эволюционисты обсуждают другой тип отбора: родственный отбор (или отбор родичей: kin selection). Обычно животные взаимодействуют друг с другом и с окружающей средой, объединяясь в группы: семьи, трибы, стаи. В пределах такой группы часто наблюдается поведение, противоречащее предположению о борьбе каждой особи со всеми другими представителями своего вида за выживание и размножение, т.е. тому, что подразумевалось в ранних моделях отбора. Биологический смысл некоторых форм такого поведения (например, альтруистического), которое иногда даже стоит особи жизни, интуитивно очевиден, скажем, в случае матери, защищающей от хищника свое потомство. Но бывают случаи, когда биологическая основа поведения менее ясна, например лев, «наследующий» гарем, убивает потомство своего предшественника. Теоретическое объяснение такого социального поведения (как альтруистического, так и других типов) оставалось загадкой для эволюционистов со времен Дарвина и до тех пор, пока в 1964 г.

Хамилтон [1784] не разработал теорию родственного отбора. Эта теория сложна и здесь будет рассмотрена только в общих чертах. Однако основная ее идея проста и очевидна: особь борется за сохранение и передачу *своих генов*. Часто «интересы» генов особи совпадают с ее собственными интересами; однако, к примеру, если особь имеет двух потомков, то, с точки зрения теории, пожертвовать за них жизнью равнозначно спасению своей жизни за их счет, поскольку каждый из них несет половину генов родительской особи. Если потомков трое или больше, альтруистическое поведение приобретает еще большую ценность, так как при выживании потомков сохраняется большее количество генов родительской особи, чем в случае ее собственного выживания. Аналогичные рассуждения применимы к сибсам или более отдаленным родственникам (дедам, бабкам, дядям, племянникам и т.д.). С другой стороны, лев владеет гаремом в течение ограниченного промежутка времени. Он «заинтересован» в том, чтобы за это время оставить как можно большее число потомков. Львицы, выкармливающие детенышей другого самца, не овулируют и не способны к зачатию. Следовательно, в интересах льва убить этих детенышей.

На теоретических концепциях Хамилтона и его последователей основывается социобиология – отрасль биологии, приобретающая все большее значение (разд. 7.2.4). Ее выводы стали доступными широкому кругу ученых благодаря дискуссии по поводу «эгоистических генов» и вызвали горячие споры между биологами, философами и социологами. Их понимание требует знания концептуальных предпосылок. Ниже приводится простое формальное обоснование альтруистического поведения [1738]:

Ген А обуславливает альтруистическое поведение его носителей. Например, самка дрозда, пролетая очень близко от кошки, отвлекает ее внимание от своих птенцов с риском быть пойманной самой. Альтруистическое поведение может снизить приспособленность особи на величину c , в то же время повышая приспособленность родственной ей особи на величину b . Ген А имеет селективное преимущество, если $c/b < r$, где r – «коэффициент связи» между донором и реципиентом, r измеряет вероятность того, что копия данного гена донора имеется у реципиента; величина r зависит только от относительного положения донора и реципиента в родословной. В отсутствие инбридинга значения r равны:

Сибсы: 1/2	Двоюродные сибсы: 1/8
Полусибсы: 1/4	Родители - дети 1/2

Это означает, что r равно доле общих по происхождению генов, которые имеют две особи (см. разд. 6.3.1).

Теперь выведем это правило для простой диплоидной модели со следующими характеристиками.

1. Один локус, два аллеля; А – ген «альтруизма» (частота равна p); а – ген «эгоизма» (частота равна q).
2. Популяция панмиктическая, ее численность бесконечно велика.
3. Ген А определяет взаимоотношения между двумя родственными особями, например «сibs—сibs» или «двоюродный сibs—двоюродный сibs».
4. Поскольку предложенное условие распространения гена А $-r > c/b$, то в модели условие распространения этого гена $c/b < ?$, и ? сравнивается с r .

Если приспособленности трех генотипов (АА, Аа и аа) равны w_{11} , w_{12} и w_{22} соответственно, условие распространения гена аллеля А [45]:

$$p (w_{11} - w_{21}) + q (w_{21} - w_{22}) > 0.$$

Приспособленности можно записать следующим образом:

$$w_{11} = 1 + s, w_{21} = 1 + r, w_{22} = 1 + t,$$

где r , s и t обозначают дополнительные изменения приспособленности, происходящие в результате альтруистического поведения.

Теперь определим следующие величины: N - размер популяции (очень большой);

n - число «альтруистических действий» на поколение;

b - приращение приспособленности особи, которой была оказана помощь;

c - убыль приспособленности особи, оказавшей помощь;

m - доля n действий в помощь индивидам АА;

e - доля n действий в помощь индивидам Аа;

x - доля n действий, где «помощник» имеет генотип АА.

Используя эти определения, можно записать приспособленности следующим образом:

$$w_{11} = 1 + \frac{nbm - nxc}{p^2 N},$$

$$w_{21} = 1 + \frac{nbe - nc(1 - x)}{2pqN},$$

$$w_{22} = 1 + \frac{bn(1 - m - e)}{q^2 N}.$$

В этих уравнениях генотипам просто придаются коэффициенты, определяющие уменьшение (c) или увеличение (b) их приспособленности за счет альтруистического действия (нормированные на число особей). Подставляя эти выра-

жения в формулу 6.1, получаем

$$c/b < \frac{2m + e - 2p}{1 + x - 2p} \quad (6.11)$$

Конечно, знак < изменяется на обратный, если приспособленность увеличивается за счет реципиента.

Для того чтобы показать, что в случае полных сибсов (выражение 6.11) сводится к 1/2, как утверждалось выше, необходимо получить формулы для m , e и x . Они имеют следующий вид [1738]:

$$m = (x + p) \left[\frac{1 + p}{4} \right]; \quad e = \frac{1 + p - p^2 - xp}{2}.$$

Если эти выражения подставить в формулу 6.11, оно сводится к 1/2. Сходные расчеты можно произвести для других степеней родства. Более общую и строгую трактовку читатель найдет, например, в работах Хамилтона.

Отбор по мультифакториальным признакам с непрерывным распределением. До сих пор мы рассматривали только отбор по отдельным генам. Однако многие нормальные и аномальные признаки и многие заболевания имеют в популяциях непрерывное распределение и детерминируются некоторым точно не установленным числом генов. В принципе, закономерности теории отбора применимы и к этим признакам. Однако, поскольку такие признаки на фенотипическом уровне пока еще не поддаются генетическому анализу (разд. 3.6), здесь необходимо использовать биометрические методы [63; 65; 124]. Эти методы имеют большое значение для селекции растений и животных. Приведем некоторые закономерности отбора по полигенным признакам:

- 1) изменение количественного признака в популяции под действием естественного отбора пропорционально величине наследуемости (обсуждение концепции наследуемости см. в разд. 3.6.1.5);
- 2) ответ признака на отбор зависит от интенсивности отбора (рис. 6.15, *А* и *Б*);
- 3) он также зависит от генетической изменчивости популяции (рис. 6.15). В отсутствие генетической изменчивости отбор неэффективен.

На рис. 6.16 показаны последствия искусственного отбора в нескольких поколениях. Среднее значение признака сдвигает-

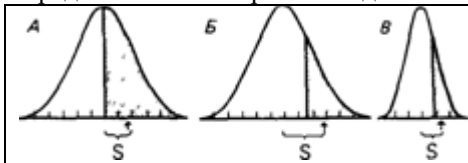


Рис. 6.15. Отбор по непрерывно распределенному мультифакториальному признаку (*А*). Отбор происходит благодаря тому, что 50% популяции не размножается (значение признака меньше популяционной средней, незаштрихованный участок графика). В поколении F_1 средняя сдвигается на s . Можно показать, что этот сдвиг равен $0,8 \times$ стандартное отклонение (SD). (*Б*). Отбор происходит благодаря тому, что 80% популяции не размножается. В следующем поколении средняя сдвигается на $1,4 \times$ SD. (*В*). Популяция с более низким уровнем генетической изменчивости. Если, как в случае (*Б*), не размножается 80% популяции, отношение изменения средней к стандартному отклонению то же самое, но его абсолютное значение гораздо ниже (в этом случае 1/2) [63].

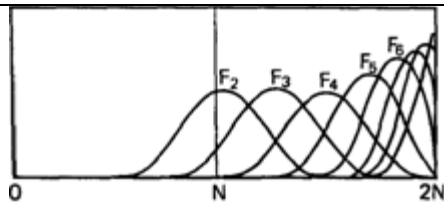


Рис. 6.16. Действие отбора в нескольких поколениях на непрерывно распределенный признак с мультифакториальным наследованием. По мере сдвига средней изменчивость постепенно падает. То же самое происходит при действии отбора в одном поколении. В конечном итоге популяция станет генетически гомогенной и дальнейший отбор будет невозможен [63].

ся в сторону направления отбора, а генетическая изменчивость уменьшается от поколения к поколению до тех пор, пока отбор становится неэффективным.

Мутации, вызывающие слабые, почти неразличимые изменения мультифакториальных систем, вероятно, имеют большое эволюционное значение. Под действием отбора эти мутации приводят к медленным и постепенным сдвигам значений количественных признаков.

Один из наследственных признаков, имеющих непрерывное распределение и потому считающихся полигенными, - предрасположенность к таким «мультифакториаль-

ным» болезням, как врожденные пороки развития, многие распространенные патологии или расстройства психики. Изменение давления отбора (например, путем успешного лечения врожденных болезней сердца или шизофрении) приведет к изменению кривой распределения предрасположенности к данному заболеванию и, следовательно, к увеличению частоты его встречаемости. Однако произвести количественную оценку таких изменений трудно. Мы недостаточно хорошо знаем, дает ли мультифакториальная генетическая модель адекватное описание реальной ситуации.

6.2.1.6. Отбор, обусловленный инфекционными болезнями [1831; 211]

В предыдущих разделах рассмотрены наиболее важные математические модели отбора и некоторые их практические применения к ситуациям, встречающимся в популяциях человека. Однако мы пока не касались типа отбора, который, возможно, является основным в популяциях человека: отбора, возникающего в результате генетически обусловленных различий в восприимчивости к инфекционным заболеваниям.

Отбор в результате инфекционных заболеваний в популяциях прошлого. Естественный отбор особенно эффективен, когда он действует за счет дифференциальной смертности до достижения репродуктивного возраста, т. е. в детском и юношеском возрасте. Первые достоверные статистические данные по детской смертности были получены в XVIII в. в Европе [1875]. На рис. 6.17 показана выживаемость детей от рождения до 20-летнего возраста в середине XVIII в. в Пруссии, типичной стране Центральной Европы. Более половины новорожденных не доживали до 20 лет. Приблизительно четверть из них погибала в течение первого года жизни. Каковы были причины ранней смертности? Статистические данные отвечают на этот вопрос только частично, поскольку не все диагнозы того времени можно соотнести с известными сейчас болезнями. Однако не приходится сомневаться в том, что большинство детей умирало от вирусных и бактериальных инфекционных заболеваний, кишечных инфекций, оспы, туберкулеза и кори. Следовательно, можно априорно предположить, что инфекционные болезни являются селективными факторами. Эндемичные инфекции, воздействующие на каждое поколение, должны быть более селективно эффективными, чем эпидемии, возникающие только эпизодически, такие, например, как чума.

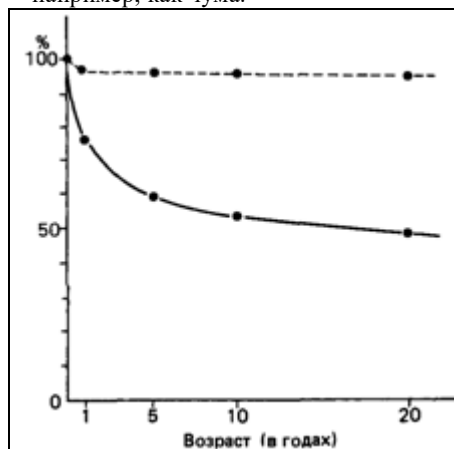


Рис. 6.17. Выживаемость детей от рождения до возраста 20 лет в Пруссии (Центральная Европа) в XVIII в. [1875]. Для сравнения пунктиром показана выживаемость для Берлина (1955).

История некоторых инфекционных заболеваний.

Какие инфекционные болезни могли влиять в прошлом на частоту генов в популяциях?

1. Острые инфекционные заболевания, распространявшиеся на целые страны и уносившие значительную часть их населения. Примеры: чума, холера, оспа.
2. Хронические инфекционные заболевания, например туберкулез, проказа и сифилис.
3. Разнородная группа кишечных инфекций, которые затрагивали все возрастные группы, но к летальному исходу приводили, в основном, в младенчестве и в раннем детстве.
4. Тропические болезни, например малярия.

Информация, касающаяся истории этих болезней, фрагментарна и зачастую неточна, поскольку бактериологические данные об эпидемиях прошлого отсутствуют, а по описаниям диагнозов часто невозможно поставить. Однако некоторые выводы все же сделать можно [1791].

1. Первые упоминания о чуме относятся к концу II – началу III в. до н.э. Известны подробные описания чумы в Александрии и Ливии в начале нашей эры; в средние века чума несколько раз вспыхивала в Европе, унося тысячи жизней. В более недавнее время эпидемии приходили с Ближнего Востока (Турции) и Южной и ЮгоВосточной Азии. Центры возникновения оспы находились в Африке и Азии, особенно в Индии и Китае. В обеих этих странах оспа была из-

вестна в течение тысячелетий; В Индии даже существовала богиня оспы Сита.

2. Туберкулез был эндемичным заболеванием в значительной части Старого Света и распространялся вместе с белыми поселенцами. В средние века в Европе часто встречалась проказа, однако к XVIII в. она была вытеснена оттуда благодаря улучшению условий жизни. В настоящее время проказа распространена в Индии, Юго-Восточной Азии и Южной Америке. Согласно одной из гипотез, сифилис являлся болезнью Нового Света (Центральной и Южной Америки) и был ввезен в Европу сразу после открытия Америки. После эпидемий конца XV начала XVI в. сифилис стал эндемичной болезнью [1728]. Хотя эта гипотеза достаточно хорошо соответствует многим историческим фактам, она принята далеко не всеми. Исторические гипотезы такого рода трудно опровергнуть, но еще труднее подтвердить.

3. Известно, что детская смертность от кишечных инфекций была очень высока в Европе вплоть до 1900 г., а в некоторых обширных областях Азии, Африки и Латинской Америки – до гораздо более недавнего времени. Представляется вероятным предположение о том, что высокая детская смертность от этих заболеваний наблюдалась в течение всей истории человечества. Гипотезы, более конкретно трактующие эти заболевания, сформулировать невозможно.

4. Хотя статистические данные по смертности, подобные упомянутым выше для Пруссии (рис. 6.17), для тропических стран появились только в последнее время, многие сведения указывают на то, что даже после второй мировой войны во многих из этих стран детская смертность была еще очень высока. Ее причина – различные заболевания, главные из которых – тропическая малярия и кишечные инфекции. Если предрасположенность к этим болезням обусловлена генетически, чувствительные индивиды должны умирать чаще, тогда как индивиды, обладающие большей генетической устойчивостью, имеют большую вероятность выжить и передать свои гены потомству. На генетический состав современных популяций человека подобные различия в устойчивости к инфекционным заболеваниям тоже оказывают сильное влияние. Последние десятилетия ознаменовались значительными успехами в изучении механизмов такой устойчивости и исследовании генетического состава популяций человека. Остановимся на двух примерах.

1. Отбор, обусловленный заболеваемостью малярией в связи с частотой генов гемоглобина в населении тропических стран.

2. Отбор в связи с группами крови системы ABO. Благодаря успехам, достигнутым за последние годы иммуногенетикой, в недалеком будущем в популяционный анализ, вероятно, будут включены и другие генетические системы.

Распределение гена серповидноклеточности и других генов, кодирующих аномальные формы гемоглобина. Наиболее известный пример гетерозиса у человека – селективный механизм, обуславливающий высокую частоту гена серповидноклеточности в некоторых популяциях. Молекулярные основы, генетическое определение и взаимосвязь генотипа и фенотипа в случае серповидноклеточного гемоглобина рассматриваются в разд. 4.3 и 5.1.4.

Серповидноклеточный гемоглобин (HbS) возникает в результате замены одного нуклеотида в глобиновой р-цепи. Пораженные гомозиготы страдают тяжелой гемолитической анемией, тогда как гетерозиготные индивиды в нормальных условиях клинически здоровы.

С точки зрения популяционной генетики, поразительной особенностью гена серповидноклеточности является его крайне неравномерное распределение в мировой популяции. Впрочем, такое распределение обнаруживает не только этот ген; оно характерно для некоторых других вариантов гемоглобина, например HbC, D, E и талассемии. Однако ген серповидноклеточности встречается наиболее часто. В пределах широкого периекваториального пояса от Камеруна и Конго до Танзании гетерозиготность по HbS варьирует от 25% до такого высокого уровня, как 40%. Эта частота слегка понижается в направлении западной части Африки. В северной и южной Африке она гораздо ниже; во многих популяциях этих областей HbS встречается только спорадически. В Средиземноморье HbS особенно распространен в Сицилии, Калабрии и некоторых районах Греции. На полуострове Халкидики частота гетерозигот достигает 30%. Ген HbS сравнительно часто встречается в популяциях Южной Индии и обнаруживается в арабских странах. Его нет у коренных жителей Америки, практически отсутствует он и во всех популяциях севера и северо-запада Европы. В принципе существуют три объяснения такого неравномерного распределения.

1. Различная частота возникновения мутаций (скорость мутирования), причины которой могут быть либо внешними (например, дифференциальное воздействие мутагенных факторов), либо внутренними (например, неравномерное распределение мутаторных генов).
2. Разное давление отбора в различных условиях среды.
3. Случайные колебания генных частот (генетический дрейф), особенно если эффективная репродуктивная величина популяции мала (разд. 6.4.1).

Начнем обсуждение с последней возможности и отметим, что случайное возникновение различий между такими большими группами популяций, как в случае HbS, крайне маловероятно. Опровергает последнюю гипотезу и тот факт, что все известные полиморфные варианты гемоглобина (HbS, C, D, E и талассемии) встречаются почти исключительно в тропической и субтропической зонах. Вот почему предположение о дрейфе генов никогда всерьез не принималось в расчет при объяснении распределения этих генов.

Различная скорость мутирования. Эта гипотеза рассматривалась серьезно [1836]. Для вычисления частоты возникновения мутаций HbS был использован косвенный метод Холдейна (разд. 5.1.3). Согласно этому методу, сначала определяется число мутантных генов у пораженных неразмножающихся гомозигот, которые в каждом поколении элиминируются из популяции. Если считать, что между мутационным процессом и отбором существует генетическое равновесие, то частота возникновения мутаций HbS приблизительно равна частоте элиминации этих мутаций из популяции. Подсчитанная таким образом «скорость мутирования» в некоторых популяциях оказалась равной 10^{-2} (1:100). Эта величина настолько высока, что представляется маловероятной. Гипотеза о необыкновенно высокой частоте возникновения мутаций серповидноклеточности действительно вскоре была отвергнута [1805].

Из 530 матерей, каждая из которых имела по крайней мере одного ребенка, страдающего серповидноклеточной анемией, 525 обладали признаком серповидноклеточности (т. е. имели серповидные эритроциты), и, следовательно, считались гетерозиготами. Из 485 отцов этот признак обнаружен у 445. В подобных исследованиях следует рассматривать только данные по матерям, если путем анализа по многим генетическим маркерам не было показано, что их «официальные» отцы действительно являются биологическими отцами. Однако даже те пять матерей, которые не имели серповидных эритроцитов, все-таки не были носителями вновь возникшей мутации: вероятно, они были носителями β -талассемии и их дети страдали серповидноклеточной β -талассемией, клинические проявления которой очень сходны с серповидноклеточной анемией. В любом случае максимальная вероятная скорость мутирования далеко не так высока, чтобы на ее основе можно было объяснить высокую частоту гена в популяции.

Все имеющиеся данные свидетельствуют об очень низкой скорости мутирования, обусловленной одиночными замещениями нуклеотидов ДНК (разд. 5.1.4): возможно, в пределах 10^{-8} — 10^{-9} . Отсюда, учитывая малочисленность популяций в прежние века, можно предположить, что в конечном счете все гены серповидноклеточности произошли от очень небольшого числа мутаций или только от одной мутации. Недавно этот вывод был подтвержден при исследовании сцепления 11 вариантов полиморфизма ДНК у негров США и Ямайки. Было обнаружено четыре кластера гаплотипов, ни один из которых не мог быть получен из остальных в результате менее чем двух кроссинговеров. Это указывает на наличие 4 или даже менее мутационных событий, если считать, что произошли два кроссинговера или две генные конверсии (разд. 2.3.4).

Соответствующие гаплотипы по генам серповидноклеточности были найдены в средиземноморских популяциях, и, стало быть, гены серповидноклеточности в популяциях Средиземноморья возникли не в результате отдельной мутации, а были внесены африканскими неграми [1721]. Принимая во внимание очень низкие значения оценок скорости мутирования (разд. 5.1), мы считаем весьма вероятным предположение о том, что все аллели HbS произошли от *одной* мутации и что теперешнее

присутствие этого аллеля в четырех гаплотипах объясняется очень редкими рекомбинационными событиями или генной конверсией (см. разд. 2.3 и 4.3). Такие же рассуждения применимы и в случае HbE.

Почему же все-таки столь высока частота этих генов в популяциях? Вероятно, они должны иметь селективное преимущество.

Гипотеза о малярии. Исследование географического распространения этих генов и их всесторонний анализ показали следующее.

1. Их селективное преимущество, вероятно, ограничивается тропическими и субтропическими регионами.
2. Гомозиготные по ним индивиды страдают тяжелой гемолитической анемией. Репродуктивная способность гомозигот составляет приблизительно 20-25% от нормальной; в примитивных условиях жизни она приближается к нулю. В Центральной Африке вплоть до последнего десятилетия ген серповидноклеточности вообще не встречался, поскольку пораженные анемией дети умирали в раннем возрасте. Высокая частота HbS может быть достигнута только благодаря селективному преимуществу гетерозигот, которые встречаются гораздо чаще, чем гомозиготы.

На основе этих двух фактов была высказана гипотеза о том, что гетерозиготы по HbS менее подвержены тропической малярии, чем гомозиготы по нормальному аллелю.

Бит [1724; 1725] показал, что в районе Бейловейла и в других областях Северной Родезии в течение сухого сезона, когда заболеваемость малярией вообще низка, в мазках крови детей, гетерозиготных по гену серповидноклеточности, малярийные паразиты встречаются реже, чем у нормальных гомозигот. Эта разница была статистически недостоверна, однако спленомегалия у гетерозигот также была менее выраженной. Вероятно, Бит первым высказал предположение, что основным селективным фактором в данном случае является малярия. В 1951 г. Ламбот-Легран (Заир) предположил, что церебральная малярия реже поражает гетерозигот по серповидноклеточной анемии.

Отмечая сходное географическое распространение талассемии и малярии, Холдейн [1778] предположил, что талассемия поддерживается в популяции благодаря селективному преимуществу гетерозигот в присутствии малярии. Эта гипотеза была проверена для гена серповидноклеточности Аллисоном, сформулировавшим ее следующим образом:

1. Состояние гомозиготности по гену серповидноклеточной анемии фактически является в Африке летальным... Скорость элиминации этого гена не может компенсироваться вновь возникающими мутациями.
2. Сбалансированный полиморфизм поддерживается в результате преимущества гетерозигот по гену серповидноклеточности, возникающему в основном благодаря их устойчивости к тропической малярии.
3. Селективное действие малярии осуществляется в основном путем дифференциальной выживаемости лиц, имеющих и не имеющих ген серповидноклеточности, в промежутке времени между рождением и репродуктивным возрастом и в гораздо меньшей степени путем дифференциальной плодовитости.
4. Высокая частота гена серповидноклеточности отмечается только в тех районах, где малярия является (или была до недавнего времени) эндемичным заболеванием.
5. В большинстве негритянских популяций Нового Света, частота гена серповидноклеточности ниже, чем ожидается на основе «разбавления» африканского генного пула примесью генов белой расы. Возможно, что это результат элиминации гена серповидноклеточности, происходящей при отсутствии уравновешивающего преимущества гетерозигот.
6. В районах, где оба гена, кодирующие аномальные формы гемоглобина, присутствуют одновременно и взаимодействуют таким образом, что обладание ими селективно невыгодно для их носителя, эти гены имеют тенденцию к исключению из популяции.

Перейдем к обсуждению данных, подтверждающих первые четыре пункта «гипотезы о малярии». Пункты 5 и 6 мы проанализируем в последующих разделах.

Аргументы в пользу «гипотезы о малярии». Этот пример иллюстрирует методологию проверки гипотезы о естественном отборе применительно к человеку.

Соответствующие данные можно разделить на две категории: 1) результаты проверки предположения относительно селек-

тивного преимущества; 2) результаты анализа репродуктивных процессов и частот генов в популяции с точки зрения данной гипотезы.

1. Гипотеза предсказывает, что дети раннего возраста (в течение первых пяти лет жизни), не имеющие признака серповидноклеточности, должны сильнее инфицироваться, тяжелее болеть и чаще умирать от тропической малярии, чем дети, гетерозиготные по серповидноклеточности. Гипотеза не предполагает, что дети школьного возраста и взрослые чаще заражаются малярией или болеют ею более тяжело. В гиперэндемичных районах иммунизация вследствие частых заболеваний малярией возникает уже в раннем возрасте, поэтому различий в уровне смертности между гетерозиготами по серповидноклеточности и нормальными гомозиготами не наблюдается.

В таблице 6.10 приведена частота заражения малярийным плазмодием (*Plasmodium falciparum*) для лиц, обладающих и не обладающих признаком серповидноклеточности. Статистическая обработка данных проведена методом Вулфа (разд. 3.7.2); средняя взвешенная относительная частота показывает, что риск тяжело заболеть у детей без серповидноклеточности (нормальных гомозигот) в 2,17 раза выше, чем для гетерозигот. В таблице представлены только случаи тяжелой формы заболевания (более 1000 паразитов в 1 мкл крови). Однако различия в приспособленности в результате заболевания малярией возникнут, только если большой процент пораженных нормальных гомозигот погибнет или если болезнь повлияет на их репродуктивную способность. В табл. 6.11 содержатся сведения о количестве фатальных исходов среди нормальных и гетерозиготных по HbS детей в некоторых районах Африки. За одним исключе-

Таблица 6.10. Частота сильного заражения *P. falciparum* у африканских детей [1719]

Авторы	Тип инфекции	Серповидноклеточность		Несерповидноклеточность		Сравнительная частота ¹⁾ (Woolf)	χ^2	Вероятность
		Сильное заражение	Сумма	Сильное заражение	Сумма			
Allison (1954a)	Группа 2 или 3	4	43	70	247	3,86	6,16	0,02 > P > 0,01
Foy et al. (1955)	Тяжелая	21	241	38	241	1,96	5,44	0,02 > P > 0,01
Raper (1955)	> 1000/мкл	35	191	374	1 009	2,63	23,74	P < 0,001
Colbourne and Edington (1956)	> 1000/мкл	3	173	57	842	4,11	5,59	0,02 > P > 0,01
Colbourne and Edington (1956)	> 1000/мкл	5	15	75	177	1,47	0,46	P > 0,50
Garlick (1960)	> 1000/мкл	25	91	147	342	1,99	7,06	0,01 > P > 0,001
Allison and Clyde (1961)	> 1000/мкл	36	136	152	407	1,66	5,27	0,05 > P > 0,02
Thompson (1962, 1963)	> 5630/мкл	3	123	42	593	3,05	3,38	0,10 > P > 0,05

¹⁾ Относительная частота сильного заражения *P. falciparum* в выборках лиц без серповидноклеточности (частота в соответствующих выборках лиц с серповидноклеточностью принята равной единице). Взвешенная средняя относительная частота = 2,17. Отличие от $\chi^2 = 51,379$ для 1 степени свободы P < 0,001. Межгрупповая гетерогенность $\chi^2 = 5,719$ для 7 степеней свободы, P > 0,5.

Таблица 6.11. Смертность от малярии носителей HbS(AS) [1829]

	Частота гетерозигот в популяции, %	Число умерших от малярии	Наблюдаемое число гетерозигот, умерших от малярии	Ожидаемое число гетерозигот, умерших от малярии
Леопольдвиль, Конго (Заир)	26	23	0	6
Лулуабург, Конго (Заир)	29	21		6,1
Ибадан, Нигерия	24	27	0	6,5
Аккра, Гана	8	13	0	1
Кампала, Уганда	19	16	0	3
Сумма		100	1 ¹⁾	22,6
¹⁾ $\chi^2 = 26,67$ $P < 0,001$.				

нием, от малярии гибли только нормальные гомозиготы. Учитывая, что частота серповидноклеточности в этих популяциях составляет 8-29%, эти результаты не могут быть случайными. Таким образом, можно сделать вывод, что нормальные гомозиготы имеют более высокую восприимчивость к малярии в раннем детстве и, следовательно, более высокую смертность по сравнению с гетерозиготами. Менее убедительны результаты исследований, в ходе которых добровольцев - носителей признака серповидноклеточности – заражали малярийным плазмодием. В одной из работ [1715] показано, что гетерозиготы по серповидноклеточности после экспериментального заражения малярией имели меньшую частоту носительства паразита по сравнению с контрольными индивидами, однако в других исследованиях этот результат не подтвердился. 2. В другой серии работ был проведен анализ популяционных последствий повышенной восприимчивости к малярии: а) высокая смертность среди детей, не имеющих признака серповидноклеточности, должна приводить к повышению частоты серповидноклеточности у взрослых по сравнению с детьми из той же популяции (табл. 6.12); б) высокая смертность среди лиц с нормальными эритроцитами, кроме того, должна привести к тому, что число выживших детей будет больше в браках, где происходит выщепление гетерозигот по серповидноклеточности. В табл. 6.13 приведены результаты подробного исследования по дан-

Таблица 6.12. Сравнение встречаемости гетерозигот по серповидноклеточности среди детей и взрослых [1718]

Популяция	Число обследованных детей	Гетерозиготы по серповидноклеточности, %	Число обследованных взрослых	Гетерозиготы по серповидноклеточности, %
Дар-эс-Салам	753	17,9	283	23,3
Конго, балуба	147	16,3	775	23,5
Конго, пигмеи	119	22,7	327	28,1
Дакар	1350	6,2	952	15,5
Руанда-Урунди	516	14,2	928	13,2
Мусома, Танзания	287	31,8	654	38,1
Мандинго, Гамбия	211	9,0	713	11,5
Йола, Гамбия	103	14,5	312	17,0
Фула, Гамбия	69	17,3	127	18,9
Йолофф, Гамбия	48	18,8	104	17,3

Таблица 6.13. Плодовитость и смертность детей у африканцев, живущих в области Мусома (Танзания)

Тип брака	Число браков	Общее число живых детей	Среднее число выживших детей/ брак	Число умерших детей	Среднее число детей/ брак	% умерших детей	Общее число детей (живых и умерших)	Общее число детей/ брак
AS x AS	18	44	2,44	35	1,94	44,3	79	4,39
AS x AA	84	221	2,63	121	1,44	35,3	342	4,07
AA x AA	74	172	2,32	115	1,55	40,1	287	3,88
Все типы	176	437	2,48	271	1,54	38,2	708	4,02

ному вопросу [1790, 1718]. Детская смертность оказалась самой высокой среди потомков двух гетерозигот. Это неудивительно, поскольку в таких браках четверть детей должна быть гомозиготной по гену серповидноклеточности и, следовательно, страдать серповидноклеточной анемией. Однако браки между гетерозиготами и нормальными гомозиготами (AS x AA) были относительно фертильными и в то же время в них было самое низкое число умерших детей. Такие результаты ожидаются в том случае, когда риск смерти в раннем возрасте ниже для гетерозигот. Используя разницу между наблюдаемыми частотами генотипов AA, AS и SS во взрослом населении района Мусома и соответствующими частотами, ожидаемыми на основании закона Харди—Вайнберга, Аллисон [1718] вычислил относительную приспособленность разных генотипов $w_{AA} = 0,7961$; $w_{AS} = 1,000$; $w_{SS} = 0,1698$, что соответствует s_1 (отбор против AA) = 0,2039; s_2 (отбор против SS) = 0,8302.

Достаточно ли такое соотношение между коэффициентами отбора, чтобы поддерживать генетическое равновесие, соответствующее реально наблюдаемым частотам гена серповидноклеточности? Чтобы проверить это, вернемся к уравнению 6.6, определяющему условия равновесия:

$$\hat{q} = \frac{s_1}{s_1 + s_2} = \frac{0,2039}{0,2039 + 0,8302} = 0,1972.$$

Генная частота такого порядка, соответствующая частоте гетерозигот, равной 31,7%, была действительно продемонстрирована для некоторых популяций. Таким образом, эти данные приблизительно соответствуют предсказаниям гипотезы сбалансированного полиморфизма.

Через сколько поколений установится такое равновесие, если отбор начался заново? На рис. 6.18 представлены результаты, полученные методом математического моделирования 40 поколений. Если предположить, что продолжительность поколения равна 25 годам, то 40 поколений соответствуют тысяче лет. Поскольку тысячелетие - не такой уж долгий срок, модель является реалистичной и с этой точки зрения. Некоторые данные указывают на

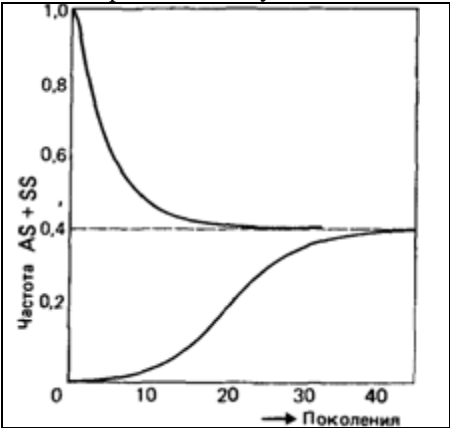


Рис. 6.18. Моделирование изменения суммарной частоты гомозигот и гетерозигот по серповидноклеточности при значениях s_1 и s_2 , указанных в тексте. Здесь предполагается, что приспособленность гетерозиготы в 1,26 раза выше, чем приспособленность нормальной гомозиготы. Приспособленность гомозиготы по серповидноклеточности составляет 1/4 приспособленности гетерозиготы [1872]. При таких разных начальных частотах, как 0 и 1, достигается одинаковая равновесная частота.

дополнительную потерю плодовитости, обусловленную плацентарной малярией у зараженных плазмодием нормальных женщин [1758]. Однако эти данные не вполне убедительны.

Некоторые другие аспекты «гипотезы о малярии» [1829, 1830]. В последнее время «гипотеза о малярии» исследовалась с различных точек зрения.

1. Показано [1814], что в эндемичных районах, где малярия повсеместно распространена, приблизительно 15% детской смертности связаны с ней. Если учесть, что детская смертность достигает здесь $\approx 50\%$, такой уровень смертности является достаточным для того, чтобы любой ген, обеспечивающий хотя бы частичную защиту от малярии, имел селективное преимущество.
2. Малярия - древняя болезнь; вероятно, в Средиземноморье она возникла по крайней мере 2000 лет (80 поколений) назад. В некоторых областях Африки малярия, вероятно, появилась позднее; возможно, в результате применения подсеčno-огневого земледелия [1812], которое способствовало размножению комаров в лужах с нагретой солнцем водой. Малярия и, следовательно, отбор в пользу гена серповидноклеточности зависят от экологических условий.

Что будет, если преимущество гетерозигот исчезнет? Гетерозиготы по серповидноклеточности имеют преимущество только в случае высокой детской смертности от малярии; при ликвидации малярии оно исчезает. Несомненно, во многих случаях заболеваемость малярией стала значительно ниже того уровня, на котором она была 20-30 лет назад, хотя в некоторых областях эта болезнь появляется вновь. Это означает, что в настоящее время преимущество гетерозигот по серповидноклеточности невелико или вообще отсутствует. Последствия этого для частоты гена серповидноклеточности очевидны. Отбор против гена серповидноклеточности должен привести к постепенному понижению его частоты при условии, что отбор против аномальных гомозигот (больных серповидноклеточной анемией) продолжается. Скорость уменьшения частоты можно рассчитать с помощью формул, использованных при рассмотрении отбора, полностью элиминирующего гомозиготы.

Поскольку большинство популяций негров Нового Света в течение нескольких поколений обитали в свободной от малярии среде, частота гена серповидноклеточности в них ниже, чем ожидается в результате притока генов белой расы (разд. 6.3.4).

Ожидаемое уменьшение частоты гена серповидноклеточности наблюдалось у негритянского населения Курасао, где малярия отсутствует, тогда как в негритянском населении Суринама частота выше. Обе эти группы имеют сходное африканское происхождение [1797]. Малярией страдает только население Суринама, эта болезнь там сохранилась до настоящего времени. Сходные результаты были получены при изучении популяции североамериканских индейцев штата Джорджия, где для нескольких генетических маркеров оценили приток генов белой расы (см. разд. 6.3.4). Оказалось, что признак HbS дает гораздо более высокое значение оценки притока генов белой расы, чем другие маркеры.

Эти результаты можно объяснить отбором против гетерозигот по HbS в отсутствие малярии [1729; 1797; 1884].

Популяционная генетика вариантов G6PD и тропическая малярия [1829; 1830]. До сих пор мы обсуждали только признак серповидноклеточности (HbS). Однако в тропических и субтропических областях распространены и другие генетические варианты эритроцитов. В качестве примера можно привести HbC в западной Африке, HbD в некоторых областях Индии, HbO в Аравии, HbE в Юго-Восточной Азии, различные типы α - и β -талассемии и некоторые варианты фермента глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы (G6PD). Весьма вероятно, что и для этих признаков малярия является селективным фактором. Однако полученные на этот счет данные далеко не так убедительны, как в случае серповидноклеточности. Здесь мы не можем обсуждать их подробно и ограничимся рассмотрением вариантов G6PD, талассемии и HbE.

Вскоре после открытия недостаточности по G6PD обнаружилось, что она наблюдается в основном в популяциях, происхо-

дящих из тропических и субтропических регионов. Географическое распределение этого признака сходно с распределением малярии и предполагает, что, так же как и в случае серповидноклеточности, он определяется отбором вследствие малярии. Для развития малярии необходим глутатион (GSH). Поскольку его уровень при дефиците G6PD снижен, развитие малярии в этом случае может быть затруднено. Уменьшение уровня паразитирования связано с более низкой смертностью. Микрогеографическое картирование частот G6PD в областях высокой и низкой эндемичности тропической малярии показало, что высокая частота этого гена обнаруживается в районах с высокой частотой малярии, а низкая - там, где малярии нет или ее уровень невысок. Особенно убедительными были данные, полученные для населения Сардинии: в этой области частота G6PD была высокой на равнинах, где малярия эндемична, и низкой в холмистой местности, где малярия отсутствует. В отношении других генетических маркеров население равнин и холмов оказалось сходным.

Убедительным свидетельством в пользу наличия отбора являются данные о том, что различные варианты G6PD (такие как A⁺, «средиземноморский» или «азиатские» типы) достигают высоких частот в разных областях земного шара. Положительная корреляция между частотой гена серповидноклеточности и G6PD A⁺ показана для населения стран Африки, а между частотой β-талассемии и «средиземноморским» типом G6PD-для населения Сардинии. Другими словами, оба признака на данной территории обнаруживали высокую или низкую частоту в зависимости от наличия там прежде малярии. Поскольку недостаточность по G6PD сцеплена с полом, а HbS и β-талассемия - аутосомные признаки, эти корреляции не могут объясняться ничем, кроме отбора.

Динамика отбора по признаку, сцепленному с X-хромосомой, сложна, поскольку мужчины относятся к двум генотипическим классам (нормальному и мутантному), а женщины - к трем (нормальному, гомозиготному и гетерозиготному). Различные данные и теоретические расчеты свидетельствуют о том, что в этой системе женщины защищены лучшим образом и имеют большее селективное преимущество. Гетерозиготные женщины имеют эритроциты двух типов: с мутантной G6PD и нормальные (разд. 2.2.3.3). Показано, что в эритроцитах с мутантным ферментом присутствует меньшее количество малярийных плазмодиев, нежели в нормальных. Эти данные - прямое доказательство защитного свойства клеток с недостаточностью G6PD по отношению к тропической малярии.

Изучение развития малярийного паразита в эритроцитах in vitro [1766; 1816; 1821; 1847]. Разработка методов культивирования малярийного плазмодия в эритроцитах дала возможность непосредственно изучать способность генетически дефектных клеток поддерживать развитие возбудителя малярии. Заметим, однако, что метод этот весьма трудоемкий и не всегда дает ясные результаты.

Показано, что эритроциты особей, гетерозиготных по серповидноклеточности, в условиях гипоксии являются плохой средой для пролиферации малярийного паразита [1847]. Инвазия таких клеток также несколько снижена. Эритроциты мужчин с недостаточностью G6PD африканского или средиземноморского типа хуже поддерживают рост *Plasmodium falciparum*, чем нормальные клетки [1859; 1860], хотя некоторые исследователи не нашли между ними разницы [см. 1845]. Впрочем, по общему мнению, способность малярийного плазмодия размножаться в эритроцитах гетерозиготных по G6PD женщин прямо зависит от числа клеток, дефектных по G6PD [1860]. При изучении окрашенных препаратов было показано, что малярийные плазмодии реже встречаются у гетерозигот по G6PD, эритроциты которых представляют собой смесь дефектных и нормальных клеток [1823].

Вероятно, малярийный плазмодий развивается у гетерозигот по HbC и HbE так же, как и в нормальных клетках; данные относительно гомозигот HbEE и HbCC противоречивы. В большинстве исследований не было показано разницы в пролиферации между нормальными клетками и клетками с P-талассемией [1861]. При α-талассемии только в случае болезни HbH, т. е. при отсутствии трех генов α (α -/- -), показано определенное уменьшение роста [1793].

В случае двух аномальных генов α данные менее убедительны, а в случае одной делеции Hbα (α-thal 2) наблюдается нормальный рост. Вероятно, HbF ингибирует пролиферацию *P. falciparum* [1847a]. Однако многие болезни, для

которых характерно наследование фетального гемоглобина с его высоким уровнем у гетерозигот, не встречаются с той частотой, которую можно предположить исходя из результатов исследований in vitro. Овалоциты устойчивы к внедрению малярийного плазмодия in vitro; овалоцитоз распространен в некоторых областях Новой Гвинеи и Папуа [1799]. Эритроциты людей с группой крови Еп (а —) устойчивы к инвазии малярийного плазмодия in vitro [1846], но эта группа крови ни в одной популяции не достигает полиморфных частот.

Многие исследования, проведенные in vitro, показали, что обнаружить разницу в способности малярийного плазмодия размножаться в каких-то клетках можно лишь в том случае, когда эта разница ощутима, как у гетерозигот по HbS. Наблюдаемые различия в пролиферации малярийного плазмодия у довольно редко встречающихся гомозигот по вариантам HbC и HbE не влияют на распространение этих генов в популяциях, однако подтверждают, что в лабораторных исследованиях выявляются только значительные генетические различия. Если различия незначительны, как в случае гетерозигот по HbE и HbC, этот метод может оказаться не настолько чувствительным, чтобы выявить их. В любом случае результаты, полученные in vitro, недостаточно убедительны и не могут ни доказать, ни опровергнуть «гипотезу о малярии».

Выявление и измерение интенсивности отбора у человека. В этом разделе кратко излагаются некоторые экспериментальные методы, с помощью которых можно продемонстрировать и измерить интенсивность отбора у человека. Большинство этих подходов использовано для проверки «гипотезы о малярии» [1830].

- 1. Между распространением заболевания, которое можно рассматривать как коллективный фактор, и геном, повышающим устойчивость к этому заболеванию, существует очевидная географическая корреляция.
- 2. Заболеваемость тяжелыми формами малярии и, следовательно, смертность снижены у гетерозигот по «защитному» гену по сравнению с нормальными гомозиготами.
- 3. Плодовитость гетерозигот A/S может быть выше, чем плодовитость нормальных гомозигот [1829; 1830].
- 4. Дифференциальная смертность должна приводить к возрастной стратификации популяции. Если заболевание селективно повышает смертность детей раннего возраста, относительная частота «защитного» гена увеличивается с возрастом.

Наиболее очевидный способ измерения отбора в раннем возрасте это сравнение частот генов у детей и во взрослой части популяции; в качестве дополнения можно провести сравнение эффективной плодовитости в семьях (табл.чб.11-6.13). Такой подход может быть успешным, если интенсивность отбора высока, как, например, в случае серповидноклеточности. Однако в популяциях человека ожидаемая интенсивность отбора, как правило, гораздо ниже. При рецессивном заболевании со 100%-ным отбором против гомозигот по соответствующему гену и 3%-ной селективной невыгодности нормальных гомозигот, равновесная частота (уравнение 6.6) не зависит от частоты гена и равна

$$\hat{q} = \frac{0,03}{0,3 + 1} = 0,0291; \quad q^2 = 0,00085.$$

Отсюда получаем, что частота гомозигот немного ниже 1:1000, что превышает частоту кистозного фиброза у населения Западной Европы. Для поддержания равновесия по более редким рецессивным генам селективная невыгодность нормальных гомозигот (s1) должна быть гораздо ниже, чем у гетерозигот (табл. 6.14). Для определения селективной невыгодности такого порядка (0,5-3,0%) необходима выборка огромного размера. Если более редкий аллель встречается с достаточно высокой частотой, т.е. существует генетический полиморфизм, коэффициент отбора против нор-

Таблица 6.14. Селективное преимущество нормальной гомозиготы (s1), необходимое для поддержания сбалансированного полиморфизма, если отбор приводит к полной элиминации аномальных гомозигот (s2 — 1) при генетическом равновесии			
q	q²	s1	Пример
0,0219	0,000847	0,03	Кистозный фиброз
0,0109	0,000118	0,011	Фенилкетонурия
0,00498	0,000025	0,005	Галактоземия

мальной гомозиготы будет выше и необходимый для его определения размер выборки становится более приемлемым. Большая часть работ по отбору была выполнена на полиморфных системах, таких как группы крови. Однако полученные результаты оказались неоднозначными [211]. Это неудивительно, поскольку наблюдаемые в настоящее время частоты генов либо отражают процессы отбора, происходившие в прошлом, либо вообще не являются результатом отбора. Детская смертность как таковая резко упала. Если исследования, результаты которых приведены в табл. 6.11-6.14, повторить в настоящее время в свободных от малярии районах, дифференциальную детскую смертность и различия в числе выживших детей вряд ли удастся продемонстрировать. Таким образом, изучение дифференциальной плодовитости и смертности в популяциях человека с целью оценки давления отбора может быть неосуществимо по чисто практическим причинам. Использование современных данных для определения интенсивности отбора, происходившего в прошлом, когда преобладали совершенно другие условия окружающей среды, часто приводит к искаженным результатам.

5. Трудности такого рода характерны для большинства современных исследований, посвященных отбору. Их можно избежать, если прямо анализировать предполагаемый механизм отбора. Для этого необходимо сформулировать конкретную гипотезу относительно механизма отбора. В случае «гипотезы о малярии» это не слишком трудно. Географическое распределение гена серповидноклеточности обнаружило большое сходство с распределением тропической малярии; кроме того, известно, что малярийный плазмодий внедряется именно в эритроциты.

Вообще формулировка такой причинно-следственной гипотезы предполагает знание физиологической функции соответствующего гена. При наличии обоснованной гипотезы о механизме отбора задача проверки на отбор становится гораздо проще. Высказывалось даже мнение, что ни один случай сбалансированного полиморфизма ни у одного вида не был открыт без знания биологического механизма отбора или по крайней мере существования гипотезы относительно этого механизма (Б. Кларк, личное сообщение).

6.2.1.7. Естественный отбор и история популяций: HbE и β -талассемия 1)

Часто обсуждается вопрос о том, как использовать генетические данные (например, по частотам полиморфных генов) для получения выводов относительно истории популяций и сходства между ними. Рассматриваемый ниже пример показывает, как для решения этого вопроса можно сочетать различные методы популяционного анализа с лингвистическими и историческими данными. Кроме того, этот пример демонстрирует важность моделирования на ЭВМ для популяционно-генетических исследований.

Взаимодействие в популяции двух генов, кодирующих аномальные формы гемоглобина. Аллисон высказал предположение, что в областях, где одновременно присутствуют два гена, кодирующие аномальные формы гемоглобина и взаимодействующие таким образом, что против носителей соответствующих аллелей обоих локусов действует отбор, будет наблюдаться тенденция к взаимному исключению этих генов.

В качестве иллюстрации этой проблемы рассмотрим взаимодействие генов, кодирующих HbE и талассемию, в популяциях Юго-Восточной Азии [1760]. Гомозиготность по талассемии была описана в разд. 4.3. Гомозиготность по HbE вызывает гемолитическую анемию, протекающую в гораздо более легкой форме, чем анемия, возникающая у гомозигот по HbS. Для большой β -талассемии (анемии Кули) характерны тяжелый гемолиз и пониженный синтез гемоглобина. Большинство двойных гетерозигот по β -талассемии и HbE (болезнь талассемия—HbE) страдают выраженной хронической анемией, приближающейся по тяжести протекания к анемии Кули. Гены, кодирующие варианты Hb β -цепи, такие как HbE и β -талассемия, сцеплены так тесно (разд. 4.3.4) в *транс*-положении, что их можно рассматривать как аллели.

Распространение HbE и β -талассемии. Максимальная частота HbE в Юго-Восточной Азии

¹⁾ Для понимания последующих рассуждений данный раздел не обязателен.

зарегистрирована среди кхмероязычного населения Северной Кампучии и прилежащих к ней районов северо-восточного Таиланда; здесь частота этого гена может достигать 0,3, что соответствует частоте гетерозигот 42%-одной из самых высоких частот, когда-либо достигнутых по гемоглобинопатии. В других областях Таиланда, на Малайском полуострове и в Индонезии, эта частота гораздо ниже. HbE встречается также в Китае, Ассаме и Бенгалии (рис. 6.19). Общее число носителей данного гена, возможно, составляет около 20 млн. Аллели β -талассемии встречаются в этих же областях, однако они распространены гораздо шире.

HbE и малярия. После выявления ассоциации между HbS и тропической малярией поддержание полиморфизма по другим формам гемоглобина было логично объяснить сходным образом. Попытка проверить эту гипотезу прямо не увенчалась успехом. В популяциях, которые необходимо было для этого изучить, отсутствовало медицинское наблюдение. Проблема осложнялась и тем, что в этих популяциях отсутствовали другие защитные генетические механизмы, например талассемия и дефицит G6PD. Тем не менее было высказано предположение о защитном действии аллеля HbE у гетерозигот и гомозигот. При сравнении географического распространения HbE и малярии надо иметь в виду, что на территории материковой Юго-Восточной Азии основным переносчиком этой болезни является лесной комар *Anopheles minimus*, обитающий в холмистых и горных местностях. Поэтому распределение малярии в этом регионе противоположно ее распределению в странах Средиземноморья, где важнейшие переносчики - комары, размножающиеся в болотах и засоленных водоемах. В Юго-Восточной Азии малярия-болезнь холмов и лесов. Действительно, именно в этих областях частота HbE наиболее высока [1762].

Приспособленность генотипов HbE и талассемии: проблема генетического равновесия. Каковы условия изменения генных частот в такой системе из трех аллелей (HbA, HbE, HbT)? Для ответа на этот вопрос необходимо оценить величину приспособленности (т. е. селективное преимущество или невыгодность) генотипов. Исходя из генных частот в ядерной кхмерской группе и клинических проявлений анемии у гомозигот по HbE, были получены следующие значения приспособленности:

HbE/HbE	$w_{EE} = 0,7 - 0,8$	$s_{EE} = 0,2 - 0,3$
HbE/HbA	$w_{AE} = 1,05 - 1,2$	$s_{AE} = (-0,2) - (-0,05)$
HbA/HbA	$w_{AA} = 0,9 - 0,95$	$s_{AA} = 0,05 - 0,1$
HbT/HbT	$w_{TT} = 0$	$s_{TT} = 1$
HbT/HbA	$w_{AT} = 1,05 - 1,2$	$s_{AT} = (-0,02) - (-0,05)$
HbT/HbE	$w_{ET} = 0,2 - 0,5$	$s_{ET} = 0,5 - 0,8,$

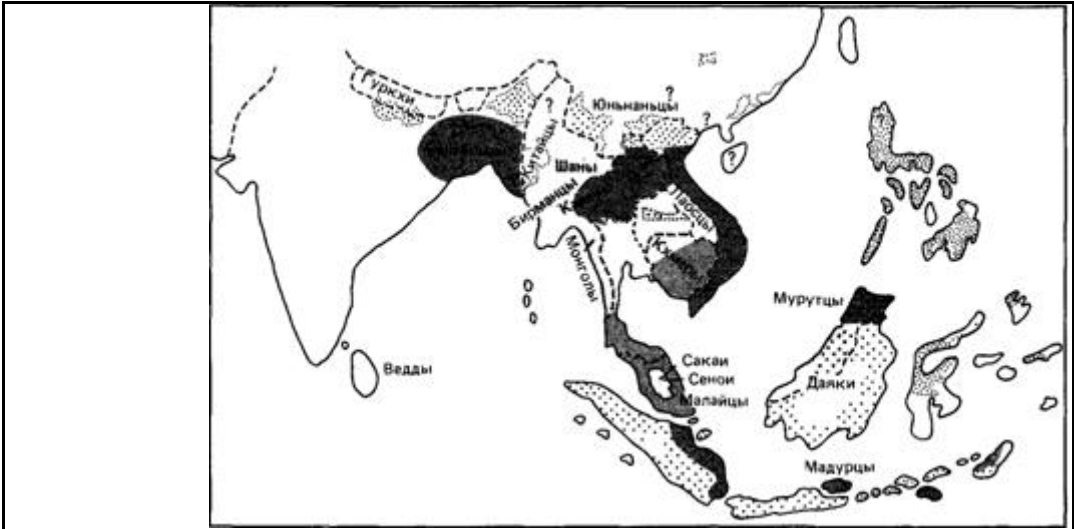


Рис. 6.19. Популяции, где отмечено наличие HbE [1760]. Темным цветом выделены регионы с высокой частотой; серые участки соответствуют областям с умеренной частотой; участки, отмеченные точками - одиночные случаи обнаружения HbE.

где w - приспособленность генотипа относительно средней приспособленности популяции, а s коэффициент отбора (по определению $s = 1 - w$). При селективной благоприятности генотипа, как в случае s_{AE} , величина s будет отрицательной. Гены, определяющие Hb β A-, Hb β E- и Hb β -талассемию, для простоты обозначены буквами A, E и T.

Возможно ли в таких условиях генетическое равновесие? В отличие от случая двух аллелей, описываемого уравнением (6.6), селективное преимущество гетерозигот в трехаллельной системе не обязательно приводит к возникновению стабильного генетического равновесия. Для поддержания стабильного равновесия необходимо выполнение следующих четырех условий:

- 1) $s_{AA} > 0, s_{EE} > 0, s_{TT} > 0,$
- 2) $s_{AA} s_{EE} - s_{AE}^2 > 0,$
- 3) $s_{AA} s_{TT} - s_{AT}^2 > 0,$
- 4) $s_{EE} s_{TT} - s_{ET}^2 > 0,$

Вывод этих формул, который мы здесь не приводим, получен Пенроузом (Penrose et al., [1848]).

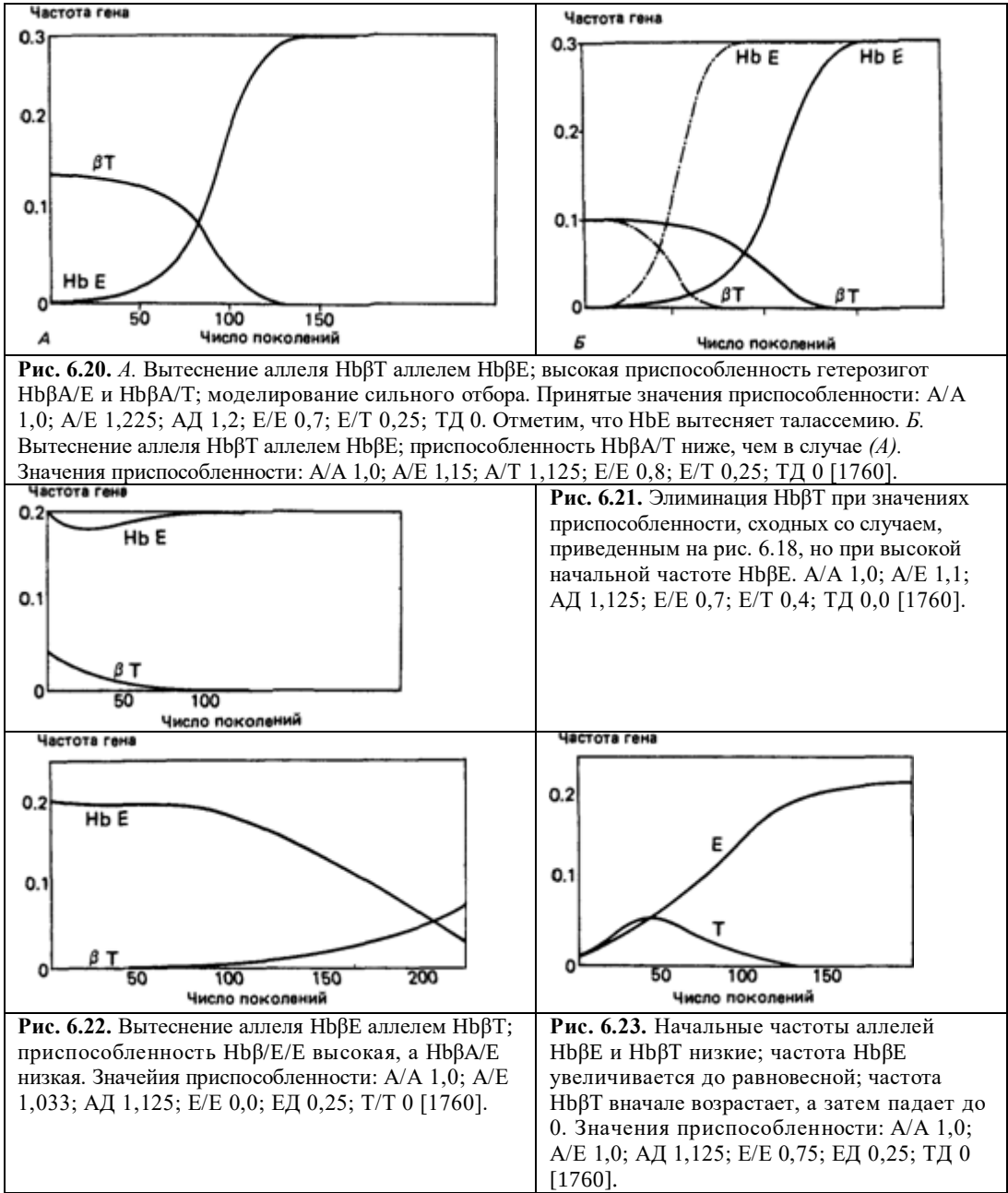
На основании данных по приспособленности трех генотипов можно сделать следующие выводы: условие 1, селективная невыгодность гомозигот, в рассматриваемой системе удовлетворяется; условия 2 и 3 могут удовлетворяться при определенном, достаточно вероятном сочетании данных; с другой стороны, условие 4 (т. е. то, что произведение селективных ценностей двух гомозигот должно превышать квадрат селективной ценности двойной гетерозиготы) выполняется только при очень маловероятных сочетаниях коэффициентов отбора. Интенсивность отбора против двойной гетерозиготы по сравнению с гомозиготой E/E, вероятно, слишком высока для того, чтобы установилось равновесие, тем более стабильное. Этот вывод в большой степени не зависит от величины преимущества гетерозигот, значение которого может варьировать в зависимости от уровня контакта с малярией и основан на проявлениях заболевания, связанных с генотипами Hb β E/E, Hb β E/T, Hb β T/T. Однако приспособленность этих двух гомозигот и двойной гетерозиготы очень мало зависит от условий среды.

Каковы будут распределения частот генов Hb β E и Hb β T (q_E и q_T) в различных группах популяций при стабильном или полустабильном равновесии по сравнению со случаями нестабильного равновесия или отсутствия равновесия? При стабильном равновесии точки распределения, соответствующие паре значений q_E, q_T в двумерной системе координат, группируются вокруг некоторой точки равновесия. Если равновесие полустабильное, кластеризация точек уменьшается; после нарушения равновесия точки распределения не обязательно возвращаются к той же точке равновесия, что и раньше, а, как показал Пенроуз [1848], могут вернуться к некоторой точке, лежащей на прямой линии, связывающей независимые точки равновесия Hb β E и Hb β T (когда присутствует только один аллель).

Реально полученное распределение [1760] указывает на отсутствие в системе стабильного или полустабильного равновесия. Это означает, что при совместном существовании в популяции аллелей Hb β E и Hb β T их частоты обнаруживают тенденцию к падению ниже точки равновесия. Причиной этого реципрокного эффекта является сильное давление отбора против двойной гетерозиготы.

Динамика Hb β E и Hb β T в популяциях. Если популяция не находится в состоянии равновесия, с какой скоростью и в каком направлении будут изменяться частоты генов? Или - если взглянуть на этот вопрос с точки зрения истории популяции - каким образом было достигнуто наблюдаемое в настоящее время распределение генных частот? В предыдущих разделах для некоторых частных случаев выведены формулы, описывающие изменения генных частот от поколения к поколению (Δq). Сходным образом можно получить выражения для изменения генных частот в поколениях в трехаллельной системе. Таким образом удастся проанализировать скорость изменения генных частот при различных интенсивностях отбора. В прежнее время, когда еще не было вычислительной техники, эту задачу нельзя было решить из-за огромного объема числовых расчетов, теперь она решается легко.

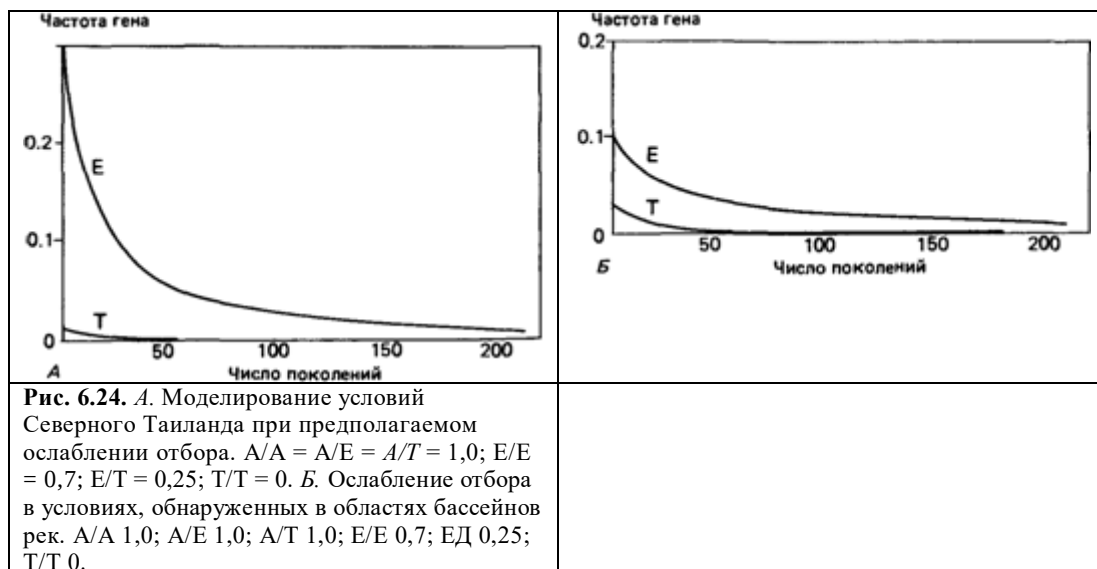
Некоторые примеры приведены на рис. 6.20-6.23. На рис. 6.20 показана ситуация, когда аллель E вводится в популяцию, где с высокой частотой присутствует аллель T. Обе гетерозиготы A/E и A/T обладают высоким селективным преимуществом: аллель E вытесняет аллель T. Если селективное преимущество гетерозигот A/E ниже, то существует некоторая его критическая величина, ниже которой аллель E уже не может вытеснить аллель T. Даже в том случае, когда это вытеснение происходит, его скорость сильно зависит от начальной частоты аллеля E. Если значения приспособленности те же, а начальная частота аллеля E высока, аллель T не вытесняет аллель E (рис. 6.21). Если приспособленность гетерозигот A/E намного ниже, чем гетерозигот A/T, T может вытеснить E (рис. 6.22). Если начальные частоты обоих аллелей A и



Т низки (т. е. оба они вновь вводятся в популяцию), вполне вероятно, что E вытеснит Т, даже если селективное преимущество по отношению к гомозиготам А/А имеют только гетерозиготы АД, а не гетерозиготы А/Е (рис. 6.23).

Релаксация отбора. Возможно, что в будущем малярия в Юго-Восточной Азии будет искоренена. Тогда селективное преимущество гетерозигот АД и А/Е исчезнет, но отбор против гомозигот Е/Е и ТД и гетерозигот ЕД сохранится. Каковы будут последствия этого для аллелей Е и Т?

Две подобные ситуации показаны на рис. 6.24. В первом случае частота Т очень низка (как



в северо-восточном Таиланде), во втором частоты Е и Т более сходны (как в центральном Таиланде). В обоих случаях наблюдается довольно быстрое - особенно в начале процесса - уменьшение частоты обоих аллелей. Падение частоты аллеля Е достигает такого порядка величины, что его можно выявить при сравнении выборок достаточного размера из двух разных популяций.

Приложение этих результатов к истории популяций Юго-Восточной Азии. Генные частоты, наблюдаемые в популяциях в настоящее время, являются результатом не только давления отбора, но и демографических процессов в популяциях. Говоря конкретнее, если в двух разных популяциях адаптация к условиям внешней среды произошла различным образом (например, в одной популяции адаптация к малярии была достигнута за счет $Hb\beta E$, а в другой - за счет талассемии) и если эти механизмы являются в какой-то степени взаимоисключающими, то сравнение генных частот и известных фактов истории этих популяций может пролить свет на их генетические взаимоотношения.

Данных о неолитической культуре Юго-Восточной Азии имеется немного. Можно выделить три стадии общественного развития. Каждой из них соответствовала определенная экологическая ситуация.

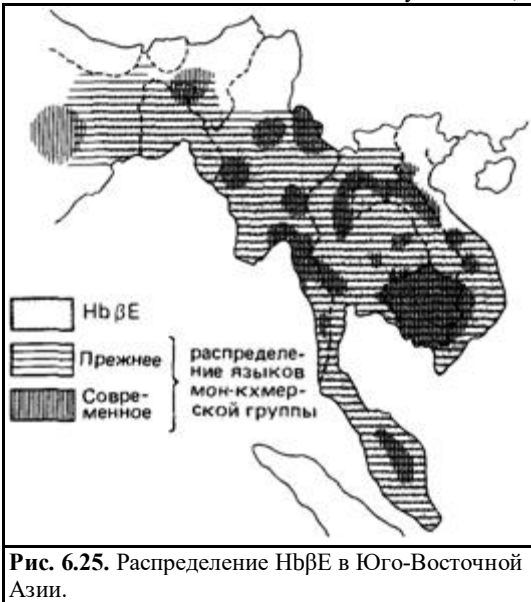
1. Группы охотников и собирателей. Судя по существующим в настоящее время популяциям, находящимся на приблизительно такой же ступени развития, они обитали в лесах, расположенных на склонах холмов и гор. Если предположить, что распространение малярии в то время было сходно с теперешним, группы охотников и собирателей должны были испытывать ее интенсивное воздействие. Несмотря на это, условия распространения для гена, имеющего преимущество в гетерозиготном состоянии, были неблагоприятными из-за маленького эффективного репродуктивного размера популяций и низкой вероятности генного обмена между ними; в большинстве случаев даже благоприятные мутации в конечном счете элиминировались из популяции (разд. 6.4).
2. Приблизительно в 1000 г. н. э. с началом культивирования риса на орошаемых землях возникла социальная организация на уровне деревень. Большая часть поселений располагалась по периферии долин. При подобной социальной организации условия распространения гена, который поддерживался в популяции благодаря его защитным свойствам против малярии, были очень благоприятными. Период времени продолжительностью 3000 лет (или 120 поколений, если принять продолжительность поколения за 25 лет) достаточен для того, чтобы гены $Hb\beta T$ и $Hb\beta E$ достигли частот, наблюдаемых в настоящее время (см. рис. 6.24).
3. В настоящее время большая часть населения стран Юго-Восточной Азии обитает в бассейнах и дельтах больших рек, которые в доисторические времена почти не были заселены. Социальные и политические события исторического времени привели к развитию равнинного земледелия. Между тем благодаря экологическим особенностям своего переносчика *Anopheles minimus* малярия в этой области редко встречается в равнинной местности. Следовательно, миграция населения на сравнительно свободные от малярии равнинные территории должна привести к значительному ослаблению отбора против гомозигот $Hb\beta A$ и уменьшению селективного преимущества гетерозигот $Hb\beta E$ и $Hb\beta T$. Действительно, гены $Hb\beta E$ и $Hb\beta T$ реже встре-

чаются у населения равнин, нежели у жителей соседних гористых территорий.

Сравнение с Hb β S Западной Африки. В Западной Африке основными переносчиками малярии являются комары, требующие для своего размножения открытого пространства и стоячих водоемов. Вероятно, ген серповидноклеточности появился в Западной Африке в эпоху неолита одновременно с подсечно-огневым земледелием. Благодаря такому способу ведения сельского хозяйства в этом районе Африки, там появились благоприятные для размножения комаров открытые участки земли, что в свою очередь вызвало распространение гена серповидноклеточности и установление полиморфизма по этому гену.

Таким образом, сходные тенденции развития земледелия в двух разных популяциях при различных экологических потребностях переносчиков малярии привело к тому, что на равнинах Африки установился полиморфизм по Hb β C, а на холмах Юго-Восточной Азии – полиморфизм по Hb β E.

Гемоглобин β E в популяциях, принадлежащих к южноазиатской (мон-кхмерской) языковой группе. Южноазиатская языковая группа включает в себя кхмерский язык (Кампучия), племенные языки Вьетнама, язык мон в Южной Бирме, западном и северном Таиланде, племенные языки Таиланда, Бирмы и южного Китая и несколько языков Ассама и Бенгалии. Исторические и лингвистические данные свидетельствуют о том, что вся материковая территория Юго-



Восточной Азии, за исключением южной Малайи и некоторых областей Вьетнама, была заселена южноазиатскими народностями вплоть до V или VI в. н. э., когда началась миграция населения в широких масштабах.

На рис. 6.25 указаны, во-первых, те области, население которых говорит на южноазиатских языках, и, во-вторых, те области, население которых полиморфно по гену HbβE. Совпадение очевидно; вероятно, оно объясняется параллельным распространением этих языков и гена HbβE. Возможно, что ген, о котором мы говорим, впервые появился в исходной южноазиатской группе, а затем вместе с языками постепенно распространился по материковой части ЮгоВосточной Азии. Моделирование генной динамики указывает на то, что в популяции, где происходило распространение данного гена, могла до этого с высокой частотой присутствовать талассемия, поскольку ген HbβE во многих селективных ситуациях вытесняет ген талассемии.

Подтвержденное предположение. Как уже отмечалось, некоторые языки, принадлежащие к южноазиатской группе, встречаются вне материковой части Юго-Восточной Азии. Если рассмотренная нами гипотеза относительно гена HbβE верна, и малярия действительно является тем экологическим фактором, который поддерживает его высокую частоту, тогда популяции, принадлежащие к южноазиатской языковой группе, которые в течение долгого времени занимали зараженные малярией области, вне ЮгоВосточной Азии должны иметь высокую частоту HbβE.

В Ассаме было проведено сравнение двух групп населения: хази, южноазиатской группы, сохранившей свое этническое своеобразие, и ахом, группы монголоидного происхождения, сравнительно недавно (в XIII в.) иммигрировавшей из Таиланда. Обе группы обитали в областях, где малярия была эндемичным заболеванием. Результаты сравнения приведены в таблице 6.15. Частота HbβE очень высока в обеих группах. Для группы хази подтверждается предположение о том, что ген HbβE должен быть очень распространенным в популяции, происходящей от южноазиатской группы и подверженной селективному давлению малярии. Однако иногда ген HbβE может быть внесен в соседнюю популяцию неюжноазиатского происхождения. При его поддержании отбором он может даже достичь в ней относительно высокой частоты, что и наблюдается в группе ахом [1752].

При обсуждении стратегии исследования в популяционной генетике человека мы высказали мнение, что такие исследования более плодот-

Таблица 6.15. Гемоглобин E в выборках из популяций Ассама Хази (Бхой) и Ахом [1752]

Группа	N	Тип гемоглобина			Процент носителей HbE AE, E	Частота HbE
		A	AE	E		
Хази	80	47	31	2	41,3	0,2188
Ахом	82	34	37	11	58,5	0,3598
Различие генов HbE $\chi^2 = 7,82$ $P < 0,01$.						

ворны, если они опираются на какую-то гипотезу. Изучение HbE в южноазиатских популяциях Ассама служит примером научного поиска, основанного на конкретной популяционной гипотезе.

Некоторые выводы, сделанные на основании исследования HbE и талассемии. Изучение распространения HbE и талассемии среди жителей Юго-Восточной Азии позволило сделать некоторые общие выводы, интерпретирующие межпопуляционные различия генных частот. Они касаются того, каким образом история популяций и естественный отбор определяют эти различия.

При сравнении популяций, на которые воздействовал один и тот же естественный экологический фактор отбора (в данном случае малярия), обнаружились явные генетические различия, обусловленные разной историей этих популяций. В одной из них адаптация к экологическому фактору была достигнута благодаря наличию Hb β E, в другой - β -талассемии; показано, что эти системы адаптации являются до некоторой степени взаимоисключающими. Поскольку гомозиготы HbE/E менее подвержены малярии, чем гомозиготы HbT/T, адаптация к малярии с использованием HbE проходит легче и имеет тенденцию к замещению адаптации через β -талассемию. Такие результаты достигаются в течение длительного периода времени, несмотря на противодействующее влияние - частичное взаимоисключение двух этих генов, вызванное сильным давлением отбора против двойной гетерозиготы.

Значительные генетические различия выявлены также при сравнении популяций, в разной степени испытывающих воздействие малярии. Hb β E и талассемия с большей частотой обнаруживаются среди жителей холмистых местностей, чем в популяциях, населяющих обширные равнины, где малярия встречается реже. Эти результаты содержат мало информации относительно этнических взаимодействий между популяциями холмов и равнин. Чтобы внести ясность в данный вопрос, необходимо иметь сведения о селективном факторе-в данном случае малярии.

В литературе по антропологии и генетике человека часто проводится сравнение различных популяционных групп по генетическим маркерам. Однако критический анализ таких различий с учетом отбора, с одной стороны, и истории популяции, с другой, обычно отсутствует.

Исследование полиморфизма по серповидноклеточности в Африке: стохастическая модель замещения одного аллеля другим [126]. В исследованиях подобного рода был проведен комплексный анализ, включающий изучение истории популяций Западной Африки, воздействия на них малярии и частот генов Hb β S и Hb β C. Наблюдаемая здесь ситуация сходна со случаем HbE и талассемии в Юго-Восточной Азии: в популяции присутствуют два аллеля Hb β S и Hb β C, обладающие противомаларийными свойствами; значения приспособленности w_i различны для гомо- и гетерозигот; против двойных гетерозигот действует сильный отбор. На рис. 6.26 показано изменение генных частот, происходящее при вытеснении аллеля Hb β C аллелем Hb β S; решающим фактором здесь является селективное преимущество гетерозиготы по Hb β S по сравнению с гетерозиготами по Hb β C. Как и в случае Hb β E и талассемии, использована детерминистическая модель отбора. Предполагается, что популяция имеет бесконечно большую величину. С другой стороны, в модели, приведенной на рис. 6.26,Б, эффективный репродуктивный размер популяции (разд. 6.4.1) принят равным 1000, поэтому возникают случайные флуктуации генных частот. Эта модель стохастическая. Общая тенденция здесь та же, что и на рис. 6.26,А, однако ясно видны случайные флуктуации частот.

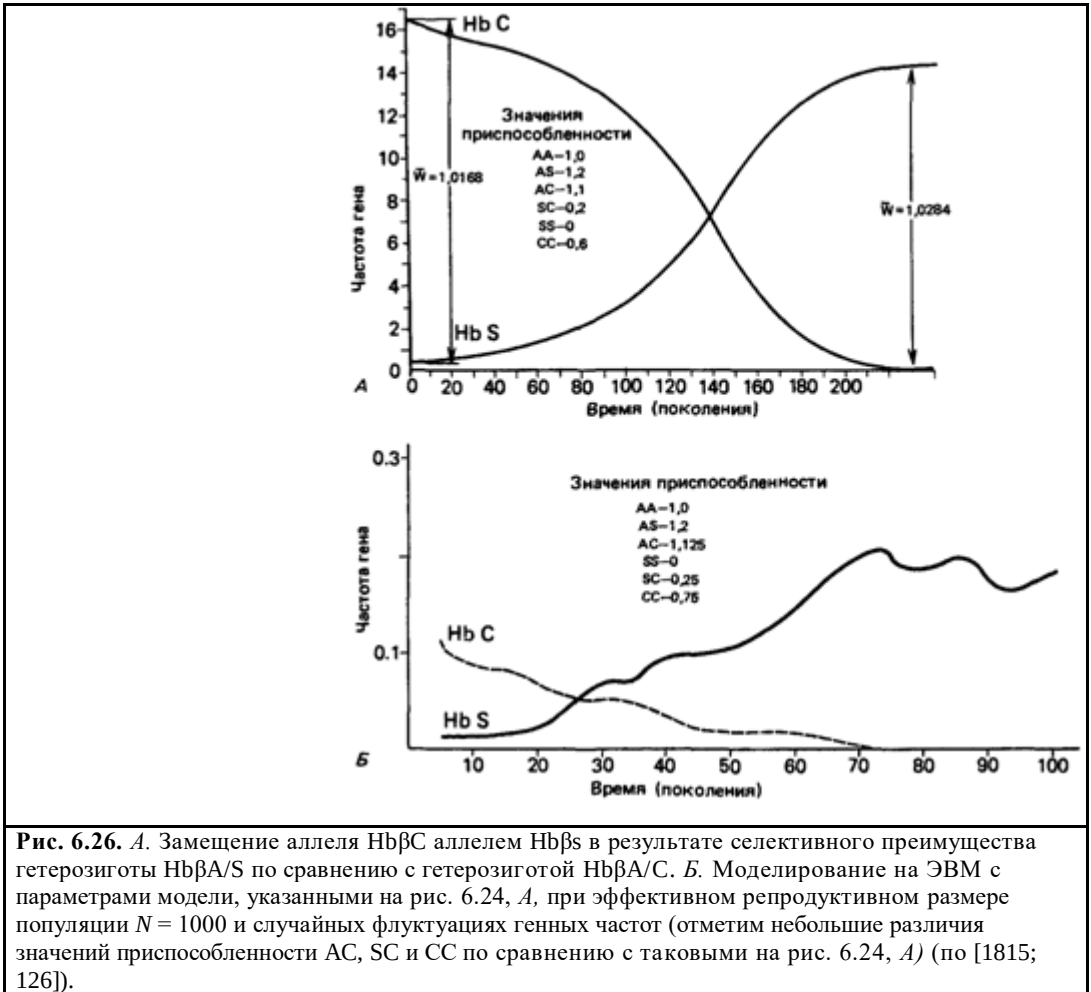


Рис. 6.26. А. Замещение аллеля HbC аллелем HbS в результате селективного преимущества гетерозиготы HbA/S по сравнению с гетерозиготой HbA/C. Б. Моделирование на ЭВМ с параметрами модели, указанными на рис. 6.24, А, при эффективном репродуктивном размере популяции $N = 1000$ и случайных флуктуациях генных частот (отметим небольшие различия значений приспособленности AC, SC и CC по сравнению с таковыми на рис. 6.24, А) (по [1815; 126]).

Изучение аномальных гемоглобинов у жителей Западной Африки, так же как и в Юго-Восточной Азии, внесло вклад в наши представления об истории популяций. На земном шаре существуют и другие регионы, где можно провести подобные исследования - их население имеет сложную популяционную историю; необходимо только изучить распространение разных вариантов G6PD и гемоглобина. Одним из таких регионов является Индия, особенно ее южные и восточные области.

В популяциях Филиппин и Таиланда одновременно, с полиморфными частотами встречаются несколько типов недостаточности по G6PD. В африканских популяциях обнаружены только два основных варианта G6PD (A^- и A^+). Возможно, что эта ситуация возникла из-за смешения групп, каждая из которых исходно имела только одну мутацию G6PD. Для подробного анализа этого вопроса необходимы дальнейшие исследования вариантов G6PD и истории популяций этой части Азии.

6.2.1.8. Отбор по системе групп крови ABO и другим полиморфным системам

Группы крови ABO и заболеваемость. Ни одна генетическая система у человека не изучена так детально, как система вариантов гемоглобина,

G6PD и малярии. Однако мы рассмотрим некоторые проблемы, возникающие при анализе таких систем, на примере, гораздо более сложном и противоречивом: группах крови ABO. Как уже отмечалось выше, один аспект отбора по этой системе - серологическая несовместимость матери и плода - общепризнан, хотя относительно интенсивности отбора общего мнения нет. Эта несовместимость приводит к нестабильному равновесию и к медленному изменению частот генов (разд. 6.2.1.4). В отсутствие других форм отбора полиморфизм по ABO должен постепенно исчезнуть. Однако, вопреки этому предсказанию, он присутствует почти во всех популяциях человека. Следовательно, по этой системе должны существовать другие селективные факторы. Имеются ли данные, подтверждающие их наличие?

Группы крови ABO и инфекционные заболевания. В настоящее время продемонстрирована ассоциация групп крови ABO с очень многими заболеваниями (разд. 3.7.2). Например, лица с группой крови А чаще болевают раком, тогда как лица, имеющие группу крови 0, более подвержены к язве желудка и двенадцатиперстной кишки. Связь с группами крови показана и для ревматизма, иммунный механизм которого бесспорен [211]: риск заболевания ревматизмом самый низкий среди лиц группы 0. Хотя эта ассоциация, возможно, повышает вероятность достижения носителями группы 0 пожилого возраста, она вряд ли оказывает влияние на естественный отбор, поскольку ревматизм, как правило, поражает людей среднего и более старшего возраста, т. е. после завершения репродуктивного периода. Обнаруженные корреляции групп крови системы ABO с заболеваниями демонстрируют фундаментальное влияние антигенов этой системы на физиологию организма. Например, данные по ревматизму свидетельствуют о том, что это влияние может иметь какое-то отношение к иммунному ответу [1789]. Даже ассоциация группы А с раковыми заболеваниями и группы 0 с язвой желудка может быть обусловлена различиями иммунного ответа.

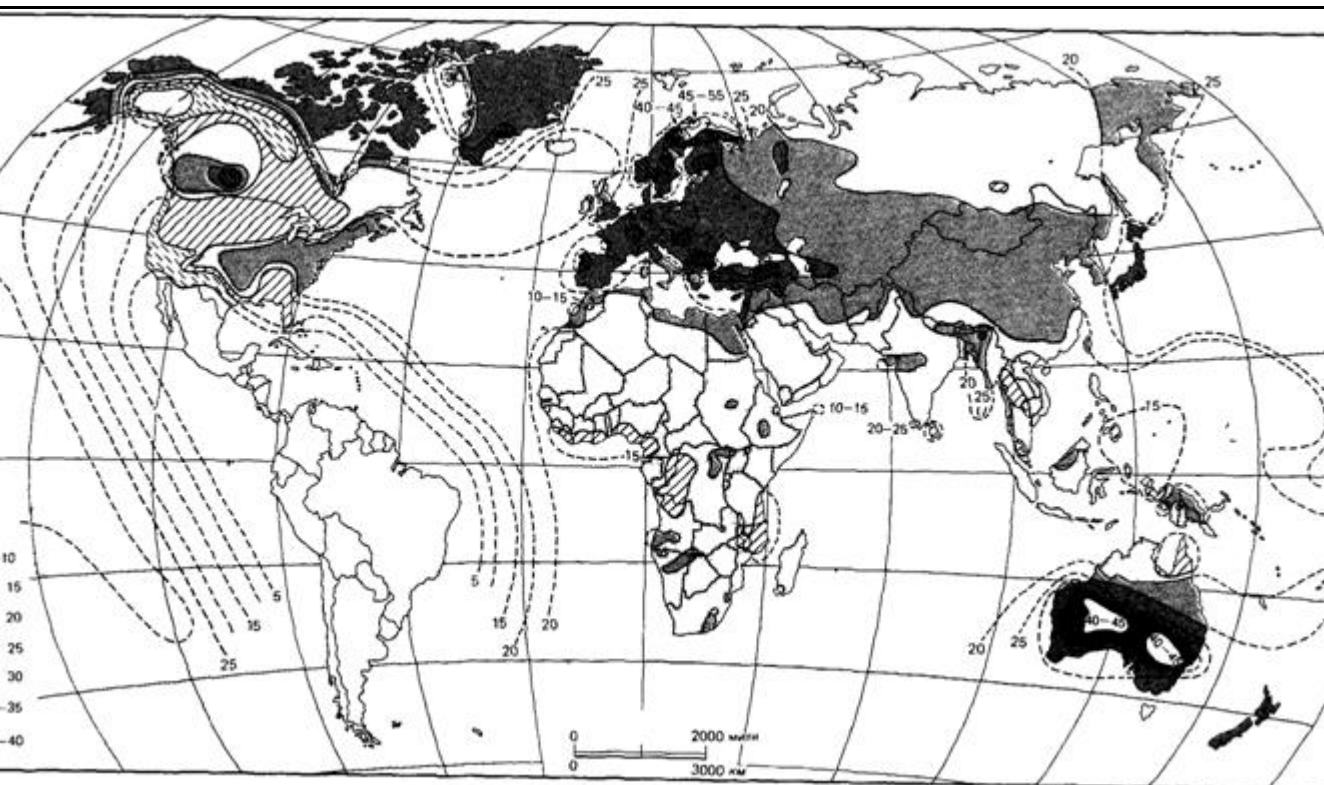
Инфекционные заболевания оказывают специфическое воздействие на иммунный ответ организма. Если группы крови ABO влияют на иммунный ответ, то отбор, возникающий из-за дифференциальной восприимчивости к инфекционным заболеваниям, может привести к дифференциальной детской и юношеской смертности.

Распространение аллелей ABO в мировом населении. Распределение аллелей А, В и 0 (рис. 6.27-6.29) [144] свидетельствует о наличии естественного отбора по данной системе. Если бы отбора не было, а распределение отражало только случайные колебания генных частот, то в популяции присутствовали бы все комбинации генных частот, возможные в системе из трех аллелей. В действительности дело обстоит по-другому: наблюдается только небольшое число из возможных комбинаций [1732].

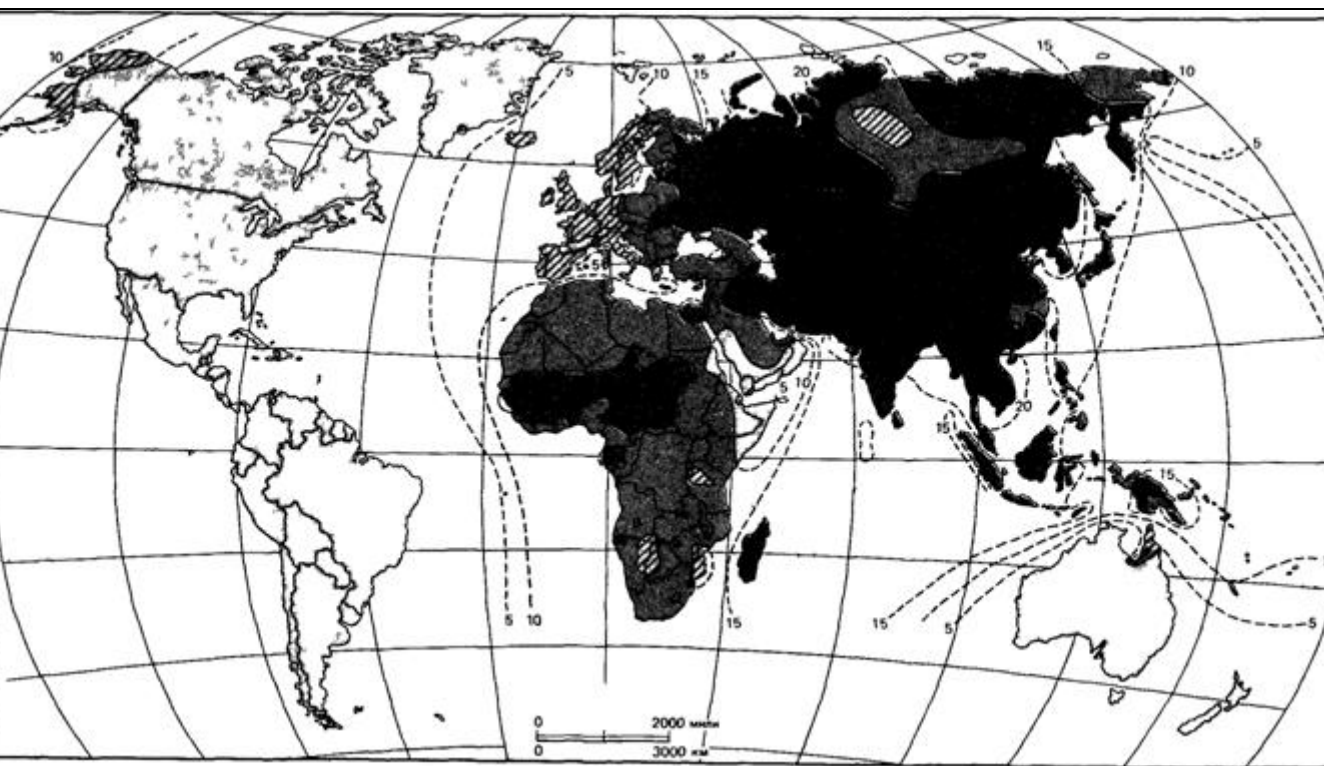
Некоторые сведения относительно механизма отбора можно получить, рассмотрев распределение аллеля 0. Обычно этот аллель с высокой частотой встречается в популяциях, которые в течение длительного времени находились в относительной изоляции (например, коренное население Австралии, Полинезии, Арктики и северной Сибири). В Европе, в некоторых изолированных популяциях также наблюдается высокая частота этого аллеля (ирландцы, баски, исландцы, жители Корсики и Сардинии). Особенно высокая частота аллеля 0 отмечается у индейцев Центральной и Южной Америки, что отличает их от других популяций. Различия по частотам других полиморфных систем, например Rh, свидетельствуют против гипотезы о том, что когда-то население этих областей имело высокую частоту аллеля 0. Имеющиеся данные предполагают наличие естественного отбора по этому аллелю. Какая форма отбора могла привести к повышению аллельных частот в сравнительно изолированных популяциях или, наоборот, к их понижению в популяциях, расположенных «в русле» мировых миграций? Одна из вероятных возможностей - влияние инфекционных заболеваний, особенно крупных эпидемий прошлого.

В разделе 6.2.1.6 перечислены следующие группы заболеваний, которые, возможно, имеют селективное значение:

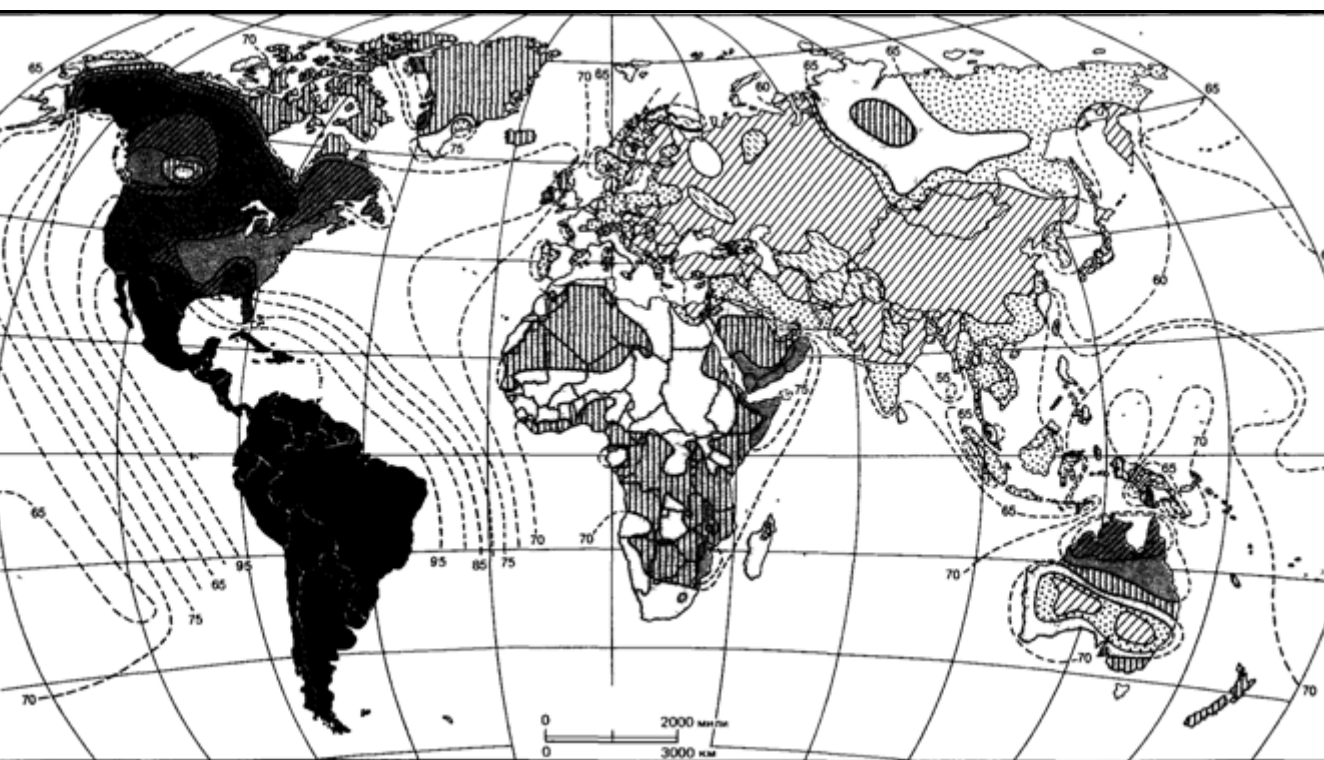
- а) эпидемические заболевания, например чума, холера, оспа;
- б) хронические болезни, например туберкулез и сифилис;



Распределение частоты аллеля А в популяциях коренного населения разных регионов планеты [144]



Распределение частоты аллеля В в популяциях коренного населения разных регионов планеты [144]



Распределение частоты аллеля 0 в популяциях коренного населения разных регионов планеты [144].

- в) кишечные инфекции (в основном детские);
- г) тропические болезни (в детском и юношеском возрасте).

В отличие от полиморфных вариантов гемоглобина, которые встречаются только в тропических областях, полиморфизм по системе АВО распространен по всему миру. Следовательно, тропические болезни вряд ли играют роль селективного фактора в этой системе. Для формулировки рабочей гипотезы можно использовать три факта.

1. Население Центральной и Южной Америки до открытия этого континента Колумбом было почти полностью изолировано. Возможно, что для американских популяций того времени была характерна особая группа инфекционных заболеваний, отсутствующих в остальной части мирового населения, например сифилис и связанные с ним болезни, вызываемые трепонемой. Частота группы крови 0 в этих популяциях очень высока. Есть ли данные в пользу того, что носители группы крови 0 менее восприимчивы к заражению *Treponema pallidum* - микроорганизма, вызывающего сифилис?
2. Эпидемии чумы многократно опустошали Европу, в основном поражая густонаселенные области. В краевых и частично изолированных популяциях, которые, вероятно, были затронуты чумой в меньшей степени, группа 0 обычно встречается с высокой частотой. Имеются ли данные, свидетельствующие о большей устойчивости носителей группы 0 к возбудителю чумы?
3. До середины 70-х годов во многих странах регистрировались случаи оспы. Имеются статистические данные о частоте встречаемости и смертности от оспы, особенно для населения Африки и Индии. Для этих регионов известно распределение групп крови АВО. Если носители какой-то группы крови обладают повышенной восприимчивостью к оспе, то в областях с высоким уровнем заболеваемости эта группа должна встречаться реже. Так ли это в действительности?

Сифилис и группа крови 0. Перед нами стоит задача оценить возможное влияние сифилиса на дифференциальную биологическую приспособленность человеческой популяции. Как и в случае серповидноклеточности и малярии (разд. 6.2.1.6), наиболее убедительным косвенным доказательством такого влияния было бы доказательство того, что носители группы 0 имеют повышенную устойчивость к этой болезни. Это предположение в настоящее время проверить нельзя, так как сифилис настолько успешно вылечивается пенициллином, что индивидуальных различий в исходе болезни, обусловленных различием иммунного ответа, просто не существует. Однако в 1920-е годы лечение пенициллином еще не применялось. В это время был собран обширный материал по группам крови и заболеваемости сифилисом, анализ которого позволил сделать следующие выводы:

- а) связь между заражением сифилисом и группами крови системы АВО отсутствует;
- б) после лечения распространенным тогда препаратом неосальварсаном носители группы 0 имели гораздо большую вероятность стать «серонегативными», чем лица с другими группами крови (рис. 6.30);
- в) третичный сифилис, так же как и общий паралич, реже встречается у лиц с группой 0, чем у лиц с другими группами крови системы АВО (рис. 6.31).

Итак, все данные вместе свидетельствуют о том, что группа крови 0 имеет преимущество в иммунном ответе на сифилис. Известно, что влияние сифилиса на репродукцию осуществляется в основном путем заражения плода больной матерью. Зачастую такое заражение ведет к гибели плода на поздних стадиях развития. Можно высказать предположение, что широкое распространение группы 0 у индейцев Центральной и Южной Америки обусловлено отбором за счет сифилиса и связанных с ним инфекционных заболеваний, вызываемых трепонемой.

Холера и группа крови 0 [1770]. Недавние обширные исследования холеры в Бангладеш убедительно показали существование связи между системой АВО и летально эндемичной инфекционной болезнью. Больные диареей, вызванной ротавирусом, шигеллой, токсикогенной *E. coli* или

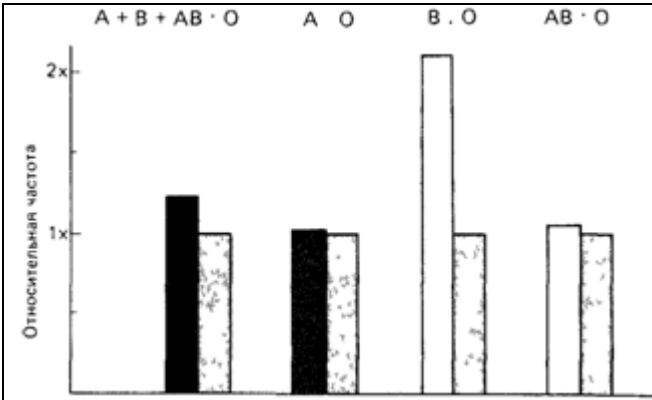


Рис. 6.30. Относительная частота положительной реакции Вассермана у лиц с различными группами крови после лечения сифилиса неосальварсаном [211].

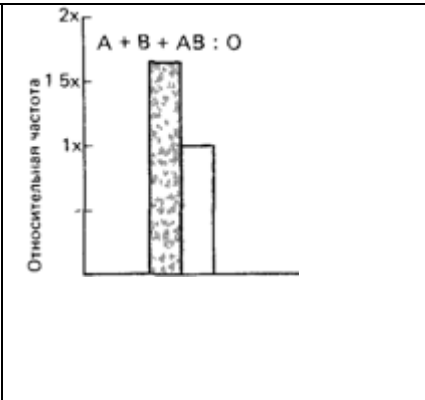


Рис. 6.31. Относительная частота третичного сифилиса в связи с системой групп крови AB0 [211].

нетоксикогенными возбудителями холеры, имели частоты группы 0, сходные с контрольными (около 30%), между тем больные, зараженные токсикогенным холерным вибрионом с группой крови 0, составляли 57%. Эта разница статистически высоко достоверна. Среди членов семей, зараженных токсикогенным штаммом холеры, наблюдается статистически достоверная тенденция к повышению частоты группы крови 0 с увеличением тяжести протекания диареи. Эпидемии тяжелых кишечных заболеваний, описанные в прошлом в этом регионе, вероятнее всего, были эпидемиями холеры. Низкая частота группы крови 0 в этом регионе, возможно, обусловлена более высокой восприимчивостью к холере и смертностью от нее лиц с группой крови 0. Механизм этого взаимодействия остается невыясненным

Чума и группа крови 0. Связана ли чума с распределением группы 0 в Европе? В отличие от сифилиса и холеры данные по группам крови заболевших чумой отсутствуют. Чума сейчас , болезнь очень редкая; она встречается только в областях, недоступных для исследователей. Поэтому нам придется анализировать косвенные данные.

В разд. 6.2.1.5, посвященном частотно-зависимому отбору, упоминалось, что одним из способов адаптации паразита к хозяину является выработка поверхностных антигенов, аналогичных антигенам хозяина; таким образом обеспечивается его защита от иммунного ответа. Данные, подтверждающие существование такого способа адаптации, получены для позвоночных и их паразитов [1739; 1751]. С конца 1950-х годов известно, что человек имеет общие АВН-подобные антигены со многими бактериями, особенно с бактериями группы *E. coli*. Даже «нормальные» изоантитела анти-А и анти-В считаются иммунными антителами против широко распространенных кишечных инфекций. Поэтому интересно было выяснить, имеет ли *Pasteurella pestis* АВН-подобные антигены [1849; 1850]. Такой антиген действительно обнаружен (антиген Н). Он распространен в основном среди лиц с группой 0. Этот факт, во-первых, свидетельствует о том, что обладатели первой группы крови имеют более слабую иммунную реакцию против *P. pestis* и, во-вторых, согласуется с предположением о селективной невыгодности группы 0 вследствие высокой смертности ее носителей от чумы. Конечно, эти результаты нельзя считать подтверждением гипотезы.

Ослабляет ли принадлежащий микроорганизму обычный антиген группы крови иммунный ответ хозяина? E. coli и инфекционная диарея. Ответ на этот вопрос не может быть получен на примере чумы из-за отсутствия соответствующих больных. Однако такое исследование вполне реально в отношении другой группы болезней. Они вызываются бактериями, способность которых синтезировать антигены АВН хорошо из-

вестна; речь идет о бактериях группы *E. coli*. В 1950-х-начале 1960-х годов по Центральной Европе прокатилось несколько волн инфекционной детской диареи. Возбудителем во всех случаях была *E. coli*, которую путем серологического анализа антигенных спектров можно подразделить на несколько штаммов. В отличие от эпидемий прошлого исход болезни редко оказывался летальным благодаря лечению антибиотиками, переливанию плазмы.

Австрийский педиатр Киршер (1961, 1964) [1800;1801] пришел к выводу, что наиболее тяжело диарея протекает у детей, имеющих группу крови А. Этот вопрос был изучен с привлечением обширного материала, собранного в течение многих лет. Результаты оказались неоднородными: в некоторые годы большая частота заболеваемости наблюдалась у носителей группы крови А, в другие - у носителей группы 0 (рис. 6.32). Критерием тяжести протекания болезни была необходимость переливания плазмы (табл. 6.16). В те годы, когда среди пациентов преобладала группа крови А, болезнь протекала тяжелее. В годы, когда более высокую частоту имела группа 0, дети с этой группой крови болели несколько тяжелее. Эта тенденция была особенно выраженной в той части данных, где можно было идентифицировать специфический штамм *E. coli*. Проведенное в это время серотипирование штаммов *E. coli* показало,



Рис. 6.32. Относительная частота групп крови А по сравнению с 0 у 1200 детей Гейдельберга, страдающих детской диареей, 1956-1963 [211].

Таблица 6.16. Течение детской диареи у 396 больных с положительной реакцией на *E. coli* [1889]

Сравниваемые	1956 и	1960-1963	1957-1959	
признаки	А	0	А	0
Больные, которым производилось переливание плазмы (%)	56,6	39,4	41,9	52,3
Потеря веса (г)	161,0	137,1	154,0	158,6
Средняя частота стула	6,10	5,42	5,95	6,0
Наивысшая температура тела (°C)	38,40	38,18	38,51	38,60
Время, проведенное в больнице (дни)	26,54	26,13	23,67	28,10
Прирост веса (г)	577,8	549,0	506,3	585,6

что наблюдаемые различия, вероятно, связаны с соответствующей изменчивостью этих штаммов.

Ассоциация групп крови с детской диареей была продемонстрирована во многих исследованиях [1858; 1873]. Установлено, что титры антител против *E. coli* 086 выше у больных с группами крови А, В и АВ по сравнению с 0 [1756] (рис. 6.33). Известно, что данный штамм *E. coli* имеет антигены В и А.

Эти результаты указывают на то, что общность антигенов паразита и хозяина может действительно приводить к более тяжелой форме заболевания, если хозяином является человек, и антиген принадлежит к системе АВН. Аналогичным образом Н-антиген возбудителя чумы может привести к более тяжелому протеканию этой болезни у носителей группы крови 0. Тогда против этого аллеля будет действовать отбор.

Группы крови АВ0 и оспа. Вопрос о возможной связи групп крови с оспой еще более противоречив, чем вопрос об ассоциациях, обсуждавшийся выше. Однако мы рассмотрим его здесь, поскольку данная экспериментальная схема может быть использована в качестве модели будущих исследований взаимодействия вирус — хозяин.

После разработки гипотезы о том, что распределение групп крови АВ0 в популяциях человека может быть связано с крупными эпидемиями,

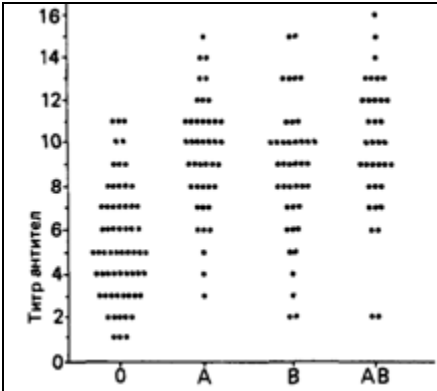


Рис. 6.33. Титры антител системы ABO против *E. coli* 086 у лиц с различными группами крови [1756].

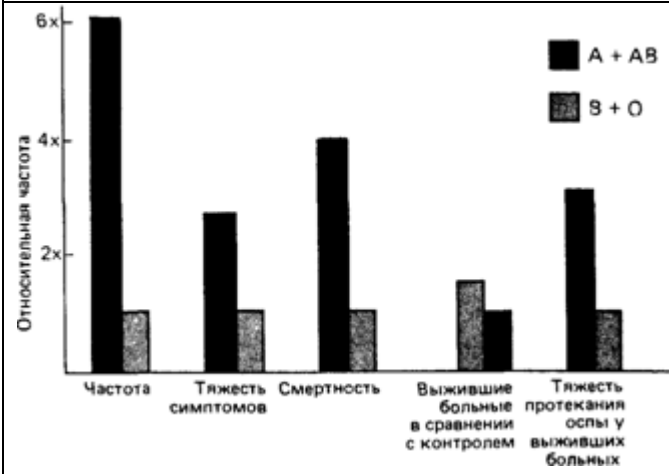


Рис. 6.34. Относительная частота оспы у лиц с группами крови A + AB и B + 0. Слева направо: частота (437 случаев заболевания и 428 незаболевших контрольных sibсов); 300 случаев с тяжелым и 137 случаев с легким течением заболевания; 225 больных, умерших от оспы, и 212 выживших больных; распределение групп крови среди 428 выживших больных по сравнению с 324 контрольными индивидами; тяжелые и легкие поражения кожи у 548 выживших больных [211].

а решающим фактором является общность антигенов возбудителя и хозяина, было решено исследовать активность АВН у возбудителя оспы. По чисто методическим причинам эти исследования провели не на вирусе натуральной оспы (вариола), а на близко родственном ему вирусе оспы коров. Была выявлена высокая активность антигена А [1849; 1890], что с очевидностью предполагает наличие иммунологического механизма, определяющего ассоциацию с данной болезнью. При попадании в организм человека вирус, имеющий антиген А, будет частично инактивирован антителами анти-А, которые присутствуют только у людей с группами крови В и 0. У лиц с группами крови А и АВ (у них этих антител нет) инактивации вируса не произойдет. Следовательно, можно ожидать, что у больных с группами крови А и АВ болезнь будет протекать тяжелее. Поскольку оспа поражает детей и часто заканчивается смертельным исходом, различия по группам крови должны оказывать сильное влияние на отбор.

Результаты, касающиеся наличия у вируса оспы А-подобного антигена вызвали сомнение [1786]. Было высказано предположение, что обнаруженный антиген А принадлежал не самому вирусу, а среде, в которой вирус выращивался. В то время когда проводилось это исследование, еще не было известно, что вирус может включать материал хозяина в собственный капсид. Сейчас получены данные в пользу существования такого механизма. Ими объясняют различную клиническую реакцию на заражение вирусом гепатита В [1818]. Вероятно, этот вирус включает компоненты белков сыворотки (особенно гамма-глобулина) и переносит их к новому хозяину, иммунная реакция которого может зависеть (по крайней мере частично) от сходства этих компонентов с его собственными белками.

Исследования ассоциации с группами крови, проведенные на больных оспой, дали противоположные результаты. Предположение, что лица, с груп-

пами крови А и АВ будут чаще и тяжелее болеть оспой, проверялось многократно, но результаты были получены неоднозначные. В одной из работ, в которой исследовались 986 случаев оспы (давних и возникших вновь), показано, что относительная частота заболеваемости значительно выше у лиц с группами А и АВ по сравнению с В и 0 [1888]. Та же тенденция обнаружилась при анализе тяжести клинических симптомов и смертности [1888] (рис. 6.34). Более того, среди людей, переживших эпидемии оспы, наблюдался небольшой избыток обладателей групп крови В и 0, что указывает на более высокую смертность лиц с группами крови А и АВ. Среди выживших больных тяжелые поражения кожи наблюдались чаще у лиц с группами А и АВ. Это исследование было проведено в индийской деревне во время эпидемии оспы; в качестве контроля использовались sibсы пораженных пробандов, которые остались здоровыми, несмотря на то, что также соприкасались с инфекцией. Почти все жители деревни, как заболевшие, так и здоровые, никогда не подвергались вакцинации. Такая постановка эксперимента подчеркивает разницу в распределении групп крови у больных и здоровых индивидов и в то же время до минимума снижает возможность ошибки, связанной со стратификацией популяции.

Эксперименты, спланированные подобным образом, больше никогда не проводились. Однако обследование пациентов городских больниц Индии [1755; 1874] и изучение более легкой формы оспы в Бразилии [1804] не подтвердили ассоциацию оспы с группами крови. Это расхождение возможно, объясняется тем, что рассмотренное выше исследование оспы в деревнях Индии [1888] выполнено в основном на детях. В работах, проведенных в городских больницах Индии, возрастное распределение пациентов не приводится, однако на основе некоторых косвенных сведений можно предположить, что большинство больных были взрослыми.

Выше отмечалось (разд. 6.2.1.6), что селективное преимущество гетерозигот HbS характерно только для детей раннего возраста; выжившие взрослые высокоиммунны независимо от того, каким типом HbS они обладают. Вполне возможно, что это справедливо и в случае оспы. До ликвидации оспы эта болезнь в некоторых областях Индии была почти эндемической. Действительно, высокий титр препятствующих гемагглютинации антител вариолы был найден у многих жителей этих областей, никогда не имевших клинических проявлений оспы и не подвергавшихся вакцинированию [1737]. Однако данные по этому вопросу остаются противоречивыми, а возможность его окончательного решения невелика из-за практически полной ликвидации оспы.

Группа крови А и оспа в мировом населении. Как уже отмечалось, до начала 1970-х годов оспа часто встречалась во многих популяциях. По данному вопросу существуют обширные статистические материалы. Если бы оспа являлась важным селективным фактором, направленным против аллеля А, между частотой этого аллеля и частотой заболеваемости оспой или смертностью от нее наблюдалась бы отрицательная корреляция. Наличие такой отрицательной корреляции показано для популяций Индии [1727] и Африки [1885] при сравнении частоты группы А в различных субпопуляциях и частоты встречаемости в них оспы.

	Число групп популяций	Число индивидов, включенных в подсчет	Коэффициент корреляции Спирмена
Индия и Пакистан (смертность)	18	87153	$r = -0,634$
Африка (заболеваемость)	27	195313	$r < 0,01$

Распределение генов групп крови АВ0 среди населения земного шара и отбор за счет инфекционных заболеваний. Какие особенности распределения аллелей АВ0 в мировом населении можно объяснить действием рассмотренных выше механизмов отбора, а какие нельзя? Предположительные выводы таковы:

- а) исключительно высокая частота группы 0 в популяциях Центральной и Южной Америки, возможно, обусловлена преимуществом этой группы в присутствии сифилиса;
- б) более высокая частота группы 0 в периферических популяциях Европы может быть вызвана более низким давлением отбора, возникающего вследствие чумы и холеры;
- в) сравнительно низкие частоты группы А в Центральной и Южной Азии, возможно, объясняются отбором в результате оспы. В этих же областях частота группы крови 0 также не очень высока; соответственно повышена частота аллеля В. Это преимущество группы В может быть обусловлено длительным отбором против фенотипа А в результате оспы и

против фенотипа 0 в результате чумы и холеры.

Если против аллеля А существует сильное и длительное давление отбора, почему группа крови А все еще присутствует в популяциях? Возможно, этот аллель имеет какое-то до сих пор неизвестное селективное преимущество. Данные относительно ассоциации групп крови с другими вирусами противоречивы [211]. Если способность включать поверхностные антигены хозяина присуща многим вирусам, частотно-зависимый отбор, возникающий в результате обычных вирусных заболеваний, может быть распространенным. Если частотно-зависимый отбор действует в пользу более редкого аллеля, вполне возможно, что эта форма отбора является основным фактором поддержания полиморфизма по системе АВО в популяциях человека.

Один из аспектов распределения аллелей системы АВО среди населения Земли не получил удовлетворительного объяснения. Почему аллель В так распространен в Центральной и Южной Азии и так редко встречается в большинстве других регионов? Частичным объяснением может быть длительный отбор как против А, так и против 0. Одним из неизвестных факторов механизма отбора по системе АВН является взаимодействие организма хозяина (человека) с кишечными микроорганизмами и, возможно, пищей, содержащей АВН-подобные антигены [1843].

Результаты популяционных исследований гена Hb β E в населении Таиланда (разд. 6.2.1.7) показывают, что такие клины частот в популяциях трудно поддаются интерпретации. Они могут отражать как историю популяции и миграцию генов, так и интенсивность отбора.

Методология и результаты исследований отбора по группам крови АВО имеют значение для изучения естественного отбора в популяциях человека. Хотя несовершенство исследований эффектов отбора по группам крови системы АВО очевидно, эти работы важны с методологической точки зрения. 1. Следует признать чрезмерно упрощенным представление о том, что отбор, длительно действующий в одной и той

же популяции, является постоянным. Однако для основного фактора отбора по вариантам гемоглобина - *Plasmodium falciparum*- предположение о постоянстве отбора в течение многих столетий или даже нескольких тысячелетий может быть справедливым, поскольку малярия оставалась эндемическим заболеванием до тех пор, пока не изменились условия обитания ее переносчика - комара. С другой стороны, многие другие инфекционные заболевания имеют эндемичную природу. В этом случае давление отбора может измениться даже за короткий промежуток времени. Иногда возникают катастрофические вспышки заболеваний, память о которых надолго сохраняется в истории (например, эпидемии чумы в средние века). В других случаях некоторые инфекционные заболевания (такие, как детская диарея) не регистрируются вообще. Разнообразие селективных факторов и их изменение во времени - явление почти повсеместное. "

2. Генетическая изменчивость благоприятна для популяции. Если в результате эпидемии погибают почти все лица, несущие какой-либо генетический вариант, индивиды, имеющие другие варианты и поэтому менее подверженные инфекции, выживают. Следующая эпидемия может уничтожить эти варианты, но способствовать распространению первого. Таким образом, возникает динамическая ситуация, при которой генные частоты флуктуируют во времени в зависимости от преобладания того или иного фактора отбора. Данные по группам крови, полученные на костном материале XV и XVI вв., подтвердили гипотезу о колебании генных частот [1798]. Принимая во внимание трудности правильного определения группы крови АВО по ископаемому костному материалу, обусловленные иммунологической реакцией бактериальных загрязнений, к этим результатам надо относиться с осторожностью. Если благоприятной является генетическая изменчивость как таковая, единственного оптимального генотипа не существует.
3. Тот факт, что нестабильный полиморфизм благоприятен для выживания вида,

еще на означает обязательного его поддержания. Учитывая малый размер популяций у изолированных групп на ранних этапах истории человечества, можно с течением времени ожидать перехода многих популяций к полиморфизму. Для поддержания полиморфизма необходим стабилизирующий фактор. Высказано предположение, что таким фактором может быть частотно-зависимый отбор (разд. 6.2.1.5).

Генетическая восприимчивость и инфекционные болезни. В предыдущих разделах обсуждались многие примеры отбора, возникающего в результате инфекционных заболеваний. Если в дальнейшем исследование этой проблемы будет проводиться на болезнях, вызывающих наибольшее давление отбора, оно скорее всего будет успешным. Эндемические заболевания, постоянно влияющие на популяцию, являются более эффективными факторами отбора, чем эпидемические болезни, оказывающие эпизодическое влияние. Болезни, захватывающие значительную часть популяции, более эффективны как селективные факторы, нежели те болезни, действие которых ограничивается только небольшой ее частью. Заболевания, обуславливающие гибель в раннем возрасте, служат более эффективными факторами отбора по сравнению с болезнями, не приводящими к летальному исходу или поражающими людей после окончания репродуктивного периода их жизни.

Вероятно, полиморфизм по МНС поддерживается естественным отбором, возникающим в результате инфекционных заболеваний. Логично предположить, что помимо групп крови системы АВО с инфекционными заболеваниями могут ассоциировать и другие полиморфные системы. Априорно наиболее подходящим представляется главный комплекс гистосовместимости (МНС), в особенности по генам HLA. Сведений относительно ассоциации типов HLA с основными инфекционными заболеваниями в настоящее время имеется мало. Исследователи, изучающие эту систему, в основном работают в странах, где крупные эпидемии ликвидированы или утратили свое значение. Известно что МНС является основным компонентом генетической изменчивости иммунного ответа человека (разд. 3.5.5). Следовательно, в случае HLA весьма вероятна ассоциация с эпидемическими заболеваниями и сильное давление естественного отбора. Действительно, имеются данные по ассоциации HLA с проказой [1772, 1883], тифом [1884], малярией [1852], возможно также их участие в иммунном ответе к антигенам стрептококка [1773] и столбняка [1866]. Не исключено, что в будущем отбор по системе АВО будет считаться незначительным по сравнению с отбором по МНС.

Влияет ли генетическая предрасположенность к atopическим заболеваниям на резистентность к гельминтозам (к заражению гельминтами)? Один из основных факторов, реально угрожающих здоровью детей и взрослых в тропических странах - почти поголовное заражение кишечными гельминтами, в основном ленточными червями, аскаридами и анкилостомами. Анкилостомы вызывают тяжелую анемию, которая в сочетании с другими инфекционными заболеваниями может привести к ранней гибели. Характерными клиническими признаками заражения гельминтами являются повышенное содержание эозинофильных гранулоцитов и IgE в крови. Эти же признаки характерны для atopических болезней типа астмы, сенной лихорадки и atopического дерматита. Существуют убедительные доказательства того, что atopические заболевания имеют полигенную природу и в их определении участвуют ген или гены, влияющие на уровень IgE. Atopические болезни весьма распространены в современных популяциях, вполне возможно, что генотипы, обуславливающие их, прежде обладали селективным преимуществом.

Были проведены исследования с целью установить, имеют ли atopические генотипы папуасов Новой Гвинеи [1774] селективное преимущество в отношении гельминтозов. В 5000 жителей деревни произвели кожный тест на чувствительность к нескольким аллергенам. На основании полученных результатов 10% жителей были классифицированы как обладающие atopическим фенотипом. Обследование всех пациентов местной больницы показало, что 24 из них страдают астмой. Пробы кала выявленных астматиков, 50 жителей деревни, не страдающих астмой, но имеющих atopической фенотип, и 130 жителей, не имеющих atopических признаков (контроль), были проверены на наличие яиц анкилос-

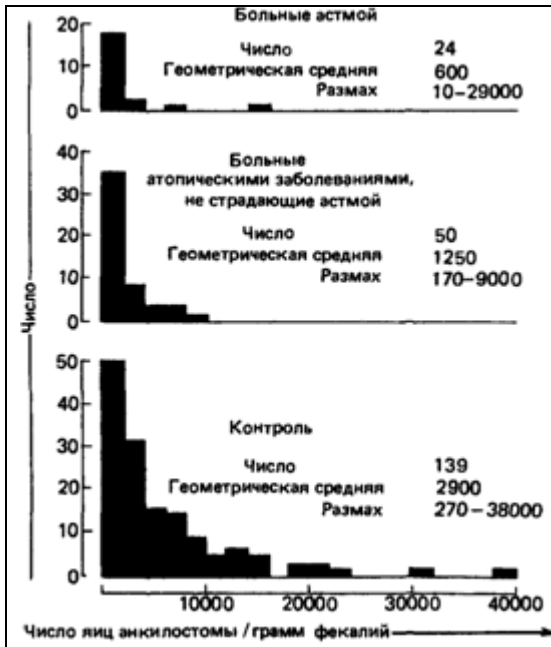


Рис. 6.35. Распределение числа яиц анкилостомы/грамм кала в трех выборках из сильно зараженной популяции Папуа (Новая Гвинея). Отметим огромную разницу в степени зараженности между астматиками, лицами, страдающими другими atopическими заболеваниями, и контрольной группой.

том. Результаты представлены на рис. 6.35. Среднее число яиц гельминтов оказалось наименьшим у больных астмой, повышалось у не страдающих астмой atopических индивидов и было наиболее высоким в контрольной группе. Возможные ошибки, обусловленные различным распределением atopических и неatопических фенотипов в разных деревнях, тщательно исключались. Результаты этого исследования подтверждают выдвинутое авторами предположение: сопутствующие atopии признаки, такие как повышение уровня IgE, вероятно, обеспечивают некоторую защиту от заражения гельминтами.

6.3. Отклонение от случайного скрещивания

В предыдущем обсуждении предполагалось случайное скрещивание и сохранение соотношений Харди—Вайнберга. Однако эти предположения являются абстракцией. В современных аутбредных популяциях скрещивания могут быть почти случайными по таким наследственным признакам, как группы крови или варианты ферментов, однако по другим признакам, например врожденной глухоте, они, конечно, неслучайны. Люди, страдающие глухотой, нуждаются в специальных школах и особой профессиональной подготовке, они образуют социальные группы с интенсивными внутригрупповыми контактами и остаются частично изолированными от внешнего мира. Естественно, между глухими часто происходят так называемые ассортативные браки. Если оба родителя имеют один и тот же рецессивный ген, определяющий глухоту, все их дети будут глухими. Менее очевидны, но гораздо более распространены браки, ассортативные по психологическим или социальным особенностям, таким как социальное положение, доход, круг интересов, образование, умственное развитие (рис. 6.36). Браки в популяциях человека заключаются отнюдь не случайно; популяции человека представляют собой сложные и постоянно изменяющиеся системы, состоящие из более или менее изолированных подгрупп. Эти подгруппы называются «изолятами», если их границы четко определены, а браки в основном совершаются между членами группы. В том случае, когда вероятность внутригрупповых браков выше, чем вероятность браков с представителями другой группы, группа называется демом [103]. Резкого разграничения между изолятами и демами нет.

Один из типов ассортативного брака – брак между родственниками. Поскольку некоторые гены родственников имеют общее происхождение, кровнородственные браки увеличивают частоту наследственных заболеваний. Сравнение потомства кровнородственных и некровнородственных браков позволяет обнаружить проявление рецессивных генов, которое выражается в увеличении частоты определенных заболеваний. Сравнительный анализ браков помогает получить информацию о роли рецессивных генов в заболеваемости и смертности и по таким болезням, где рецессивные гены играют второстепенную роль. Эти исследования могут быть полезны для определения генетического груза (см. разд. 6.3.2).

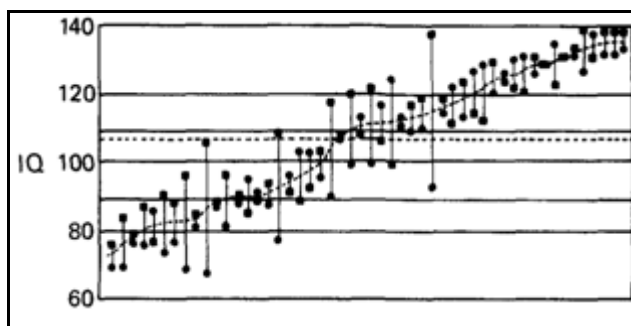


Рис. 6.36. Ассортативность скрещивания по коэффициенту умственного развития (IQ) в выборке супружеских пар в Соединенных Штатах. ■-муж; ●-жена; пунктирная линия-средняя (Outhit, 1933; Schwidetzky, Das Menschenbild der Biologie, 1959).

Другой аспект проблемы-широко распространенная тенденция предпочтения браков внутри одной субгруппы, что с течением времени приводит к возникновению генетических различий между такими субгруппами. Чтобы оценить эти различия были разработаны меры «генетического расстояния». На структуру и генетический состав популяций существенное влияние оказывает миграция между субпопуляциями. Этот фактор противодействует эффектам изоляции и в настоящее время приобретает все большее значение.

6.3.1. Кровнородственные браки

6.3.1.1. Коэффициент инбридинга [103]

Все люди – родственники. Родственники определяются как лица, часть генов которых общая по происхождению. Если понимать это определение в буквальном смысле, то родственниками можно считать всех людей. Все мы имеем общих предков. Возможно, ими является одна-единственная пара (см. разд. 7.2.1). Тогда почему же у нас такие разные гены? По той простой причине, что наши общие предки отстоят от нас на тысячи поколений. В течение этого долгого времени произошло множество мутационных событий, которые привели к возникновению генетической изменчивости. Очевидно, считать все человечество родственниками не имеет смысла, так как из этого – пусть даже формально верногопредположения нельзя сделать никаких выводов. Мы измеряем степень кровного родства для того, чтобы исследовать эти мутации и влияние кровного родства на их фенотипическое проявление. Однако при измерении степени кровного родства не следует забывать, что число поколений, которое при этом учитывается, определяется только соображениями практического удобства.

Степень родства, которая обычно рассматривается. В большинстве случаев родословные анализируют только по трем поколениям. Это ограничение означает, что рассматриваются только родители, деды и прадеды, а более отдаленные родственники во внимание не принимаются. Таким образом, самые дальние родственники, которые учитываются при оценке кровного родства двух индивидов, это троюродные сибсы. Первоначально это ограничение было введено из чисто практических соображений. Дело в том, что у католиков требуется специальное разрешение на брак между троюродными сибсами или более близкими родственниками и данные по частоте таких браков легко получить из церковных книг, где регистрируются эти разрешения. Типы кровнородственных браков приведены на рис. 6.37. Ограничение оценки кровного родства достаточно узкими рамками оправдано с теоретической точки зрения. При переходе за третье поколение рост коэффициента инбридинга индивида с увеличением числа кровнородственных браков между его (ее) предками происходит очень медленно.

Две полезные меры: коэффициент родства и коэффициент инбридинга [130; 1819]. В популяции могут встречаться различные типы кровнородственных браков: между двоюродными и троюродными братьями и сестрами, между дядей и племянницей, а иног-

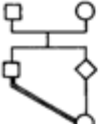
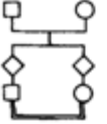
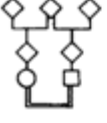
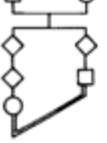
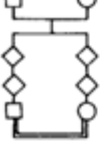
Обозначение	Тип брака	Коэффициент инбридинга	
	Дядя — племянница	1/8	
	Двоюродные сибсы	1/16	
	Троюродные сибсы	1/32	
	Двоюродный дядя — племянница	1/32	
	Четверородные сибсы	1/64	

Рис. 6.37. Наиболее важные типы кровнородственных браков.

да даже между братом и сестрой или отцом и дочерью. Конечно, частоты всех этих типов браков можно оценить: такие данные представляют интерес с социологической точки зрения. Однако для генетики интересен только один аспект данного вопроса: какова степень родства между супругами, какая часть генов у них общая? Если мы хотим сравнить особей по степени инбридинга или описать популяцию по среднему уровню инбридинга составляющих ее особей, нам необходима величина, измеряющая эту общую часть генов. Введение соответствующего параметра упрощает нашу задачу точно так же, как введение понятия генных частот упрощает описание популяции в терминах генотипов. Предложено несколько мер уровня инбридинга; выбор между ними в большой степени условен. Наиболее удобной оценкой является «коэффициент инбридинга» Райта [1885]. Он тесно связан с «коэффициентом родства» Малеко [130]. Эти коэффициенты определяются следующим образом:

- а) коэффициент родства Φ_{AB} двух индивидов А и В – это вероятность того, что случайно выбранный ген, принадлежащий А, идентичен гену того же локуса у В;
- б) коэффициент инбридинга индивида равен коэффициенту родства его отца и матери.

Разница между этими коэффициентами состоит в том, что коэффициент родства определяется для двух индивидов, которые могут иметь общих предков. Коэффициент инбридинга определяется для одного индивида и измеряет степень связи между его родителями и, следовательно, сходство между двумя генами каждого локуса, полученными от родителей. *Коэффициент инбридинга - это вероятность того, что два аллеля в данном локусе идентичны по происхождению.*

Коэффициент инбридинга и закон Харди— Вайнберга. Рассмотрим два аллеля А и а аутосомного гена; пусть частота этих аллелей равна p и q . В случайно скрещивающейся популяции частоты трех генотипов равны $p^2:2pq:q^2$. Если генотип содержит N пар аллелей, а их частоты в популяции равны p_i и q_i ($i = 1, 2, ..., N$), степень гетерозиготности при случайном скрещивании будет равна

$$2 \sum_{i=1}^N \frac{p_i q_i}{N},$$

а гомозиготности –

$$\sum_{i=1}^N \frac{p_i^2 + q_i^2}{N},$$

причем их сумма равна 1. Степень гетерозиготности отражает долю аутосомных генов, по которым в среднем гетерозиготен индивид. В случае одного гена она определяет вероятность того, что данный индивид гетерозиготен по этому гену.

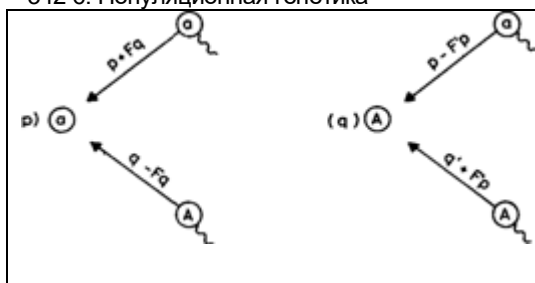


Рис. 6.38. Ооцит может нести аллель *a*. При случайном скрещивании вероятности того, что этот ооцит будет оплодотворен сперматозоидами, несущими аллели *a* и *A*, равны *p* и *q* соответственно. При кровнородственном скрещивании эти вероятности равны $(p + Fq)$ или $(q - Fq)$. Слева: оплодотворение ооцита *a*; справа: оплодотворение ооцита *A* [1819].

чае кровнородственного брака (рис. 6.38). Пусть ооцит несет аллель *a*. Если скрещивание случайно, то вероятность того, что этот ооцит будет оплодотворен сперматозоидами, несущими аллели *a* и *A*, равна *p* и *q* соответственно. Если супруги являются родственниками, то часть их генов имеет общее происхождение, поэтому *p* увеличивается до $(p + Fq)$, а *q* уменьшается до $(q - Fq)$. Аналогичные рассуждения справедливы для ооцитов, несущих аллель *A*. Величину, соответствующую *F* в предыдущем изложении, здесь можно обозначить как *F'*. Если наследование аутосомное, распределение генов *A* и *a* будет идентичным у обоих родителей. Поэтому $pq(1 - F) = qp(1 - F')$ и, следовательно, $F = F'$.

Можно показать, что *F* равен коэффициенту инбридинга, как он был определен выше. Это означает, что частоты генотипов детей, коэффициент инбридинга которых равен *F*, не соответствуют соотношению Харди—Вайнберга и равны

$$\begin{array}{l} AA : Aa : aa \\ (p^2 + Fpq) : 2(1 - F)pq : (q^2 + Fpq). \end{array}$$

Степень гетерозиготности ребенка уменьшается в среднем в *F* раз. Говоря другими словами, *F* — вероятность того, что две гомологичные хромосомы несут в случайно выбранном локусе два аллеля, происходящие от одного и того же предкового гена.

Вычисление коэффициента инбридинга *F*. В большинстве реальных ситуаций, возникающих в генетике человека, вычисление *F* или *F* необязательно, поскольку степень кровного родства в популяциях человека обычно известна. Иногда коэффициент инбридинга необходимо вычислить для какой-либо конкретной родословной. Совершенно иное положение в селекции животных, где между скрещиваемыми особями встречаются очень сложные родственные связи. Для определения коэффициента инбридинга Райт разработал метод коэффициентов путей [124; 961]. Для этого строятся родословные скрещивающихся особей и отмечаются все их общие предки. Затем выбирается один из ближайших общих предков и родительские особи соединяются всеми возможными путями, которые:

а) ведут к этому общему предку;

б) состоят из «шагов» (один шаг определяется как связь между особью и одним из ее родителей);

в) не ведут к одной особи более одного раза. Все остальные общие предки анализируются тем же способом. Для каждого пути подсчитывают число шагов. Для одного предка может существовать *x* путей, состоящих из $m_1, \dots, m_x$ шагов каждый; для *t* общих предков существует

$$\sum_{i=1}^t x_i = r \text{ путей. Тогда}$$

$$F = \frac{1}{2} (2^{-m_1} + 2^{-m_2} + \dots + 2^{-m_x}) = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^r 2^{-m_i} \quad (6.12)^1$$

Эту формулу легко понять с помощью следующего простого рассуждения. $1/2$ генов ребенка общая с каждым из его родителей, $1/4$ — с дедом и бабушкой, $1/8$ — с прадедом и прабабушкой и т. д. Если от матери к какому-нибудь предку ведет путь из *a* шагов, она имеет с этим предком $(1/2)^a = 2^{-a}$ общих генов. Если от отца к этому предку ведет путь из *b* шагов, он имеет с этим предком 2^{-b} общих генов. Это означает, что отец и мать имеют $2^{-a} \times 2^{-b} = 2^{-m}$ общих генов ($m = a + b$). Это число, деленное на 2, дает вероятность того, что ген, случайно выбранный у матери, идентичен по происхождению гену, случайно выбранному у отца ²⁾.

Примеры. На рис. 6.39 показан брак между двоюродными сибсами. Пути к общему деду и общей бабушке у этой пары состоят каждый из 4 шагов.

¹⁾ Если один из общих предков происходит от кровнородственного брака, необходимо внести поправку с учетом коэффициента инбридинга.

²⁾ Более строгий вывод и другие методы вычисления *F* см. в [124; 103; 108].

Подстановка в уравнение (6.12) дает

$$F = \frac{1}{2}(2^{-4} + 2^{-4}) = \frac{1}{2}\left(\frac{1}{16} + \frac{1}{16}\right) = \frac{1}{16}.$$

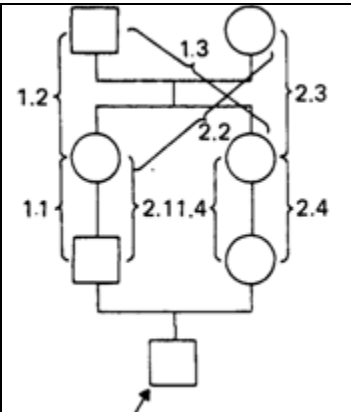
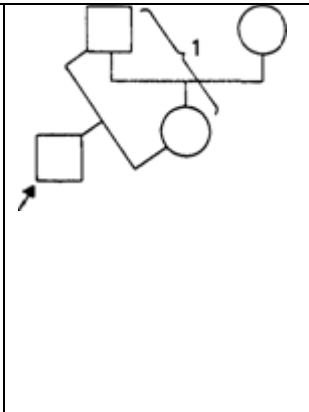
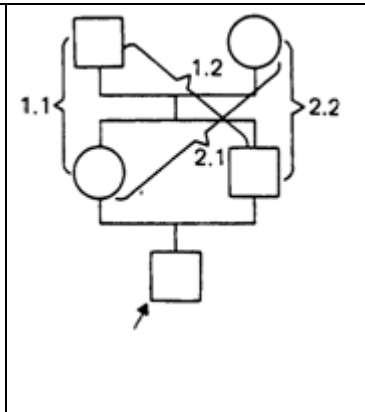
На рис. 6.40 показан брак отца и дочери. Здесь только один путь, состоящий из одного шага:

$$F = \frac{1}{2} \cdot 2^{-1} = \frac{1}{2} \cdot \frac{1}{2} = \frac{1}{4}.$$

Третий пример - брак между братом и сестрой (рис. 6.41):

$$F = \frac{1}{2}(2^{-2} + 2^{-2}) = \frac{1}{2}\left(\frac{1}{4} + \frac{1}{4}\right) = \frac{1}{4}.$$

Как упоминалось выше, для человека эти вычисления условно ограничены тремя поколениями. Это условие разумно с количественной точки зрения: например, если общий предок отстоит от данной пары на 5 поколений, соответствующий путь имеет 5 шагов; следовательно, его вклад в F равен только $1/2 \cdot 2^{-10} = 1/2048$.

		
Рис. 6.39. Брак между двоюродными сибсами. Вычисление F методом коэффициентов путей. Четыре шага (1.1-1.4) соединяют отца и мать пробанда через их общего деда. Четыре других шага (2.1-2.4) соединяют отца и мать через их общую бабушку. $F = 1/16$.	Рис. 6.40. Инцестный брак отец—дочь. Их соединяет только один путь.	Рис. 6.41. Инцестный брак брат—сестра. Их соединяют два пути, из двух шагов каждый.

Коэффициент инбридинга популяции. Во многих случаях нас интересует величина, измеряющая среднюю степень кровного родства в популяции и учитывающая все типы имеющихся в ней кровнородственных браков. Если ограничить анализ последними тремя поколениями, то в результате мы получим коэффициент явного кровного родства K :

$$K = \sum F_i M_i.$$

Суммирование производится по различным типам кровнородственных браков; F_i и M_i - коэффициент инбридинга и относительная частота i -того типа кровнородственного брака. K зачастую называют просто средним F или F популяции. При сравнении по этому параметру разных популяций необходимо учитывать, что условие, касающееся анализа только трех ближайших поколений, соблюдается не всегда. Кроме того, почти во всех популяционных исследованиях определяют не коэффициенты инбридинга всех особей, а коэффициенты родства всех пар. Коэффициент родства дает несмещенную оценку коэффициента инбридинга только в том случае, когда инбридинг не влияет на репродукцию.

6.3.1.2. Инбридинг, размер изолята и наследственные заболевания

Частота детей с рецессивными и полигенными заболеваниями в кровнородственных и неродственных браках. Пусть аллель, который в гомозиготном состоянии приводит к возникновению рецессивного заболевания, встречается в популяции с частотой q . Тогда частота соответствующего фенотипа в случайно скрещивающейся популяции будет равна q^2 ; если коэффициент инбридинга особей в популяции равен F , эта частота составит $q^2 + Fpq$. С уменьшением q увеличивается отношение Fpq/q^2 : чем ниже частота гена (генотипа), тем выше частота кровнородственных браков среди родителей пораженных гомозигот. Этот вывод справедлив не только для рецессивных заболеваний, но и для полигенных признаков (разд. 3.6). У особей с коэффициентом инбридинга F дисперсия нормально распределенной подверженности заболеванию с наследуемостью $h^2 = 1$ равна

$$V_F = V_0(1 + F),$$

где V_0 — дисперсия в неинбредной популяции. Однако с увеличением дисперсии относительное число особей со значением признака, превышающим пороговое, также увеличится. Следовательно, риск заболевания мультифакториальной болезнью с пороговым эффектом несколько выше для детей от кровнородственных браков, чем для детей, родители которых не являются родственниками (рис. 3.63).

В случае рецессивных генов ситуация противоположная. Если в популяции обнаружено большее число кровнородственных браков, чем ожидалось на основании частоты встречаемости в ней определенного рецессивного заболевания, возможно, что это заболевание детерминруется не одним, а несколькими рецессивными генами, имеющими более низкие частоты, т. е. существует генетическая гетерогенность. Если предположить, что частоты этих генов одинаковы, можно даже определить их число. Однако на практике такой подход почти всегда оказывается бесполезным по следующим причинам.

1. Уменьшение инбридинга в современных популяциях привело к резкому снижению числа гомозигот по рецессивным заболеваниям.
2. Уменьшение инбридинга характерно главным образом для больших городов и территорий с большой плотностью населения. В отдаленных сельских областях, где кровнородственные браки встречаются чаще, рецессивные заболевания проявляются.
3. Высокое значение отношения кровнородственных браков к неродственным может объясняться просто гетерогенностью популяции даже при наличии только одного рецессивного гена.

Эти вопросы будут обсуждаться в связи с генетической природой глухонемоты (приложение 3).

Определение величины изолята по частоте кровнородственных браков. Если браки заключаются случайным образом, а размер популяции бесконечно большой, вероятность кровнородственного брака равна нулю. Это утверждение можно сформулировать противоположным образом. Если браки внутри изолята происходят случайно, какова должна быть его величина, чтобы соответствовать реально наблюдаемой в этом изоляте частоте кровнородственных браков? Эта идея лежит в основе определения размера изолята [1750].

Пусть n — число индивидов в изоляте, $n/2$ — число индивидов каждого пола, способных вступить в брак, а b — среднее число детей на брак. Тогда среднее число двоюродных сибсов противоположного пола для каждого индивида будет равно $b(b - 1)$. Если вероятность их вступления в брак такая же, как и у других членов популяции, то доля кровнородственных браков составит

$$c = \frac{b(b - 1)}{n/2}.$$

Решая это уравнение, для n получаем

$$n = \frac{2b(b - 1)}{c}.$$

Такие же вычисления можно произвести для других степеней родства. Они широко применялись разными авторами для определения структуры скрещиваний в популяциях человека.

В действительности кровнородственные браки происходят не случайно: на них влияет множество различных социальных и социально-пси-

Таблица 6.17. Оценка величины изолята по различным типам кровнородственных браков [1826]							
Популяции	Частота кровнородственных браков				Оценка величины изолята		
	Все браки	Двоюродные сибсы	Троюродные сибсы	Дядя—племянница, тетя—племянник	Двоюро; х-ные сибс	Троюроды ные сибсы	Дядя—племянница, тетя—племянник
Япония (ХиросимаНагасаки)	66417	2683	1116	1	100	950	130 000
Австрия (Orel, 1932)	117431	840	309	63	560	6100	3 700
Англия (Bell, 1940)	59 551	340	67	4	700	14000	30000
Бразилия (Freire-Maia, 1952)	43 082	2185	1 124	22	80	610	3 900

хологических факторов. Слабость этого метода можно легко продемонстрировать, показав, что оценки размера изолята, основанные на различных типах кровнородственных браков, дают совершенно разные результаты для одной и той же популяции (табл. 6.17).

Коэффициент инбридинга F в различных популяциях. В табл. 6.18 приведены частоты кровнородственных браков в различных популяциях. В этой таблице приведены браки между двоюродными сибсами (1–С) и значения F, вычисленные на основе имеющихся данных ¹⁾. Сведения получены при анализе родословных пар, заключивших кровнородственный брак. В зависимости от метода оценки значение коэффициента инбридинга F может быть в той или иной степени занижено по следующим причинам.

- 1.Для стран с католическим населением данные обычно основаны на записях разрешения на брак, которые имеются в церковных книгах. Однако, вероятно, не все католики, собирающиеся вступить в брак с близким родственником, обращаются в церковь за разрешением; священники, особенно в городах, могут недостаточно хорошо знать своих прихожан, чтобы определить родственные связи между ними.
 - 2.В некоторых работах используются опросы семей, но надо учитывать, что кровное родство между супругами часто скрывается.
- Пример: при изучении населения острова Хосодзима (Япония) семь членов совета острова из общего числа браков 45 выделили 19 кровнородственных. Проверка регистрационных записей увеличила это число до 25, в результате тщательного анализа родословных число браков между родственниками возросло до 29 [1794].

Почти во всех странах Европы и в США коэффициенты инбридинга очень низкие; высокие коэффициенты инбридинга характерны для небольших поселений, а также для религиозных, географических и этнических изолятов. В Южной Америке, которая изучена очень хорошо, средний коэффициент инбридинга, вероятно, в два или три раза выше, чем в Европе [1763; 1764]. Высокие значения F показаны также и для Японии. Наиболее высокие значения получены для населения некоторых областей Южной Индии (особенно для штата Андра Прадеш), нубийских племен Египта и племени фульбе Гвинеи.

Падение частоты кровнородственных браков в развитых странах. В странах Западной Европы с высоко развитой промышленностью с начала XX в. наблюдалось уменьшение частоты кровнородственных браков. Эта тенденция зародилась в индустриальных областях и больших городах и сейчас распространяется в сельскохозяйственные районы. Особенно подробно в этом отношении изучена Франция. В 1926-1930 гг. средний коэффициент инбридинга (точнее,

¹⁾ Для Израиля приведены только частоты браков двоюродный брат—двоюродная сестра, дядя—племянница и тетя—племянник, поэтому значение коэффициента инбридинга может быть заниженным.

Таблица 6.18. Частота кровнородственных браков и коэффициенты инбридинга F ($\times 10^{-5}$) в различных странах [1767]

Страна, область, епархия	Метод оп-ределения ¹⁾	Время	Величина популяции	% браков между дво-юродными сибсами	% кровно-го родства (все типы суммарно)	F ($\times 10^5$)	Время	Популяции	% браков между дво-юродными сибсами	% кров-ного род-ства	F
Европа											
Бельгия	КЦ	1918-59	2404027	0,49	1,47	50	1955-59	300592	0,22	0,97	29
ЧССР, епархия Брно	КЦ	1930-66	230988		0,93	28	1960-66			0,20	8
Германия, Бавария,	КЦ + ЦПК	1848-1922	16182	0,50	1,18	44	—	—	—	—	—
Вюртемберг											
5 локальностей близ Тюбингена	КЦ + КР	1920	453	4,91	20,00	472	—	—	—	—	—
Архиепископская епархия Колонь	КЦ	1898-1943	192980	0,37	0,93	35	—	—	—	—	—
Епархия Мюнстер и Оснабрюк	КЦ	---	---	---	---	—	1946-51	119899	0,18	0,59	19
Франция	КЦ	1926-58	6061000	0,52	1,36	49	1956-58	530000	0,22	0,67	23
Ирландия	КЦ	—	—	—	—	—	1959-68	190547	0,13	0,53	16
Италия	КЦ	1911-60	13687897	1,33	3,00	118	1956-60	1646612	0,77	1,90	70
Австрия, архиепис-копская епархия	КЦ	1901/02	117 294	0,67	1,28	60	—	—	—	—	—
Вены		1914/14									
Швейцария, 4 горные деревни	Р + ЦПК	1920	538	2,79	32,71	509	—	—	—	—	—
Испания (в целом)	КЦ	1930	17000	2,00	5,34	203	—	—	—	—	—
Д. Куидад, Родриго	КЦ	1940-64	11394	2,18	9,41	254	1960-64	2069	2,10	10,63	275
Северная Америка											
Католическое насе-ление Канады	КЦ	---	---	---	—	---	1959	51729	0,37	1,51	45
		1885-95									
Франкоязычное население	КЦ	1915-25	149992	1,03	4,17	180	1955-65	50128	0,37	2,10	90
Католическое население США	КЦ	—	—	—	—	—	1958	133 228	0,08	0,11	8
Мормоны	СА	1930-50	132 524	0,04	?	?	—	—	—	—	—
Мормоны, 9 сельских приходов	СА	—	—	—	—	—	1950	625	1,44	9,92	189

Центральная и Южная Америка											
Аргентина 12D ²⁾	КЦ	—	—	—	—	—	1956/57	51391	0,75	1,12	58
Бразилия 72D	КЦ	—	—	—	—	—	1956/57	212090	2,63	4,82	225
Бразилия 95D	КЦ	—	—	—	—	—	1965/67	198088	2,14	4,00	176
Боливия 5D	КЦ	—	—	—	—	—	1956/57	4130	0,32	0,63	28
Чили 8D	КЦ	—	—	—	—	—	1956/57	28 596	0,80	1,31	74
Чили, Вальпараисо	КЦ	1917-66	195 721	0,60	0,98	50	1957/66	51828	0,41	0,68	35
Коста-Рика ID	КЦ	—	—	—	—	—	1954	3 833	0,94	3,39	114
Эквадор 3D	КЦ	—	—	—	—	—	1956/57	3 954	2,17	6,27	229
Эль-Сальвадор 2D	КЦ	—	—	—	—	—	1956/57	2494	1,04	4,85	142
Гондурас 3D	КЦ	—	—	—	—	—	1956/57	3 759	0,56	3,43	ПО
Колумбия 13D	КЦ	—	—	—	—	—	1956/57	34470	1,25	2,95	119
Куба 3D	КЦ	—	—	—	—	—	1956/57	2277	0,53	0,83	54
Мехико 10D	КЦ	—	—	—	—	—	1956/57	28 292	0,17	1,27	31
Панама ID	КЦ	—	—	—	—	—	1956/57	350	0	0	—
Перу 3D	КЦ	—	—	—	—	—	1956/57	565	2,12	4,07	279
Уругвай 3D	КЦ	—	—	—	—	—	1956/57	8 822	0,85	1,43	65
Венесуэла 4D	КЦ	—	—	—	—	—	1956/57	2931	1,60	4,46	191
Азия											
Япония (в целом)	О + СА	—	—	—	—	—	1950	213148	5,39	8,16	400
Хирадо ³⁾	О + СА	1880-1964	10403	5,58	14,72	461	1960-64	853	1,76	10,79	200
Индия, Бомбей ⁴⁾	О	—	—	—	—	—	1955	3 520	9,29	11,39	612
Южная Индия	О	—	—	—	—	—	после	26042	24,58	39,37	2 835
							1950				
Израиль	О	—	—	—	—	—	1955-57	11424	5,22	9,68	387
Африка											
Египет, нубийское население	О	—	—	—	—	—	1967/68	1782	45,29	75,76	3 335
Гвинея, фульбе	О	—	—	—	—	—	1960	1280	15,21	29,91	819

¹⁾ КЦ - разрешения на брак, выданные католической церковью. Р - родословные; ЦПК - церковно-приходские книги; О-опросы; КР- книги регистрации браков; СА-семейные архивы.

²⁾ Цифра +D показывает число епархий (dioceses).

³⁾ Данные для Хирадо относятся ко времени брака для тех браков, в которых хотя бы один супруг был жив ко времени обследования.

⁴⁾ Коэффициент инбридинга был вычислен на основании числа браков дядя - племянница и тетя - племянник, поэтому он может быть занижен на 1/4-1/3.

коэффициент явного кровного родства, см. выше) был равен $86,1 \times 10^{-5}$; в 1956-1958 гг. он упал до 23×10^{-5} . Уменьшение коэффициента инбридинга обычно объясняют повышением мобильности населения промышленно развитых стран и расширением возможности выбора брачного партнера. Такое объяснение подтверждается исследованиями, в которых показано, что расстояние между местами рождения супругов возрастает во времени. Это явление обычно называется «разрушением» изолятов. В последнее время тенденция к уменьшению числа родственных браков усилилась из-за уменьшения числа детей в семьях и, следовательно, уменьшения числа двоюродных сибсов.

Исходя из этих и других соображений, возникает вопрос о том, в какой степени кровнородственные браки представляют собой репрезентативную в других отношениях выборку из всех браков. Этот вопрос имеет значение при использовании кровнородственных браков для оценки генетического груза (разд. 6.3.2), обусловленного летальными и неблагоприятными в гомозиготном состоянии генами.

Влияние социальных и психологических факторов на частоту кровнородственных браков. В промышленно развитых районах Франции, где частота кровнородственных браков ниже, качество акушерской и педиатрической помощи обычно выше.

Исследования, проведенные в Германии, показали, что люди, вступившие в брак с близким родственником, в психологическом отношении отличаются от среднепопуляционного уровня [1896]. Например, мужья из кровнородственных браков с большим трудом, нежели другие мужчины, устанавливали межличностные контакты, именно поэтому они и выбрали в качестве жены родственницу. В некоторых регионах отношение к кровнородственным бракам положительное, например в Южной Индии наиболее предпочтительным с социальной точки зрения считается брак между племянницей и ее дядей по материнской линии.

До самого недавнего времени в Индии и Японии выбор жениха и невесты осуществлялся их семьями. Определяющую роль при этом играли экономические мотивы, а также степень знакомства с семьей жениха (невесты). В этом случае психологические факторы, подобные упомянутым выше в связи с исследованием популяции Германии, вероятно, играют небольшую роль. По этой причине, а также по ряду других соображений можно сделать вывод, что в Японии кровнородственные браки являются более репрезентативной выборкой из всех браков по сравнению с Европой. Однако некоторые смещения наблюдаются и здесь. Например, изучение кровнородственных браков в населении японского острова Хирадо [1877; 1878; 1879] показало повышенную частоту браков между старшими братьями и их двоюродными сестрами. Кроме того, именно старшие братья наследовали участок земли, принадлежащий семье, поэтому они чаще оставались в родной деревне, тогда как младшие братья меняли место жительства. При определении влияния кровного родства родителей на состояние здоровья потомства такие отклонения должны учитываться.

Влияние уменьшения частоты кровнородственных браков на частоту рецессивных заболеваний. Предположим, что в популяции со средним коэффициентом инбридинга F при частоте гена, равной q , скорость мутирования μ и коэффициент отбора s находятся в состоянии равновесия. Пусть в течение короткого промежутка времени, равного, скажем, одному поколению, коэффициент инбридинга уменьшился от F_1 до F_2 . Число гомозигот соответственно упадет с $q^2 + F_1pq$ до $q^2 + F_2pq$. Это изменение частот нарушит генетическое равновесие. Поскольку гомозигот стало меньше, давление отбора теперь недостаточно для элиминации возникающих в результате мутирования генов. Например, для населения Европы F_1 варьирует в пределах 0,003-0,005. Предположим, что скорость мутирования равна 10^{-5} , а коэффициент отбора (s) против гомозигот – 0,5. Равновесная частота $q = 2,6-3,2 \times 10^{-3}$. В этом случае полное прекращение инбридинга приводит к падению частоты гомозигот, показанному на рис. 6.42. Для того чтобы пройти половину пути к достижению новой равновесной час-

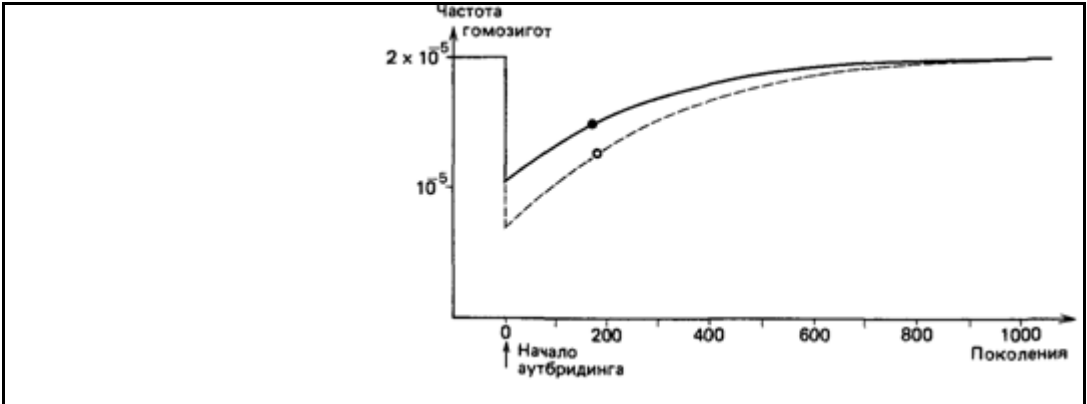


Рис. 6.42. Уменьшение частоты рецессивных гомозигот в популяции с длительным инбридингом вследствие полного прекращения инбридинга и очень медленного возвращения к исходным значениям частот в результате превышения числа вновь возникающих мутаций над числом мутаций, элиминируемых отбором. Скорость мутирования $\mu = 10^{-5}$; коэффициент отбора для рецессивной гомозиготы $s = 0,5$; коэффициенты инбридинга $F = 0,003$ (прямая линия) и $F = 0,005$ (пунктирная линия). В точках ● и ○ соответственно генная частота q достигает половины нового равновесного значения. Значения частоты гена s вычислялись путем решения уравнения $q^2 + Fq(1-q) = \mu/s$ для q и затем $q' = (q^* - sq^{*2})/(1 - sq^{*2})$, где $q^* = q + \mu r$

тоты, популяции понадобится 175-185 поколений, или около 4500 лет.

Уменьшение инбридинга является одной из причин того, что в современном обществе рецессивные наследственные болезни встречаются и будут встречаться еще в течение долгого времени с такой необыкновенно низкой частотой. Вторая причина, связанная с первой, заключается в том, что в результате стохастических процессов в популяциях малого размера (разд. 6.4) частоты генов, определяющих рецессивные заболевания, различны в разных группах населения. При увеличении числа браков между представителями этих групп генные частоты в них выравниваются, а высокие частоты генов и соответственно высокие частоты гомозигот исчезают.

6.3.2. Концепция генетического груза

6.3.2.1. Теория

Определение общего числа рецессивных генов в популяциях человека [1856; 1871]. Гомозиготы, особенно по редким заболеваниям, среди детей от кровнородственных браков встречаются чаще, чем в популяции в целом. Исходя из этого, можно определить число таких рецессивных генов у каждого индивида в популяции.

Например, пусть вероятность того, что ген, случайно выбранный у индивида, идентичен по происхождению одному из двух аллелей того же локуса его брата (сестры), равна $1/2$. Если один из сибсов в браке брат—сестра несет ген, который в гомозиготном состоянии вызывает рецессивное заболевание, то другой сибс имеет этот ген с вероятностью $1/2$, а риск заболевания для каждого ребенка этой пары равен $1/4$. Следовательно, вероятность того, что хотя бы один ребенок от этого брака окажется больным, равна $1 - (3/4)^s$, где s — число детей в браке. Таким образом, путем анализа частоты рецессивных болезней в потомстве некоторого числа браков между братьями и сестрами (при условии, что отбор по каким-либо другим признакам отсутствует) можно определить среднее число особей в популяции, имеющих этот рецессивный ген. Те же самые рассуждения справедливы для браков отец—дочь. Однако браки между столь близкими родственниками встречаются крайне редко и запрещены законом. Кроме того, индивидов, вступающих в по-

добные браки, никак нельзя считать репрезентативной выборкой из популяции (см. раздел 6.3.2.4).

Интуитивные предпосылки: наш груз мутаций. Известного генетика Г. Мёллера с юных лет занимала мысль о том, что для человека как вида существует опасность биологического вырождения. Он считал, что рано или поздно человечество погрузится в пучину страданий от болезней и умственных расстройств.

В начале века эти опасения разделяли многие ученые; именно они явились причиной появления работ Ф. Гальтона и евгенического движения.

Аргументы Мёллера были подробно изложены в его статье «Наш груз мутаций» (1950) [1835]. Наиболее важные положения этой статьи можно сформулировать следующим образом:

а) большинство зигот человека в результате мутаций погибает или утрачивает способность к делению;

б) общая скорость мутирования на индивид, т.е. общее число новых мутаций, содержащихся в тех двух зародышевых клетках, от которых он происходит, составляет одну мутацию на 2—10 зародышевых клеток;

в) каждый индивид гетерозиготен по нескольким генам, летальным в гомозиготном состоянии; эти гены обычно даже в гетерозиготном состоянии оказывают вредное действие;

г) из-за ослабления интенсивности естественного отбора число вредных генов в популяциях человека угрожающе растет; их частота может превысить критический уровень, после чего генетическая система человека разрушится и человек как вид исчезнет;

д) эта опасность обостряется в связи с увеличением воздействия ионизирующей радиации;

е) необходимо противостоять опасным тенденциям путем искусственной регуляции размножения человека.

С тех пор как Мёллер сформулировал эти положения, наши знания о генетике человека пополнились и на некоторые из поставленных им вопросов мы получили довольно точный ответ [1886]. Выделим один из них, а именно утверждение, что каждый человек гетерозиготен по нескольким генам, летальным в гомозиготном и неблагоприятным даже в гетерозиготном состоянии.

Влияние изменчивости на приспособленность. Более формализованная и рациональная концепция была разработана Холдейном в нескольких статьях, особенно в одной, названной «Влияние изменчивости на приспособленность» [1775; 1780]. Холдейн определил приспособленность генотипа как среднее число потомков, оставляемое особью этого генотипа, и отметил, что средняя приспособленность вида почти всегда близка к единице, так как в противном случае размер популяции будет очень быстро увеличиваться.

Однако у любого вида приспособленность некоторых генотипов ниже 1 и падает до нуля в случае летальных генов и генов, вызывающих полную стерильность. Следовательно, приспособленность «стандартного» генотипа, не содержащего неблагоприятных генов, должна превышать единицу.

Совершенно ясно, что в состоянии равновесия гены с вредным эффектом отмечаются естественным отбором точно с такой же скоростью, с какой они возникают в результате мутирования. Летален ли ген или почти безвреден, значения не имеет. В первом случае отбором отмечается каждая особь, имеющая такой ген, или, если этот ген рецессивный, каждая особь, гомозиготная по этому гену. Во втором случае жизнеспособность или плодовитость несущих данный ген особей может уменьшиться только на одну тысячную. Однако в обоих случаях падение приспособленности вида зависит только от скорости мутирования, а не от влияния гена на приспособленность несущей его особи.

Внимательный читатель, возможно, уже понял, что это утверждение является обобщением аргументов Холдейна, обосновывающих косвенный метод оценки частоты мутирования у человека (разд. 5.1.3.1). Проведя предварительный анализ общей скорости мутирования у дрозофилы, Холдейн продолжает: «Это та цена, которую вид платит за изменчивость, являющуюся, вероятно, необходимым условием эволюции».

В более поздней работе [1780] Холдейн оценил, насколько должна уменьшиться приспособленность, чтобы в ходе эволюции в результате действия естественного отбора произошло замещение адаптивного гена.

Концепция генетического груза была использована для оценки мутирования в популяциях человека Мортон в его работе: «Определение мутационного груза у человека на основе данных по кровнородственным бракам» [1827].

Определение генетического груза [1827]. Мортон, Кроу и Мёллер [1827] различают общий генетический груз, обусловленный вредными мутациями, присутствующими в геноме человека, и выявляемый (expressed) генетический груз; и тот и другой выражаются в летальных эквивалентах. Летальный эквивалент - это такое число мутаций, которое, будучи распределено среди нескольких особей, в среднем приводит к одному летальному исходу по генетическим причинам. Например, летальному эквиваленту соответствует одна летальная мутация, которая обуславливает гибель особи во всех случаях, или две мутации, каждая из которых приводит к гибели в 50% случаев. Общий груз на гамету определяется как среднее число летальных эквивалентов на такую зиготу, которая образуется путем удвоения всех хромосом гаметы. Выявляемый груз на гамету - это среднее число летальных эквивалентов, которое проявилось бы в том случае, если бы эта гамета образовала зиготу при соединении с другой гаметой в соответствии с системой скрещивания, преобладающей в данной популяции.

Общий генетический груз можно оценить следующим образом. Рассмотрим один генный локус. Вероятность выживания данной зиготы, несмотря на вредный эффект мутаций по этому локусу, равна

$1 - qFs$	$-q^2(1-F)s$	$-2q(1-q)(1-F)sh$
Вероятность гибели, обусловленная гомозиготностью из-за кровного родства	Вероятность гибели, обусловленная гомозиготностью, возникшей не из-за кровного родства	Вероятность гибели гетерозиготы

(6.14)

Здесь s = вероятность гибели зиготы, гомозиготной по данной мутации; h -степень доминантности этой мутации ($h = 0$, если ген полностью рецессивен, $h = 1$, если ген приводит к гибели в гомозиготном и гетерозиготном состоянии с одинаковой частотой); F -коэффициент инбридинга.

Второе допущение предполагает независимое действие генетических и средовых причин, приводящих к гибели. При этом условии доля выживших зигот оценивается следующим образом:

$$S = \prod_{i,j} (1 - x_i) [1 - q_j F s_j - q_j^2 (1 - F) s_j - 2q_j (1 - q_j) (1 - F) s_j h_j] \quad (6.15)$$

Здесь X_j - вероятность гибели в результате влияния какого-либо фактора среды. Произведение включает все x_i и q_s (частоты вредных мутаций). Предполагается, что число этих мутаций и число факторов среды x_i велико, а отдельные значения вероятностей малы. Поэтому это выражение можно аппроксимировать следующим образом:

$$S = 1 - \sum x - \sum F q s - (1 - F) \sum q^2 s - 2(1 - F) \sum q (1 - q) s h.$$

Это в свою очередь аппроксимируется как

$$S = e^{-(A+BF)} \text{ или } -\ln S = A + BF, \quad (6.16) \text{ где}$$

$$A = \sum x + \sum q^2 s + 2 \sum q (1 - q) s h,$$

$$B = \sum q s - \sum q^2 s - 2 \sum q (1 - q) s h.$$

Суммирование производится по всем факторам среды и соответственно по всем локусам с мутантными аллелями.

В случайно скрещивающейся популяции ($F = 0$) выявляемый генетический груз вместе со средовым грузом равен A . Величина B , с другой стороны, измеряет скрытый генетический груз, который проявляется только в случае полной гомозиготности ($F = 1$). Общий генетический груз равен $\sum q s$, что соответствует сумме B и генетического компонента A и, следовательно, является промежуточной величиной между B и $B + A$.

B и A можно оценить, используя взвешенные коэффициенты регрессии $\ln s$ (s – доля выживающих особей) на F . Учитывая низкую степень инбридинга, наблюдающуюся обычно в популяциях человека, и низкую смертность в потомстве родителей, не связанных кровным родством, в качестве удовлетворительной аппроксимации используется следующая упрощенная формула:

$$S = 1 - A - B F \quad (6.17)$$

Таблица 6.19. Число мертворождений и смертность новорожденных в кровнородственных и некровнородственных браках во Франции [1827]				
	Браки двоюродных сибсов	Браки 1 1/2 сибсов	Браки троюродных сибсов	Некровнородственные браки F = 0
Область Морбиан				
Мертворождения и неонатальная смертность	51/461	3/78	23/309	72/1628
Смертность в раннем детстве	(0,111)	(0,038)	(0,076)	(0,044)
	64/410	17/75	32/286	138/1556
	(0,156)	(0,227)	(0,112)	(0,089)
Область Луар и Шер				
Мертворождения и неонатальная смертность	18/282	6/105	11/240	36/1117
Смертность в раннем детстве	(0,064)	(0,057)	(0,046)	(0,032)
	32/264	1/99	17/229	60/1081
	(0,121)	(0,010)	(0,074)	(0,056)

Вычисления производятся следующим образом:

$S_1 = 1 - A, S_2 = 1 - FB, S_1 - S_2 = BF;$

$A = 1 - S_1; B = \frac{S_1 - S_2}{F},$

где S_1 - число выживающих потомков некровнородственных браков, а S_2 - число выживающих потомков в кровнородственных браках. Число летальных эквивалентов определяется как разность между числом мертворожденных и умерших до достижения половой зрелости детей от кровнородственных и некровнородственных браков.

Пример. В работе Мёллера, Кроу и Мортонa [1827] для предварительной оценки величин A и B использованы некоторые данные по населению Франции (табл. 6.19). Вычисленная для мертворождений и гибели в детстве и юности (до достижения репродуктивного возраста) оценка B находилась в интервале между 1,5 и 2,5; величина $A + B$ была немногим выше. Отношение B/A , которое будет играть важную роль в последующем изложении, варьирует от 15,06 до 24,41. Это означает, что в среднем гамета несет такое число неблагоприятных генов, которое при распределении их между отдельными индивидами и переходе в гомозиготное состояние приведет к гибели до достижения репродуктивного возраста 1,5-2,5 человека. Общий генетический груз составляет 1,5-2,5 летального эквивалента на гамету; 3-5 летальных эквивалентов на зиготу. В этом расчете не учитывались спонтанные аборт и гибель во взрослом возрасте (например, в течение репродуктивного периода). Следовательно, при таком подходе оценка генетического груза получается заниженной. Вероятно, каждый человек гетерозиготен по нескольким мутациям, которые в гомозиготном состоянии оказывают неблагоприятное действие. Авторы осторожно замечают, что разница между кровнородственными и некровнородственными браками может отчасти объясняться причинами небиологического характера. Путем прямого опроса определялся только исход беременности в кровнородственных браках; возможно, что в повышенную смертность детей от кровнородственных браков вносят вклад также социальноэкономические различия между городским и сельским населением. Позднее мы увидим, что это предостережение вполне оправдывается.

Оценка выявляемого генетического груза. Следующим пунктом в рассуждениях авторов был вывод, что те же самые гены могут оказывать неблагоприятное воздействие даже в гетерозиготном состоянии, т.е. что их «доминантность» h больше 0. Согласно формуле 6.15, вероятность элиминации данного мутанта в условиях естественной системы скрещивания равна приблизительно $z \times s$, где $z = F + q + h$ (обозначения те же, что и выше). Можно показать, что число выявляемых летальных эквивалентов равно произведению общего числа летальных эквивалентов на гармоническую среднюю величин z для отдельных мутантов. Сведения, необходимые для определения h у человека отсутствовали, поэтому были использованы данные, полученные на дрозофиле. На их основе для 16 аутосомных леталей рассчитаны значения h со средней, равной 0,04. Учитывая, что мутации с более вредным эффектом в природных популяциях должны встречаться реже, и предполагая, что в основном вредное влияние производится гетерозиготами (из-за их более высокой частоты), оценка гармонической средней z для всех вредных генов составляет 0,02.

При общем числе летальных эквивалентов на гамету, равном 1,5-2,5, это соответствует 3-5% выявляемой летальности на гамету или 6-10% на зиготу.

Оценка общей скорости мутирования для неблагоприятных мутаций. Как уже отмечалось, Холдейн (1935) [1472] постулировал существование генетического равновесия между отбором и мутационным процессом. В течение достаточно долгого времени в каждом поколении число вновь возникающих мутаций должно равняться числу вредных аллелей, теряющихся из популяции вследствие их летальности. Отсюда скорость мутирования была также оценена как 0,03-0,05 на гамету на поколение. Авторы предположили, что от 1/2 до 2/3 реального генетического груза невозможно обнаружить путем анализа мертворождений и младенческой смертности (например, невозможно выявить гибель ранних эмбрионов). Принимая это во внимание, была получена оценка общей скорости мутирования, равная 0,06-0,15 на гамету [1827]. Эта величина согласуется с оценкой, приводимой Мёллером в его работе «Наш груз мутаций» [1835]. Однако читатель не должен забывать, что эта оценка основывается на двух допущениях:

1) более высокая частота мертворождений и неонатальная смертность в потомстве кровнородственных браков по сравнению с некровнородственными (проанализированная в упоминавшейся выше работе и ведущая к высокому значению B/A) действительно являются биологическим следствием кровного родства;

2) летальные и вредные гены и в гетерозиготном состоянии уменьшают приспособленность их носителей.

Критика выводов, полученных на основе теории генетического груза, касается в основном этих двух предположений.

Влияние концепции генетического груза на развитие популяционной генетики человека. Каждый человек гетерозиготен по нескольким генам, которые не только могут привести к генетически детерминированной гибели (особенно в потомстве кровнородственных браков), но неблагоприятны даже в гетерозиготном состоянии. В популяции с высокой скоростью происходит постоянное возникновение новых мутаций, имеющих вредное действие. Можно сказать, что каждый человек менее здоров, чем в том случае, если бы он был свободен от этих мутаций.

Концепция генетического груза оказала большое влияние на теоретическое мышление и планирование исследований в области популяционной генетики человека. Отчасти это произошло благодаря присущей данной теории привлекательности, поскольку исследования в этом направлении обещали дать общее представление о проблемах, определяющих будущее нашего вида. Вероятно, большую роль в успехе концепции сыграла также научная репутация разработавшей ее группы ученых: лауреата Нобелевской премии Мёллера, оставившего изучение дрозофилы ради того, чтобы внести свой вклад в спасение человечества; известного популяционного генетика Кроу, чье участие гарантировало надежность подхода, и Мортон, выдающегося молодого ученого с блестящим будущим.

Дискуссии и противоречия по поводу концепции генетического груза. Концепция генетического груза широко обсуждалась популяционными генетиками [1809; 1863]. С одной стороны, было установлено, что сравнение потомства кровнородственных и некровнородственных браков может внести вклад в решение вопроса о том, что вносит больший вклад в генетический груз человека - неблагоприятные мутации («мутационный груз») или сбалансированный полиморфизм, обусловленный преимуществом гетерозигот («сегрегационный груз») [1745-1747]. С другой стороны, показано, что в некоторых случаях применение концепции генетического груза приводит к абсурдным выводам [1809]. В настоящее время многие генетики разделяют мнение о том, что пользоваться этой концепцией следует с осторожностью. Современная, несколько более реалистическая версия изложена в работе [1748].

6.3.2.2. Практическое применение теории

Предпринималось много попыток оценить реальный генетический груз в популяциях человека. Ранние работы представляли собой практическое приложение теории генетического груза. Однако более поздние исследования основаны на непосредственном использовании медицинских данных.

Таблица 6.20. Результаты нескольких исследований влияния инбридинга на смертность в младенчестве, детстве и юношеском возрасте в населении Японии					
Автор, регион	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>B/A</i>	Размер инбредной выборки	Метод определения
Ватанабе, префектура Фукусима	0,0881	0,5157	5,8	4 594	Учитывается смертность среди детей школьного возраста
Танака, Кисимото, Сидзуока	0,1253	0,7191	5,7	2205	Учитывается смертность среди детей школьного возраста
Шелл и др., префектура Нагасаки (Куросима)	0,0927	1,4074	15,2	223	Данные приблизительно за 15 лет, учитывается смертность до 20-летнего возраста
Шелл и Нилл, префектура Хиросима, префектура Нагасаки	0,0875	0,5317	6,1	1697	Регистрация беременности на 5-м месяце; учитывается смертность до 8-летнего возраста
Шелл и Нил, Куре	0,0929	0,0405	0,4	564	Регистрация беременности на 5-м месяце; учитывается смертность до 15-летнего возраста
Янасе, префектура Фукуока (3 локальности)	0,0962	1,2535	13,0	277	Посемейное обследование, учитывается смертность до 6 лет
	0,1292	0,3308	2,6	304	
	0,0916	0,9884	10,8	301	
Фудзика и др., префектура Ямагути (3 локальности)					Регистрационные книги и посемейный опрос; смертность до среднего детского возраста
	0,1222	0,3287	2,7	497	
	0,1985	-0,8107	-4,1	234	
	0,1936	-0,9608	-5,0	79	
Нагано, префектура Фукуока (гор. Фукуока)	0,0873	0,6765	7,8	5953	Учитывается смертность до 12-летнего возраста
Шелл и др., префектура Нагасаки (Хирадо)	0,1157	0,7703	6,7	6626	Посемейное обследование; смертность от неслучайных причин в основном до 20-летнего возраста
Фрейре-Майо и др., японцы, иммигрировавшие в Бауру, шт. Сан-Паулу, Бразилия	0,1378	0,6995	5,1	105	Посемейное обследование, смертность
Среднее	0,1036	0,6700	6,7	—	—

Эти работы будут рассмотрены в разд. 6.3.2.4.

Попытки оценить генетический груз путем анализа кровнородственных браков. Влияние кровного родства родителей на частоту мертворождений и детскую смертность исследовалось во многих работах. Наиболее полные и наиболее надежные во многих отношениях данные относятся к населению Японии [198; 1839; 1840; 1876].

В таблице 6.20 обобщаются результаты этих работ до 1972 г. Размеры контрольных инбредных выборок не приводятся; как правило, они превышают размеры инбредных выборок. Отношение B/A изменяется от +15,2 до — 5. Отрицательное значение B/A означает, что детская смертность в кровнородственных браках была ниже, чем в некровнородственных. Формально это означает наличие «отрицательного генетического груза», что с биологической точки зрения бессмысленно.

В большинстве работ, исследующих влияние кровного родства на генетический груз, получены оценки B/A , варьирующие между 5,7 и 7,8; простое усреднение дает отношение B/A , равное 6,7. Этот результат, вероятно, завышен благодаря более низкому социально-экономическому статусу

Таблица 6.21. Влияние инбридинга и смертность [1763]			
Литературный источник	Исследованная популяция		В/А (сравнение браков двоюродных сибсов с неродственными браками)
	Раса	Регион	
Нил (1963) ¹⁾	Негры	Бразилия	6,9
Нил (1963)"	«	«	7,6
Фрейре-Майо (1963)	«	«	9
Фрейре-Майо и Азеведо (1971)	«	«	3
Нил (1963)	«	Танганьика	-1,0
Нил (1963)	Белые	Бразилия	-0,0
Нил (1963)	«	«	-0,6
Фрейре-Майо (1963)	«	«	1,0
Фрейре-Майо и Азеведо (1971)	«	«	3
Фрейре-Майо и др. (1963)	Смешанная	«	16,5
Нил (1963)	Белые	США	7,2
Нил (1963)	«	Чикаго, Франция	6,6
Нил (1963)	«	Морбиан, Франция	20,2
Нил (1963)	«	Луар и Шер, Франция	13,1
Нил (1963)	«	Сев. Швеция	-3,0
Кумар и др. (1967)		Керала	20
Роберте (1969)	Индийцы	«	14,8
¹⁾ Работа Нила суммирует данные многих авторов. Робертс модифицировал результаты Кумара для учета других степеней кровного родства, кроме двоюродных сибсов.			

пар, вступивших в кровнородственный брак. Несмотря на то что в Японии кровнородственные браки социально намного больше распространены, чем в других странах, особенно с христианской религией, социально-экономические отклонения наблюдаются и там, причем эти отклонения имеют различные направления.

В исследованиях, проведенных в Южной Америке, Франции, США, Индии и Африке, этот эффект проявляется еще ярче (табл. 6.21). Для удобства сравнения оценка отношения В/А здесь ограничена браками между двоюродными братьями и сестрами, поэтому эти данные нельзя непосредственно сравнивать с данными табл. 6.20, составленной для населения Японии. Однако изменчивость здесь, вероятно, еще выше, чем между данными, полученными в работах японских авторов. Это неудивительно, поскольку в Европе и в США кровнородственные браки очень редки (табл. 6.18). В странах с сильными христианскими традициями общественное мнение выступает против таких браков и, как было показано выше, пары, вступившие в кровнородственный брак, отличаются от обычного населения в социальном и даже в психологическом отношении.

Один из способов устранения, по крайней мере частично, этих отклонений - использование в качестве контроля детей братьев и сестер лиц, вступивших в кровнородственный брак. В работе, в которой таким образом изучалось население Вогезских гор (Франция) [1768], было проведено сравнение 189 кровнородственных и 646 «контрольных» браков. Разница в уровне перинатальной смертности оказалась невелика, статистически недостоверна для браков двоюродных сибсов и пренебрежимо мала для браков, где между супругами была более отдаленная степень родства (табл. 6.22). Разница в числе стерильных браков между кровнородственными и некровнородственными браками была статистически значима. Этот результат, возможно (но не обязательно), указы-

Таблица 6.22. Эффект инбридинга [103]

	Браки двоюродных сибсов		Браки троюродных сибсов		Все браки	
	Кровнородственные браки	Контроль	Кровнородственные браки	Контроль	Кровнородственные браки	Контроль
Среднее число детей на семью	4,2	5,1	4,8	4,8	4,5	4,8
Процент стерильных браков	—	—	—	—	6,9	4,6
Перинатальная смертность (%)	11,1	9,0	8,0	7,9	8,9	8,5

вает на более высокую внутриутробную смертность детей от кровнородственных браков. Кроме того, необходимо учитывать, что в отношении B/A величина A отражает не только генетическую компоненту смертности в случайно скрещивающейся популяции, но также и все средовые компоненты ¹⁾.

Вообще говоря, данные таблиц 6.20 и 6.21 довольно неутешительны. Из-за того что отношение B/A варьирует в широких пределах, мы даже не можем с уверенностью сказать, что инбридинг как таковой повышает риск мертворождения и детскую смертность, хотя такое утверждение и представляется вероятным. Однако один вывод очевиден. Высокие значения отношения B/A , полученные для данных, проанализированных Мортоном с соавт. [1827], не подтвердились ни в одной из других работ. Вероятно, они завышены в результате методических отклонений или из-за социально-экономических различий между кровнородственными и некровнородственными браками.

Рецессивные болезни и врожденные уродства в потомстве от кровнородственных браков. Наше обсуждение было пока совершенно абстрактным. Если дети от кровнородственных браков чаще рождаются мертвыми или гибнут в раннем возрасте, возникает вопрос: почему это происходит? Страдают ли они от известных рецессивных заболеваний или от мультифакториальных пороговых болезней, таких, как врожденные аномалии.

Наиболее полные данные по этому вопросу были получены японскими исследователями (табл. 6.23 [1876]). В этой таблице приведены частоты грубых врожденных аномалий, полученные в одной из работ японских авторов. Между кровнородственными и некровнородственными браками наблюдается незначительное достоверное различие. В той же большой когорте новорожденных Японии суммарная частота смертных случаев и грубых врожденных аномалий составила 4,3% у контрольных детей и 6,2% у детей от браков между двоюродными сибсами. Большинство аномалий в этой работе являлись уродствами (иногда очень сложной природы), рецессивное наследование которых доказано не было. Даже из наиболее подробного обзора [198] нельзя установить приблизительное число идентифицируемых заболеваний с точно установленным рецессивным типом наследования. Это означает, что в результате огромной работы по изучению влияния кровного родства не было получено данных, позволяющих приписать хотя бы некоторые из эффектов инбридинга определенной группе генов, которые в рецессивном состоянии приводят к возникновению болезней.

Другие признаки, проявляющие эффект инбридинга: умственные способности. В нескольких работах изучалось влияние кровного родства на антропологические

¹⁾ Кроме этих отклонений отношение B/A зависит также от особенностей статистической оценки [1763].

Таблица 6.23. Зависимость числа детей с тяжелыми врожденными аномалиями от места жительства и степени кровного родства родителей [1876]						
Город	См. сноску"	Браки двоюродных сибсов	Браки двоюродный дядя х племянница	Браки троюродных сибсов	Некровнородственные браки	Сумма
Хиросима	<i>n</i>	936	313	384	26012	27 645
	<i>m</i>	17	2	4	293	316
	<i>P</i>	0,0182	0,0064	0,014	0,0113	0,01114
Куре	<i>n</i>	318	113	140	7544	8115
	<i>m</i>	4	2	1	58	565
	<i>P</i>	0,0126	0,0177	0,0071	0,0077	0,0080
Нагасаки	<i>n</i>	1592	412	637	30240	32 881
	<i>m</i>	27	4	8	300	339
	<i>P</i>	0,0170	0,0097	0,0126	0,0099	0,0103
Всего	<i>n</i>	2846	838	1161	63 796	68 641
	<i>m</i>	48	8	13	651	720
	<i>P</i>	0,0169	0,0095	0,0112	0,0102	0,0105
			Анализ ²⁾			
			χ^2	DF	<i>P</i>	
Города			7,269	2	0,02 < <i>P</i> < 0,05	
Кровнородственные—некровнородст венные браки			11,775	3	0,001 < <i>P</i> < 0,01	
Взаимодействие			2,535	6	0,75 < <i>P</i> < 0,90	
1) <i>n</i> число детей; <i>m</i> - число детей с тяжелыми врожденными аномалиями.						
2) Использован метод Роя и Кастенбаума (1956); см. Шелл (1958). Между частотами основных врожденных нарушений в кровнородственных и некровнородственных браках наблюдается значимое различие.						

признаки, стоматологические характеристики, кровяное давление, координацию, остроту зрения и слуха, умственное развитие, школьную успеваемость [1840; 1879; 198; 1765]. В целом значение каждого признака немного уменьшалось с увеличением инбридинга. Особенно интересны результаты, касающиеся умственного развития и школьной успеваемости, которые только частично обусловлены социально-экономическими различиями. После исключения путем соответствующей статистической обработки социально-экономических факторов было показано следующее: при увеличении *F* на 10% коэффициент интеллектуального развития IQ уменьшался на 6 единиц по вербальным субтестам и субтестам действия при использовании шкалы Векслера для детей (WISC). В такой же степени снижалась и успеваемость в школе [198].

Закключение о том, что инбридинг понижает средний уровень познавательных способностей, подтверждается исследованием выборки из 3203 школьников арабов в Израиле. В этой популяции процент браков между двоюродными сибсами составлял около 34%; приблизительно 4% браков были между дважды двоюродными сибсами. Тщательно проанализированные социально-экономические условия оказались практически идентичными в инбредной группе и неинбредном контроле. Средние результаты трех различных тестов по проверке умственных способностей оказались значительно ниже у детей от браков двоюродных сибсов (и особенно дважды двоюродных сибсов) по сравнению с

контрольной группой. Те же различия наблюдались по средней школьной успеваемости по четырем предметам [1723].

Общая оценка потери гетерозигот, обусловленная кровным родством родителей. Данные по влиянию кровного родства на умственное развитие или антропометрические признаки интересны со многих точек зрения. Однако они не увеличивают наших знаний о влиянии кровного родства родителей на гибель зигот до достижения репродуктивного возраста, а это единственный параметр, важный для определения летального эквивалента. В табл. 6.20 и 6.21 приведены сведения только о перинатальной смертности. Эти данные на включают гибель эмбрионов до седьмого месяца беременности, а также детей после достижения 8-летнего возраста. Последней группой можно пренебречь, так как в большинстве развитых стран смертность в ней очень низка. Относительно спонтанных абортс имеются только отрывочные сведения. Соответствующая оценка Шелла и Нила (1972) [1879] приведена на рис. 6.43.

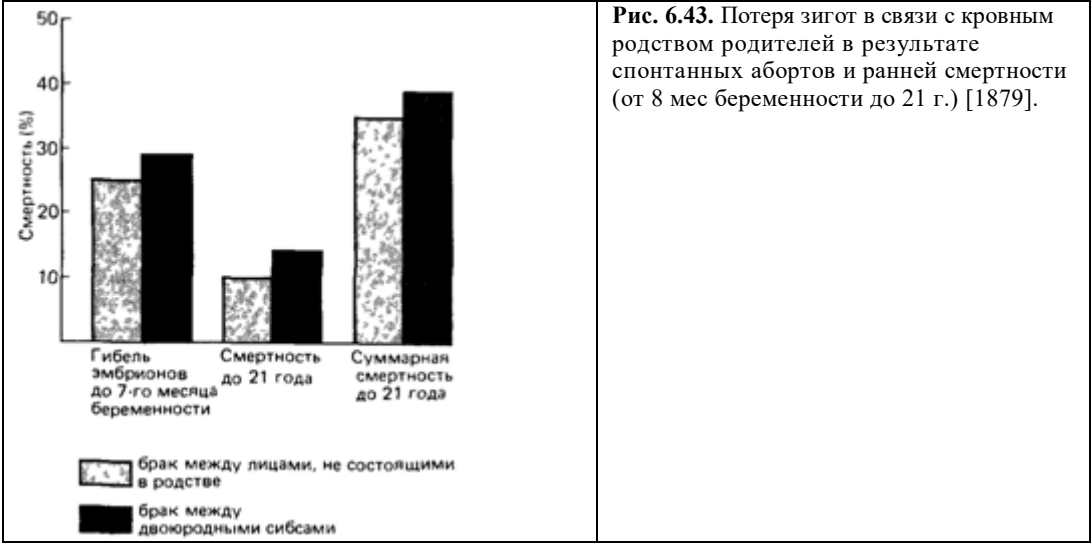


Рис. 6.43. Потеря зигот в связи с кровным родством родителей в результате спонтанных абортов и ранней смертности (от 8 мес беременности до 21 г.) [1879].

6.3.2.3. Критическая оценка

Теоретическая интерпретация. Все эти результаты, по предложению Мортонa [1827], можно интерпретировать в терминах летальных эквивалентов, число которых надо определить. Однако тот факт, что значения B/A оказываются в разных работах различными (табл. 6.20 и 6.21), вызывает скептическое отношение к подобной интерпретации. Используемая при анализе этих данных генетическая модель предполагает независимость эффектов летальных генов. Конечно, данное предположение является излишним упрощением и потому приводит к концептуальным затруднениям. Последних можно избежать, используя другие генетические модели: например, можно предположить, что существует некий порог допустимого числа гомозиготных генов, совместимого с выживанием особи. Однако даже введение такой поправки не устраняет главной трудности, связанной с интерпретацией результатов. Она состоит в отсутствии специфичности фенотипических различий между потомством кровнородственных и некровно-родственных браков.

Медицинские данные. Рассмотрим наиболее часто применяемые характеристики - частоты мертворождений и неонатальную смертность. Медицинские данные свидетельствуют о том, что оба этих параметра иногда определяются генетическими факторами. Однако в большинстве случаев наследственные факторы выявить невозможно. Причиной гибели плода может быть и преждевременная отслойка плаценты, и удушение плода пуповиной, и положение плода, вызывающее неправильный ход родов, и длительные роды, приводящие к асфиксии плода и т. д. Смерть в младенчестве или раннем детстве может быть вызвана инфекционной болезнью, недоеданием и многими другими причинами. В одних случаях наличие генетического компонента вероятно, в других - возможно, а в некоторых случаях он отсутствует. Кроме того, наблюдение за ходом беременности, улучшение акушерской помощи, например часто применяемое кесарево сечение, и улучшение медицин-

ского обслуживания новорожденных привели к снижению перинатальной смертности в большинстве развитых стран до 1-3% и менее. Эта частота составляет менее 10% перинатальной смертности, наблюдавшейся в 1900*г.; она намного ниже, чем в выборках сельского населения Франции, описанных в табл. 6.19. Можно возразить, что многие дети несут мутации, которые в более примитивных условиях были бы летальными. Однако после критического перинатального периода такие дети, вероятно, не страдают никакими нарушениями.

Один довольно хорошо изученный пример - пилорический стеноз, который чаще встречается у мальчиков. Риск заболевания составляет приблизительно 2-6% для родственников первой степени пробандов мужского пола и 10-20% для родственников первой степени пробандов женского пола. Все данные указывают на полигенное наследование этой болезни в сочетании с пороговым эффектом (разд. 3.6.2). Следовательно, с увеличением кровного родства родителей ожидается некоторое повышение риска заболевания. У больных пилорическим стенозом гипертрофирована пилорическая мышца, что препятствует выводу содержимого желудка в двенадцатиперстную кишку. В прежние времена больные часто умирали в младенчестве. В настоящее время путем хирургического вмешательства нормальное опорожнение желудка восстанавливается. Операция проста, устраняет все неблагоприятные симптомы, после нее дети нормально развиваются. Есть данные, свидетельствующие о том, что у людей, страдавших этой болезнью, хорошо развита мускулатура и они добиваются выдающихся успехов в спорте ¹.

Если эффекты других летальных эквивалентов, приводящих к ранней гибели, в чем-то сходны с этим примером, возникает вопрос: стоит ли обращать на них внимание? Давайте благополучно сосуществовать с нашими летальными эквивалентами. Однако другие причины ранней смертности не столь незначительны. Например, в исследовании, проведенном в Японии, получены некоторые данные, указывающие на то, что одна из причин повышенной смертности детей от кровнородственных браков, заключается в усилении чувствительности к инфекционным заболеваниям [198]. Причины мертворождений и неонатальной и детской смертности подробно изложены в учебниках по акушерству и педиатрии. Они могут быть генетическими; природа многих причин в настоящее время еще не известна. Несомненно, что будущие исследования в области медицинской генетики помогут распознать генетический характер некоторых из них. К сожалению, пока широкомасштабное изучение кровнородственных браков внесло небольшой вклад в идентификацию генетических причин неонатальной смертности.

6.3.2.4. Более прямые подходы к оценке числа рецессивных генов на индивид

В последнее время используются более прямые подходы к оценке среднего числа рецессивных генов на индивид. Эти исследования ограничиваются генами, приводящими в гомозиготном состоянии к появлению аномального фенотипа. Это означает, что рассматривается в основном та часть генетического груза, которая относительно точно определена с генетической и медицинской точек зрения. Одним из подходов является изучение детей от инцестных браков, т. е. браков между очень близкими родственниками. В таких браках коэффициент инбридинга наиболее высок (в браках отец—дочь и брат—сестра $F = 1/4$). Если люди действительно гетерозиготны по большому количеству неблагоприятных генов, в потомстве инцестных браков должна наблюдаться высокая частота гомозигот по этим генам и, следовательно, высокая частота детей с тяжелыми наследственными аномалиями.

Исследование детей от инцестных браков [1713; 1734; 1867]. Опубликовано четыре работы, в которых исследуются дети от браков между родственниками ближайшей степени родства (табл. 6.24). Во всех этих работах показано, что значительная часть

¹ С. О. Картер, личное сообщение.

Таблица 6.24. Дети от браков между родственниками первой степени родства (браки отец - дочь и брат—сестра)				
Авторы	Страна	Число детей	Число детей с серьезными аномалиями	Примечания
Адамс и Нил (1967) [1713]	США	18	6	В контрольной выборке того же размера, которая выбиралась с учетом возраста, расы, веса, роста и социального статуса, был найден только один ребенок с аномалиями
Картер (1967) [1734]	Великобритания	13	8	
Симанова (1971) [1867]	ЧССР	161 (138 выживших)	60 из 138 выживших; 40 с тяжелой умственной отсталостью	В контрольной выборке из 95 детей обнаружено только 5 с тяжелыми пороками и ни одного с умственной отсталостью
Бэд и Мак-Гиливри (1982) [1722]	Канада	21	9	

детей от таких браков страдает серьезными нарушениями. Следовательно, число неблагоприятных рецессивных мутаций, которые в гетерозиготном состоянии несут родители, действительно очень велико. У детей от таких браков найдены болезни, характеризующиеся аутосомно-рецессивным наследованием (болезнь Санфилиппо, мукополисахаридоз, гомоцистинурия, кистозный фиброз или глухонмота).

Если предположить, что все дети в этих исследованиях, страдающие серьезными нарушениями, гомозиготны по рецессивным генам, можно определить число этих генов [1856]. В трех выборках, приведенных в табл. 6.24, 85 из 190 выживших детей (44%) были поражены болезнью, которая, возможно, вызывается рецессивным геном в гомозиготном состоянии. Если мужчина гетерозиготен по одному рецессивному гену (Аа), вероятность того, что его дочь или сестра также гетерозиготна по этому гену, составляет $1/2$; тогда вероятность того, что их ребенок будет по нему гомозиготен, равна $1/2 \times 1/4 = 1/8$. Если этот мужчина гетерозиготен по n рецессивным генам, вероятность того, что его ребенок от брака с дочерью или сестрой не будет по ним гомозиготным (т. е. не будет больным), равна $(7/8)^n$. Это позволяет определить n - число генов, по которому индивид гетерозиготен.

Согласно данным таблицы 6.24, $(7/8)^n = 1 - 0,44 = 0,56$; $7/8^4 = 0,586$; $7/8^5 = 0,513$. Следовательно, число рецессивных генов на индивид равно приблизительно 4-5, что хорошо соответствует оценке, полученной Мёллером.

Однако большая часть пораженных детей имела неопределенные аномалии, такие, как, например, «неосложненная идиотия». Кроме того, тщательное исследование показало, что многие из вступающих в инцестный брак страдали умственной отсталостью. Поэтому очень трудно отделить вклад аутосомных рецессивных аномалий, выявленных путем анализа браков между очень близкими родственниками, с одной стороны, и вклад аномальных по другим параметрам родительских генотипов и неблагоприятных условий внешней среды - с другой. Например, сколько детей страдает алкогольным синдромом плода? Все же предположение о том, что значительная часть этих аномалий обусловлена гомозиготностью по вредным рецессивным генам, представляется вероятным. Этот вывод означает, что в популяции родителей многие индивиды гетерозиготны по вредным генам.

Кровное родство родителей детей с тяжелой умственной отсталостью. Если гетерози-

готы по генам, ведущим к тяжелой умственной отсталости, встречаются относительно часто, гомозиготы по таким генам должны быть распространены среди умственно отсталых людей; в этой группе ожидается также увеличение кровного родства родителей. Кроме того, сибсы таких больных должны принадлежать к двум ясно различимым классам: нормальным и умственно отсталым. Это предположение подтверждается некоторыми недавними исследованиями. При изучении 904 семей умственно отсталых лиц из Израиля [1743] доля гомозигот составила 18% у умственно отсталых индивидов, родители которых не были родственниками, и около 75% у умственно отсталых индивидов, родители которых были двоюродными сибсами; сибсы пробандов в обоих случаях оказались здоровыми. У большинства пробандов метаболические заболевания отсутствовали. В другой работе [1828], где изучались 703 пробанда с Гавайских островов и их семьи, показано некоторое увеличение кровного родства родителей в группе, названной авторами «биологической», в которую входили в основном лица, страдающие тяжелой формой умственной отсталости. Эти данные также свидетельствуют о том, что в некоторых случаях наблюдается простое рецессивное наследование данного признака.

Альтернативный подход к оценке среднего числа рецессивных генов у человека. Расширение программ скрининга наследственных метаболических заболеваний позволило определить частоту гетерозигот по этим болезням ($2pq$) непосредственно из частоты гомозигот (q^2). В работе Харриса (1975) [93] эта оценка получена путем анализа данных скрининга населения Массачусетса [1806]. Сведения, приведенные в табл. 6.25 позволяют сделать вывод, что в среднем 11% родительской популяции могут быть гетерозиготными по одному из 14 скринируемых в этой популяции заболеваний. Представляется заманчивым обобщить такой вывод.

Предположим, что в данной популяции присутствует еще 100 генов, контролирующих рецессивные заболевания. Пусть гомозиготы по каждому из них встречаются с частотой 1:1 000 000 (частота гена $q = 1/1000$, частота гетерозигот $2pq = 1/500$). Если пренебречь множественными гетерозиготами, эти гены прибавят к числу гетерозигот еще 20%, что дает суммарную частоту гетерозигот по любому из 114 ($14 + 100$) рецессивных генов в популяции, равную $11 + 20 = 31\%$. Поскольку существует почти 1300 рецессивных заболеваний, а частота некоторых из них выше 1 на миллион, 31%- это минимальная оценка гетерозиготности. Как уже упоминалось, вероятно, существует несколько рецессивных генов, вызывающих тяжелую неспецифическую умственную отсталость. Они могут даже быть довольно распространенными. Точную количественную оценку частоты этих генов существующими в настоящее время методами произвести невозможно.

Эффекты кровного родства и уровень генетического анализа. Чем ближе находится объект анализа к действию гена, тем лучшие результаты дает популяционно-генетическое исследование. Одна из причин эффективности изучения действия естественного отбора на варианты гемоглобина - их исследование непосредственно на уровне действия гена. Это позволило провести точный анализ механизма отбора.

До сих пор возможную генетическую отягощенность популяции летальными или вредными мутациями выявляли путем сравнения на фенотипическом уровне потомства кровнородственных и некровнородственных браков с помощью биометрических методов. При этом удалось установить, что генетическая изменчивость присутствует, но простые способы наследования или конкретные гены не выявлены. Таким образом собранные данные демонстрировали влияние кровного родства. Однако интерпретация полученных результатов в терминах генетических механизмов очень сложна и во многих случаях противоречива. Для преодоления этих трудностей применялись различные сложные статистические методы. В результате было показано, что влияние социально-экономических факторов накладывается на биологические эффекты, поэтому конкретные заключения о генетичес-

Таблица 6.25. Частота некоторых метаболических нарушений у новорожденных Массачусетса [1806]				
Аномалия	Общее число обследованных новорожденных	Число новорожденных с нарушениями	Частота	Оценка частоты гетерозигот (на 1000)
Фенилкетонурия	1012017	66	1: 15000	16
Цистинурия	350176	23	1: 15 000	16
Болезнь Хартнупа	350176	22	1: 16000	16
Гистидинемия	350176	20	1: 17 500	15
Аргининсукцинацидемия	350176	5	1: 70000	8
Галактоземия	588 827	5	1:118000	6
Цистатионинемия	350176	3	1:117000	6
Болезнь «кленового сиропа»	872 660	5	1:175 000	5
Гомоцистинурия	480271	3	1:160000	5
Гиперглицинемия (без кетоацидоза)	350176	2	1:175 000	5
Пропионацидемия (гиперглицинемия с кетоацидозом)	350176	1	<1:350000	3
Гиперлизинемия	350176	1	<1:350000	3
Рахит (как при гиповитаминозе D, с гипераминоацидурией)	350176	1	<1:350 000	3
Синдром Фанкони	350176	1	<1:350 000	3
				110= 11%

ких механизмах сделать трудно, если вообще возможно. В гл 8 мы убедимся в том, что этот вывод справедлив и для многих аспектов генетики поведения человека. Анализ на биометрически-фенотипическом уровне приводит к неоднозначным результатам.

Исследование частоты гетерозигот по хорошо идентифицируемым рецессивным заболеваниям, таким, как метаболические нарушения, включенные в программы скрининга населения, должны давать более удовлетворительные результаты. В случае таких болезней известен определяющий их ген, а во многих случаях изучено и действие соответствующего фермента. Поэтому определение средней гетерозиготности на индивид может дать довольно ясные результаты.

В исследованиях инцестных браков идентификация многих из наблюдаемых фенотипов затруднена, однако для некоторых из них предполагается рецессивное моногенное наследование. Изучение потомства кровнородственных браков вновь демонстрирует, что глобальный всеохватывающий подход, при котором фенотипы трактуются в широком смысле, приводит к худшим результатам, чем анализ специфических четко идентифицируемых признаков или заболеваний.

Несмотря на упомянутые трудности, исследование кровного родства вызывает ряд конкретных вопросов. Каково влияние материнского (или отцовского) инбридинга на частоту нерасхождения и на нарушение числа хромосом?

Действие длительного инбридинга. Какое влияние на частоту рецессивных генов в популяции окажет длительный инбридинг, наблюдаемый, например, в популяциях Южной Индии, где брак между дядей и племянницей ($F = 1/8$) является социально вполне приемлемым. Каков уровень постоянно идущей при этом элиминации таких генов? Скрытые неблагоприятные гены выявляются инбридингом только в том случае, когда предки пары, вступившей в кровнородственный брак, в течение многих поколений скрещивались случайно. Длительный инбридинг «очистил» бы генофонд популяции от вредных мутаций уже много лет назад. Если предположить, что общая скорость мутирования постоянна, отбор против неблагоприятных генов может к ней адаптироваться, однако частоты генов в

такой популяции в состоянии равновесия будут гораздо ниже, чем в популяции, в которой в течение длительного времени происходило случайное скрещивание. Следовательно, в популяции, в которой долгое время осуществлялся инбридинг, сравнение потомства кровнородственных и некровнородственных браков должно дать меньшую величину B/A , чем в популяции, для которой было характерно более или менее случайное скрещивание.

Это предположение получило подтверждение в недавних исследованиях внутриутробного развития, частоты врожденных уродств и репродуктивных потерь (аборт, мертворождения, смерть в течение первого года жизни) среди потомства более чем 20000 женщин Южной Индии [1854; 1855]. Как упоминалось выше, кровнородственные браки очень распространены в настоящее время и были распространены в прошлом среди дравидов Южной Индии. В выборке, в которой изучались репродуктивные потери, почти 47% женщин из сельской местности и 29% городских женщин вышли замуж за близкого родственника, в 80% случаев - за дядю со стороны матери ($F = 1/8$). Среди более чем 70000 беременностей наблюдалось четко выраженное различие между женщинами, живущими в сельской и городской местности: частота спонтанных аборт и гибели детей в первый год жизни у сельских женщин была намного выше. Между тем различие по частоте кровнородственных браков между выборками сельских и городских женщин было небольшим.

При изучении развития плода и врожденных уродств, которое проводилось в той же группе матерей, было проанализировано более 14 000 беременностей. При этом у детей от кровнородственных браков не обнаружено повышения частоты врожденных уродств по сравнению с контролем. Таким образом, тесное родство родителей не оказывало влияния на длительность беременности, вес и длину тела ребенка при рождении.

Все имеющиеся данные свидетельствуют о том, что длительный тесный инбридинг удаляет из генофонда неблагоприятные гены. Однако, учитывая трудности, касающиеся разделения биологических и социально-экономических факторов, даже к этому выводу, несмотря на его правдоподобность, следует относиться с осторожностью.

С теоретической точки зрения очень интересно сравнить две популяции, в одной из которых в течение долгого времени осуществлялся тесный инбридинг, а в другой - относительно случайное скрещивание. Важно только, чтобы они обитали в сходных условиях среды и имели близкие антропологические характеристики. Популяции, в которых происходил длительный тесный инбридинг, характерны, например, для некоторых областей Южной Индии, где поощряются браки между дядями и племянницами, а также между двоюродными сибсами. В других популяциях Южной Индии уровень инбридинга настолько ниже, что они могут служить в качестве контроля. Однако основной проблемой такого исследования является опять-таки выбор подходящего генетически детерминированного фенотипического признака. Вопросы кровного родства в генетическом консультировании будут обсуждаться в разд. 9.1.

6.3.3. Дифференциация субпопуляций: генетическое расстояние

Реальная структура скрещивания популяций человека. Обычное предположение о том, что в популяциях человека преобладает случайное скрещивание - это абстракция. Выбор брачного партнера вовсе не случаен. Он зависит от расстояния между местами рождения вступающих в брак, от ограничений, обусловленных религией, расовой, языковой и социальной принадлежностью и т.д. В прошлом неслучайные браки заключались гораздо чаще, чем сейчас. Особенно ярко выраженным был неслучайный выбор партнеров в течение тысяч поколений доисторического времени, когда наши предки жили как охотники и собиратели, объединяясь в маленькие группы. Изучение современных племен дает возможность получить представление о структуре популяций того времени.

Небольшие популяции, находящиеся в относительной изоляции друг от друга, постепенно станут различаться генетически - либо в результате давления отбора различной интенсивности, либо благодаря разным способам адаптации к одному и тому же селективному фактору, либо просто из-за случайной флуктуации генных частот (разд. 6 4). Конечная цель популяционной генетики - анализ причин таких популяционных различий. Однако в большинстве случаев эта цель оказывается недостижимой.

В отсутствие более определенной информации во многих случаях удобно начать с предположения, что генетическое сходство между популяциями обусловлено их общим происхож-

дением. Отсюда, чем более сходны две популяции, тем ближе они генетически. Это означает, что если популяции сходны, то они разделились недавно, если же их сходство не очень велико, можно сделать вывод, что с момента обособления прошло более длительное время. Следовательно, на основании генетического состава популяций, наблюдаемого в настоящее время, можно сделать заключение об истории этих популяций. В принципе этот метод лежит в основе любой классификации (например, расы) у людей. В разд. 6.2.1.7 рассмотрен хорошо известный пример такого рода: распространение аллеля HbF среди населения, принадлежащего южноазиатской языковой группе. Здесь мутация HbE достигла высокой частоты благодаря селективному преимуществу ее носителей, их устойчивости к малярии. Эта мутация «мигрировала» вместе с субпопуляциями данной группы в различные области страны, и теперь высокая частота HbE свидетельствует не только о продолжающемся отборе под влиянием малярии, но также и о происхождении от определенной популяционной группы. Таким образом, аллель HbE является свидетелем истории популяции.

История популяции или отбор? На этом примере можно судить и о том, насколько неоднозначным может быть распределение генетического признака. Аллель HbE обычно реже встречается у населения равнин великих рек Юго-Восточной Азии по сравнению с населением холмистых областей, где малярия более распространена. Однако эта дифференциация не имеет никакого отношения к разделению популяций, произошедшему в отдаленные исторические периоды; она возникла в относительно недавнее время просто в результате менее интенсивного давления отбора, обусловленного малярией.

Генетическое сходство между популяциями тоже можно интерпретировать по-разному. Оно может отражать (но не обязательно отражает) общую историю этих популяций. С другой стороны, такое сходство может свидетельствовать о параллельном изменении генофонда популяций под влиянием сходного давления отбора. В рассмотренном примере, касающемся населения Юго-Восточной Азии, в качестве показателя сродства между популяциями использовался только один ген. Можно предположить, что чем большее число различных генов вовлечено в такой анализ, тем менее вероятность того, что все они находятся под одинаковым давлением отбора. Следовательно, сходство популяций по большому числу генов убедительно свидетельствует в пользу общего происхождения этих популяций. Действительно, при анализе сродства и различий между популяциями обычно стараются использовать как можно больше наследственных признаков и применяют методы многомерной статистики. Тем не менее, рассматривая выводы таких исследований, необходимо всегда иметь в виду, что обычно о селективных силах, оказывающих влияние на популяцию, ничего не известно.

Методы определения генетического расстояния. Методы определения генетического расстояния между популяциями обсуждаются в нескольких прекрасных обзорах [36; 103; 1893]. Для непрерывно распределенных признаков, например антропологических измерений, обычно используют обобщенное расстояние Махаланобиса, его упрощенный вариант - индекс Пенроуза D^2 . Для альтернативных признаков, таких как полиморфные признаки с простым типом наследования, как правило, применяются угловая и хордовая меры Кавалли-Сфорца и Эдвардса (1964) [1735].

6.3.4. Поток генов

Кроме отбора (рассмотренного выше) и случайных флуктуации генных частот (которые будут обсуждаться позднее), на генофонд популяции оказывает большое влияние также поток генов. Для обозначения переноса генов из одной популяции в другую часто применяется термин «миграция».

Влияние миграции на генные частоты [124]. Действие миграции на частоты генов будет рассмотрено на несколько упрощенной модели. Большая популяция может подразделяться на субпопуляции меньшего размера. Предположим, что средняя частота гена равна $\bar{q}$; каждая субпопуляция в каждом поколении обменивается со случайной выборкой из всей популяции долей своих генов, равной m . Пусть генная частота в первом поколении в рассматриваемой популяции равна q . Тогда в следующем поколении частота гена в этой субпопуляции будет равна

$$q' = (1 - m)q + m\bar{q} = \bar{q} - m(q - \bar{q}),$$

$$\Delta q = q' - q = -m(q - \bar{q}).$$

Δq пропорционально как отклонению частоты гена в субпопуляции q от средней частоты в популяции в целом ($\bar{q}$), так и m . С течением времени в отсутствие других факторов (таких как дифференциальное давле-

ние отбора в субпопуляциях) различия между субпопуляциями сгладятся и все они будут иметь одну и ту же частоту гена $\bar{q}$. Эта модель далека от реальности, поскольку мигранты обычно приходят в субпопуляцию из соседних с ней субпопуляций. Если соседние субпопуляции отклоняются от общепопуляционной средней в ту же сторону, что и популяция-«реципиент», скорость уравнивания частот между субпопуляциями снижается. Для выполнения вычислений более реалистично рассматривать в качестве $\bar{q}$ не общепопуляционную среднюю, а среднюю частоту гена у особей, мигрирующих в субпопуляцию.

Миграция и отбор. Если субпопуляции подвержены давлению отбора различной интенсивности, этот отбор может противостоять процессу выравнивания генных частот. Здесь возможны три ситуации ¹.

1. Если скорость миграции и интенсивность отбора имеют один порядок величины, частоты генов в субпопуляциях могут сильно отличаться друг от друга.

2. Если интенсивность отбора намного превышает скорость миграции в субпопуляциях, частоты генов в субпопуляциях будут определяться в основном отбором и «разбавляющее» влияние миграции окажется очень слабым.

3. Напротив, если доля «иммигрантов» намного выше интенсивности отбора, действие миграции «перевесит» действие отбора.

В любом случае возможно установление стабильного равновесия между отбором, с одной стороны, и миграцией, с другой. Такая ситуация несколько сходна с равновесием между отбором и мутационным процессом (разд. 5.2).

Измерение притока генов в субпопуляцию. Часто производится оценка доли генов, которую субпопуляция получила извне путем миграции. Пусть q_a – частота гена в «чистой» предковой популяции, а q_n – частота того же гена в той же популяции в настоящее время; предполагается, что в эту популяцию произошел приток генов извне. Пусть частота гена в популяции-«доноре» равна q_c . Тогда доля m генов в исследуемой популяции в настоящее время, пришедших из популяции-«донора», составляет $qn = mq_c + (1 - m)q_a$ и, следовательно,

$$m = \frac{q_n - q_a}{q_c - q_a}.$$

Вариансу m можно определить следующим образом:

$$V_m = \frac{1}{(q_c - q_a)^2} [V_{qn} + m^2 V_{qc} + (1 - m)^2 V_{qa}].$$

Оценка притока генов в субпопуляцию. В последнее время всеобщее внимание привлекает вопрос о том, какова доля генов белого населения (и других расовых групп) у негров США. Хотя в принципе оценить это просто, решение данной задачи требует выполнения определенных условий [1857]:

а) должны быть известны точный этнический состав предковой популяции и частоты генов, используемых для оценки;

б) частота анализируемого гена (генов) не должна систематически изменяться в течение времени, прошедшего от «предкового» поколения до настоящего времени. Систематическое изменение генных частот может быть вызвано естественным отбором. Например, в негритянском населении Америки распространен ген серповидноклеточности. Известно, что этот ген широко распространен в Африке благодаря отбору в связи с малярией (разд. 6.2.1.6); в Северной Америке такого отбора нет. С другой стороны, в США ген серповидноклеточности должен испытывать направленное против него давление отбора, возникающего в результате выщепления гомозиготных индивидов, страдающих серповидноклеточной анемией. Таким образом, оценка, основанная на частоте этого гена, приведет к завышению примеси генов белой расы.

Однако можно рассуждать и иначе. Если оценка примеси генов производится на основе одного или (в идеальном случае) многих генов, удовлетворяющих этим ус-

¹ Математический анализ этих вопросов см. в работах [103; 124].

ловиям, разница между этой оценкой, и оценкой, произведенной на основе гена, испытывающего давление отбора, может быть использована для демонстрации наличия отбора и измерения его интенсивности.

Оценка притока генов белой расы в популяцию американских негров. Американские негры произошли от рабов, завезенных в США из Западной Африки (Нигерии, Сенегала, Гамбии, Кот-Дивуара, Либерии и др.). В этих предковых популяциях частоты большинства генетических маркеров обнаруживают ярко выраженную изменчивость. То же самое справедливо и для белого населения Америки, которое произошло от иммигрантов из различных областей Северной, Западной, Центральной и Южной Европы. Возможно, что гены, внесенные в генофонд американских негров, не являются несмещенной и случайной выборкой генов всего белого населения США. Некоторые группы белого населения могли принимать более активное участие в аутбридинге по сравнению с другими группами. Все же тщательное выявление возможных отклонений способствует определению правильного порядка величины притока генов [1857].

Считается, что дифференциальный отбор почти или совсем не оказывает влияния на оценки притока генов, основанные на системах групп крови и сывороточных белков (Rh, Duffy, группы Gm). Для различных негритянских субпопуляций эти оценки изменяются от $m = 0,04$ до $m = 0,30$. Величины m для населения южных сельских районов, как правило, ниже, чем для крупных городов типа Балтимора или Нью-Йорка, для которых они обычно превышают 0,2.

Рассмотрим метод оценки притока генов на следующем примере. Частота аллеля Fy^a групп крови системы Duffy составляет у американского белого населения $q_c = 0,43$. В популяциях Западной Африки его частота q_a в настоящее время ниже 0,03, а в большинстве групп населения Африки Fy^a вообще отсутствует. Можно предположить, что в то время, когда происходил вывоз рабов из Африки, частота аллеля Fy^a также была очень низкой. В современном негритянском населении Окленда, штат Калифорния ($n = 3,146$), частота $Fy^a q_n = 0,0941 + 0,0038$, соответствующая частота в белом населении ($n = 5\,046$) $q_c = 0,4286 + 0,0058$; q_a (частота гена в африканской популяции) принимается равной 0. Пользуясь формулой, приведенной выше, получим следующую оценку притока генов:

$$m = \frac{q_n}{q_c} = \frac{0,0941}{0,4286} = 0,2195.$$

Если принять q_n за 0,02, эта оценка составит 0,181. Следовательно, приток генов белого населения, определенный на основе частот групп крови Duffy, составляет 18-22% генофонда негритянского населения Окленда (Калифорния). Оценка притока генов на основе системы ABO для той же популяции приводит к сходному результату ($m = 0,20$).

Доказательство наличия отбора. Как отмечалось, оценки притока генов, полученные для генов, испытывающих в африканских популяциях давление отбора, можно использовать для определения того, изменились ли интенсивность и направление отбора в новом месте обитания африканских негров. В нескольких работах были получены более высокие оценки притока генов белых для трех генетических маркеров: гена серповидноклеточности (Hb[3S]), аллеля африканского варианта G6PD (GD^A) и аллеля гаптоглобина Hр¹. Как отмечалось в разд. 6.2, на аллели Hb β S и Gd^A в Африке действует отбор, связанный с тропической малярией; гаптоглобин является белком, участвующим в переносе гемоглобина. Определенные величины притока генов для этих аллелей были достоверно выше, чем соответствующие оценки, полученные на основе частот систем групп крови Duffy и ABO; они варьировали приблизительно от 0,49 (Gd^A , Сизтл, северо-запад США) до 0,17 (GD^A , Мемфис, юг США). Эти результаты указывают на то, что в Соединенных Штатах - стране, где малярии нет, против этих генов идет отбор. Из-за отсутствия необходимых данных интенсивность этого отбора не может быть точно определена. Для доказательства существования отбора в отношении генов, для которых

оценка притока генов таким способом невозможна, необходимо использовать другие подходы.

6.4. Случайные флуктуации генных частот

6.4.1. Генетический дрейф

Детерминистические и стохастические модели. До сих пор наше обсуждение полностью основывалось на менделевских соотношениях и на законе Харди—Вайнберга. Такие популяционно-генетические параметры, как скорость мутирования, коэффициенты отбора и инбридинга, считались постоянными и связанными определенными соотношениями. Другими словами, рассматриваемые нами модели были детерминистическими. Однако в действительности все эти параметры являются статистическими переменными, подверженными случайным изменениям, а изучаемые популяционной генетикой процессы не строго детерминистическими, а стохастическими (случайными).

В случае популяций бесконечно большого размера случайными флуктуациями можно пренебречь: использование стохастических и детерминистических моделей дает приблизительно одинаковые результаты. Использование детерминистических моделей оправдано, если мы хотим в общих чертах узнать, каким образом какой-либо фактор влияет на генетический состав популяции.

В одном из рассмотренных примеров динамике аллелей Hb β S и Hb β C в Западной Африке (разд. 6.2.1.7) мы подробно анализировали флуктуации генных частот под давлением отбора в популяции конечного размера. Однако даже в том случае, когда мы сравниваем наблюдаемые популяционные частоты по генам системы групп крови с ожидаемыми на основе соотношений Харди—Вайнберга, нами рассматриваются и случайные флуктуации. Они будут иметь место, даже если все доступные индивиды подвергаются типированию на группы крови.

На протяжении почти всей эволюционной истории человека размеры его популяций были относительно малыми; наш вид был разделен на ряд небольших скрещивающихся внутри себя групп. До недавнего времени таких изолятов было много; некоторые из них существуют до сих пор. Вот почему необходимо рассмотреть влияние случайных флуктуаций с теоретической точки зрения.

Модель островных популяций. Рассмотрим вымышленный пример, представляющий собой крайний случай. Предположим, что в Тихом океане существует 160 изолированных островов, на каждом из которых поселилась одна супружеская пара. Все эти 320 поселенцев имеют группу крови MN. У каждой пары родились сын и дочь, которые, вступив в инцестный брак, становятся предками островной популяции. Ни один из генотипов системы MN не является селективно благоприятным или невыгодным. Через несколько сотен лет мы возвращаемся на острова, чтобы определить группы крови MN в этих популяциях. Что же мы обнаружим?

Основатели популяций не различались по генам групп крови данной системы. Поэтому наше первое предположение: то же самое будет наблюдаться и у их потомков, поскольку отбор отсутствовал (а допустим также и это) новые мутации не возникали. Однако более внимательный анализ показывает, что наше предположение неверно. Поскольку генотип родителей во всех случаях был MN, предполагается, что соотношение генотипов у их детей будет $1/4MM + 1/2MN + 1/4NN$.

Отсюда получаем следующие вероятности генотипов пар сибсов, которые были основателями островных популяций:

$$MM \times MM = 1/4 \times 1/4 = 1/16$$

$$MN \times MN = 1/2 \times 1/2 = 1/4$$

$$NN \times NN = 1/4 \times 1/4 = 1/16$$

$$MM \times MN = 2 \times 1/4 \times 1/2 = 1/4$$

$$MM \times NN = 2 \times 1/4 \times 1/4 = 1/8$$

$$NN \times MN = 2 \times 1/4 \times 1/2 = 1/4.$$

Следовательно, в первом поколении около 10 островов будет заселено только индивидами генотипа MM, другие 10 островов — индивидами генотипа NN. На 40 островах оба сибса будут иметь генотип MN. На остальных 100 островах будет встречаться по два генотипа: на 40 — MM и MN, на 40 — MN и NN, на 20 — MM и NN.

Ясно, что в последующих поколениях частоты генотипов будут зависеть от данного распределения. Это утверждение наиболее очевидно для тех 10 островов, где генотип основате-

лей – ММ х ММ и NN х NN. Население первой группы этих островов будет иметь только генотип ММ, а другой – только генотип NN. Второй аллель здесь был потерян случайно, без направленного против него отбора. Такие процессы называются случайной фиксацией и случайной потерей аллеля соответственно.

М и N - распространенные аллели. Однако один из основателей подобной островной популяции может оказаться гетерозиготным по какому-нибудь редкому аллелю. Тогда этот редкий аллель в последующих поколениях с высокой вероятностью будет иметь в популяции высокую частоту, если только он не будет случайно потерян (см. ниже). «Эффект основателя» очень распространен в популяциях человека. Например, в белом населении Южной Африки, говорящем на африкаанс, часто встречается доминантное заболевание - острая перемежающаяся порфирия (17620); его происхождение прослеживается до одного из первых иммигрантов, который был среди основателей этой группы популяций.

Более общий случай. Возвращаясь к нашему примеру с островными популяциями, заметим, что случайная потеря и соответственно случайная фиксация аллеля могут произойти не только в первом поколении, как в описанном случае, но также и в последующих поколениях. Их вероятность увеличивается с уменьшением эффективного репродуктивного размера популяции N . Случайная потеря и фиксация - это крайние случаи; в промежуточном случае в популяции сохраняются оба аллеля, но их частота флуктуирует случайным образом.

Такие случайные колебания частоты часто называют «генетическим дрейфом». Ниже генетический дрейф анализируется с несколько более формальной точки зрения.

Рассмотрим популяцию, имеющую эффективную репродуктивную численность, равную N диплоидным особям. Можно считать, что эта популяция образовалась в результате случайного выбора $2N$ гамет предыдущего поколения. Пусть в данном поколении частота аллеля a равна q , а аллеля A — $p = 1 - q$. Число аллелей в данном поколении при размере популяции N будет соответствовать биномиальному распределению $(p + q)^{2N}$. Это означает, что $2N + 1$ возможных значений частоты q аллеля a в этом поколении равны

$$0, \frac{1}{2N}, \frac{2}{2N}, \frac{3}{2N}, \dots, \frac{1}{2N}, \dots, \frac{2N-1}{2N}, \quad (6.18)$$

а вероятность того, что q будет равно некоторой

величине $q_j - j/2N$, составляет

$$\binom{2N}{j} p^{2N-j} q^j = \frac{2N}{2Nq_j} p^{2N-j} q^{2Nq_j}. \quad (6.19)$$

Теперь предположим, что $\delta q = q_t - q$ — это случайное отклонение q от поколения к поколению¹. Тогда из приведенного выше распределения следует, что

$$\sigma_{\delta q}^2 = \frac{q(1-q)}{2N}. \quad (6.20)$$

Следовательно, дисперсия, оценивающая уровень случайного изменения q от поколения к поколению, обратно пропорциональна N , эффективной величине популяции. Например, пусть $N = 50$, $q = 0,5$, тогда

$$\sigma_{\delta q}^2 = \sqrt{\frac{0,5 \cdot 0,5}{2 \cdot 50}} = 0,05.$$

Вероятности, с которыми встречаются различные значения q , приведены в табл. 6.26

Это распределение можно рассмотреть и с другой точки зрения. Пусть имеется большое число локусов, и все они в родительском поколении имеют частоту одного из аллелей, q , равную 0,5. Тогда в следующем поколении у одних локусов частота q будет выше, а у других - ниже 0,5 в соответствии с распределением, приведенным в табл. 6.26.

Уменьшение изменчивости [124]. Пример с островными популяциями показывает, что какой-либо аллель может быть случайно потерян из популяции; в этом случае происходит фиксация альтернативного аллеля. Как видно из табл. 6.26 и уравнения (6.19), в популяции конечного размера этот процесс происходит с определенной, хотя обычно и низкой, частотой. Однако, если фиксация уже произошла, обратный процесс невозможен. Вероятность фиксации (т. е. того, что q станет равным 0 или 1) с увеличением числа поколений стремится к 1. Таким образом, по прошествии длительного времени группа популяций рано или поздно станет гомозиготной даже при отсутствии отбора (если процесс не нарушается миграцией и возникновением мутаций). Это явление называется уменьшением изменчивости (decay of variability).

¹ Δq , напротив, обозначает систематическое отклонение, обусловленное, например,

Таблица 6.26. Вероятностное распределение генной частоты q ($N = 50$ детей) при $q = 0,5$ в поколении родителей [124]									
$q =$	$<0,35$	$0,35$	$0,40$	$0,45$	$0,50$	$0,55$	$0,60$	$>0,65$	Сумма
		$-0,40$	$-0,45$	$-0,50$	$-0,55$	$-0,60$	$-0,65$		
Вероятность	$0,002$	$0,021$	$0,136$	$0,314$	$0,341$	$0,136$	$0,021$	$0,002$	$1,000$

Пусть K -скорость фиксации (или элиминации) аллелей за поколение, $K/2$ - скорость либо фиксации, либо элиминации некоторого аллеля. Можно показать, что $K = 1/2N$. Таким образом, в одном поколении $1/4N$ аллелей будет элиминирована и $1/4N$ зафиксирована [124].

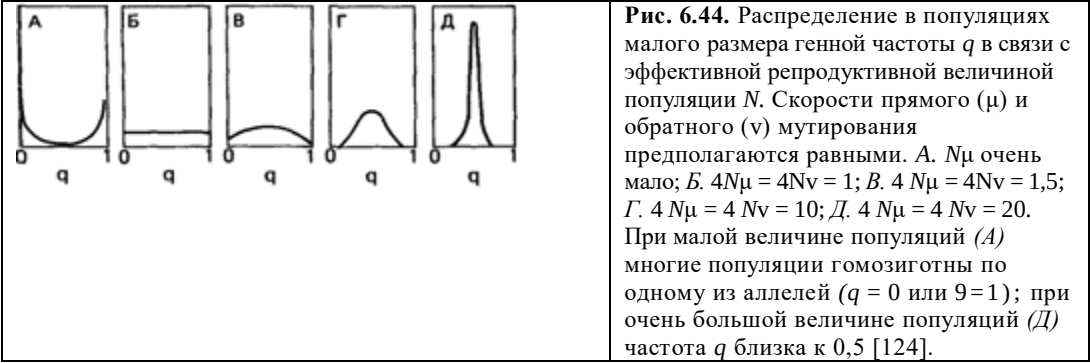
Мы еще вернемся к этому вопросу и обсудим его более подробно в связи с молекулярной эволюцией (разд. 7.23).

6.4.2. Генетический дрейф в сочетании с мутационным процессом и отбором

Мутационный процесс. Представим себе большую популяцию, состоящую из множества субпопуляций малого или среднего размера. Распределение аллельных частот q в этих субпопуляциях зависит от эффективной репродуктивной численности N , скорости мутирования μ ($A \rightarrow a$) и скорости обратного мутирования ν ($a \rightarrow A$). Если скорости прямого и обратного мутирования равны и постоянны ($A \rightarrow a$; $a \rightarrow A$), в зависимости от величины популяции N возникают распределения частот, показанные на рис. 6.44.

Средняя величина q во всех случаях постоянна (в нашем примере $q = 0,5$), однако дисперсия увеличивается с уменьшением N . При малой величине N классы у краев распределения, где q близко к 0 или 1, имеют высокую частоту, что указывает на высокую скорость фиксации или элиминации аллелей. С другой стороны, при больших значениях N распределение стягивается к средней.

Судьба вновь возникшей мутации. В предыдущем параграфе мы рассматривали мутации, возникающие с постоянной частотой. А какова судьба единичной новой мутации? Мутация возникает в одном сперматозоиде или в одной яйцеклетке. Зигота, образуемая от слияния двух зародышевых клеток, будет в этом случае гетерозиготной. Каждый ребенок первого носителя мутации получит эту мутацию с вероятностью $1/2$. Если первый носитель имеет двух детей, вероятность случайной потери мутации после первого поколения составит $1/2^2 = 1/4$. С другой стороны, вероятность того, что число новых аллелей в следующем поколении будет равно 2, также составляет $1/4$. Фишер (1930) [1759] определил риск элиминации из популяции такого нового аллеля, исходя из предположения, что число сибсов в семьях имеет распределение Пуассона со средней 2 (рис. 6.45). Если мутация нейтральна, т. е. не имеет ни селективного преимущества, ни селективной невыгодности, риск того, что она в конце концов исчезнет из популяции, исключительно высок. Это справедливо даже для мутаций, имеющих небольшое селективное преимущество. Однако этот вывод получен только для популяций бесконечно большого размера; в популяции малого размера



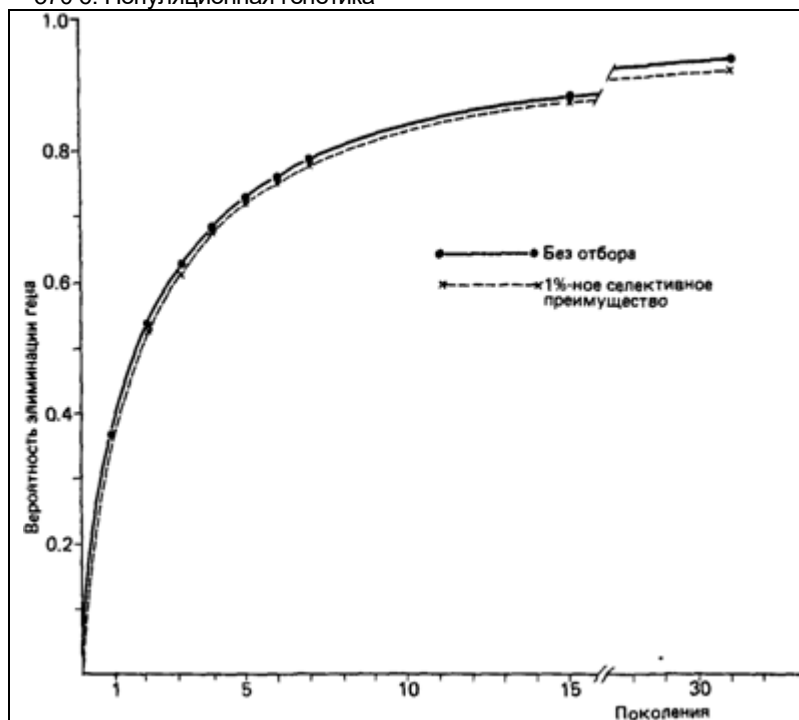


Рис. 6.45. Увеличение вероятности того, что новая мутация исчезнет из популяции. При селективной ценности мутации, равной 1%, эта вероятность почти не отличается от таковой в случае нейтральности мутации. Предполагается, что число детей в семье соответствует распределению Пуассона со средней, равной 2 [1759].

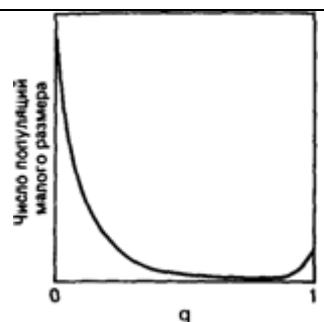
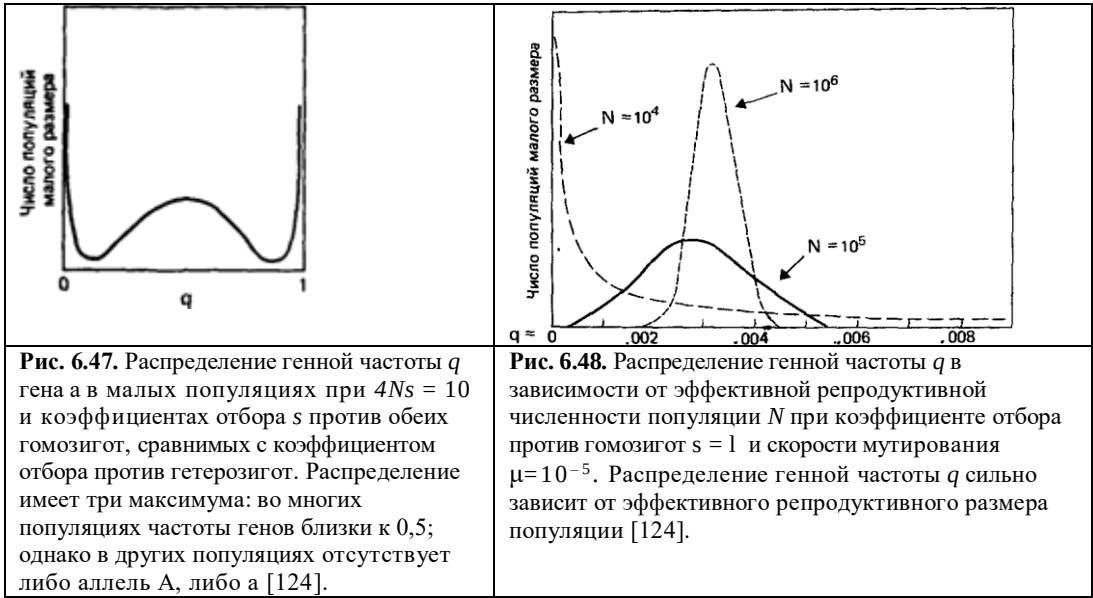


Рис. 6.46. Распределение генной частоты q гена a в малых популяциях с $ANs = 5$ (s - коэффициент отбора против гетерозигот Aa ; $2s$ - коэффициент отбора против гомозигот aa). В большинстве популяций гена a вообще не будет. В нескольких популяциях этот ген будет иметь промежуточную или высокую частоту, а в некоторых он даже вытеснит альтернативный аллель. Подробнее см. в тексте [124].

случайные флуктуации могут все же привести к фиксации такой мутации.

Отбор. Взаимодействие между генетическим дрейфом и отбором может быть более сложным, поскольку существует несколько разных типов отбора (разд. 6.2.1). На рис. 6.46 показана ситуация, когда гомозиготы AA имеют приспособленность, равную 1, гетерозиготы Aa — равную $1 - s$, а гомозиготы aa — $1 - 2s$. В бесконечно большой популяции в отсутствие мутирования частота гена q будет приближаться к 0. В случае большого числа субпопуляций q в большинстве из них станет равным 0. Однако в некоторых случаях q будет больше 0, а в немногих субпопуляциях произойдет фиксация мутации ($q = 1$), т. е. сдвиг частот произойдет в направлении, противоположном направлению отбора.

В случае селективного преимущества гетерозигот распределение частот в субпопу-



лящих будет совершенно другим (рис. 6.47). Если селективная невыгодность обеих гомозигот одинакова, значения q будут сгруппированы около $q = 0,5$, однако фиксация или элиминация аллелей будет все же происходить с небольшой вероятностью, величина которой зависит от генетически эффективного размера популяции N . В табл. 6.27 контрастно представлен характер распространения новых генов в результате дрейфа или отбора.

Таблица 6.27. Распространение новых мутаций путем дрейфа и отбора (по [1821])	
Дрейф	Отбор
Распространение зависит от миграции населения больше, чем от окружающей среды	Распространение зависит от окружающей среды больше, чем от миграции населения
Если популяция мала, частота гена может возрасти очень быстро	Увеличение частоты гена в основном не зависит от размера популяции
Распространяются как селективно благоприятные, так и нейтральные гены	Распространяются только гены, селективно благоприятные в данной среде
Распространившиеся мутантные гены идентичные по происхождению	Могут отбираться разные мутации одного локуса или различных локусов, дающие сходные фенотипы (эволюционная конвергенция)

Одновременное действие отбора и мутационного процесса. Рассмотрим теперь распределение в субпопуляциях частот полностью рецессивного гена, имеющего скорость мутирования μ , и селективную невыгодность гомозигот aa , равную s ; пусть эффективный размер популяции равен N . Предположим, что q мало, поэтому обратным мутированием $a \rightarrow A$ можно пренебречь. На рис. 6.48 приведено распределение q для крайнего случая $s = 1$ (отбор полностью элиминирует гомозиготы aa) и для различных значений N . Скорость мутирования принята равной $\mu = 10^{-5}$ в соответствии с порядком величины скорости мутирования для некоторых выраженных наследственных заболеваний (разд. 5.1.3). Оказалось, что даже при среднем размере популяции ($N = 10^4$) в большинстве субпопуляций данный рецессивный ген будет вообще отсутствовать. Однако в некоторых субпопуляциях его частота окажется гораздо выше, чем в популяции в целом. Разница между частотами пораженных гомозигот будет еще выше, поскольку их частота соответствует квадрату частоты гена.

В принципе эти выводы приложимы и к доминантным мутациям, если гетерозигота Aa селективно невыгодна. Однако из-за

отбора против гетерозигот случайное увеличение генных частот, происходящее вопреки давлению отрицательного отбора, становится менее вероятным. Поэтому таким способом могут распространиться только те доминантные аномалии, селективная невыгодность которых очень низка. При данном типе наследования повышение частоты особей с аномальными фенотипами происходит только в соответствии с частотой гена, а не с частотой гомозигот.

Редкие наследственные заболевания в популяциях человека. Из предыдущего обсуждения становится ясно, почему в небольших популяциях, существующих долгое время в условиях сравнительной изоляции, наследственные заболевания, в особенности рецессивные, иногда достигают высокой частоты. Новый аллель либо возникает путем мутирования, либо вносится извне основателем популяции (эффект основателя). Как правило, различить эти две ситуации нельзя. В любом случае у аллеля есть шансы достигнуть высокой частоты даже при противодействующем давлении отбора. Это одна из причин, почему исследование изолятов дает много информации о редких наследственных болезнях. Кроме того, в большинстве современных неизолированных популяций кровнородственные браки стали менее частыми. Следовательно, частота гомозигот по редким наследственным заболеваниям упала ниже равновесного значения (разд. 6.3.1). В сравнительно изолированных - во многих случаях сельских - популяциях наблюдается тенденция к сохранению традиционных способов выбора мужа или жены и, следовательно, прежнего уровня инбридинга. Поэтому общего падения уровня гомозигот не происходит, и средняя частота рецессивных гомозигот в изолятах оказывается выше, чем в популяции в целом. Этот факт, а также неравномерное распределение генных частот являются причиной того, что именно в изолятах обнаруживаются до сих пор неизвестные рецессивные заболевания. Еще один важный фактор - селективная миграция. В течение относительно длительного времени более приспособленные и более активные члены популяции мигрировали из изолятов в города и индустриальные центры. С другой стороны, было показано, что у гетерозигот по некоторым серьезным рецессивным аномалиям могут в некоторых случаях в незначительной степени проявляться симптомы заболевания (разд. 4.2.2.8), поэтому в группе таких мигрантов число гетерозигот может быть заниженным.

Однако исследование изолятов привело к некоторой односторонности наших представлений о наследственных заболеваниях. Этот метод можно сравнить с микроскопированием: он позволяет очень детально изучить некоторую часть исследуемого объекта, при этом, однако, другие его части вообще упускаются из виду. Между этими методами существует только одно различие. При микроскопировании мы сами выбираем те части объекта, которые нас интересуют. При изучении изолятов, напротив, исследователем руководит случай.

Пример: болезнь острова Млет. Болезнь острова Млет - это аутосомное рецессивное заболевание, входящее в группу ладонно-подошвенных кератозов. В отличие от наиболее распространенного доминантного типа (Unna-Thost) в этом случае кератозные изменения не ограничиваются ладонями и ступнями, а могут распространяться и на другие части рук и ног. Впервые данная патология обнаружена около 150 лет назад на небольшом острове Млет, расположенном у югославского побережья. Население острова составляет всего несколько сотен человек; в 1930 г. частота браков между двоюродными сибсами была не менее 14 на 93 брака [1731]. В 1960 г. многие из пораженных этой болезнью еще оставались в живых. Типичная родословная представлена на рис. 6.49. Высокая частота гетерозигот и большое число кровнородственных браков сделали реальностью браки между пораженными гомозиготами и гетерозиготами и обусловили явление «псевдоминирования» (разд. 3.1.3). Вне острова Млет случаи этого заболевания отмечаются редко.

Можно привести немало примеров рецессивных заболеваний, которые были открыты или подробно описаны при исследовании изолятов.

Одно из них - классическая миоклоническая эпилепсия, еще в 1913 г. описанная Лундборгом [1820] (25480) в Швеции. Другие примеры включают амвротическую идиотию юношеского

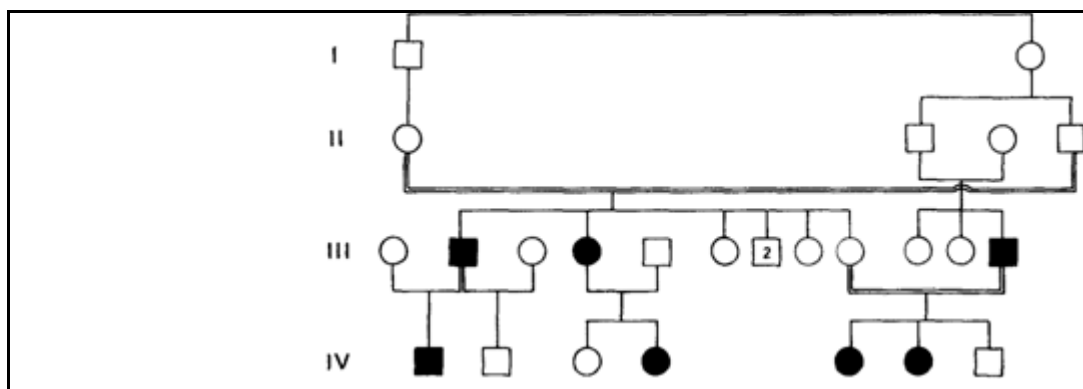


Рис. 6.49. Родословная с кровнородственными браками и случаями болезни острова Млет. Это рецессивное заболевание с высокой частотой встречается среди жителей острова Млет и почти отсутствует вне этого острова. (Courtesy of Dr. U. W. Schnyder.)

типа (20420), описанную Шёгренем (1870) в шведском изоляте; атаксию Фридрейха (22930); особый случай карликовости, обнаруженный Ханхартом в долинах Швейцарских Альп [1785]; синдром Вернера (27770) (разд. 5.1.6.7) в Сардинии [1736]; синдром Элліса—Ван-Кревельда (хондрозкостодермальная дисплазия, 22550) у амишей, религиозной секты, живущей в Пенсильвании [1825], и тирозинемии (27670) среди франкоязычного населения Канады [1726]. Довольно распространенные болезни могут встречаться в изолятах с повышенной частотой благодаря генетическому дрейфу и эффекту основателя. В качестве примера приведем кистозный фиброз, с высокой частотой встречающийся в небольшой области Бретани (Франция) (1:377 новорожденных, т.е. в 6-8 раз чаще, чем у населения северо-западной Европы) [1730], и то же заболевание (частота 1:569) у амишей Огайо [1802]. Отметим также широкое распространение трех болезней, связанных с нарушением обмена липидов среди евреев ашкенази [1771; 1837]. К ним относятся болезнь Тея—Сакса (27280), болезнь Ниманна—Пика (25720) и взрослая форма (тип I) болезни Гоше (23080) [1264]. С одной стороны, некоторые факты истории евреев-ашкенази, казалось бы, говорят в пользу гипотезы генетического дрейфа: в течение длительных периодов эта популяция находилась в сравнительной изоляции как религиозное меньшинство; существует мнение, что размер предковой популяции современных ашкенази в начале IX века был менее 10000 человек. Однако при более внимательном анализе истории и демографии эти доказательства кажутся более сомнительными (Нил [1771]): популяция ашкенази была подразделена на множество изолятов, которые иногда находились далеко друг от друга; размер популяции, по крайней мере в некоторые периоды, был слишком велик для действия генетического дрейфа; кроме того, происходило «разбавление» генного пула благодаря внесению генов извне. С другой стороны, факт остается фактом: в одной и той же популяции с высокой частотой встречается не менее *трех* генов, сходных в патогенетическом и биохимическом отношении. Мы считаем, что причиной этого может быть только высокоспецифичное селективное преимущество гетерозигот в определенных условиях обитания популяции в прошлом. Высказывалось предположение, что в качестве такого селективного фактора в данном случае мог выступать туберкулез, однако доля популяции евреев-ашкенази, устойчивая к туберкулезу, значительно превышает 4%, которые составляют носители болезни Тея—Сакса. Другое возражение против этой версии, выдвинутое Нилом, состоит в том, что туберкулез распространен во многих городских популяциях, однако данные гены не встречаются в них с высокой частотой. Проблема взаимодействия дрейфа и отбора будет вновь обсуждаться в разд. 7.2.3.

«Редкое растение - на редкой почве»: наследственные болезни в Финляндии [1842]. В связи с происходящим в последнее время интенсивным ростом населения планеты некоторые популяции, которые раньше представляли собой относительно небольшие краевые изоляты, превратились в нации, включающие несколько миллионов людей. Если благодаря благоприятным географическим и политическим условиям рост популяции проходил в отсутствие

внешних влияний, обусловленных миграцией и притоком генов из других популяций, набор рецессивных генов, случайно оказавшийся у основателей этой популяции, должен обнаруживаться и в современном населении. В такой популяции можно ожидать наличие целого ряда уникальных рецессивных заболеваний. В ней должны отсутствовать гены, сравнительно распространенные в других популяциях, и, напротив, присутствовать гены, не встречающиеся в других регионах. Поскольку интенсивная миграция населения и обмен генами происходили и в прежние время (особенно в популяциях европейского происхождения), о чем имеются полные сведения), примеры ничем не нарушаемого роста сравнительно изолированной популяции довольно редки. Наиболее яркий пример такого рода – это финскоязычное¹ население Финляндии. К привлекательным для исследователя особенностям этой популяции можно отнести: сохранившуюся «традиционную» популяционную структуру; высокий уровень медицинского обслуживания, позволяющий надежно диагностировать редкие заболевания; прекрасное состояние церковно-приходских книг, служащих надежным источником сведений о населении приблизительно для 10 последних поколений.

Популяционная история Финляндии. Большинство предков современного населения Финляндии в течение нескольких столетий первого тысячелетия нашей эры иммигрировало из Балтийского региона. Они, как и эстонцы, были потомками одной базовой популяции балтийских финнов, которые принадлежали к особой языковой группе. Возможно, что иммиграция закончилась задолго до начала исторического времени, т. е. до 1000 г. н. э. Иммигранты осели на юго-востоке страны; немногочисленность захоронений и других следов поселения свидетельствует о том, что число первых жителей было очень небольшим. В течение последующих столетий поселение медленно расширялось в северном и восточном направлениях. Общая численность населения в XVII в. составляла 400000; в 1850 году она достигла 1,6 млн., а в 1970–4,6 млн. человек. До недавнего времени население по преимуществу было сельским; сейчас в связи с развитием промышленности многие семьи переселились в большие города. Однако уровень миграции в сельских областях остался по-прежнему низким.

Медленная иммиграция ограниченного числа поселенцев и сравнительно независимый рост субпопуляций при низком уровне обмена генами между ними обеспечивают наиболее благоприятные условия для проявления эффекта основателя и для последующих изменений генных частот в субпопуляциях в результате генетического дрейфа.

Браки между двоюродными сибсами были до 1972 г. запрещены законом, однако более отдаленное родство между супругами встречалось и до сих пор встречается очень часто. Учитывая все эти факты, можно предсказать результаты популяционных исследований:

а) в некоторых субпопуляциях должна обнаружиться довольно высокая частота рецессивных заболеваний, которые в других популяциях встречаются редко или неизвестны; в соседних финских субпопуляциях частота этих заболеваний, возможно, более низкая благодаря сравнительно недавней миграции;

б) следует ожидать, что частоты этих заболеваний в больших городах окажутся очень низкими, поскольку в таких городах происходит «перемешивание» всех генов генофонда финского населения;

в) вероятно, некоторые рецессивные заболевания, известные в других, не финских популяциях, будут отсутствовать или обнаруживаться с очень низкой частотой.

Именно эти результаты и были получены.

Рецессивные заболевания в Финляндии. В табл. 6.28 перечислены рецессивные болезни, которые довольно часто встречаются в Финляндии и очень редко или вообще никогда вне этой страны. Другие заболевания, приведенные в этой таблице, зарегистрированы как в Финляндии, так и в других странах. В табл. 6.28 приводятся также болезни, которые часто встречаются в других странах, но редко или отсутствуют в Финляндии. Действительно, в Финляндии распространены очень редкие или даже неизвестные вне этой страны заболевания, тогда как некоторые известные болезни там не встречаются. Среди последних отметим фенилкетонурию, которая очень подробно изучена в рамках обширной программы скрининга новорожденных (разд. 6.1.3, таблица 6.4).

Попытки определить происхождение спе-

¹ Часть населения Финляндии говорит на шведском языке.

Таблица 6.28. Рecessивные заболевания в Финляндии [1842]		
Редкие recessивные заболевания, сравнительно распространенные в Финляндии	Рecessивные заболевания, распространенные как в Финляндии, так и вне ее	Рecessивные заболевания, редкие в Финляндии и распространенные вне ее
Врожденный нефротический синдром (25630) (финская форма)	Тирозинемия, непереносимость фруктозы	Галактоземия
Аспартилгликозаминурия (АГУ) (20840)	Мукополисахаридоз (Хурлер)	Гепатический гликогеноз
Ранний детский цереоидлипофусциноз	Мукополисахаридоз II (I-клеточная болезнь)	Цистиноз
Прогрессирующее слабоумие с липомембранной поликистозной остеодисплазией	Адреногенитальные синдромы (например, дефицит 21-гидроксилазы)	Болезнь «кленового сиропа»
Синдром dystrophia retinae pigmentosadisacusis	Поликистозная болезнь (перинатальная форма)	Фенилкетонурия
Врожденное уплощение роговицы	Глубокая детская глухота	Гомоцистинурия
Болезнь глаз Аланда (сцепленная с полом)	Пигментная ксеродерма	Кистозный фиброз поджелудочной железы
Карликовость Мелбри		Болезнь Тея—Сакса
Гипоплазия хрящей и волос		Болезнь Гоше
Карликовость дистрофическая		
Врожденная хлоридная диарея		
Селективное нарушение абсорбции витамина В ₁₂		

цифически «финских» заболеваний привели к интересным результатам. Оказалось, что центры происхождения этих заболеваний расположены в пределах ограниченных географических территорий при небольшом разбросе вокруг них, причем в коренном населении больших городов они фактически отсутствуют. На рис. 6.50 показаны места рождений предков (дедов или прадедов) больных тремя recessивными забо-



Рис. 6.50. Происхождение больных, страдающих тремя recessивными болезнями в Финляндии. Слева: врожденная хлоридная диарея: прапрадеды 11 явных и 3 возможных sibсов (64). В середине: врожденный нефротический синдром финского типа; 60 дедов 57 sibсов. Справа: врожденное уплощение роговицы. Деды 32 sibсов [1842]. Пунктиром отмечена государственная граница до второй мировой войны.



Рис. 6.51. Доминантный ген в Финляндии: семейный амилоидоз с дистрофией сетчатки и церебральной нейропатией. Отмечены места рождений пораженных родителей 207 больных пробандов. Жирная точка - 10 родителей; точка-1 родитель [1842].

леваниями, приведенными в табл. 6.28. Как отмечалось выше, дрейф и эффект основателя оказывают влияние также и на частоты доминантных аномалий, при условии, что против них нет сильного давления отбора. Примером таких аномалий в Финляндии является амилоидоз с дистрофией роговицы и церебральной нейропатией. Дистрофия роговицы обнаруживается в возрасте 20-35 лет; зрение ухудшается медленно и в умеренной степени. Симптомы амилоидоза проявляются уже в более позднем возрасте. Таким образом, эта болезнь не слишком снижает репродуктивную способность. На рис. 6.51 показаны места рождений пораженных родителей 207 пробандов.

Результаты исследования популяции Финляндии, применимы для популяционно-генетического изучения редких заболеваний. Популяционная история Финляндии и её брачная структура характерны и для многих других современных популяций Старого Света. Однако в большинстве из них отсутствуют условия, делающие финскую популяцию столь удобной для изучения: точные записи истории семей, квалифицированное медицинское обслуживание и (последнее по порядку, но не по значению) наличие исследователей, готовых воспользоваться этими материалами. В большинстве других стран, имеющих исследователей и медицинское обслуживание того же уровня (например, в США и большинстве стран Западной и Центральной Европы), отмечается интенсивный аутбридинг, происходящий в результате смешения популяций. Поэтому условия для выявления новых рецессивных заболеваний в этих популяциях неблагоприятны. В разд. 3.1.8 отмечалось, что у человека пока еще известны не все нарушения, приводящие к возникновению наследственных заболеваний; многие из них могут быть открыты в странах, где сохранилась традиционная популяционная структура. Данные этого раздела показывают, почему это так, а пример популяции Финляндии доказывает, что такое утверждение не просто теоретическая спекуляция.

Оглавление

Глава 4 Действие генов 5

- 4 1 Развитие менделевской парадигмы 5
- 4 2 Гены и ферменты 8
- 4 2 1 Гипотеза «один ген один фермент» 8
- 4 2 2 Гены и ферменты у человека современный уровень знания 12
- 4 3 Гемоглобин человека 70
- 4 3 1 История изучения гемоглобина 70
- 4 3 2 Генетика гемоглобина 72
- 4 3 3 Другие типы мутаций, изменяющих гемоглобин 84
- 4 3 4 Талассемии 88
- 4 3 5 Популяционная генетика генов гемоглобина 98
- 4 3 6 Пренатальная диагностика гемоглобинопатии 98
- 4 4 Генетика антител и системы антиген/рецептор 100
- 4 5 Фармакогенетика и экогенетика 108
- 4 5 1 Фармакогенетика 108
- 4 5 2 Экогенетика 115
- 4 6 Механизм аутосомной доминантности 119
- 4 6 1 Аномальная агрегация субъединиц 120
- 4 6 2 Аномальные субъединицы нарушают функции мультимерных белков 120
- 4 6 3 Аномальное ингибирование ферментов по типу обратной связи и структурно аномальные ферменты 121
- 4 6 4 Мутации рецепторов 122
- 4 6 5 Наследственные дефекты клеточных мембран 124
- 4 6 6 Накопление аномальных фибриллярных белков наследственные амилоидозы 124
- 4 6 7 Доминантно наследуемые опухолевые заболевания 125
- 4 7 Генетика эмбрионального развития 126
- 4 7 1 Активность генов в раннем развитии 127
- 4 7 2 Поздние стадии эмбрионального развития, фенотипы 129
- 4 7 3 Регуляция активности генов у бактерий и эукариот 130
- 4 7 4 Соотношения генотипа и фенотипа при хромосомных aberrациях у человека 133
- 4 7 5 Определение пола 136

Глава 5. Мутации 142

- 5 1 Спонтанные мутации 142
- 5 1 1 Генетические изменения, обусловленные мутациями de novo 142
- 5 1 2 Геномные и хромосомные мутации у человека 143
- 5 1 3 Генные мутации анализ на фенотипическом уровне 158
- 5 1 4 Генные мутации анализ на молекулярном уровне 185
- 5 1 5 Изучение генных мутаций в отдельных клетках 193
- 5 1 6 Соматические мутации 196
- 5 2 Мутации, индуцированные облучением и химическими мутагенами 222
- 5 2 1 Мутации, индуцированные радиацией 223
- 5 2 2 Химически индуцированные мутации 260

Глава 6. Популяционная генетика 278

- 6 1 Описание популяций 279
- 6 1 1 Закон Харди-Вайнберга генные частоты 279
- 6 1 2 Генетический полиморфизм 280
- 6 1 3 Наследственные болезни 291

6 2 Систематические изменения генных частот мутации и отбор	294
6 2 1 Естественный отбор	294
6 3 Отклонение от случайного скрещивания	339
6 3 1 Кровнородственные браки	340
6 3 2 Концепция генетического груза	349
6 3 3 Дифференциация субпопуляций генетическое расстояние	363
6 3 4 Поток генов	364
6 4 Случайные флуктуации генных частот	367
6 4 1 Генетический дрейф	367
6 4 2 Генетический дрейф в сочетании с мутационным процессом и отбором	369

УЧЕБНОЕ ИЗДАНИЕ

Фридрих Фогель, Арно Мотульски

ГЕНЕТИКА ЧЕЛОВЕКА

В 3 х томах

Том 2

Заведующий редакцией

чл корр АН СССР

Т. М. Турпаев

Зам зав редакцией М. Д. Гроздова

Старший научный редактор М. Р. Погосбекова

Мл редактор О. В. Шагинян

Художник В. Е. Карпов

Художественные редакторы А. Я. Мусин, А В Страхова

Технический редактор М. А. Страшнова

Корректор Н. А. Гиря

ИБ № 6773

Сдано в набор 31.01.89 Подписано к печати 29.12.89

Формат 70 х 100¹/₁₆ Бумага офсетная № 1 Печать

офсетная Гарнитура таймс Объем 12,00 бум л Усл

печ л 31,20 Усл кр-отт 63,05 Уч изд л 38,64 Изд

№ 4/5978 Тираж 38 000 экз. Зак 185 Цена 3 р 20 к

Издательство «Мир»

В/О «Совэкспорткнига» Государственного комитета

СССР по печати.

129820, ГСП, Москва, 1-й Рижский пер 2.

Можайский полиграфкомбинат В/О «Совэкспорткнига»

Государственного комитета СССР по печати.

г Можайск, ул Мира, 93.

ЭЛЕКТРОННОЕ ОГЛАВЛЕНИЕ

4. Действие генов.....	5
4.1. Развитие менделевской парадигмы	5
4.2. Гены и ферменты	8
4.2.1. Гипотеза «один ген – один фермент».....	8
<i>Модель Бидла и Татума. Статья этих исследователей начиналась так:</i>	8
4.2.2. Гены и ферменты у человека: современный уровень знаний.....	12
4.2.2.1. Обнаружение и анализ ферментативных нарушений.....	12
4.2.2.2. Типичные нарушения функций ферментов: ферменты эритроцитов	15
4.2.2.3. Мукополисахаридозы	29
4.2.2.5. Влияние кофакторов на активность ферментов [182].....	41
4.2.2.6. Сцепленная с X-хромосомой недостаточность гипоксантин-гуанин—фосфорибозилтрансферазы (30800) [7055].....	45
4.2.2.7. Фенилкетонурия: пример успешного лечения метаболического заболевания [182; 203]	49
4.2.2.8. Выявление гетерозигот.....	53
4.2.2.9. Лечение наследственных метаболических заболеваний [1289; 1057; 1058].....	61
4.2.2.10. Необнаруженные дефекты ферментов	67
4.3. Гемоглобин человека [119; 31; 97a].....	70
4.3.1. История изучения гемоглобина	70
4.3.2. Генетика гемоглобина.....	72
4.3.4. Талассемии [31; 972; 138; 1253; 222; 97a]	88
4.3.5. Популяционная генетика генов гемоглобина (см. [972], разд. 6.1.2.3).....	98
4.3.6. Пренатальная диагностика гемоглобинопатии [966; 2269; 2322; 2361]	98
4.4. Генетика антител и системы антиген/рецептор.....	100
4.5. Фармакогенетика и экогенетика	108
4.5.2. Экогенетика [143; 969; 1228; 1250]	115
4.6. Механизм аутосомной доминантности	119
4.6.1. Аномальная агрегация субъединиц	120
4.6.2. Аномальные субъединицы нарушают функции мультимерных белков	120
4.6.3. Аномальное ингибирование ферментов по типу обратной связи и структурно аномальные ферменты	121
4.6.4. Мутации рецепторов	122
4.6.5. Наследственные дефекты клеточных мембран	124
4.6.6. Накопление аномальных фибриллярных белков: наследственные амилоидозы (10480 10525) [1102].....	124
4.6.7. Доминантно наследуемые опухолевые заболевания	125
4.7. Генетика эмбрионального развития.....	126
4.7.1. Активность генов в раннем развитии.....	127
4.7.2. Поздние стадии эмбрионального развития; фенотипы	129
4.7.3. Регуляция активности генов у бактерий и эукариот.....	130
4.7.4. Соотношения генотипа и фенотипа при хромосомных aberrациях у человека [1176].....	133
4.7.4.1. Эффект дозы генов при трисомиях и картирование генов	133
4.7.4.2. Другие биохимические аномалии при хромосомных aberrациях	133
4.7.4.3. Изучение хромосомных aberrаций на уровне клеток	135
4.7.5. Определение поля	137

5.1.3.4. Возможные различия частот возникновения мутаций у индивидов разного пола	178
5.1.3.5. Герминативноклеточные и соматоклеточные мозаики по доминантным и X-сцепленным мутациям	183
5.1.4. Генные мутации: анализ на молекулярном уровне	185
5.1.4.1. Частоты кодонных мутаций	185
5.1.4.2. Проблема оценки общей частоты мутаций на геном и на поколение	188
5.1.4.3. Мутации в гемоглобиновых генах и генетический код	190
5.1.4.4. Мутации у микроорганизмов: их вклад в понимание механизма мутаций у человека	191
5.1.5. Изучение генных мутаций в отдельных клетках	193
5.1.6. Соматические мутации	196
5.1.6.1. Образование мозаиков по геномным мутациям	196
5.1.6.2. Наследственные синдромы с повышенной нестабильностью хромосом [1465; 1464; 1634]	198
5.1.6.3. Молекулярные механизмы хромосомной нестабильности и образование опухоли, обусловленное соматической мутацией	201
5.1.6.4. Другие факты, свидетельствующие о роли соматической мутации в механизме канцерогенеза [1520]	207
5.1.6.5. Онкогены [1686; 1690, 1691, 1696]	214
5.1.6.6. Рак у человека с точки зрения генетики	218
5.1.6.7. Соматические мутации и старение	220
5.2. Мутации, индуцированные облучением и химическими мутагенами	222
5.2.1. Мутации, индуцированные радиацией	223
5.2.1.1. Основные факты и проблемы, поставленные в ходе их анализа	223
5.2.1.2. Проблема оценки генетического риска, обусловленного радиацией и другими мутагенными факторами окружающей среды	229
5.2.1.3. Результаты изучения мутагенного действия радиации на млекопитающих [1377]	234
5.2.1.4. Облучение популяции человека ионизирующей радиацией	241
5.2.1.5. Насколько может увеличиться частота возникновения спонтанных мутаций ⁹	243
Данные о соматических хромосомных мутациях, возникающих под воздействием радиации	249
5.2.2. Химически индуцированные (мутации)	260
5.2.2.1. Суть проблемы	260
5.2.2.2. Исследовательские стратегии при оценке генетического риска, обусловленного химическими мутагенами	266
5.2.2.3. Каким образом химические мутагены действуют на генетический материал?	266
5.2.2.4. Насколько широким является воздействие агента на человеческую популяцию?	270
5.2.2.5. Какого увеличения частоты спонтанных мутаций, обусловленного химическими мутагенами, следует ожидать?	272
6. Популяционная генетика	278
6.1. Описание популяций	279
6.1.1. Закон Харди—Вайнберга: генные частоты	279
6.1.2. Генетический полиморфизм	280
6.1.3. Наследственные болезни	291
6.2. Систематические изменения генных частот: мутации и отбор	294
6.2.1. Естественный отбор	294
6.2.1.1. Математические модели отбора: дарвиновская приспособленность	294

6.3.2. Концепция генетического груза	349
6.3.2.1. Теория.....	349
6.3.2.2. Практическое применение теории.....	353
6.3.2.3. Критическая оценка	358
6.3.2.4. Более прямые подходы к оценке числа рецессивных генов на индивид	359
6.3.3. Дифференциация субпопуляций: генетическое расстояние	363
6.3.4. Поток генов	364
6.4. Случайные флуктуации генных частот	367
6.4.1. Генетический дрейф.....	367
6.4.2. Генетический дрейф в сочетании с мутационным процессом и отбором	369
Оглавление	377
ЭЛЕКТРОННОЕ ОГЛАВЛЕНИЕ	380