

## СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ В ДНК-ДИАГНОСТИКЕ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

*На основании литературных и собственных данных рассматриваются четыре основных подхода, используемых в настоящее время для диагностики наследственных болезней человека на уровне ДНК. Различные подходы применяются в зависимости от того, известен ли ген, с которым связано заболевание, мутации в нем и характер мутаций. Дальнейшее совершенствование методов ДНК-диагностики и расширение их практического использования будет связано с развитием и разработкой новых методов генетической инженерии, в частности, с выборочной амплификацией определенных участков генома при помощи полимеразной цепной реакции.*

Применение методологических подходов молекулярной генетики и генетической инженерии в исследованиях генома человека позволило расшифровать природу дефектов структуры ДНК, по-новому, на более глубоком уровне поставить и практически решать проблемы диагностики, лечения и профилактики наследственных болезней. Принципиальное достоинство новых путей разработки указанных проблем состоит в том, что они разрешаются на уровне первопричин наследственных заболеваний. Ставится и решается задача обнаружения поражаемого при данном заболевании гена, обнаруживается и характеризуется конкретное нарушение структуры ДНК в гене или его регуляторных элементах и на основе полученных данных разрабатывается методика ДНК-диагностики и подходы к генотерапии.

Наиболее ярким примером практической реализации возможностей молекулярной генетики наследственных болезней человека являются результаты исследования глобиновых генов, с аномалиями структуры и экспрессии которых связаны многочисленные гемоглобинопатии. Показано, что причинами лишь одного наследственного заболевания —  $\beta$ -талассемии — могут быть более 50 различных мутаций, блокирующих практически любой из теоретически возможных этапов реализации генетической информации [1]. Новые данные по молекулярной природе фенилкетонурии, мнодистрофии Дюшенна, по гемофилиям и другим наследственным заболеваниям показывают, что обнаруженный ранее полиаллелизм является правилом не только для талассемий, но и практически для всех наследственных заболеваний, молекулярная природа которых сравнительно хорошо изучена [2—4].

Очевидно, что идеальным решением проблемы диагностики наследственных заболеваний было бы в каждом случае выделение пораженного гена и определение в нем нуклеотидной последовательности. Методы, позволяющие проводить такие исследования, становятся все более простыми и эффективными, но ставить вопрос об их применении для массовой диагностики пока по крайней мере преждевременно. Однако молекулярная генетика в настоящее время располагает и более «практичными» методами, чем определение первичной структуры ДНК. Таковым является детекция специфических нуклеотидных последовательностей в ДНК с помощью блот-гибридизации с меченым зондом [5]. В качестве зонда используется специфическая нуклеотидная последовательность, клонированная из генома с помощью методов генетической инженерии, кДНК соответствующего гена или синтетический олигонуклеотид, полученный на основе данных о нуклеотидной последовательности гена. Этот метод, предложенный в 1975 г., оказался настолько удачным и информативным, что уже почти 15 лет без принципиальных модификаций он широко и плодотворно используется как в теоретических, так и в прикладных работах по молекулярной генетике. Именно он служит главной методической основой практической диагностики наследственных болезней. Здесь следует отметить еще одно существенное достоинство ДНК-диагностики: независимо от того, какая цитологическая форма диагностируется, технологические основы диаг-

ностики универсальны, что позволяет легко переоборудовать на диагностику иного заболевания.

В настоящее время в ДНК-диагностике наследственных болезней можно выделить четыре основных подхода. Они применяются в зависимости от того, известен или нет ген, с аномалией которого связано данное заболевание, клонирован или нет этот ген либо ДНК-копия его мРНК, известна или нет природа мутации, вызывающей заболевание, и насколько широко распространена именно данная мутация в различных случаях данного заболевания в данной популяции, в данном географическом регионе.

**Первый подход** — прямая детекция мутаций, главным образом полинуклеотидных (протяженные делеции, инверсии, транслокации). Он применяется, когда мутантный ген известен, ген или его кДНК клонированы, распространенность и природа мутации установлены и природа ее такова, что заметно изменяет по сравнению с нормой набор сайтов узнавания хотя бы одной рестриктазы, расстояния между сайтами и вследствие этого изменяются величины фрагментов, выявляемых зондом, по сравнению с нормой. Практически такого рода мутации были впервые описаны для глобиновых генов при ряде форм талассемий [6]. Они встречаются в различных регионах распространения талассемии, обнаружены и в СССР [7]. В настоящее время известно уже около 20 заболеваний, связанных с такими мутациями [8]. Так, изолированный дефицит гормона роста типа IA связан с утратой участка генома, содержащего основной ген семейства гормонов роста [9]. Поэтому при блот-анализе ДНК больных не выявляется *BamHI*-специфический фрагмент (3,8 т. п. н.), в котором локализован этот ген.

Нами была проанализирована ДНК трех больных детей с подозрением на изолированный дефицит гормона роста типа IA и их родителей. Ни у пациентов, ни у родителей картина распределения *BamHI*-фрагментов не отличалась от нормы. В случае расщепления ДНК рестриктазой *HindIII* также наблюдались лишь фрагменты, характерные для нормы, а фрагмент размером 18,5 т. п. н., возникающий вследствие делеции, отсутствовал [10]. Таким образом, у больных детей был исключен диагноз изолированного дефицита гормона роста типа IA, связанного с делецией гена гормона роста, и показано, что ни они, ни их родители не являются носителями такой делеции.

В некоторых случаях с помощью стандартного блот-анализа можно выявлять и точечные мутации. Это возможно, когда мутация приводит к исчезновению или появлению нового сайта узнавания какой-либо рестрикционной эндонуклеазы. Такие события довольно редки: сайт узнавания, в котором должна произойти мутация, встречается в среднем 1 раз на несколько сотен пар оснований ДНК, если рестриктаза узнает четырехнуклеотидную последовательность, и 1 раз на несколько тысяч пар оснований, если сайт узнавания рестриктазы шестинуклеотидный. Тем не менее такие случаи не только возможны теоретически, но и встречаются в практике. Например, серповидноклеточная анемия — одна из распространенных гемоглобинопатий — связана с единственной трансверсией, в результате которой исчезают перекрывающиеся друг друга сайты узнавания рестриктаз *MstII* и *DdeI*. Поэтому при блотинге обнаруживаются фрагменты, существенно большие, чем в норме [11]. На основе этих данных разработаны эффективные системы ДНК-диагностики серповидноклеточной анемии и ее носительства, включая пренатальную диагностику [12].

**Второй подход** в ДНК-диагностике применяется для детекции точечных мутаций, не затрагивающих сайты узнавания рестриктаз. Среди причин наследственных заболеваний такие мутации составляют, вероятно, абсолютное большинство. Для осуществления их детекции необходимы, как минимум, сведения о последовательности нуклеотидов на участке гена, где локализована мутация, в норме и при патологии, а также сведения о распространенности именно данной мутации как причины заболевания в данном географическом регионе.

Детекция точечных мутаций осуществляется следующим образом. С помощью методов органической химии синтезируются два олигонуклеотида, перекрывающих место мутации: один — комплементарный нормальной последовательности, другой — мутантной. Длина и состав олигонуклеотидов подбираются так, чтобы они могли «почувствовать» даже единичную замену нуклеотида в ДНК — гибридизовались бы с полностью комплементарной последовательностью и не гибридизовались бы даже в случае замены лишь одного нуклеотида. Длина олигонуклеотидов составляет обычно от 18 до 20 звеньев. В наиболее распространенном варианте их интенсивно метят радиоактивным изотопом и используют для детекции мутаций. Принцип детекции прост: зонд, соответствующий мутантной последовательности, гибридизуется с ДНК гомозигот по мутантному гену и гетерозигот-носителей, но не гибридизуется с нормальной ДНК здорового человека. Олигонуклеотид-зонд, соответствующий нормальной последовательности, гибридизуется с ДНК здоровых людей и гетерозигот, но не гибридизуется с ДНК гомозигот по мутантному гену. Однако осуществить детекцию с ДНК, просто нанесенной на фильтр в виде пятна, до последнего времени не удавалось: с олигонуклеотидами наблюдался высокий уровень неспецифической сорбции, маскировавшей истинный сигнал. Поэтому на практике детекцию с олигонуклеотидными зондами проводили обычно также с помощью блоттинга. Если тестируемая последовательность определялась в составе фракционированных фрагментов величиной менее 2—3 т. п. н., неспецифическая сорбция в этих диапазонах была достаточно низкой и позволяла осуществить детекцию. В последнее время проведен ряд методических разработок (о них будет сказано ниже), которые позволяют существенно упростить ДНК-диагностику с помощью олигонуклеотидов. Применение же этого подхода даст прекрасные результаты не только в эксперименте, но и на практике. Так, в течение около 5 лет на о-ве Сардиния (Италия), где основной причиной  $\beta$ -талассемии является точечная мутация в 39-м кодоне гена  $\beta$ -глобина, проводится обследование и массовая пренатальная ДНК-диагностика данного заболевания в отягощенных семьях. В результате заболеваемость среди родившихся за этот период удалось снизить во много раз [13].

Детекция точечных мутаций с помощью олигонуклеотидов сейчас возможна для широкого спектра гемоглобинопатий, фенилкетонурии, дефицита  $\alpha_1$ -антитрипсина и ряда других заболеваний. По мере установления природы дефектов структуры ДНК при наследственных болезнях возможности применения этого наиболее точного подхода в ДНК-диагностике будут появляться и для других заболеваний.

**Третий подход** ДНК-диагностики применяется в тех случаях, когда известен ген, но не известна природа мутации, приводящей к заболеванию. Он основан на семейном анализе распределения так называемых нормальных полиморфных сайтов узнавания рестриктаз в гене, изучении нормального полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Известно, что основную часть ДНК высших эукариот занимают нуклеотидные последовательности, не кодирующие структуру белков — интроны, межгенные промежутки и др. В них с гораздо большей вероятностью, чем в кодирующих областях, могут быть и действительно наблюдаются вариации, нейтральные по отношению к фенотипу. Они встречаются с частотой один на несколько сотен пар нуклеотидов и наследуются в поколениях в полном соответствии с законами Менделя. Вследствие этих вариаций могут появляться или исчезать сайты узнавания рестриктаз, меняться расстояния между сайтами. В результате при анализе ДНК блоттингом наряду с константными могут наблюдаться и переменные полиморфные рестрикционные фрагменты. С помощью различных форм ПДРФ оказалось возможным в случае конкретных семей маркировать как нормальный, так и патологический гены, определять их наличие у членов данной родословной, осуществлять пренатальную диагностику. Задача состоит в том, чтобы

подобрать одну или две различные рестриктазы, по ПДРФ которых родители гетерозиготны, а больной — гомозиготен. Например, в семье, отягощенной по аутосомно-рецессивному заболеванию фенилкетонурии, оба родителя, являющихся гетерозиготами-носителями, гетерозиготны по MspI-специфическим фрагментам 23/19 т. п. н., а больной ребенок гомозиготен по фрагменту 19 т. п. н. [14]. Очевидно, что у обоих супругов-носителей патологический ген маркирован вариантом ПДРФ 19 т. п. н. Если пренатальная диагностика при следующей беременности выявит у плода гомозиготность по фрагменту 23 т. п. н., то ребенок будет здоровым, в случае же гетерозиготности (23/19 т. п. н.) — носителем фенилкетонурии.

Как уже отмечалось, наличие у человека той или иной формы нормального ПДРФ — событие по сути чисто вероятностное. Так, в гене фенилаланингидроксилазы, с которым связана фенилкетонурия, ПДРФ был найден для 7 из примерно 20 проверенных рестриктаз, причем для 3 из них — более чем по одной паре альтернативных вариантов [15]. Большинство из них встречалось с частотой, близкой к 50 %. Мы обнаружили в этом гене еще один ПДРФ [16]. В общем же в европейских популяциях по ПДРФ можно диагностировать фенилкетонурию примерно в 90 % отягощенных семей. При заболеваниях, для которых известно меньше вариантов ПДРФ или их частоты существенно отличаются от 50 %, вероятность диагностики применительно к среднестатистической семье уменьшается. В общем же в настоящее время ДНК-диагностика по распределению вариантов нормального ПДРФ генов в семьях возможна для нескольких десятков наследственных болезней.

С другой стороны, результаты анализа ПДРФ очень важны и в исследованиях более общего плана. Так, частота встречаемости полиморфных сайтов в настоящее время становится одной из фундаментальных характеристик различных человеческих популяций [17]. Наши данные, например, показали, что по частоте встречаемости ряда полиморфных сайтов в кластере генов семейства гормонов роста русские популяции существенно отличаются от бурят, относящихся к монголоидам [18]. Но такие различия необязательны в случае других ПДРФ-маркеров, например, по ПДРФ в гене фенилаланингидроксилазы. На основании полученных результатов для трех популяций — русских из Москвы с высоким уровнем панмиксии, русских г. Егорьевска с существенно меньшим уровнем панмиксии и для бурят Забайкалья мы получили такие важные характеристики популяций, как величины инбридинга, генетические расстояния.

**Четвертый подход** наиболее ярко демонстрирует возможности и достоинства ДНК-диагностики, ее универсальность. Реализация его позволяет диагностировать даже наследственные заболевания, для которых не известны ни гены, с которыми они связаны, ни первичные биохимические дефекты. Участок, на котором анализируются полиморфные сайты, необязательно должен быть локализован в гене. Достаточно, чтобы он находился вне пока еще неизвестного гена, но достаточно близко от него, чтобы частота рекомбинаций между маркером заболевания и полиморфным маркером была как можно ниже.

Предварительные и наиболее трудоемкие исследования, которые требуется провести для создания системы диагностики какого-либо определенного заболевания с помощью данного подхода, сводятся к решению задачи поиска среди полиморфных ДНК-зондов уникальных последовательностей ДНК, клонированных из генома, такого или таких, которые наиболее тесно сцеплены с маркером заболевания. Для этого анализируют ДНК из многих тщательно охарактеризованных информативных семей, применяют специальный математический аппарат. Если задача поиска тесно сцепленных с маркером заболевания ПДРФ-зондов успешно решена, то для диагностики этого уже достаточно, и она осуществляется так же, как в описанном выше случае фенилкетонурии.

Далее с помощью методов молекулярной генетики и генетической инженерии можно локализовать отобранные ПДРФ-маркеры, а, следовательно, и маркер заболевания на определенном участке одной из хромосом, выделить ген, ответственный за заболевание, охарактеризовать соответствующие мРНК и белок в норме и при патологии. Таким образом реализуется стратегический подход, получивший название «генетика наоборот», или «обратная генетика», когда от признака, минуя белок и мРНК, выходят непосредственно на ген, а мРНК и белок ищут и анализируют уже после того.

Исторически первым примером успешной реализации данного подхода была разработка Гузеллой и сотрудниками системы ДНК-диагностики хореи Гентингтона [19]. Эта работа в середине 80-х годов произвела настоящую сенсацию, так как за предыдущие 100 лет изучения этого тяжелейшего наследственного заболевания удалось достоверно выяснить лишь то, что оно является аутосомно-доминантным и моногенным. Ни первичный биохимический дефект, ни ген, ни даже хромосому, на которой следует искать этот ген, ранее, несмотря на настойчивые попытки, установить не удавалось. А работы Гузеллы сразу дали точную информативную систему диагностики заболевания, включающую и доклиническую, и пренатальную диагностику, и выявление носительства. Последнее в случае аутосомно-доминантных болезней фактически является доклинической диагностикой.

Позже были найдены надежные ПДРФ-маркеры и разработаны системы ДНК-диагностики для ряда X-сцепленных заболеваний (в частности, для миодистрофии Дюшенна), многих аутосомно-доминантных и аутосомно-рецессивных болезней, в том числе для муковисцидоза, который наиболее часто встречается в европеоидных популяциях. Всего с помощью близко сцепленных ПДРФ-маркеров уже можно диагностировать несколько десятков наследственных болезней. Для названных и еще некоторых заболеваний уже в той или иной мере пройден путь до гена. В случае миодистрофии Дюшенна стратегический подход «генетики наоборот» реализован полностью: с помощью ПДРФ-маркеров был клонирован и исследован ген, являющийся, вероятно, самым крупным из известных генов человека, а затем выделены и охарактеризованы кодируемые этим геном мРНК и белок, названный дистрофином [20].

В настоящее время уже возможна ДНК-диагностика более 100 наследственных болезней, в том числе и наиболее часто встречающихся, наиболее актуальных с точки зрения здравоохранения. Общая тенденция развития и совершенствования систем ДНК-диагностики представляется достаточно ясной — от диагностики с помощью ПДРФ-маркеров, сцепленных с маркером заболевания, к точному обнаружению мутаций в пораженном гене с помощью олигонуклеотидов или другими способами. В последние годы выполнен ряд методических разработок, которые позволяют существенно упростить и ускорить ДНК-диагностику. Это усовершенствованные методы получения зондов с высокой удельной радиоактивностью, применение нерадиоактивных зондов, меченных ферментами или флюорохромами, гибридизация с зондами в геле, автоматический синтез олигонуклеотидов и др. Среди новых методов следует особо отметить методику так называемой «полимеразной цепной реакции» (ПЦР), которая, по мнению специалистов, революционизирует и ДНК-диагностику, и ряд других областей молекулярной генетики. Основная трудность, которую приходится преодолевать при ДНК-диагностике, связана с необходимостью работать на уникальных генах. Величина уникального гена составляет  $10^{-6}$ — $10^{-5}$  часть генома человека, и поэтому детекция проводится на ничтожно малом количестве материала. ПЦР позволяет в течение короткого времени выборочно амплифицировать интересующий исследователя участок генома. Его содержание в образце при этом увеличивается в сотни тысяч и миллионы раз, что позволяет наблюдать амплифицированный участок после электрофореза в геле без применения зондов, по окраске бромидом

стым этидием или серебром [21]. Это позволяет проводить детекцию полиморфных сайтов по распределению окрашенных в геле после электрофореза фрагментов, проводить гибридизацию с олигонуклеотидами в пятне, нанесенном на фильтр, пользоваться при этом как радиоактивными зондами, так и зондами с ферментативной или флюоресцентной меткой. Используя ПЦР, нам совместно с сотрудниками других институтов, удалось довольно быстро обследовать несколько десятков семей, отягощенных муковисцидозом, осуществить его пренатальную диагностику [22], а также показать, что в популяциях СССР имеются по крайней мере две точечные мутации из наиболее часто встречающихся как причины фенилкетонурии [23]. Другие советские исследователи с помощью ПЦР охарактеризовали несколько точечных мутаций при  $\beta$ -талассемии, распространенной в южных регионах СССР, среди которых нашли и новую, ранее не описанную мутацию [24, 25], и осуществили ДНК-диагностику  $\beta$ -талассемии. Системы ДНК-диагностики с помощью ПЦР описаны пока менее чем для 10 наследственных болезней. Они оказались настолько эффективными и недорогими, что, например, в случае некоторых наиболее распространенных мутаций при фенилкетонурии уже ставится вопрос о применении их для массового скрининга новорожденных и для медико-генетического консультирования супружеских пар [26]. Несомненно, что список нозологических форм заболеваний, диагностируемых с помощью ПЦР, будет быстро увеличиваться.

Таким образом, молекулярно-генетическая диагностика наследственных болезней, основанная на анализе структуры геномной ДНК человека, стала эффективным средством в диагностике и профилактике наследственной патологии. Ее роль в решении этих проблем здравоохранения будет возрастать. Как показывают оценки и уже имеющийся опыт, ДНК-диагностика наиболее эффективна при медико-генетическом консультировании в отягощенных семьях для выявления гетерозиготного носительства и при пренатальной диагностике плода. Она позволяет проводить точную раннюю и доклиническую диагностику, что очень важно для дальнейшего лечения болезни как традиционными способами, так и в будущем для лечения с помощью генотерапии. В случае применения ДНК-диагностики для генотерапии на соматических клетках принципиально новые трудности вряд ли возникнут, так как данный подход во многом аналогичен традиционной терапии. В случае генотерапии на зародышевых клетках даже принципиальная возможность практического применения на человеке пока не представляется бесспорной. Одним из значительных препятствий является, например, невозможность постановки диагноза на уровне оплодотворенной яйцеклетки, на ранних стадиях развития зародыша. Методов ДНК-диагностики без экстракции ДНК из клеток, как и какой-либо другой неразрушающей диагностики, пока нет. Но ДНК-диагностику можно осуществить уже тогда, когда из зародыша можно без вреда взять хотя бы несколько клеток. Вероятно, и для генотерапии молекулярно-генетическая диагностика на уровне структуры ДНК будет не менее информативной и эффективной, чем для профилактики и лечения наследственных болезней известными способами.

## PRESENT APPROACHES IN DNA-DIAGNOSIS OF HEREDITARY DISEASES

*V. N. Kalinin*

Institute of Medical Genetics,  
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

### Summary

Advantage in principle of DNA-diagnosis is that it is performed at the level of the original cause of a hereditary disease, by detection of the damaged gene and identifica-

tion of the nature of its structural anomaly. DNA-diagnosis is especially effective in prenatal and preclinical diagnosis, in heterozygote carrier detection.

DNA-diagnosis is performed by blotting-analysis, a universal methodical approach. Recently a new highly effective method has been developed: a selective amplification of the DNA region under study by the polymerase chain reaction.

It is possible to divide the DNA-diagnosis into four basic approaches. They are used: 1) when the damaged gene is known and its mutation is a polynucleotide anomaly in the structure; 2) when the damaged gene has a point mutation of the known nature; 3) when the damaged gene is known, but the nature of its mutations is unknown; 4) when neither damaged gene, nor its mutation are known. DNA-diagnosis is now possible to apply in more than 100 hereditary diseases, including the most common diseases: cystic fibrosis, phenylketouria, thalassemias, hemophilias, etc.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Antonarakis S. E., Kazazian H., Orkin S. H. DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters // *Hum. Genet.*— 1985.— 69, N 1.— P. 1—14.
2. Extensive restriction site polymorphism at the human phenylalanine hydroxylase locus and application in prenatal diagnosis of phenylketonuria / A. S. Lidsky, F. D. Ledley, A. G. DiLella et al. // *Amer. J. Hum. Genet.*— 1985.— 37, N 4.— P. 619—634.
3. Cooper D. N., Schmidke J. Diagnosis of genetic disease using recombinant DNA // *Hum. Genet.*— 1986.— 73, N 1.— P. 1—11.
4. Detection of eight new mutations in hemophilia A / H. Youssoufian, S. E. Antonarakis, D. G. Phillips et al. // *Abstr. 7th Int. Congr. of hum. genet.*— Berlin, 1986.— P. 656.
5. Southern E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis // *J. Mol. Biol.*— 1975.— 98, N 4.— P. 503—517.
6. Kan Y. M., Dozy A. M. Polymorphism of DNA sequence adjacent to the human  $\beta$ -globin structural gene: Relationship to sickle mutation // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1978.— 75, N 12.— P. 5631—5635.
7. Лимборская С. А. Молекулярно-генетические исследования наследственных дефектов экспрессии генов человека // *Молекуляр. генетика, микробиология, вирусология.*— 1983.— № 5.— С. 3—11.
8. Cooper D. N., Schmidke J. Diagnosis of genetic disease using recombinant DNA. Supplement // *Hum. Genet.*— 1987.— 77, N 1.— P. 66—75.
9. Molecular basis for familial isolated growth hormone deficiency / J. A. Phillips, B. L. Hjelle, P. H. Seeburg, M. Zachmann // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1981.— 78, N 11.— P. 6372—6375.
10. Использование генов гормона роста для диагностики заболевания карликовостью / В. Н. Калинин, Г. И. Шипшина, М. Л. Кикодзе и др. // *Молекуляр. генетика, микробиология, вирусология.*— 1988.— № 6.— С. 30—32.
11. Direct identification of sickle cell anemia by blot hybridization / R. F. Geever, L. B. Wilson, F. S. Nallaseth et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1981.— 78, N 9.— P. 5081—5085.
12. Chang J. C., Kan Y. W. A sensitive new prenatal test for sickle cell anemia // *New Engl. J. Med.*— 1982.— 307, N 1.— P. 30—32.
13. Prenatal diagnosis of  $\beta$ -thalassemia by oligonucleotide analysis in Mediterranean populations / M. C. Rosatelli, T. Tuveri, M. T. Scialas et al. // *J. Med. Genet.*— 1988.— 25, N 11.— P. 762—765.
14. Prenatal diagnosis of classical phenylketonuria by gene mapping / S. L. C. Woo, A. S. Lidsky, F. Güttler et al. // *J. Amer. Med. Assn.*— 1984.— 251, N 5.— P. 1998—2002.
15. Polymorphic DNA haplotypes at the human phenylalanine hydroxylase locus and their relationship with phenylketonuria / R. Chakraborty, A. S. Lidsky, S. P. Daiger et al. // *Hum. Genet.*— 1987.— 76, N 1.— P. 40—46.
16. New possibilities in prenatal diagnosis of phenylketonuria / V. N. Kalinin, O. L. Mazurova, V. V. Chestkov, S. S. Snishkin // *Proc. and Abstr. 7th ICHG-Satellite workshop on «New techniques and approaches to the molecular study of human inherited disease».*— Genoa, 1986.— P. 224.
17. DNA markers and genetic variation in the human species / L. L. Cavalli-Sforza, J. R. Kidd, K. K. Kidd et al. // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*— 1986.— 51.— P. 355—362.
18. Системы молекулярно-генетической диагностики изолированного дефицита гормона роста и фенилкетонурии / В. Н. Калинин, Г. И. Шипшина, О. Л. Мазурова и др. // *Тез. докл. Всесоюз. симпозиум «Актуальные вопросы профилактики наследственных болезней».*— Вильнюс, 1986.— С. 43—44.
19. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease / J. F. Gusella, N. S. Wexler, P. M. Conneally et al. // *Nature.*— 1983.— 306, N 5940.— P. 234—238.
20. Hoffman E. P., Brown R. H., Kunkel L. M. Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus // *Cell.*— 1987.— 51, N 6.— P. 919—928.
21. Kogan S. C., Doherty M., Gitschier J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A // *New Engl. J. Med.*— 1987.— 317, N 16.— P. 985—990.

22. Популяционный и семейный анализ методом блот-гибридизации полиморфизма сайтов ДНК, сцепленных с геном муковисцидоза / О. В. Воронина, В. С. Гайцхоки, Т. Э. Иващенко и др. // Биополимеры и клетка.— 1990.— 6, № 2.— С. 65—71.
23. Молекулярная природа некоторых мутаций как причин фенилкетонурии в популяциях СССР / В. Н. Калинин, Е. И. Шварц, Б. В. Скрябин и др. // Тез. докл. II Всесоюз. съезда мед. генетиков.— Алма-Ата, 1990.— С. 17.
24. Молекулярная природа делеции при  $\beta^0$ -талассемии, установленная с помощью метода амплификации геномной ДНК *in vitro* / Е. И. Шварц, А. А. Гольцов, О. К. Кобозев и др. // Биоорг. химия.— 1989.— 15, № 4.— С. 556—559.
25. Характер двух мутационных повреждений  $\beta$ -глобинового гена при  $\beta^0$ -талассемии в Азербайджане / А. А. Гольцов, В. Л. Суриц, А. В. Лукьяненко и др. // Там же.— 1989.— 15, № 7.— С. 1001—1002.
26. DiLella A. G., Huang W.-M., Woo S. J. C. Screening for phenylketonuria mutations by DNA amplification with the polymerase chain reaction // Lancet.— 1988.— 1, N 8584.— P. 497—499.

Ин-т мед. генетики АМН СССР, Москва

Получено 05.10.89

УДК [575.1/2:599.9]:577.2

Т. И. Бужиевская, В. Ю. Черненко, Л. А. Полищук

## СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ НАСЛЕДСТВЕННОГО ДЕФИЦИТА $\alpha_1$ -ИНГИБИТОРА ПРОТЕАЗ

*Изложены молекулярно-генетические основы наследственного дефицита  $\alpha_1$ -ингибитора протеаз, приведен обзор литературных данных по современным подходам к генной терапии данной патологии у человека.*

Наследственный дефицит  $\alpha_1$ -ингибитора протеаз ( $\alpha_1$ ИП) в настоящее время является одним из наиболее изученных наследственных заболеваний человека в отношении этнопатогенетических его основ и ассоциации с соматической патологией [1—3].

Актуальность изучения данной патологии обусловлена высокой частотой ее распространения в популяциях, которая носит ярко выраженный клановый характер и колеблется от 1 : 40 000 в Южной Италии [4] до 1 : 1 750 в Швеции [5] (гомозиготное носительство Z-аллеля  $\alpha_1$ ИП). Это свидетельствует о том, что 1—3 % населения Европы является гетерозиготным носителем патологического Z-аллеля [4].

Согласно данным популяционных исследований генетического полиморфизма  $\alpha_1$ ИП у населения центрального региона Украины, проведенных в отделе генетики человека Ин-та молекуляр. биологии и генетики (ИМБиг) АН УССР в 1984—87 гг., частота гетерозиготного носительства патологического Z-варианта составляет 1,5 %. Последняя согласуется с данными по другим популяциям европейской части СССР [6—8]. Частота гомозиготных носителей Z-гена в группе больных с хроническими бронхо-легочными заболеваниями составила 1 : 400 (всего обследованы 811 пациентов Киевского НИИ туберкулеза, пульмонологии и грудной хирургии МЗ УССР), что в 12 раз превышает среднюю частоту в европейских популяциях [9]. Частота же гетерозиготных носителей «дефицитных» генов в группе патологии составила 7 %. Полученные результаты согласуются с литературными данными о взаимосвязи между патологическими вариантами ингибитора и заболеваниями легких у людей [3, 4]. Определение генетических вариантов  $\alpha_1$ ИП проводили изоэлектрическим фокусированием образцов сыворотки крови в искусственном борат-глицериновом pH-градиенте. Данный методический подход был разработан в отделе генетики человека ИМБиг АН УССР.

$\alpha_1$ ИП является одним из основных регуляторов деструктивно-пролиферативных процессов в организме человека. Это поливалентный