

75. Wu G. Y., Wu C. H. Receptor-mediated *in vitro* gene transformation by a soluble DNA-carrier system // J. Biol. Chem.—1987.—262, N 10.— P. 4429—4432.
76. Parkman R. The application of bone marrow transplantation to the treatment of genetic diseases // Science.—1986.—232, N 4756.— P. 1373—1378.
77. Louis D. S., Verma I. D. An alternative approach to somatic cell gene therapy // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1988.—85, N 9.— P. 3150—3154.
78. Wilson J., Jefferson D. M., Chowdhury J. R. Retrovirus-mediated transduction of adult hepatocytes // Ibid.— P. 3014—3018.
79. Palmer T. D., Hock R. A., Osborne W. Efficient retrovirus-mediated transfer and expression of a human adenosine deaminase gene in diploid fibroblasts from an adenosine deaminase-deficient human // Ibid.—1987.—84, N 4.— P. 1055—1059.
80. Complete correction of the enzymatic defect of type I Goucher disease fibroblasts by retroviral-mediated gene transfer / J. Sorge, W. Kuhl, C. West, E. Beutler // Ibid.— P. 906—909.
81. Correction of the genetic defect in hepatocytes from the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits / J. M. Wilson, D. E. Johnston, D. M. Jefferson, R. C. Milligan // Ibid.—1988.—85, N 12.— P. 4421—4425.
82. Efficient expression of retroviral vector-transduced human low density lipoprotein (LDL) receptor in LDL-receptor-deficient rabbit fibroblasts *in vitro* / A. Miyanojara, M. F. Sharkey, J. L. Witztum et al. // Ibid.— N 17.— P. 6538—6542.

НИИ эксперим. медицины АМН СССР, Ленинград

Получено 13.06.89

УДК 616—055.5/7—084:614:061.14

**В. С. Баранов**

## **ПРОБЛЕМЫ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ И ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ ИХ КОРРЕКЦИИ**

*В работе дается определение пренатальной диагностики (ПД) как нового научного направления медицинской генетики, целью которого является изучение функций генома развивающегося зародыша человека в норме и патологии, его взаимодействий с митохондрическим организмом и разработка на этой основе оптимальных путей профилактики, диагностики и, в перспективе,— лечения наследственных болезней. Рассмотрены наиболее актуальные задачи ПД, непосредственно связанные с широким применением молекулярно-генетических методов исследования. Таковыми для диагностики моногенных болезней являются: ПДРФ-анализ семей высокого риска и создание банков ДНК-данных; необходимость широкого внедрения полимеразной цепной реакции синтеза ДНК; поиск новых диагностических полиморфных сайтов; анализ молекулярной природы патологических мутаций; выяснение первичных биомеханизмов действия мутантных генов. Актуальные задачи ПД хромосомных болезней включают: анализ хромосомных аберраций при помощи хромосом-специфических ДНК-зондов; исследование геноза анеуплоидии; анализ хромосомного мозаицизма; разработка неинвазивных методов определения пола и кариотипирования плода. Кратко обсуждаются основные подходы к проблеме коррекции генетических дефектов и терапии наследственных болезней на разных стадиях онтогенеза человека.*

ПД — сравнительно новое направление медицинской генетики, по праву занимающее центральное место в комплексе мероприятий по профилактике и предупреждению наследственных болезней [1, 2]. Возникшая на стыке медицины и многих биологических наук ПД преследует сугубо практическую цель: своевременное выявление и предупреждение рождения плодов с тяжелыми пороками развития и наследственными болезнями, которая достигается при помощи самых разнообразных медицинских подходов и привлечения богатого арсенала разнообразных биохимических, цитогенетических, а в последние годы и молекулярных методов исследования. Вместе с тем сегодня становится все более очевидным, что ПД — отнюдь не простой набор методов. По мере развития ПД все больше трансформируется в самостоятельное научное направление со своими задачами, методами и предметом исследования. По сути ПД следует рассматривать как клиническую (медицинскую) генетику развития человека, основной задачей которой является изу-

чение особенностей реализации генетической информации развивающегося зародыша человека в норме и патологии на молекулярном, клеточном, тканевом и организменном уровнях с целью разработки оптимальных способов профилактики, диагностики и, впоследствии, лечения наследственных болезней.

Целью работы является рассмотрение наиболее актуальных задач ПД, сосредоточив основное внимание на тех из них, которые непосредственно связаны с использованием молекулярно-генетических подходов в диагностике как моногенной, так и хромосомной патологии, а также возможные пути пренатальной коррекции наследственных болезней.

Основные принципы молекулярной диагностики наследственных болезней подробно изложены в многочисленных обзорах и главах монографий как зарубежных [3—5], так и отечественных [1, 2, 6—10] авторов. Наиболее распространенным подходом является диагностика с помощью сцепленных маркеров, представляющих собой полиморфные сайты молекул ДНК внутри мутировавшего гена или расположенные в непосредственной близости от него и узнаваемые при помощи специфических эндонуклеаз (рестриктаз). Разрезание ДНК соответствующими рестриктазами и анализ полученных фрагментов позволяют выявить полиморфизм длины рестрикционных фрагментов, т. е. провести ПДРФ-анализ. Величина аллельного полиморфизма уникальна для каждого полиморфного сайта, подвержена значительным популяционным колебаниям и может существенно варьировать в зависимости от наличия или отсутствия мутации исследуемого гена. Поэтому изучение ПДРФ локусов, тесно сцепленных с мутантным геном, в популяции, в семьях высокого риска (гетерозиготных носителей) и у больных — первый и очень важный этап молекулярной диагностики наследственных болезней, представляющий собой одну из актуальных задач ПД. Особенно наглядно это иллюстрирует пример с муковисцидозом (МВ) — наиболее распространенным летальным наследственным заболеванием. ПДРФ-анализ локусов, сцепленных с геном МВ, позволил выявить достоверное сцепление определенных аллелей локуса *D7S23* (зонды *KM-19*, *CS-7* и *XV-2c*) с мутантным геном. Сцепление оказалось настолько сильным, что определенные аллели этого локуса в 80—90 % случаев были характерны для хромосом с геном МВ и не встречались у хромосом с нормальным аллелем этого гена [11, 13]. Такое неравновесное сцепление оказалось особенно удобным для маркирования мутации МВ и существенно расширило возможности ДНК-зондовой диагностики МВ. ПДРФ-анализ семей высокого риска с использованием различных ДНК-зондов и различных полиморфных сайтов позволяет заранее оценить информативность каждой семьи, ее пригодность для последующей ПД молекулярными методами. Эти результаты после соответствующей обработки должны вводиться в память компьютеров и сохраняться в виде банка ДНК-данных. Создание региональных, а затем на их основе союзных банков ДНК-данных является важным и совершенно необходимым итогом ПДРФ-анализа семей высокого риска. Такие банки данных уже созданы во многих западных странах. Большая потребность в них имеется и в нашей стране.

Актуальной задачей ПД является настоятельная необходимость широкого внедрения метода полимеразной цепной реакции синтеза ДНК (реакции специфической амплификации — ПСА). Простота, хорошая воспроизводимость, возможность диагностики в день забора материала без использования радиоактивной метки быстро превратила ПСА в один из наиболее эффективных методов молекулярной биологии [13]. Очень перспективно ее широкое внедрение и в ПД. ПСА уже стала основным методом ПД таких распространенных наследственных заболеваний, как МВ [12, 14, 15], гемофилия А [16]. Она с успехом применяется для быстрого и надежного определения пола плода [17]. Так, в случае МВ ПСА для полиморфных сайтов *KM-19* и *CS-7* позволила решить проблему ПД у 70 % семей высокого риска [14, 15]. Основываясь на факте неравновесного сцепления аллелей локуса *D7S23*

с геном МВ (см. выше) и учитывая высокую эффективность РСА и ее сравнительно низкую себестоимость, представляется вполне реальным использование данного метода и для скринирования гетерозиготного носительства гена МВ. Весьма перспективно внедрение РСА для экспресс-диагностики и многих других наследственных болезней (фенилкетонурии, миодистрофии Дюшенна и др.). Естественно, что для этого в каждом случае необходимо точное знание нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК, фланкирующих полиморфный сайт. Выяснение первичной структуры этих фрагментов и разработка на его основе удобных олиго-праймеров при современном уровне генноинженерных исследований — вполне реальная задача.

В качестве других актуальных проблем ПД моногенных болезней можно также назвать поиск новых диагностических полиморфных сайтов с высокой степенью информативности в семьях высокого риска, анализ тонкой структуры мутантных генов, и, наконец, выяснение первичных биомеханизмов их действия. Быстро увеличивающийся список специфических рестрикционных эндонуклеаз, получение и клонирование все новых ДНК-зондов для каждого заболевания с описанием их первичной структуры, выяснение молекулярной природы патологических мутаций открывают большие перспективы для разработки оптимальной стратегии ПД все большего числа наследственных болезней. Уже в 1988 г. число заболеваний, диагностируемых молекулярными методами, достигло 170 [14] и продолжает стремительно увеличиваться. Используя принцип обратной генетики (т. е. двигаясь от первичной структуры гена к признаку (белку)), в ряде случаев (миодистрофия Дюшенна) удалось идентифицировать белковый продукт, кодируемый мутантным геном. Такой подход делает вполне реальным комплексную диагностику заболевания как молекулярными, так и биохимическими методами.

Среди задач ПД хромосомных болезней, решаемых методами молекулярной биологии, наиболее актуальными являются: 1) анализ хромосомных aberrаций при помощи хромосом-специфических ДНК-зондов; 2) исследование генеза анеуплоидии в потомстве; 3) изучение хромосомного мозаицизма; 4) разработка неинвазивных методов определения пола. Рассмотрим каждую из этих задач.

В настоящее время практически для каждой хромосомы человека известны специфические повторяющиеся последовательности, как правило, расположенные околоцентромерной альфондной ДНК [16]. Кроме того, для каждой хромосомы человека получены сотни уникальных последовательностей как анонимных, так и известных структурных генов и идентифицированы многочисленные полиморфные сайты рестрикции. Используя этот богатый материал, уже сейчас представляется вполне реальным значительное повышение эффективности столь трудоемких и зачастую малоинформативных стандартных цитогенетических исследований. Применение хромосом-специфических ДНК-зондов позволяет с легкостью идентифицировать нужные хромосомы не только на метафазных пластинках, но, что особенно важно, регистрировать их число и положение в интерфазном ядре. Все это не только повышает эффективность ПД анеуплоидии, но и позволяет широко использовать автоматическую сканирующую технику. Хромосом-специфические зонды все чаще применяются и для выяснения природы структурных перестроек, затрагивающих центромерную область хромосом, для диагностики пола плода, скринирования числовых нарушений геномом. Повышенный интерес к таким зондам в последние годы объясняется также широкой возможностью использования нерадиоактивной метки.

В плане прогноза потомства принципиально важно выяснить генез обнаруженной анеуплоидии, т. е. устанавливается ли мутация с мужскими или женскими гаметами. Применение только цитогенетических маркеров для этой цели, как правило, недостаточно. Дополнение цитогенетических исследований анализом аллельного полиморфизма локусов aberrантной хромосомы позволяет однозначно решить эту за-

дачу. Такой подход особенно эффективен при выяснении генеза моносомии X (синдром Тернера) и трисомии 21 (болезнь Дауна).

Хромосомный мозаицизм — сравнительно частое нарушение кариотипа, представляющее серьезные методические трудности для цитогенетического анализа. Использование РСА в выявлении даже небольших количеств Y-специфической ДНК в образцах ткани плода позволяет значительно упростить диагностику мозаичных вариантов XO-моносомии [17]. На основе РСА, а также данных о первичной структуре различных типов альфоидной ДНК вполне реальна разработка молекулярных подходов диагностики дисбаланса и других хромосом, особенно X-хромосомы.

Известно, что в крови матери циркулируют клетки плода, число которых может существенно варьировать в зависимости от срока беременности, проницаемости плаценты, состояния плода и других факторов. Разработаны условия получения клеточных культур, обогащенных клетками плода, которые могут быть использованы не только для определения пола, но даже для диагностики кариотипа [18]. Применение РСА и хромосомных зондов может существенно повысить диагностику пола плода и его кариотипа по клеткам, находящимся в периферической крови матери. Решение этой задачи имело бы исключительно важное значение для ПД, особенно болезней, сцепленных с полом.

Наконец, доступность плодного материала на разных сроках антенатального развития, включая и самые ранние, позволяет сегодня по-новому подойти к решению фундаментальной проблемы генетики развития человека — анализу роли индивидуальных хромосом и их сегментов на разных стадиях эмбриогенеза человека. Следует напомнить, что ранее исследования по цитогенетике развития человека проводились исключительно на материале спонтанных абортных, т. е. на мацерированных плодах и дегенерирующих яйцах. Естественно, что установить первичные биомеханизмы проявления хромосомных нарушений на таком материале невозможно. В случае ПД объектом исследования является развивающийся зародыш с уже установленным кариотипом. Всесторонний патоморфологический, биохимический и молекулярный анализ таких зародышей в случае хромосомных aberrаций позволит получить принципиально новую информацию о патогенезе хромосомных эмбриопатий у человека, о роли отдельных хромосом и их частей (локусов) в эмбриональном развитии.

Понятно, что рассмотренный круг задач отнюдь не исчерпывает всех проблем ПД наследственных болезней. Однако их решение будет, безусловно, способствовать быстрому прогрессу этого нового научного направления, позволит отработать оптимальные варианты ПД каждого заболевания и наметить возможные пути их генетической коррекции и терапии.

В настоящее время проблема генной терапии зародыша человека, несмотря на свою привлекательность и впечатляющие успехи генной инженерии, все еще не выходит за пределы чистого эксперимента. Современные методы молекулярной биологии и экспериментальной эмбриологии млекопитающих позволяют эффективно вводить чужеродную генетическую информацию непосредственно в оплодотворенное яйцо, в стволовые клетки зародыша, получать такими способами трансгенных животных с заданными генетическими свойствами, успешно моделировать наследственные болезни. Предложенные в последнее время способы генетической трансформации с использованием РСА позволяют даже *in vivo* проводить направленную замену мутантного гена на нормальный путем гомологической рекомбинации (конверсии), т. е. становится реальной полная коррекция наследственного дефекта [19]. Экстраполируя экспериментальные данные на человека, следует иметь в виду, что, согласно рекомендациям Международных Советов по медицинской генетике [20], объектом генной инженерии у человека могут быть только соматические клетки. Совершенно обязательны экспериментальные исследования предлагаемых генных конструкций на жи-

вотных с целью проверки эффективности сайт-специфического встраивания предлагаемой генной конструкции, ее нормальной экспрессии в нужном месте и в положенное время, гарантированной безопасности используемых векторов. В настоящее время для ряда генетических конструкций все эти требования выполнены и некоторые из них (ген рецептора холестерина) на пути к клиническому испытанию [21].

Генноинженерные работы непосредственно на зародышах человека пока представляются малореальными. Тем не менее уже сейчас даже в ПД намечаются по крайней мере два возможных подхода в профилактике и коррекции наследственных болезней. Один из них заключается в применении достаточно эффективного метода разделения X- и Y-гамет с последующим использованием для искусственного осеменения женщин фракции X-обогащенных сперматозоидов в случае наследственных болезней, сцепленных с полом. Второй подход предполагает введение заведомо нормальных стволовых клеток печени или крови непосредственно в печень или кровь пораженного плода. Учитывая незрелость иммунной системы плода 16—18 недель развития, достаточную безопасность хордоцентеза, такой подход, по-видимому, может быть применен для коррекции многих наследственных заболеваний, связанных с генетическими дефектами клеток печени (ФКУ, гемофилии) и крови. Оба этих подхода, однако, требуют серьезных доклинических испытаний.

#### PROBLEMS ON PRENATAL DIAGNOSIS OF HEREDITARY DISEASES AND POSSIBLE WAYS OF THEIR CORRECTION

*V. S. Baranov*

Institute of Obstetrics and Gynecology,  
Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad

#### Summary

Prenatal diagnosis (PD) is defined as a relatively new branch of medical genetics. Its major goal is to study human genome functions in normal and abnormal development, embryonic-maternal interactions. Its practical application is confined to elaboration of new effective ways to prevent hereditary diseases and probably somewhat later their specific corrections. Most urgent problems of prenatal diagnosis are outlined and briefly discussed. They include RFLP analysis in high risk families and organization of DNA data banks; wide application of polymerase chain reaction; search for new informative RFLP sites; molecular analysis of mutated genes and their primary effects. Urgent problems in prenatal diagnosis of chromosomal diseases include application of chromosome specific DNA probes; the studies of aneuploidy origin and chromosomal mosaicism detection; elaboration of non-invasive methods for karyotyping and sexing of the human embryos. Possible ways for corrections and treatment of hereditary diseases in man are briefly discussed.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бочков Н. П. Теоретические и организационные основы профилактики наследственных болезней // Профилактика наследств. болезней.— М., 1987.— С. 5—16.
2. Кулиев А. М. Достижения в области пренатальной диагностики и их значение в профилактике наследственных болезней // Там же.— С. 27—37.
3. Sommer S. A., Sobel J. L. Application of DNA-based diagnosis to patient care: the example of hemophilia A. // Mayo Clin. Proc.— 1987.— 62.— P. 387—404.
4. Jeanpierre M., Junien C. DNA analysis as clinical investigation. When and how? // Ann. Genet.— 1984.— 27, N 3.— P. 134—147.
5. Davies K. Human genetics diseases. A practical approach.— Oxford, Washington: IRL press, 1986.— 138 p.
6. Калинин В. Н. Генно-инженерная диагностика наследственных болезней // Диагностика наследств. болезней.— М., 1986.— С. 103—122.
7. Баранов В. С. Дородовая диагностика наследственных болезней. Современное состояние, реальные возможности и перспективы // Вестн. АМН СССР.— 1987.— № 4.— С. 44—50.

8. Гинюлис В. М., Ананьев Е. В. Молекулярные подходы к систематическому картированию генома человека // Генетика.— 1984.— 20, № 11.— С. 1749—1762.
9. Давиденкова Е. Ф., Ланцов В. А., Шварц Е. И. Основы современной диагностики, профилактики и лечения наследственных заболеваний // Вестн. АМН СССР.— 1986.— № 9.— С. 8—13.
10. Евграфов О. В., Макаров В. Б. Диагностика миодистрофии Дюшенна с помощью зондов ДНК // Журн. невропатологии и психиатрии.— 1987.— 87, № 11.— С. 1732—1736.
11. Patterns of polymorphism and linkage disequilibrium for cystic fibrosis / X. Estiville, P. J. Scambler, B. G. Wainwright et al. // Genomics.— 1987.— 1, N 2.— P. 257—263.
12. Анализ частоты рестрикционного полиморфизма, выявляемого ДНК зондом СС-7 в популяции и в семьях больных муковисцидозом с помощью метода цепной реакции синтеза ДНК / Е. И. Шварц, О. К. Кабоев, А. А. Гольцов и др. // Докл. АН СССР.— 1989.— 307, № 2.— С. 327—330.
13. Saiki R. K. Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase // Science.— 1988.— 239, N 4203.— P. 491—495.
14. Same day first trimester antenatal diagnosis for cystic fibrosis by gene amplification / C. Williams, R. Williamson, Ch. Couteille et al. // Lancet.— 1988, July.— P. 102—103.
15. Prenatal diagnosis of cystic fibrosis by DNA amplification for detection of KM-19 polymorphism / G. L. Feldman, R. Williamson, A. L. Beudet, W. E. O'Brien // Ibid.— P. 102.
16. Юров Ю. Б. Молекулярная цитогенетика гетерохроматинных районов в геноме человека: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— М., 1987.— 34 с.
17. Kogan S. C., Doherty A. B. M., Gitschier J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences // New Engl. J. Med.— 1988.— 317, N 16.— P. 985—990.
18. Selwyns A., Lorenz R. A noninvasive method for determination of the sex and karyotype of the fetus from the maternal blood // Hum. Genet.— 1988.— 79, N 4.— P. 357—359.
19. Zimmer A., Gruss P. Production of chimeric mice containing embryonic stem cells carrying Hox 1.1 allele mutated by homologous recombination // Nature.— 1989.— 332, N 6211.— P. 150—153.
20. Gene therapy in man. Recommendations of European Medical Research Council // Lancet.— 1988.— N 8597.— P. 1271—1272.
21. Leslie R. New targets for human gene therapy // Science.— 1988.— 241, N 4868.— P. 906.

Ин-т акушерства и гинекологии АМН СССР, Ленинград

Получено 13.06.89

УДК 577.152.1

**А. Л. Шварцман, М. П. Страхова, В. С. Гайцхоки,  
В. Бергер, Ч. Кутель**

## **ДНК-ДИАГНОСТИКА И ПОДХОДЫ К ГЕННОЙ ТЕРАПИИ НАСЛЕДСТВЕННОГО ДЕФИЦИТА $\alpha_1$ -АНТИТРИПСИНА**

*Из библиотеки кДНК печени человека на экспрессионном векторе  $\lambda$ gt11 выделен ряд клонов, содержащих последовательности кДНК  $\alpha_1$ -антитрипсина (АТ). Анализ нуклеотидной последовательности полученных клонов показал, что в их составе отсутствуют последовательности (30—150) нуклеотидов, кодирующие 5'-конец мРНК АТ. Объединением последовательностей кДНК АТ и последовательностей гена АТ в уникальном *Cfr10.1*-сайте экзона II получена кДНК АТ, включающая кодоны мРНК АТ, начиная с позиции +2. Выделенная кДНК АТ использована для ДНК-диагностики наследственного дефицита АТ в семьях носителей мутации в популяциях СССР и ГДР. Выявлено сцепление генотипа при наследственной недостаточности АТ с отсутствием полиморфного *MaeIII*-сайта в экзоне III гена АТ.*

**Введение.** АТ — это гликопротеин плазмы крови, относящийся к семейству белков — ингибиторов сериновых протеаз. АТ представляет собой одноцепочечный белок с молекулярной массой 50 000 и содержанием углеводов до 15% [1]. Ген АТ имеет длину 10,2 тысяч пар нуклеотидов (т. н. н.), включает пять экзонов, общая длина мРНК АТ составляет 1390 н. [2]. Более 30 аллелей АТ определяют полиморфизм этого белка, выявляемый в большинстве случаев изофокусированием белков