

# ПРОБЛЕМЫ СТРУКТУРНОЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ГЕНОМИКИ ПРИ КРИТИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ

В. В. Мороз, Л. М. Тучина, Г. Г. Порошенко

ГУ НИИ общей реаниматологии РАМН, Москва

## Problems in Structural and Functional Genomics in Critical States

V. V. Moroz, L. M. Tuchina, G. G. Poroshenko

Research Institute of General Reanimatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Для понимания патогенеза критических состояний все более широко начинают использовать методы генетики. В настоящее время рассматривают два уровня, на которых проводят генетические исследования. Первый из них (более традиционный) называют структурной геномикой. На этом уровне выясняют, какой ген задействован в развитии данного патологического процесса или какие структурные его повреждения. Здесь используют как цитогенетические, так и молекулярно-генетические методы исследований. Первые направлены на поиск изменений в структуре хромосом данного индивида, а вторые — нарушений в структуре его ДНК и способности к заживанию (репарации) таких повреждений. Второй уровень принято называть функциональной геномикой. На этом уровне выясняют все множество генов и их продуктов, задействованных в патогенезе сепсиса, острого повреждения легких, внутрисосудистого свертывания крови и других проявлений критических состояний. В последние годы появляется все больше публикаций, в которых патогенетические механизмы критических состояний анализируют, используя методы функциональной генетики.

Genetic methods are being increasingly used to understand the pathogenesis of critical states. At present there are two levels at which genetic studies are conducted. The first level (more traditional) is designated as structural genomics. At this level, investigators clarify what gene is involved in the development of the given pathological process or what its structural regions are damaged. Here both cytogenetic and molecular genetic studies are performed. The former studies are aimed at searching for chromosomal structural changes in the given individual, the latter examine structural disturbances in his/her genes and their products and his/her capacity for healing (reparation) of such lesions. The second level is generally called functional genomics. At this level, investigators elucidate a more and more increasing number of genes and their products involved in the pathogenesis of sepsis, acute lung lesions, intravascular coagulation, and other manifestations of critical states. There have been recently more and more publications where the pathogenetic mechanisms of critical states are analyzed, by applying the methods of functional genetics.

### Повреждения генетического аппарата

Генетический аппарат — основа сохранения постоянства наследственных признаков. В нем хранится наследственная информация, обеспечивающая все метаболические процессы.

Учитывая огромную значимость наследственного аппарата для жизни отдельной клетки, отдельного индивида и необходимости передачи его в ряду поколений, природа позаботилась о существовании разнообразных механизмов, обеспечивающих постоянство и неизменность его структур [1]. С одной стороны, нет ничего абсолютно неизменного в природе, а с другой, абсолютная неизменяемость генетического аппарата существенно ограничила бы возможности изменчивости живого. Разрешение такого противоречия кроется в возможности появления внезапных нарушений в структуре генетического материала, получивших название мутаций.

Мутации — это внезапные и устойчивые изменения генотипа, происходящие «спонтанно»

или под влиянием мутагенных факторов. Различают генные мутации, затрагивающие один ген. Часто их называют точковыми мутациями. Среди генных мутаций различают транзиции, трансверсии и мутации сдвига рамки считывания.

Мутации сдвига рамки — это мутации, вызванные инверсией или делецией (выпадением) нуклеотидов ДНК, в результате которых изменяется рамка трансляции кодонов в молекуле мРНК; они приводят к появлению ненормальной последовательности аминокислот в молекуле белка, начиная с точки, соответствующей положению мутации.

Различают также соматические и генеративные мутации. К первым относятся те, что произошли в соматической клетке и передаются лишь в ряду поколений клеток, но не наследуются потомками данного индивида. Такие мутации проявляются в виде разнообразных форм мозаицизма. Они лежат в ряде случаев в основе развития опухолевого процесса. Ко второму классу относят те мутации, что произошли в половых клетках (муж-

ских или женских). Они передаются в ряду поколений организмов, распространяясь по популяции, в том случае, если не представляют собой летальные мутации.

Летальными мутациями называют мутации, приводящие их обладателей к гибели на различных стадиях онтогенеза, начиная с эмбриональных. Летальные мутации, произошедшие на ранних стадиях эмбриогенеза, могут не проявляться, проходя как несостоявшиеся беременности; на более поздних стадиях они проявляются в виде «спонтанных» аборт или рождения детей с дефектами развития, несовместимыми с жизнью.

Процесс возникновения мутаций принято называть мутагенезом. Он может быть спонтанным, осуществляющимся без влияния каких-либо внешних факторов, обычно с определенной для данного гена частотой, или индуцированным, то есть вызванным влиянием каких-либо внешних мутагенных факторов. Последние могут быть физической (ионизирующее излучение, например), химической (некоторые лекарственные препараты) или биологической (некоторые вирусы) природы.

Структуру наследственного аппарата данного индивида и ее нарушения изучает так называемая структурная геномика. Но по мере развития генетики стало ясно, что изучение лишь структурных особенностей генетического аппарата и его нарушений недостаточно. Это связано с тем, что от гена до признака лежит длинный путь превращений. При этом тот или иной признак может являться результатом экспрессии не одного, а множества генов. Отсюда возникла функциональная геномика, которая стремится исследовать весь комплекс факторов, влияющих на появление данного признака.

## **Структурная геномика**

### **Повреждения генетического аппарата при критических состояниях**

Воспалительный процесс, сопровождающий заболевание, не только контролируется генетическим аппаратом клетки, но может выступать в качестве фактора, влияющего на наследственный аппарат (в половых или соматических клетках). Излишнее количество свободных радикалов, возникающих в очаге воспаления, вызывает однонитчатые и двунитчатые повреждения ДНК. Сразу после появления таких повреждений в клетках включаются механизмы репарации ДНК. Последние контролируются генетически, о чем свидетельствует наличие наследственных заболеваний со сниженным уровнем процессов репарации ДНК. Наиболее известное среди них — пигментная ксеродерма.

Мы провели серию исследований, в которых показали наличие выраженных межиндивидуальных различий в уровне репарации ДНК, а также при ряде воспалительных заболеваний. В начатых, в последнее время, исследованиях состояния ДНК в лимфоцитах периферической крови больных хроническими вирусными гепатитами мы обнаружили зависимость интенсивности повреждения наследственных структур от активности процесса размножения вирусов в организме больного [2].

Известно, что повреждения ДНК выступают начальным звеном процесса апоптоза клеток. Поэтому наблюдавшиеся нами повреждения ДНК могут рассматриваться как начальные стадии апоптоза, в тех случаях, когда они не подвергаются последующей репарации. Часть клеток с поврежденной ДНК выживают за счет последующей репарации ДНК. В тех случаях, когда репарация ДНК осуществляется неправильно, возникают мутантные клетки. Наличие мутантных лимфоцитов должно сказываться на извращении иммунных реакций организма за счет образования клонов клеток с измененными свойствами. В отдельных случаях мутантные клетки могут приобрести злокачественные свойства и вступить на путь опухолевой прогрессии. Нельзя исключить случаев, когда состояния повышенной мутабельности во время вирусной инфекции затрагивают не только соматические, но и половые клетки. В последнем случае у таких лиц должна повышаться вероятность рождения детей с теми или другими наследственными заболеваниями. Ряд вирусных заболеваний, в частности корь, способствуют увеличению рождения детей с болезнью Дауна, и вызывают повреждения хромосомного аппарата соматических клеток больных, выражающихся в увеличении частоты аберраций хромосом и микроядер.

Нарушения в структуре ДНК, вызванные воспалительным процессом, можно фиксировать и с помощью цитогенетических методов. Так, нами было показано, что неспецифические воспалительные заболевания легких сопровождаются увеличением сестринских хроматидных обменов (СХО) в лимфоцитах периферической крови этих больных. СХО — процесс обмена участками между сестринскими хроматидами одной хромосомы в соматических клетках. Обмены происходят в норме с определенной частотой. Под влиянием ряда внешних факторов частота СХО может значительно возрастать. Между интенсивностью процессов репарации ДНК и частотой СХО наблюдались обратные пропорциональные взаимоотношения.

При анализе частоты СХО в лимфоцитах периферической крови врачей и медицинских сестер одной из клиник установили, что у врачей и сестер, профессионально подвергавшихся воздействию в среднем 170 ppm N<sub>2</sub>O и 4 ppm галотана и изофлюрана, частота СХО была примерно в три

раза выше, чем у работников, не подвергавшихся подобному воздействию [3].

Представляют несомненный интерес и исследования, направленные на выяснение влияний, оказываемых на хромосомный аппарат, как лимфоцитов периферической крови, так и других клеток у лиц, перенесших критические состояния. Эти воздействия на хромосомный аппарат можно оценивать по увеличению частоты aberrаций хромосом или микроядер в интерфазных клетках.

Aberrации хромосом — изменения структуры хромосом, вызванные мутагенными факторами. Различают делеции (потери части материала хромосомы), транслокации (перенос части хромосомы с одной на другую хромосому), инверсии (отрыв участка хромосомы с последующим поворотом на  $180^\circ$  и прикреплением к той же хромосоме). Инверсии и делеции могут быть как концевыми, так и интерстициальными (внутри плеча хромосомы). Aberrации хромосом можно анализировать лишь в делящихся клетках. Для их выявления используют культуры клеток (чаще всего культуру лимфоцитов периферической крови человека), клетки костного мозга и некоторые другие.

Микроядро — малое ядро, располагающееся по соседству с основным ядром и образованное отдельными хромосомами, в силу тех или других нарушений митоза, оказавшимися за пределами ядерной мембраны, или фрагментами их, возникшими во время предыдущего митоза. Микроядра служат показателем мутагенного (кластогенного) воздействия на клетку. В отличие от aberrаций хромосом, которые можно наблюдать лишь в митотических клетках, микроядра, являющиеся результатом их, наблюдают в клетках интерфазных. Первоначальная и наиболее широко употребляющаяся методика анализа частоты микроядер предполагает выявление их в полихроматофильных эритроцитах. Но позднее были разработаны методики наблюдения микроядер во многих других клетках организма.

Существует большой класс химических соединений, нуждающихся для проявления своего мутагенного потенциала в метаболической активации. Наиболее активно метаболическая активация осуществляется микросомными ферментами гепатоцитов. Была разработана специальная методика тестирования мутагенного действия химических соединений с использованием фракции  $S_9$  из гомогената печени крыс, предварительно получавших индуктор микросомных ферментов. Немалый интерес представляет выяснение вопроса о том, меняется ли способность перенесших гипоксию гепатоцитов метаболически активировать промутагены и как сказывается на этой способности введение больным в реанимационных отделениях ряда лекарственных препаратов, в частности перфторана. Мы назвали здесь перфторан потому, что известны данные о влиянии его на активность системы цито-

хрома-P-450, который во многом ответственен за процессы метаболической активации мутагенов.

Снижение активности процессов репарации ДНК при ряде заболеваний, а также повышение при них уровня мутабельности ставит вопрос о применении при этих заболеваниях антимутагенных веществ, в особенности таких, которые активизируют процессы репарации ДНК. Использование таких препаратов открывает еще один путь профилактики наследственных заболеваний [4].

В организме человека, находящегося в критическом состоянии могут складываться условия, приводящие к тем или другим повреждениям генетического аппарата. Это обусловлено, главным образом тем, что ткани такого больного переживают гипоксию с последующей реоксигенацией. При этом в тканях лавинообразно нарастают свободно-радикальные процессы, приводящие к повреждениям многих структур клеток, в том числе и ее генетического аппарата. Поражения генетического аппарата могут выражаться в появлении точковых мутаций (событий, происходящих на уровне одного или нескольких нуклеотидов), возникновения одно- или двунитчатых разрывов ДНК, тех или других повреждений хромосом, проявляющихся в возрастании числа aberrаций хромосом или микроядер, в возрастании числа сестринских хроматидных обменов (СХО). Названные процессы повреждений генетического аппарата могут усиливаться или ослабляться под влиянием лечебных мероприятий, в том числе использовании тех или других лекарственных препаратов. При этом не следует забывать, что, хотя лекарственные препараты до утверждения их Фармкомитетом проходят испытания на мутагенность, все эти испытания проводятся на здоровых животных или крови здоровых доноров. В организме же лиц, находящихся в критических состояниях, складываются совершенно другие условия, в которых может проявляться прежде незамеченное мутагенное действие того или другого лекарственного препарата.

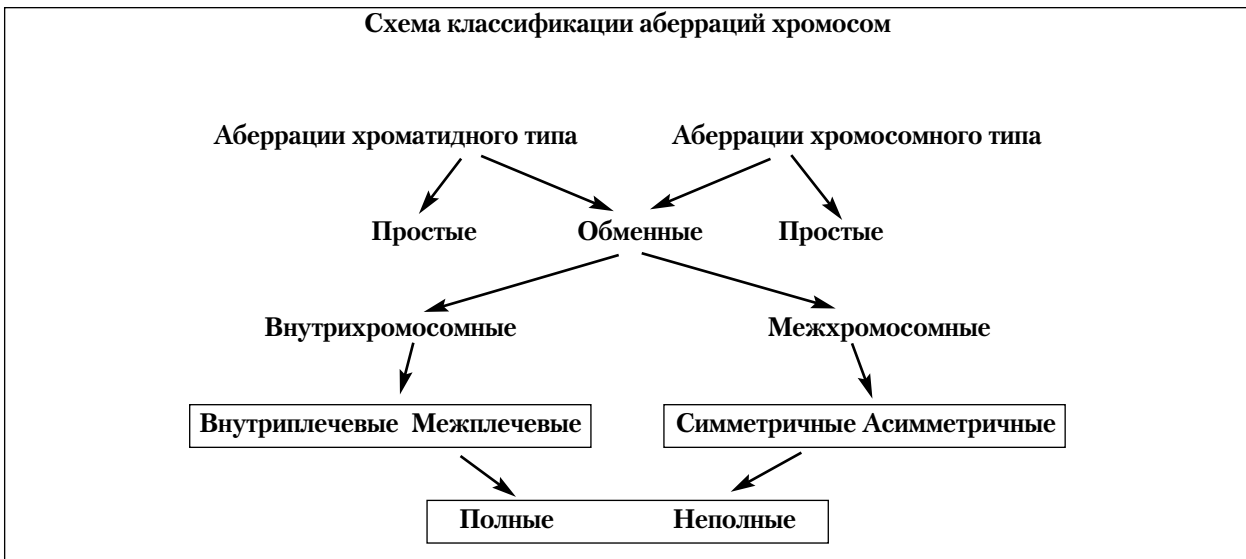
В процессе изучения мутагенного действия разнообразных химических соединений генетики разработали соответствующие методики, которые нужно знать исследователям, планирующим изучение повреждений генетического аппарата, возникающих у лиц, находящихся в критических, терминальных и постреанимационных состояниях. Ниже мы приводим краткую характеристику некоторым из них.

## 1. Цитогенетические методы

### 1.1. Учет хромосомных aberrаций

У эукариот, к которым, как известно, относится и человек, генетический материал упакован в специ-

### Схема классификации aberrаций хромосом



альные структуры — хромосомы, расположенные в клеточном ядре. Хромосомы — это сложные образования, включающие в себя ДНК и «обслуживающие» их белки. Дело в том, что ДНК — структура, которая не может функционировать без ряда белков, выполняющих как структурные, так и функциональные обязанности. Обычно хромосомы изображают в виде «палочек» различной длины и формы. Но такое представление о хромосоме неверно. Хромосома очень лабильная структура, закономерно изменяющаяся на протяжении митотического цикла [5]. То, что мы будем говорить о хромосомах ниже, относится к метафазным хромосомам.

Изменения числа и структуры хромосом в соматических и зародышевых клетках могут возникать спонтанно, после воздействия внешними физическими и химическими агентами или под влиянием процессов, происходящих в организме, в том числе и различных заболеваний, в особенности приводящих к критическим состояниям. Изменения числа или структуры хромосом, возникающие в зародышевых клетках, приводят к разнообразной врожденной патологии у человека. Эти нарушения принято относить к мутациям, которые могут быть разделены на геномные в случае изменения числа хромосом и хромосомные при структурных нарушениях. Аберрации хромосом, происходящие в соматических клетках, также не безразличны для организма, так как они приводят к гибели части активных клеток, сказываются на функциональных возможностях соответствующих клеток.

В ряде случаев накопление хромосомных мутаций в соматических клетках выступает одним из факторов, инициирующих развитие клонов злокачественных клеток, а также процессы старения.

Анализ хромосом соматических клеток методически хорошо разработан [6]. Наиболее часто с этой целью используют культуру лимфоцитов периферической крови человека и пунктат костного мозга.

Все хромосомные aberrации, возникающие в соматических клетках человека и животных и учитываемые на стадии метафазы, разделяют на 2 основные группы: хромосомные и хроматидные. Отнесение той или иной aberrации к хромосомному или хроматидному типу зависит от того, на каком уровне (хромосомы или хроматиды) повреждена хромосома, вовлеченная в перестройку. Аберрации хромосомного типа отражают повреждение хромосомы на предсинтетической стадии ( $G_1$ -фаза), когда она представляет собой однитетивую структуру, тогда как aberrации хроматидного типа возникают при повреждении хромосомы на двунитчатой стадии, то есть в фазе S и  $G_2$ . Нередко при повреждении обеих хроматид хромосомы в идентичных локусах возникают изохроматидные разрывы, морфологически неотличимые от aberrаций хроматидного типа.

Аберрации могут быть простыми и обменными. Нарушение целостности одной или нескольких хромосом с образованием свободных или связанных с ней фрагментов относят к простому типу aberrаций, тогда как перестройки участков одной и той же хромосомы или рекомбинации участками между несколькими хромосомами — к обменному типу.

Обменные aberrации могут быть внутрихромосомными и межхромосомными. В зависимости от локализации внутрихромосомные aberrации разделяют на внутриплечевые и межплечевые. При межхромосомных обменах, если ацентрические фрагменты соединяются с центрическими, то обмены классифицируют как симметричные, а в случае соединения центрических фрагментов — как асимметричные. В последнем случае обмен характеризуется появлением полицентрических хромосом или хроматид. Внутрихромосомные и межхромосомные обмены могут быть полными и неполными. При полных обменах происходит воссоединение всех рекомбинирующихся участков поврежденных хромосом.

## 1.2. Культура лимфоцитов периферической крови человека

Культура лейкоцитов человека широко используется для изучения радиационного и химического мутагенеза у человека. Изменения лейкоцитов периферической крови человека в процессе культивирования в присутствии фитогемагглютина (ФГА) достаточно исследованы [6].

При таком культивировании происходит гибель всех форм лейкоцитов за исключением малых лимфоцитов, которые претерпевают изменения, приводящие к митозу. Поэтому при анализе митотических клеток, по существу, исследователь имеет дело с культурой лимфоцитов.

К достоинствам культуры лимфоцитов человека относятся доступность материала, синхронность клеточной популяции, низкий уровень спонтанного мутирования, отработанность методики культивирования и изученность морфологии хромосом.

Определение основных типов хромосомных aberrаций, схема образования и основные принципы их анализа подробно приведены в атласе хромосом человека [7].

Для целей тестирования используют микроили полумикрометод культуры лимфоцитов. Анализ хромосом проводят на метафазных пластинках с хорошо окрашенными и разбросанными хромосомами. При этом метафазные пластинки не должны иметь большое количество наложений хромосом и уровень конденсации их должен быть таким, чтобы акроцентрические хромосомы были видны в виде четко выраженных структур. Не анализируются метафазные пластинки с хромосомами, вошедшими в анафазу, так как трудно дифференцировать их от парных фрагментов. Из-за технических манипуляций возможны потери хромосом в пластинке. Поэтому при учете хромосомных aberrаций обычно анализируется клетка с числом хромосом от 44 до 47.

При тестировании мутагенного действия того или другого фактора хромосомные aberrации учитывают без кариотипирования. Кариотипирование метафазной пластинки применяют лишь в специальных исследованиях, например, при изучении распределения повреждений по группам хромосом, по длине отдельных хромосом.

О мутагенной активности судят по частоте хромосомных aberrаций, превышающей спонтанный уровень в норме. Поэтому очень важно знать закономерности спонтанного мутагенеза.

На основании ряда исследований был сделан вывод, что в 96,7% исследуемых культурах лимфоцитов от здоровых лиц клетки с хромосомными aberrациями встречались до 3% случаев. Это позволяет сделать вывод о том, что максимальный уровень клеток с хромосомными aberrациями в

культуре лимфоцитов человека в норме не превышает 3% [8].

## 1.3. Сестринские хроматидные обмены

Феномен обмена участками между сестринскими хроматидами одной хромосомы привлек внимание исследователей мутагенных факторов окружающей среды своей высокой чувствительностью. Изучение уровней индукции сестринских хроматидных обменов и хромосомных aberrаций при действии 5 мутагенных агентов на лимфоциты человека *in vitro* и на клетки костного мозга мышей *in vivo* показало, что эффективность индукции СХО *in vitro* в 300–30 раз превышает эффективность образования aberrаций хромосом. Та же закономерность сохранялась при действии *in vivo*, хотя в этом случае превышение было лишь в 60–20 раз.

Принцип метода обнаружения СХО заключается в воздействии на клетки таким образом, чтобы две сестринские хроматиды отличались друг от друга по степени окрашивания. Достигается это введением в растущую культуру клеток 5-бромдезоксисуридина (БДУ) с последующей окраской препаратов. БДУ присутствует в среде в течение двух клеточных циклов. Хроматиды, включившие БДУ в обе субъединицы, выглядят на окрашенных препаратах более светлыми, чем хроматиды, включившие его в одну субъединицу или не включившие вообще.

Природа СХО, до сих пор остается не выясненной и этой проблеме посвящено много работ [9]. Не ясно также, следует ли считать СХО прямым генетическим эффектом или следствием определенных типов повреждений ДНК. В этой связи понятен интерес исследователей к выяснению взаимосвязи между СХО, мутагенезом и повреждениями ДНК.

## 1.4. Микроядерный тест

Метафазный анализ, который используется при учете хромосомных aberrаций в соматических клетках животных и человека, требует много времени и высокой квалификации исследователя. Поиск новых принципов учета структурных нарушений хромосом был направлен на упрощение метода. В 1973 г. J. A. Heddle, а в 1975 г. W. Schmid [10] независимо друг от друга предложили микроядерный тест, основанный на учете микроядер в полихромных эритроцитах костного мозга. Позже его стали применять для учета микроядер в ранних сперматидях, печени плода при изучении трансплацентарной активности химических соединений, в клетках слизистой оболочки рта, лимфоцитах человека, в клетках печени и толстой кишки животных. К настоящему времени учет ми-

крядер стал возможен в большинстве популяций делящихся клеток.

Микроядра возникают из фрагментов хромосом, которые лишены центромер и поэтому исключаются из клеточных ядер в момент деления клеток, то есть они являются ацентрическими фрагментами, возникшими в результате структурных нарушений хромосом и не попавшими во вновь формирующееся ядро при делении клеток. Кроме того, они могут образовываться из хромосом, оставшихся в анафазе.

Наиболее распространенным методом является учет микроядер в полихромных эритроцитах. С помощью этого метода испытано большое количество соединений. Это связано с тем, что полихромные эритроциты (ПХЭ) легко распознаются, имеют короткий жизненный цикл и любое содержащееся в них микроядро является следствием хромосомных aberrаций в эритробластных клетках, возникших спонтанно или индуцированных исследуемыми факторами [11, 12].

Для анализа частоты микроядер в слизистой оболочке ротовой полости с нее берут мазок. Приготовленные препараты слушающихся клеток эпителия слизистой ротовой полости высушивают на воздухе и фиксируют в 96° спирте. После хранения в термостате при 37° в течение нескольких дней препараты окрашивают красителем Гимза (0,2% раствор, pH 7,0; 10 минут). Анализ препаратов производят под микроскопом при увеличении 100x с иммерсией. Просчитывают все имеющиеся на стекле клетки на наличие в них микроядер. Оценивают долю разных типов микроядерных клеток и клеток с другими ядерными нарушениями.

В результате анализа выявляют микроядра (МЯ) четырех типов (рис. 1). Первый тип — 1 маленькое микроядро (~ 1/40 от размера основного ядра), находящегося на небольшом удалении от основного ядра. Микроядра данного типа образованы, вероятно, оторвавшимся маленьким фрагментом одной хромосомы. Второй тип — 1 микроядро более крупного размера (~1/15 — 1/10 от размера основного ядра) и предположительно состоящее из нескольких мелких фрагментов, оторвавшихся от нескольких хромосом, или из 1—2 более крупных фрагментов хромосом. Третий тип — микроядра этого типа представляют собой несколько мелких образований количеством от 2 до 10 и размером примерно с микроядра первого и второго типов. Микроядра этого типа разделяют по внешнему виду на 2 варианта, так как в части клеток эти образования скорее похожи на мелкие «вакуоли» — округлые образования с четкой границей и мелко дисперсным содержанием. Окраска этих образований по цвету приближается к нормальному окрашиванию

хроматина. Четвертый тип — это одно крупное образование размером до 1/4 основного ядра, состоящее из нескольких (1—3) целых хромосом и/или из многих фрагментов других хромосом. Порой встречаются и клетки с двумя ядрами. Эти ядра в некоторых случаях имеют размеры, сходные с размерами обычных ядер, а иногда размер половины нормального ядра. В таких случаях, по-видимому, произошло деление ядра без разделения цитоплазмы.

Все клетки, несущие дефектные хроматиновые структуры (микроядра всех типов, «вакуолярный» хроматин, двуядерные клетки) обозначают как «дефектные».

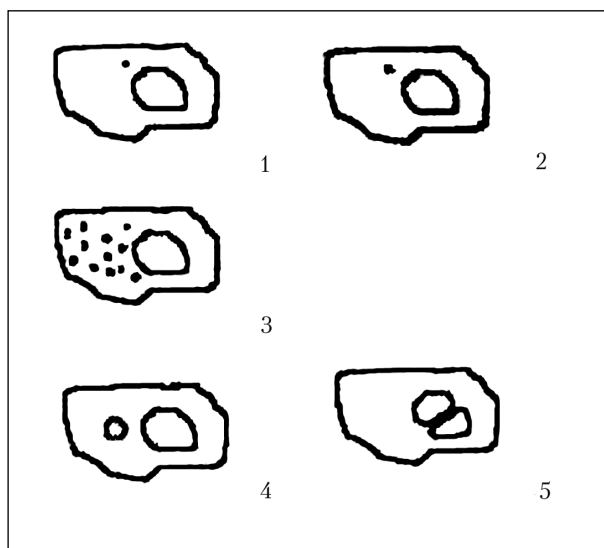


Рис. 1. Клетки с различными типами микроядер и двуядерные клетки на препаратах слизистой ротовой полости.

1 — клетки с одним мелким микроядром; 2 — клетки с более крупным микроядром; 3 — клетки с несколькими мелкими микроядрами; 4 — клетки с одним крупным микроядром; 5 — клетки с двумя ядрами.

## 2. Молекулярно-генетические методы

### 2.1. Разрывы ДНК и их репарация

Большинство, если не все, случаев нарушения наследственных структур клетки связаны с повреждением ядерной ДНК. Как только по тем или другим причинам в молекуле ядерной ДНК происходит разрыв, включаются ферментные системы клетки, направленные на застраивание (репарацию) возникшего повреждения, то есть начинается внеплановый синтез ДНК (в отличие от планового, происходящего во время митотического цикла). Синтез ДНК в клетке можно зафиксировать по включению в нее тимидина, меченного по тритию. С тем, чтобы отдифференцировать внеплановый синтез ДНК от планового, клетки *in vitro* обрабатывают мочевиной, подавляющей плановый (митотический) синтез. Анализируемые

**Спонтанный репаративный синтез ДНК и способность лимфоцитов периферической крови к репарации ДНК у больных острым инфарктом миокарда в первую неделю заболевания**

Группа обследованных	Число лиц	Спонтанный репаративный синтез ДНК, % от нормы	Способность лимфоцитов к репарации ДНК, усл. ед.
Здоровые	39	100,8±8,0	4,9±0,4
Больные	15	468,0±158,0*	1,8±0,4*

Примечание. \* — отличия от нормы достоверны ( $p < 0,05$ ).

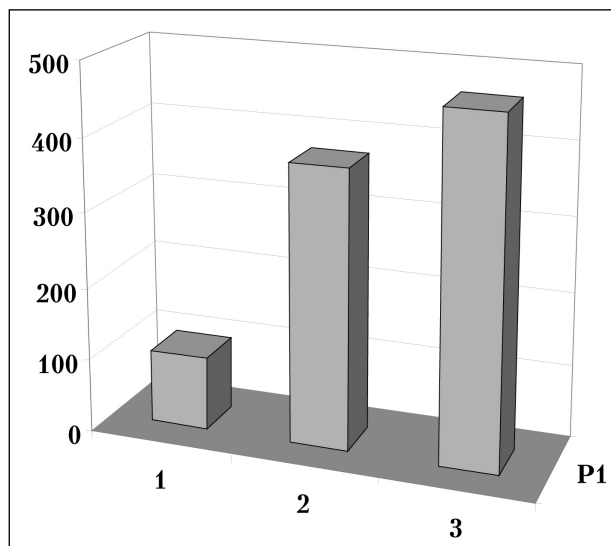


Рис. 2. Спонтанный репаративный синтез ДНК (в %) у здоровых лиц (1), больных острой пневмонией (2) и острым инфарктом миокарда (3).

клетки некоторое время выдерживают с  $^3\text{H}$ -тимидином, который в последующем отмывают, из клеток выделяют ДНК и анализируют количество включенного в нее тимидина с помощью сцинтилляционного счетчика [13].

Показано, что воспалительные процессы изменяют мутабельность клеток, и в этих условиях лекарственные препараты могут существенно усиливать свои мутагенные потенции. Снижение способности лимфоцитов к репарации ДНК и накопление повреждений в ДНК лимфоцитов периферической крови человека при заболеваниях является одним из неизвестных ранее механизмов нарушения функции иммунокомпетентных клеток, приводящих к формированию временной иммунологической недостаточности у человека [14]. Таким образом, иммунологический механизм поддержания гомеостаза является производной от системы репарации ДНК, т. е. от геномеостаза [1].

В результате проведенных подобным методом исследований уровней спонтанного репаративного синтеза ДНК у лиц с острыми воспалительными заболеваниями легких и острым инфарктом миокарда выяснилось, что у названных категорий больных он резко возрастает по сравнению с нормой. Особенно велик он у больных с острым инфарктом миокарда (табл. 1, рис. 2).

## Функциональная геномика

В последние годы в реаниматологии все шире используют подходы функциональной геномики. Функциональная геномика пользуется высокопроизводительными и крупномасштабными экспериментальными методиками в сочетании со статистической и вычислительной обработкой результатов. Функциональная геномика расширяет границы биологических исследований от изучения единичных генов или белков к изучению одновременно всех генов или белков как единой системы.

Использование методов функциональной геномики в реаниматологии позволяет лучше понять сложные интегративные молекулярные ответы на повреждения, возникающие в результате воспалительного процесса, хирургического вмешательства, травмы, шока или сепсиса.

Структурная геномика рассматривает единственный ген, исходя из постулата «один ген — одна мутация — одна болезнь». На основе такого подхода описан ряд «классических» генетических болезней: серповидно-клеточная анемия, дальтонизм, муковисцидоз и др. В наши дни генетика пытается понять не только происхождение болезней, связанных с нарушением структуры и функции единичного гена, но старается исследовать и патологические состояния, определяющиеся активацией большого числа генов, комплексно взаимодействующих друг с другом. Традиционный подход исследования единичного гена оказался недостаточным для понимания полноты сегодняшних проблем [15].

С позиций функциональной геномики функция клетки организована как цепь независимых процессов, накладывающихся друг на друга как слои луковицы: геном (ДНК), транскриптом (мРНК), протеом (белок), физиом (цепочки и пути) и биом (фенотип клетки). Эти клетки в свою очередь объединены в различные ткани и органы, формирующие инфраструктуру организма. Любое внешнее повреждение такой инфраструктуры волнообразно отражается внутрь этой луковицы. «Стена», от которой отражается «волна» повреждения — это геном. Индивидуальный ответ на повреждения или развившееся критическое состояние во многом будет зависеть от генотипа. Функциональная геномика изучает результат отражения — фенотип. Изучая ответ организма на

различные источники и типы повреждения на всех уровнях сложности, реаниматологи смогут лучше понять воспалительный и адаптивный ответ на шок, травму или инфекцию. В задачи функциональной геномики входят не столько исследования структурных нарушений генома, сколько изучение экспрессии генов.

## 1. Метод микроматриц (чипов)

Вместе с новыми задачами появились и новые методы исследования экспрессии генов. Одним из таких новых методов является метод микроматриц, который позволяет одновременно накапливать десятки тысяч матричных РНК на нейтральном носителе небольшого размера, в качестве которого чаще всего используется стекло. Подсчитывая количественно мРНК, соответствующие разным генам со всего генома, можно определить какие из генов наиболее активно участвуют в формировании ответа на то или иное повреждение.

При помощи метода микроматриц можно также оценить изменение экспрессии генов во времени, например, до лечения, во время лечения и после лечения.

Существует три уровня анализа результатов (увеличивающихся по сложности) экспрессии генов во время эксперимента. На первом уровне определяется изолированное поведение единичного гена. В частности, определяется, экспрессия какого из генов изменилась во время эксперимента, уменьшалась ли она или увеличивалась. Второй уровень изучает экспрессию генов в комбинации в поиске потенциальных генных взаимодействий и корегуляции, в частности, нахождение общего промотора у генов со сходной экспрессией. Наконец, третий и самый сложный уровень анализа направлен на выявление метаболических путей, соответствующих профилям экспрессии, полученным при исследовании. Этот процесс, получивший название «получение исходного кода», использует инструментальные средства в сфере, известной под названием «комплексные адаптивные системы», и может теоретически отразить полностью регуляторные механизмы, основанные на данных генной экспрессии.

### 1.1. Исследование экспрессии генов при сепсисе

Интерес генетиков к сепсису возник не случайно. По данным Центра контроля заболеваемости (Centers for Disease Control) встречаемость септицемии возросла с 73,6 на 100 000 населения в 1979 году до 175,9 на 100 000 населения в 1989 году. В отделениях интенсивной терапии сепсис встречается с частотой 2–11% [16].

Частота смертности от сепсиса среди населения США в настоящее время составляет около

250 тысяч случаев в год и продолжает увеличиваться. Во всем мире он является основной причиной смерти в отделениях интенсивной терапии. Летальность от септического шока остается в пределах 35–45%.

Анализ далеко не полных данных Московского бюро медицинской статистики также показал неуклонный рост частоты сепсиса в реанимационных отделениях г. Москвы, и еще более выраженный рост летальности от сепсиса [17].

#### 1.1.1. Профиль генной экспрессии у мышей с сепсисом

В одном из исследований [18] у мышей моделировали развитие перфоративного аппендицита путем наложения лигатуры на слепую кишку и ее пункции. Определяли количественные изменения мРНК (в терминах геномики — транскриптома), ассоциированные с выживанием или со смертью мышей от полимикробного абдоминального сепсиса. Изучили два органа-мишени: селезенку, чувствительную к стресс-индуцированному апоптозу, и печень, резистентную к такому апоптозу. В этих органах установили связанные с сепсисом органоспецифические изменения в 588 генах. В печени в течение 24 часов сепсиса изменения проявились в основном на уровне мембранных белков и рецепторов (интегрин  $\beta 7$ , рецептор ЛППП, рецептор гормона роста, рецептор пролактина). В то время как в селезенке изменения касались экспрессии намного большего числа генов, большинство из которых определяют сигнальные каскады, пути клеточной гибели и продукцию цитокинов (интерлейкин-10, макрофагальный воспалительный протеин 2 $\alpha$ , каспаза 11 и др.).

Авторы отмечают, что возможно определить не только изменения, ассоциированные с формированием септического транскриптома, но также и то, какие из этих изменений связаны с антибиотикотерапией, и, следовательно, выяснить, что определяет выживание при таком моделировании абдоминального сепсиса.

#### 1.1.2. Профиль генной экспрессии у пациентов с сепсисом

В ходе специального исследования проведено определение генной экспрессии в лимфоидной ткани и в циркулирующих лейкоцитах у пациентов с сепсисом. Исследование было предпринято с целью проверки предположения о том, что профиль генной экспрессии в лимфоидной ткани поможет дифференцировать сепсис, осложненный полиорганной недостаточностью от несептических состояний. Получен список генов, экспрессия которых существенно изменилась (возросла или уменьшилась) у пациентов с сепсисом и полиор-



ганной недостаточностью. Этот список опубликован на сайте [www.cia.wustl.edu/SUS.htm](http://www.cia.wustl.edu/SUS.htm).

С целью расширения и углубления подобных исследований сформированы группы, занимающиеся изучением травматических повреждений (Inflammation and Host Response program [www.mgh.harvard.edu/gluegrant](http://www.mgh.harvard.edu/gluegrant)) и сепсиса (Consortium for Expression Profile Studies in Sepsis or CEP SIS) и активно внедряющих методики функциональной геномики в изучении критических состояний.

## 1.2. Апоптоз и ОПЛ

Одной из важнейших проблем в современной реаниматологии является острое повреждение легких (ОПЛ). И здесь изучение генетически запрограммированных процессов нашло свое применение. Так, исследование роли апоптоза в развитии ОПЛ позволило разработать новые стратегии предупреждения развития некоторых форм ОПЛ.

В легких в очагах воспаления отмечается задержка апоптоза нейтрофилов при одновременном ускорении апоптоза эпителия [19, 20].

Отличительной чертой ОПЛ выступает нейтрофильное воспаление в альвеолярных пространствах. В начале воспаления циркулирующие нейтрофилы деформируются и легко проникают в легочные капилляры, где под действием ряда хемокинов (например, интерлейкина-8), продуцируемых альвеолярными макрофагами, проникают в легочную ткань. В ней в ответ на бактериальные раздражители они подвергаются метаболической активации, приводящей к респираторному взрыву. Апоптоз нейтрофилов позволит уменьшить продолжительность их жизни и, таким образом, минимизировать высвобождение нейтрофильных свободных радикалов. В лейкоцитах, полученных путем бронхоальвеолярного лаважа у больных ОПЛ, процент апоптотических нейтрофилов оказался очень низким (меньше 10%) [21]. Продление жизни нейтрофилов связывают с высокой активностью колониестимулирующих факторов (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор — ГКФ, и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор — ГМКФ). Авторы показали, что ингибирование моноклональными антителами колониестимулирующих факторов в бронхоальвеолярной жидкости позволяет свести на нет антиапоптотическую активность. Ингибирующая активность бронхоальвеолярной жидкости снижается в поздних стадиях ОПЛ параллельно со снижением концентрации ГМКФ.

В ряде случаев продление жизни нейтрофилов благодаря высокой концентрации ГМКФ позволяет больным с ОПЛ выжить. Это наблюдается при бактериальных инфекциях в легких или в системном кровотоке, когда продление жизни ней-

трофилов ассоциируется с увеличением их микробицидной активности.

Повреждению легочного эпителия помимо ускоренного апоптоза способствует механическое циклическое раздувание и сдувание легких при проведении искусственной вентиляции ОПЛ. Этот процесс получил название вентилятор-ассоциированного повреждения легких.

## 1.3. Генетика факторов свертывания при ОПЛ

Важным направлением генетических исследований, связанных с ОПЛ, является выявление генетической предрасположенности к гиперкоагуляции. Взаимодействие воспаления и коагуляции выражается в их взаимной стимуляции, и при такой положительной обратной связи воспалительные и коагуляционные изменения увеличиваются в геометрической прогрессии. Показано, [22] что генетическая предрасположенность может повысить риск внутрисосудистой и внутриальвеолярной коагуляции, что усугубляет течение воспалительного процесса и ухудшает прогноз у больных с респираторным дистресс-синдромом. К группе риска относятся лица, у которых отмечается единственный нуклеотидный полиморфизм (или гаплотип единичных нуклеотидных полиморфизмов) в промоторе или в кодирующих участках генов  $\alpha$ -тромбина, фибриногена, фактора V, протеина C, эндотелиального рецептора протеина C, ИАП-1. Для подобных нуклеотидных полиморфизмов доказана связь с повышенным риском возникновения глубокого венозного тромбоза, инфаркта миокарда, инсульта, а также с нарушением гемостаза в сосудах и воздушных пространствах легких. Это существенно повышает риск возникновения ОПЛ у больных с сепсисом, травмой, аспирацией и в других состояниях, предшествующих ОПЛ.

Генетическая предрасположенность к гиперкоагуляции во многом влияет на прогноз при ОПЛ. Единичные нуклеотидные полиморфизмы (ЕНП) или ЕНП-гаплотип в генах ключевых факторов свертывания могут сместить равновесие в сторону неблагоприятного повышения коагуляции.

ЕНП — это одна из самых распространенных форм генетического полиморфизма — аллельного варианта, встречающегося в популяции более, чем в 1% случаев с постоянной частотой и не являющегося новой мутацией. ЕНП могут представлять собой нуклеотидные замены, вставки или делеции. ЕНП встречаются в геноме человека примерно через каждые пятьсот — тысячу пар оснований. ЕНП обнаруживаются в промоторе или в кодирующих участках гена и могут существенно изменить структуру и нарушить функцию белка. В процессе мейоза ЕНП обычно передаются группами, что делает правомерным использование термина ЕНП-гаплотип.

**Примеры ЕНП для факторов свертывания и фибринолитических белков и их связь с клиническими фенотипами [22]**

ЕНП	Промежуточный фенотип	Связь промежуточного фенотипа с заболеванием	Связь генотипа с заболеванием
Фактор V Г1691А, Arg <sup>506</sup> Gln	РАПС	Четко доказана	Очевидный риск развития ГВТ и ТЭЛА
ЭРПС, повтор на 23 паре	Нарушение поверхностной экспрессии клетки	Неизвестна	Предположительный или слабый риск ГВТ, ТЭЛА, заболеланий артерий
Фибриноген $\beta$ Г-455А	Изменение уровня фибриногена	Доказана (причинно-следственная?)	Неопределенные связи с заболеваниями артерий
ИАП-1 4Г/5Г	Изменения уровня ИАП-1	Допускается	Не определена
Протеин С, 1641 А/Г	Изменения уровня протеина С	Слабая связь с ГВТ, ТЭЛА	Слабая связь с ГВТ, ТЭЛА
Протеин С, 1654 Ц/Т	Изменения уровня протеина С	Слабая связь с ГВТ, ТЭЛА	Слабая связь с ГВТ, ТЭЛА

**Примечание.** ЭРПС – эндотелиальный рецептор к протеину С; РАПС – резистентность к протеину С; ГВТ – глубокий венозный тромбоз.

Примером влияния ЕНП на прокоагулянтную предрасположенность является ЕНП в промотере ФНО- $\alpha$ , способствующий повышению его секреции и обозначенный как G ФНО- $\alpha$ -308A. Этот аллельный вариант ассоциируется с повышенным риском септического шока и смертельного исхода у пациентов в критических состояниях.

В современных генетических исследованиях, как правило, изучают связь генотипа (например, ЕНП или ЕНП-гаплотипа) с уровнем секреции белка (так называемый промежуточный фенотип) и клиническим исходом, именуемым клиническим фенотипом.

#### Литература

1. Порошенко Г. Г. Генотипогеостаз – система поддержания стабильности генома. В кн.: Фундаментальные проблемы реаниматологии (избранные лекции): тр. НИИ общей реаниматологии РАМН. М.: 2003. 331–351.
2. Reshetnayk V. I., Sharafanova T. I., Ilchenko L. U. et al. Peripheral blood lymphocytes DNA in patients with chronic liver diseases. World J. Gastroenterol. 2001; 7 (2): 235–237.
3. Wiesner G., Schrögendorfer K., Hörauf R., Sobczynski P. et al. Eine hohe Arbeitsplatzbelastung mit Inhaalationsanästhetika ist mit einer vermehrten Bildung von Schwesterchromatidaustauschen assoziiert: Eine Untersuchung zur Gentoxizität Inhalationsanästhetika. Anesthesiol. und Intensivmed. 2002; 43(1): 16–20.
4. Порошенко Г. Г., Абилов С. К. Антропогенные мутагены и природные антимутагены. В кн.: Общая генетика: ИНТ ВИНТИИ; 1988; Т. 12. 205.
5. Порошенко Г. Г. Функционально-структурные изменения хромосом на протяжении митотического цикла. В кн.: Общая генетика Итоги науки и техники ВИНТИИ. М.; 1977; Т. 2: 5–58.
6. Арсеньева М. А., Порошенко Г. Г. Культура лейкоцитов периферической крови в гематологии и радиобиологии. М.: Наука; 1974.
7. Захаров А. Ф., Бенюш В. А., Кулешов Н. П., Барановская Л. И. Хромосомы человека. (Атлас). М.: Медицина; 1982.
8. Бочков Н. П., Кулешов Н. П., Журков В. С., Яковенко К. Н. Генетические последствия хромосомных aberrаций в культуре окружающей среды. В кн.: Генетические последствия загрязнения окружающей среды. М.: Наука; 1977. 106–110.
9. Порошенко Г. Г. Межхроматидные обмены. В кн.: Общая генетика: М.: ИНТ ВИНТИИ; 1977; Т. 2. 59–90.
10. Schmid W. The micronucleus test. Mutat. Res. 1975; 31(1): 9–16.
11. Абилов С. К., Порошенко Г. Г. Ускоренные методы прогнозирования мутагенных и бластомогенных свойств химических соединений. В кн.: Итоги науки и техники Токсикология: ВИНТИИ; 1986; 14. 171.

#### Заключение

Более широкое внедрение генетических методов в реаниматологию позволит выйти на новый уровень понимания серьезных клинических проблем, таких как ОПЛ, сепсис и др. критических состояний, биохимических процессов, связанных с ними, и разработать новые методы диагностики и эффективного патогенетического лечения. В настоящее время с этой целью используют наряду с методами структурной геномики и методы геномики функциональной.

12. Ильинских Н. Н., Новицкий В. В., Ванчугова Н. Н., Ильинских И. Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. Томск: Изд-во Томского ун-та 1992.
13. Порошенко Г. Г. Экогенетические аспекты мутагенеза и их изучение в модельных системах: автореф. дис.... д-ра биол. наук. 1988.
14. Москалева Е. Ю. Молекулярно-биохимические механизмы развития вторичных иммунодефицитных состояний при действии различных экологических факторов: автореф. дис.... д-ра мед. наук. М.; 1998.
15. Lander E. S. Array of hope. Nature Genetic 2001; 21 (1 Suppl.): 3–4.
16. Angus D. C., Wax R. S. Epidemiology of sepsis: An update. Crit. Care Med. 2001; 29 (7 Suppl.): 109–116.
17. Тучина Л. М., Порошенко Г. Г. Некоторые данные о работе реанимационных отделений в лечебно-профилактических учреждениях г. Москвы. В кн.: 9 Рос. нац. конгр. Человек и лекарство, 8–12 апр. 2002, Москва: Тез. докл. М.; 2002. 464–465.
18. Cobb J. P., Laramie J. M., Stormo G. D. et al. Sepsis gene expression profiling: Murine splenic compared with hepatic responses determined by using complementary DNA microarrays. Crit. Care Med. 2002; 30(12): 2711–2720.
19. Matute-Bello G., Liles W. C., Radella F. et al. Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1997; 156: 1969–1977.
20. Matute-Bello G., Liles W. C., Radella F. et al. Modulation of neutrophil apoptosis by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor during the course of acute respiratory distress syndrome. Crit. Care Med. 2000; 28: 1–7.
21. Martin T. R., Nakamura M., Matute-Bello G. The role of apoptosis in acute lung injury. Crit. Care Med. 2003; 31 (4 Suppl.): 184–187.
22. Russell J. A. Genetics of coagulation factors in acute lung injury. Crit. Care Med. 2003; 31 (4 Suppl.): 243–247.

Поступила 09. 03. 05