
ЛЕКЦИЯ

© В.К. Ильина, 2000

МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КОНСУЛЬТИРОВАНИЕ ПРИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ СКЕЛЕТА

В.К. Ильина

Центральный институт травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова, Москва



Костный скелет чрезвычайно подвержен наследственно обусловленным заболеваниям, среди которых наиболее тяжелую группу составляют генерализованные костные дисплазии, или наследственные системные заболевания скелета. Несмотря на относительную редкость, они причиняют существенный ущерб семье и обществу, приводя к ранней и тяжелой инвалидности больных.

В основе этих заболеваний лежит нарушение морфогенеза специализированных типов соединительной ткани — кости и хряща, что в свою очередь обусловлено генетическими мутациями, которые реализуются через нарушенные функции клеток, тканей и в конечном итоге проявляются в виде клинической картины болезни.

Поэтому генетические исследования в клинике травматологии и ортопедии должны быть многоплановыми и проводиться на всех уровнях организации жизни — геном, молекулярном, клеточном, организменном, семейном и популяционном, на которых и происходит реализация генетической информации.

Эффективная профилактика наследственных болезней может быть достигнута при рациональном использовании всех звеньев медико-генетической службы.

В России медико-генетическая служба построена по территориальному принципу и включает три основных уровня: первый — медико-генетические консультативные кабинеты, имеющиеся практически во всех крупных областных центрах, второй — региональные или межрегиональные медико-генетические центры (МГЦ), являющиеся самостоятельными учреждениями или входящие в состав лечебно-профилактических учреждений; третий — МГЦ федерального уровня.

В обязанности врача-генетика медико-генетической консультации входят: установление диагноза наследственного заболевания, выявление типа наследования в данной семье, расчет риска повторения болезни в семье, определение наиболее эффективного способа профилактики [2]. В МГЦ, по-

мимо основных функций медико-генетических консультаций, осуществляются дополнительные виды специализированной диагностики наследственных болезней. Во многих из них проводятся пренатальная диагностика, массовый скрининг новорожденных на некоторые наследственные болезни, а также лечение больных с наследственной патологией. На базе ведущих НИИ России создано шесть федеральных медико-генетических центров — по одному в Санкт-Петербурге и Томске и четыре в Москве, в которых стали возможны и молекулярные исследования.

Инициатором развития генетического направления в травматологии и ортопедии в нашей стране является акад. РАМН М.В. Волков. По его личной инициативе в 1968 г. была создана первая в России лаборатория клинической генетики костных заболеваний, которую 30 лет возглавляла проф. Е.М. Меерсон.

Медико-генетическое консультирование при наследственных заболеваниях скелета требует особенно внимательного подхода. Установление точного диагноза имеет первостепенное значение. Немногие клиницисты-ортопеды в своей практике наблюдали большое число больных с костными дисплазиями, и потому нереально рассчитывать на то, что они обладают достаточным опытом в диагностике и лечении всех типов этих заболеваний. Поэтому важное значение имеют коллективный опыт и тесное сотрудничество представителей разных специальностей.

В ЦИТО исследование наследственных заболеваний скелета ведется группой специалистов, включающей клиницистов-ортопедов, рентгенологов, генетиков, лабораторных исследователей. После подробного клинического, рентгенологического и, при необходимости, специального лабораторного обследования больного проводится генеалогическое исследование — анализ родственных связей и прослеживание признаков заболевания (фенотипа) среди родственников. В лаборатории генетики разработана и ведется генеалогическая

карта на каждого больного и его семью (включая сведения не менее чем о трех поколениях). В последние годы стало возможным использование компьютерных диагностических систем, таких как Possum, Oxford Medical Data Base (London Dismorfologi Data Base, London Neurogenetics Data Base). И конечно, при постановке диагноза большую помощь оказывают справочники С.И. Козловой и соавт. «Наследственные синдромы» (1996), D.W. Smith «Recognizable patterns of human malformations» (1982).

Развитие генетики углубило изучение фенотипа до клеточного и молекулярного уровней. Это позволяет надеяться на расшифровку патогенеза заболеваний, вычленение его звеньев, что в перспективе должно стать основой подходов к патогенетическому лечению. Вместе с тем нельзя не отметить, что молекулярные методы диагностики доступны только в МГЦ федерального уровня из-за высокой стоимости молекулярных исследований. Реально ДНК-диагностика моногенных болезней в России проводится лишь в нескольких центрах и не более чем по 20 нозологиям [1]. Для некоторых болезней из группы остеохондродисплазий ДНК-диагностика в нашей стране находится пока на стадии научных разработок.

В настоящее время ощущается значительный и все возрастающий интерес к генерализованным костным дисплазиям. Генетические аспекты их изучения широко обсуждаются в литературе последних лет. Благодаря успешному выполнению международной программы «Геном человека» появилась возможность представить классификацию скелетных дисплазий с учетом молекулярных дефектов. По сути уже сегодня каждый наследственный недуг, ген которого картирован, доступен для молекулярной диагностики прямыми или косвенными методами [1]. В 1998 г. создана новая Международная классификация костных дисплазий — International Nomenclature of Constitutional Disorders of Bone (Osteochondrodysplasias), включающая 32 группы различных костных заболеваний (адрес в Интернет: wwilcox@xchg.peds.csmc.edu).

По нашему мнению, каждый врач, и прежде всего специалист-ортопед, должен знать современное состояние проблемы наследственных заболеваний скелета.

Основная масса работ по молекулярному исследованию скелетных дисплазий выполнена в последние годы. Условно их можно разделить на четыре группы: исследование 1) мутаций генов структурных белков хряща; 2) мутаций генов, ответственных за врожденные дефекты метаболизма хряща; 3) мутаций генов белков, имеющих отношение к факторам роста хряща; 4) мутаций генов, ответственных за транскрипцию белков.

К первой группе, несомненно, относятся мутации генов цепей коллагена I типа, из которых

ген про- α_1 -цепи картирован на хромосоме 17, а ген про- α_2 -цепи — на хромосоме 7.

Доказано, что при *несовершенном остеогенезе* изменения в первичной структуре коллагена вызываются самыми разными мутациями в этих генах (вставки, делеции, замены оснований и др.). Выявленные мутации коллагеновых генов могут быть: а) не препятствующими включению измененных α -цепей в молекулу проколлагена (включающая мутация); б) препятствующими их включению (исключающая мутация). Клинические проявления исключаящих мутаций оказываются более мягкими, так как они ведут только к уменьшению количества нормальных коллагеновых молекул. Включающие мутации обуславливают образование аномальных проколлагеновых цепей, которые, включаясь в проколлагеновые молекулы, изменяют их структуру, и поэтому их клинические проявления тяжелее. Включающие мутации гена α_2 -цепи дают более мягкие клинические проявления, чем аналогичные мутации гена α_1 -цепи, поскольку молекула коллагена I типа является гетеротримером, содержащим две α_1 -цепи и одну α_2 -цепь.

В последние годы обнаружено достаточно большое количество мутаций, локализующихся в гене коллагена II типа (ген расположен на хромосоме 12). При дефекте коллагена II типа клиника варьирует от тяжелых форм дисплазий, таких как *болезнь Книста*, врожденная спондилоэпифизарная дисплазия, до менее тяжелых — спондилоэпифизарная дисплазия — и сравнительно легких заболеваний, таких как наследственная артрооптальмопатия или синдром Стиклера.

Была сделана попытка найти корреляцию типа проявления заболеваний с видом мутации гена коллагена II типа. И такая корреляция была выявлена. Так, делеции приводят к более тяжелому заболеванию (например, *болезнь Книста*), а точечные замены оснований — к более легким (спондилоэпифизарная дисплазия, синдром Стиклера), образуя «семью заболеваний» гена коллагена II типа [13, 14, 19,].

В 1994 г. в результате исследований, проводимых лабораторией клинической генетики ЦИТО совместно с лабораторией проф. D.J. Proctor в Филадельфии, была обнаружена новая мутация в гене проколлагена II типа у больного спондилоэпифизарной дисплазией. Выявлена замена гуанина на аденин, что повлекло за собой замену глицина на серин. Аналогичная мутация прослежена у всех больных членов семьи, тогда как у здоровых она отсутствовала [20].

В 1995 г. было выдвинуто предположение об участии в формировании дисплазии Книста группы различных мутаций [23]. Тем не менее, вся «семья заболеваний», включая спондилоэпифизарную дисплазию *congenita*, спондилоэпифизарную дис-

плазию *tarda*, дисплазию Книста и синдром Стиклера, связана с поражением гена коллагена II типа.

К первой же группе мутаций (мутации структурных белков хряща) относится тяжелое заболевание с непропорциональной карликовостью и резкими изменениями суставов и позвоночника — *псевдоахондроплазия*. В хондроцитах больных были обнаружены характерные включения — так называемые «полосатые тела», которые ранее рассматривались как следствие дефекта молекулы протеогликанов. Вопрос обсуждался на протяжении 20 лет, и наконец ген псевдоахондроплазии был картирован в области центромеры на хромосоме 19. Установлено, что ген псевдоахондроплазии отвечает за белок — хрящевой олигопептидный протеин, связывающий коллаген IX типа с протеогликанами. Изменения же в протеогликанах являются вторичными. Во всех исследованных случаях псевдоахондроплазии была обнаружена мутация на хромосоме 19 — малые делеции или замещения, в основном цистеина [15, 19].

Исследования D. Sohn показали, что псевдоахондроплазия является генетически гомогенным заболеванием [7]. Однако мы, располагая самым большим числом наблюдений псевдоахондроплазии (59 больных из 47 семей), отмечали выраженную клиническую гетерогенность заболевания. Можно думать, что при молекулярных исследованиях на большем клиническом материале выявится, что псевдоахондроплазия и генетически неоднородна, как это установлено для другой формы скелетной дисплазии — множественной эпифизарной дисплазии [10, 15].

Ген *множественной эпифизарной дисплазии* картирован также на хромосоме 19, в той же области, что и ген псевдоахондроплазии [12]. Однако ситуация с множественной эпифизарной дисплазией оказалась сложнее. Дело в том, что в большой семье с множественной эпифизарной дисплазией у всех пораженных членов семьи была обнаружена мутация, которая локализовалась в хромосоме 1 в том месте, где картирован ген IX типа коллагена. В 1997 г. D. Sohn выявил, что и по этой мутации множественная эпифизарная дисплазия может быть гетерогенной. Коллаген IX типа является гетеротримером и состоит из α_1 -, α_2 - и α_3 -цепей. При анализе сцепления в 5 семьях обнаружены мутации в тех или других α -цепях коллагена IX типа [7]. Таким образом, множественная эпифизарная дисплазия может быть обусловлена мутацией в олигопептидном хрящевом протеине (хромосома 19) либо в трех других генах (для α_1 -, α_2 - и α_3 -цепи коллагена IX типа) на хромосоме 1 или 20.

Учитывая выраженную клиническую вариабельность множественной эпифизарной дисплазии, есть основания в дальнейшем искать корреляцию клинических вариантов с «их» генетическим дефектом. Вероятно, необходимо обследовать как

можно большее число больных, чтобы можно было сказать, чем клинически отличаются эти генетические варианты множественной эпифизарной дисплазии.

Аналогична ситуация с *синдромом Стиклера*: при одном и том же заболевании мутация может быть либо в гене II типа коллагена (о чем сказано выше), либо в гене XI типа коллагена. И если еще совсем недавно считалось, что при дефекте коллагена II типа глаза не поражаются, а при дефекте коллагена XI типа бывает выраженная миопия, ретинопатия, глаукома, то дальнейшие исследования показали, что тяжелая форма синдрома Стиклера с глазными симптомами возможна и при мутации α_1 -цепи коллагена II типа [23].

Итак, скелетные дисплазии с мутациями генов структурных белков хряща могут быть представлены следующим образом:

Тип коллагена с мутацией гена	Заболевание
I	Несовершенное костеобразование
II	Спондилоэпифизарная дисплазия Синдром Стиклера Синдром Книста
IX	Множественная эпифизарная дисплазия
XI	Синдром Стиклера
Хрящевой олигопептидный протеин	Псевдоахондроплазия Множественная эпифизарная дисплазия

Вторая большая группа — наследственные болезни обмена хряща (дефект ферментов, связанных с метаболизмом хряща). Кроме *мукополисахаридозов*, при которых имеются дефекты лизосомных ферментов, за последние 2–3 года в эту группу включены и другие заболевания.

Так, дефект арилсульфатазы установлен при *точечной хондродисплазии*. Это заболевание, характеризующееся резким склерозом скелета, карликовостью и множественными аномалиями черепных и лицевых костей [11].

Дефект лизосомной протеазы катепсина А обнаружен при *пикнодисостозе*. Ген пикнодисостоза картирован недавно на хромосоме 1. Представляет интерес дальнейшее изучение катепсина А мутаций в плане исследования этой протеазы как ингибитора, который может быть использован для лечения костных дисплазий с усиленной деградацией костной ткани, таких как остеопороз и некоторые артриты.

Несколько лет назад был обнаружен метаболический дефект при *диастрофической дисплазии*, который заключается в нарушении транспорта серы (как бы в противоположность мукополисахаридозам, при которых, наоборот, накапливаются вещества, содержащие серу). Фермент, отвечающий за метаболизм серы, был назван «ферментом транспорта серы». Тот же дефект вы-

явлен при *ахондрогенезе типа IV*. Было идентифицировано новое семейство хондродисплазий с дефектом данного фермента. Это широкий спектр заболеваний — от ахондрогенеза типа IV до диастрофической дисплазии. Установлена высокая корреляция между тяжестью клинического проявления и степенью дефекта усвоения серы и сульфатирования протеогликанов. Показано, что ахондрогенез типа IV (летальная остеохондродисплазия «коротких ребер и конечностей») является аллельным вариантом диастрофической дисплазии. При этом мутация гена, ответственного за мембранный транспорт серы, препятствует сульфатированию цепей гликозаминогликанов, приводя к тяжелым нарушениям организации хряща, созревания ростковой пластинки и энхондральной оссификации [22].

Третья группа — заболевания, связанные с дефектом генов-регуляторов роста хряща. На первом месте в изучении этой проблемы стоят новые исследования ахондроплазии, гипохондроплазии и танатофорной карликовости. Клиническое и рентгенологическое сходство ахондроплазии, гипохондроплазии и танатофорной карликовости позволило предположить наличие «семейства ахондроплазии» с общим патогенезом. Молекулярные исследования подтвердили это предположение [6]. Мутация в гене рецептора фибробластостового фактора 3, расположенного на хромосоме 4, сегодня известна как причина всех трех заболеваний. Отмечена высокая степень соответствия генотипа фенотипу при этих заболеваниях [9].

При *ахондроплазии* имеет место мутация в трансмембранном домене гена рецептора фибробластостового фактора 3. По данным D. Rimoin и соавт. [19], эта точковая мутация (замена лицина на аргинин) была обнаружена у 96,3% больных ахондроплазией. Ген *гипохондроплазии* также локализован на хромосоме 4, однако здесь имеет место мутация в проксимальном домене тирозинкиназы этого гена (точковая мутация — замена аспарагина на лицин) [6, 19].

В 1998 г. Эндокринологическим научным центром РАМН, Ногайским университетом (Япония) совместно с лабораторией генетики ЦИТО был проведен генетический скрининг на патологию гена рецептора фибробластостового фактора 3 (FGFR 3) у 16 детей с гипохондроплазией, находящихся под наблюдением нашей лаборатории. Из них у 9 обнаружена и у 7 не обнаружена данная мутация. Возможно, заболевание является генетически гетерогенным. По нашим данным, гипохондроплазия гетерогенна в клиническом плане. Предстоит выяснить зависимость клинической симптоматики от генетического статуса детей с гипохондроплазией [8].

Другие точковые замены в домене тирозинкиназы фибробластостового фактора 3 обнаружены

при *танатофорной карликовости*. Таким образом, все три заболевания обусловлены разными мутациями одного гена [17]. Похоже, что некоторые нуклеотиды этого гена в большей степени подвержены мутациям, следствием которых является нарушение роста энхондральной кости. Поэтому, если мы хотим найти способ лечения этих заболеваний, нужно искать средства, супрессирующие данный ген.

Четвертая группа — костные дисплазии с мутацией генов, ответственных за транскрипцию белков. В последнее время показано, что при некоторых формах костных дисплазий имеется нарушение факторов транскрипции. Такое нарушение, в частности, обнаружено при *черепно-ключичной дисплазии* — наследственной скелетной дисплазии, характеризующейся гипоплазией ключиц, замедленной оссификацией швов и родничков черепа. Первоначально обнаруженная на мышцах мутация остеобластспецифического фактора транскрипции (CBFA-1), картированного на хромосоме 6 (делеции, инсерции и др.), была подтверждена у человека на 2 спорадических случаях черепно-ключичной дисплазии. Показано, что этот фактор является одним из главных в дифференцировке остеобластов [14, 16, 18, 21].

В настоящее время целые коллективы исследователей в разных странах заняты молекулярно-генетическим анализом скелетных дисплазий. Много уже сделано, однако по мере продвижения исследований выясняется, что еще очень много предстоит сделать, чтобы выявить причины частого несоответствия результатов генетического и клинического анализа. Остаются открытыми вопросы, касающиеся причин различной экспрессии идентифицированных генов на клиническом уровне, продолжается поиск корреляции клинических вариантов заболеваний с соответствующими им мутациями.

Чрезвычайно важным представляется изучение генной экспрессии на клеточном уровне, поскольку клетка является структурно-топографической основой взаимодействия генов.

Новый уникальный подход к генетическому анализу заболеваний скелета стал возможным с введением методов клеточных культур. Клеточно-генетический подход позволил осуществлять генетический анализ на соматических клетках как самостоятельных биологических объектах, несущих и передающих генетическую информацию об исходных индивидуумах.

Разработанная в лаборатории генетики ЦИТО программа предусматривает структурно-функциональное изучение в клеточных культурах основных клеточных элементов соединительной ткани и ее специализированных типов — костной и хрящевой тканей: фибробластов, остеогенных и хрящевых клеток. Как стало известно сравнительно

недавно, популяции остеобластических и гемопоэтических клеток костного мозга принадлежат к разным клеточным линиям, имеющим собственные стволовые клетки [3–5]. Общие предшественники остеогенных и хрящевых клеток находятся среди стромальных фибробластоподобных клеток костного мозга, что доказано в опытах с обратной трансплантацией, а также при культивировании по методу органных культур на мембранных фильтрах [3].

Метод выявления этой категории предшественников впервые нашел применение в ортопедической клинике при изучении патогенеза заболеваний костной и хрящевой тканей. Эти клеточные элементы уже сегодня могут быть выделены нами в культуру в чистом виде. Исходным явилось представление о том, что патогенез болезней костей в значительной степени основан на генетически детерминированных нарушениях элементарных клеточных функций, таких как пролиферация, дифференцировка, движение, контакты и т.д. Особенности клеточной структуры и функций определяет так называемый «клеточный фенотип», отражающий «фенотип организма». Появляется возможность понять, как гены через клеточные функции создают макроструктуры клетки — первое элементарное звено морфогенеза. Таким образом, согласно нашей идее, на клеточных культурах можно наблюдать патологические процессы в соединительной ткани опорно-двигательного аппарата через генетически обусловленное нарушение клеточных функций. На этой основе и была разработана программа, позволяющая выявлять клеточные механизмы нарушенного процесса морфогенеза.

В соответствии с данной программой проводился анализ системного остеопороза и множественной экзостозной хондродисплазии. При этом обнаружены существенные особенности пролиферативной активности клеток. Так, при системном остеопорозе значительно ослаблена эффективность клонирования стромальных клеток костного мозга. Это указывает на то, что в патогенезе данного заболевания основная роль принадлежит нарушению гистогенеза, а не резорбции костной ткани, как считалось ранее. При множественной экзостозной хондродисплазии, напротив, существенно повышены показатели пролиферативного потенциала, особенно при быстрорастущих экзостозах, что имеет важное клиническое значение, учитывая их частое озлокачествление.

Совершенно очевидно, что причины всех этих изменений следует искать в наследственных дефектах клеток и их рецепторов.

Результаты современного генетического анализа радикально меняют существо медико-генетического консультирования.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Горбунова В.Н., Баранов В.С. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. — СПб, 1997.
2. Козлова С.И., Демикова Н.С., Семанова С., Блинникова О.Е. Наследственные синдромы и медико-генетическое консультирование. — 2-е изд. — М., 1996.
3. Фриденштейн А.Я., Лалыкина К.С. Индукция костной ткани и остеогенные клетки-предшественники. — М., 1973.
4. Фриденштейн А.Я. //Методы культивирования клеток. — Л., 1987. — С. 257–265.
5. Чертков И.Л., Фриденштейн А.Я. Клеточные основы кроветворения. — М., 1977.
6. Bonaventure J., Rousseau F., Legeai-Mallet L. et al. //Am. J. Med. Genet. — 1996. — Vol. 63. — P. 148–154.
7. Cohn D.H. //International skeletal dysplasia meeting, 3rd. — Marina Del Rey (California), 1997. — P. 24.
8. Fofanova O. et al. //Endocr. J. — 1998. — Vol. 45. — P. 791–795.
9. Francomano C.A., Ortiz de Luna R.I., Hefferon T.W. et al. //Hum. Molec. Genet. — 1994. — Vol. 3. — P. 787–792.
10. Hecht J.T., Nelson L.D., Crowder E. et al. //Nature Genet. — 1995. — Vol. 10. — P. 325–329.
11. Heikoop J.C., Wanders R.J.A., Strijland A. et al. //Hum. Genet. — 1992. — Vol. 89. — P. 439–444.
12. Knowlton R.G., Cekleniak J.A., Cohn D.H. et al. //Genomics. — 1995. — Vol. 28. — P. 513–519.
13. Lee B. et al. //International skeletal dysplasia meeting, 3rd. — Marina Del Rey (California). — 1997. — P. 19.
14. Lee B., Vissing H., Ramirez F. et al. //Ann. NY Acad. Sci. — 1990. — Vol. 580. — P. 562–563.
15. McKeand J., Rotta J., Hecht J.T. //Am. J. Med. Genet. — 1996. — Vol. 63. — P. 406–410.
16. Mundlos S., Mulliken J.B., Abramson D.L. et al. //Hum. Molec. Genet. — 1995. — Vol. 4. — P. 71–75.
17. Naski M.C., Wang Q., Xu J. et al. //Nature Genet. — 1996. — Vol. 13. — P. 233–237.
18. Ramesar R.S., Greenberg J., Martin R. et al. //J. Med. Genet. — 1996. — Vol. 33. — P. 511–514.
19. Rimoin D.L., Cohn D.H., Eyre D. //Pediatr. Radiol. — 1994. — Vol. 24. — P. 425–426.
20. Ritvaniemi P., Sokolov B., Williams C., Yurgenev L., Meerson E., Ala-Kokko L., Prockop D. //Hum. Mutation. — 1994. — Vol. 3. — P. 261–267.
21. Rousseau F., Ghouz El., Legeai-Mallet L. et al. //Hum. Molec. Genet. — 1996. — Vol. 5. — P. 509–512.
22. Superti-Furga A., Rossi A., Steinmann B., Gitzelmann R. //Am. J. Med. Genet. — 1996. — Vol. 63. — P. 144–147.
23. Williams C.J., Jimenez S.A. //J. Rheumatol. — 1995. — Vol. 22. — P. 28–33.