

ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ АНАТОМИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ НА РУБЕЖЕ ТЫСЯЧЕЛЕТИЙ

Разин А.П.

Сальская центральная больница

Сальск, Ростовская область, Россия

Роль современной патологической анатомии в развитии медико-биологических наук велика и многообразна. Широкое внедрение биохимических методов, а в морфологии – гистохимии позволило изучать метаболические и молекулярные перестройки. Прогресс молекулярной биологии и иммуногистохимии, гибридизации *in situ* стали базой для создания новой дисциплины – молекулярной патологии, изучающей молекулярную биологию общепатологических процессов и болезней на уровне изменений структуры, функциональной активности и экспрессии генов.

Патологическая анатомия постепенно вбирала в себя последние достижения и новейшие технические решения таких наук, как анатомия, физиология, химия, микробиология, иммунология, генетика, клеточная и молекулярная биология. Сегодня она имеет возможность изучать нарушения структуры и функции, начиная с организменного уровня и заканчивая молекулярно-генетическим.

Кратко охарактеризуем главные технические достижения медицинских и биологических наук, давшие основной импульс развитию современной патологической анатомии, которая в настоящее время сочетает в себе элементы классической и молекулярной патологии.

Методы, базирующиеся на иммунных механизмах, основаны на взаимодействии тканевых и клеточных антигенов человека со специально полученными антителами, несущими на себе разнообразные метки. Метки антител для световой иммуногистохимии могут быть представлены различными флюорохромами, пероксидазой хрена, щелочной фосфатазой, пероксидаза-антипероксидазным, авидин-биотин-пероксидазным и авидин-стрептоавидин-пероксидазным комплексами, а так же радиоактивными субстанциями. В электронной иммуногистохимии предпочтительнее использование меток в виде коллоидного серебра или золота.

Световая иммуногистохимия позволяет выявлять антиген на тканевом и клеточном уровнях и оценивать количество продукта реакции по интенсивности флюоресценции или окраски ткани. Электронная иммуногистохимия используется для изучения субклеточной локализации антигена.

Имуногистохимия служит также для оценки экспрессии клеточных генов по соответствующим белковым продуктам в тканях и клетках, кодируемым данными генами.

Имуногистохимические метки клеток в сочетании с их проточной цитофотометрией, лазерной и компьютерной сортировкой позволяют выделять группы клеток по наличию определенных антигенных детерминант, что широко используется в диагностике заболеваний крови.

Исследование молекулярных основ болезней связано с идентификацией отдельных продуктов (например, аномальных белков), путей передачи клеточных и межклеточных сигналов, синтеза определенных белков, глико- и липопротеидов.

Развитие современных методов исследования ДНК стало возможным после открытия серии ферментов (эндонуклеаз, рестриктаз, полимераз, транскриптаз), обеспечивающих специфические манипуляции с ДНК и РНК. В результате удалось получить специфические фрагменты молекул ДНК из различных клеток и тканей, синтезировать аминокислотные последовательности, характерные для определенных белков, создать новые молекулы ДНК, рекомбинируя фрагменты молекул из различных источников. Фрагменты вновь синтезированных молекул ДНК часто используются в качестве вектора для клонирования отдельных белков с заранее заданными свойствами. Фрагменты уже существующих ДНК с помощью эндонуклеаз переводят в векторы, которые размещают в фагах в виде геномной библиотеки. Геномная библиотека необходима для идентификации вновь открытых белков.

Использование современной техники молекулярного анализа позволило начать исследования экспрессии отдельных генов, контролирующей продукцию определенного белка. Анализ структуры генов помог понять механизмы их транскрипции и идентифицировать многие факторы, её регулирующие. В одних случаях этими факторами оказались гормоны, в других — ядерные белки, отвечающие на внеклеточные стимулы.

Возможность исследовать функции отдельных генов появилась после введения в практику методики получения трансгенных животных и моделей с выбиванием определенного гена (knockout). Животным (мышам) вводят в яйцеклетку отдельные гены, ответственные за синтез определенного фактора, и в результате получают животных с гиперэкспрессией этого фактора,

локализованного тканеспецифически. Прием выбивания генов в настоящее время особенно распространен, поскольку позволяет изучить роль отдельных факторов в патогенезе различных заболеваний.

Экспрессия генов приводит к усилению белкового синтеза. Белки могут быть обнаружены и идентифицированы как иммунохимическим путем – с помощью гель-электрофореза, так и иммуногистохимическими методами – с использованием высокоспецифичных антител.

Открытие в 1986 г. полимеразной цепной реакции (PCR) явилось революцией в практической молекулярной биологии благодаря возможности быстрой амплификации специфических фрагментов ДНК. Для использования этого метода достаточно иметь одну молекулу или фрагмент ДНК или РНК, чтобы наработать необходимое для определения с помощью гель-электрофореза и Southern-блот-гибридизации количество копий ДНК. Этот метод широко используется для исследования структуры и экспрессии генов. Для изоляции нуклеиновых кислот и перевода их в жидкую фазу необходимо разрушение клеток и тканей, что затрудняет сопоставление результатов амплификации с гистопатологической картиной и подсчет клеток.

Метод гибридации *in situ* обеспечивает точную локализацию специфической нуклеотидной последовательности в клетках. К сожалению, он обладает низкой (по сравнению с PCR) чувствительностью, и для проведения реакции требуется не менее 10-20 копий м-РНК на клетку.

Применение молекулярной техники позволило сочетать высокую чувствительность PCR с клеточной локализацией гибридации *in situ*. Этот метод получил название *in situ* PCR.

Все три метода в настоящее время широко используются в патологии. Наибольшее число исследований *in situ* PCR сфокусировано на определении вирусной или чужеродной последовательности нуклеиновых кислот. Возможность обнаруживать латентные вирусы в единичных копиях является важным шагом на пути к пониманию патогенеза вирусных заболеваний.

Метод *in situ* PCR используется также для изучения эндогенных последовательностей ДНК, включая единичные копии генов человека, хромосомные транслокации и картирование малочисленных копий геномных последовательностей в метафазных хромосомах. Возможность изучения генетических детерминант онкогенеза, включая мутации ДНК и хромосомные транслокации, крайне важна для понимания латентного периода между повреждением ДНК и появлением морфологических признаков атипии или малигнизации.

Использование в патологической анатомии комплекса молекулярно-биологических, иммунологических и морфологических методов привело к более полному пониманию взаимосвязи между структурой и функцией и формированию нового направления в развитии патологии – функциональной морфологии, которая в XXI веке становится ведущим подходом в изучении организма человека и морфогенеза различных заболеваний.