



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

КАФЕДРА ОБЩЕЙ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РАЗРАБОТКИ

**Для самостоятельной подготовки студентов института клинической
медицины, института стоматологии, института педиатрии, института
профилактической медицины и института социально-гуманитарного и
цифрового развития медицины**

ТЕМА: ЧЕЛОВЕК КАК ОБЪЕКТ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ ЧЕЛОВЕКА

Составители: Ю.В. Мякишева – д.м.н., профессор
Д.С. Громова – старший преподаватель

Самара, 2025

Методические разработки предназначены для самостоятельной работы обучающихся на практических занятиях, а также для внеаудиторной работы для подготовки к занятиям и экзамену по дисциплине «Биология».

Методические разработки составлены в соответствии с рабочей программой дисциплины, а также согласно требованиям Федерального государственного образовательного стандарта.

ТЕМА: Человек как объект генетического исследования. Методы изучения наследственности человека.

Актуальность темы. Человек сталкивается с новыми факторами среды, ранее никогда не встречавшимися на протяжении всей его эволюции, испытывает большие нагрузки социального и экологического характера (избыток информации, стрессы, загрязнение атмосферы и др.). В то же время в развитых странах улучшается медицинское обслуживание, повышается уровень жизни, что меняет направленность и интенсивность отбора. Новая среда может повысить уровень мутационного процесса или изменить проявляемость генов. И то и другое приведёт к дополнительному появлению наследственной патологии. Знание основ медицинской генетики позволяет врачу понимать механизмы индивидуального течения болезни и выбирать соответствующие методы лечения. На основе медико-генетических знаний приобретаются навыки диагностики наследственных болезней, а также появляется умение направлять пациентов и членов их семей на медико-генетическое консультирование для первичной и вторичной профилактики наследственной патологии.

Цель занятия: изучить особенности генетики человека и основные современные и классические методы изучения наследственности человека

Формируемые компетенции. В процессе изучения темы у обучающихся формируются следующие универсальные, общепрофессиональные и профессиональные компетенции:

- УК-8: Способен создавать и поддерживать в повседневной жизни и профессиональной деятельности безопасные условия жизнедеятельности для сохранения природной среды, обеспечения устойчивого развития общества, в том числе при угрозе и возникновении чрезвычайных ситуаций и военных конфликтов
- ОПК-2: Способен проводить и осуществлять контроль эффективности мероприятий по профилактике инфекционных и неинфекционных заболеваний у населения (детей), формированию здорового образа жизни и санитарно-гигиеническому просвещению населения
- ОПК-2: Способен выявлять и оценивать морфофункциональные, физиологические состояния и патологические процессы в организме человека, моделировать патологические состояния *in vivo* и *in vitro* при проведении биомедицинских исследований
- ОПК-4: Способен проводить и осуществлять контроль эффективности мероприятий по профилактике, формированию здорового образа жизни и санитарно-гигиеническому просвещению населения
- ОПК-5: Способен оценивать морфофункциональные, физиологические состояния и патологические процессы в организме человека для решения профессиональных задач
- ОПК-8: Способен использовать основные физико-химические, математические и естественно-научные понятия и методы при решении профессиональных задач
- ПК-13: Способен проводить и осуществлять контроль эффективности мероприятий по профилактике инфекционных и неинфекционных заболеваний у

населения (детей), формированию здорового образа жизни и санитарно-гигиеническому просвещению населения

- ПК-19: Оценка морфофункциональных, физиологических состояний, физических, патологических процессов и генетических факторов в организме человека, управление живым организмом как сложной системой для решения профессиональных задач

- ПК-20: Способен проводить и осуществлять контроль эффективности мероприятий по профилактике инфекционных и неинфекционных заболеваний у населения (детей), формированию здорового образа жизни и санитарно-гигиеническому просвещению населения

Студент должен **знать**:

- суть каждого метода генетики человека: его возможности, достоинства и недостатки

- особенности человека как объекта исследований

Студент должен **уметь**:

- определять тип наследования

- осуществлять анализ родословной

- решать задачи по интерпретации различных методов изучения генетики человека

- работать со специальной литературой по биологии

Студент должен **владеть**:

- навыками научно-исследовательской работы

- владеть техникой изготовления слайдов по концептуальным вопросам генетики человека

ИНФОРМАЦИОННЫЙ БЛОК

Генетика человека – раздел генетики, изучающий закономерности наследования и изменчивости признаков у человека, тесно связанный с антропологией и медициной. Генетика человека изучает:

1) генетическую детерминацию физиологических, биохимических и морфологических свойств отдельных тканей и органов человека, нервно-гуморальную координацию его психической (эмоциональной) и интеллектуальной деятельности;

2) статистические закономерности распределения генных частот в популяциях;

3) генетическую обусловленность болезней, их передачу в поколениях, проявление в онтогенезе, распространение в популяциях, возможность медико-генетических консультаций по вопросам наследственных болезней, географическое распространение и т. д.;

4) роль наследственности и среды в формировании и развитии признаков.

Развитие данного направления генетики происходило скачкообразно: каждый новый прорыв в медицинской генетике был результатом появления нового эффективного метода исследования. Так, ощутимого прогресса в области медицинской генетики удалось достигнуть в 50-е годы XX столетия, когда были разработаны методы кариотипирования. Именно в это время выявлены и

охарактеризованы основные синдромы, связанные с патологией аутосом и половых хромосом. Однако революционный прорыв стал возможен благодаря молекулярно-генетическим методам и, прежде всего, гибридизации нуклеиновых кислот. Метод амплификации ДНК (получение множества копий нужного фрагмента генома) в значительной степени компенсировал отсутствие гибридизационного метода в медицинской генетике. Использование молекулярных подходов позволило не только картировать гены человека, но и идентифицировать в них основные типы мутаций, обуславливающих развитие наследственных заболеваний.

Медицинская генетика является частью генетики человека, которую можно определить, как систему знаний о роли генетических факторов в патологии человека и систему методов диагностики, лечения и профилактики наследственной патологии в широком смысле. Задачи медицинской генетики заключаются в своевременном выявлении носителей наследственных заболеваний, выявлении больных детей и выработке рекомендаций по их лечению.

С генетической точки зрения все болезни в зависимости от роли наследственных и средовых факторов в их развитии можно подразделить на 3 группы.

1. Наследственные заболевания. Фенотипическое проявление мутации как этиологического фактора практически не зависит от среды; последняя может только изменять выраженность симптомов и тяжесть течения болезни. Это генные и хромосомные наследственные болезни (гемофилия, фенилкетонурия, муковисцидоз, болезнь Дауна и др.). В основу генетической классификации наследственных болезней положен этиологический принцип: тип мутаций и характер взаимодействия со средой. Наследственные болезни подразделяются на 5 групп: генные болезни, хромосомные болезни, болезни с наследственной предрасположенностью (мультифакториальные), генетические болезни соматических клеток и болезни генетической несовместимости матери и плода.

Болезни при несовместимости матери и плода по антигенам возникают в результате иммунологической реакции материнского организма на антигены плода. Наиболее хорошо изученным заболеванием этой группы является гемолитическая болезнь новорожденных, развивающаяся вследствие несовместимости матери и плода по Rh-антигенам. Эта группа составляет около 1% патологии новорожденных.

2. Болезни с наследственной предрасположенностью. Их в свою очередь можно подразделить еще на два вида. Болезни, наследственность при которых является этиологическим фактором, но для их проявления необходимо действие соответствующего фактора внешней среды (например, подагра, диабет). Болезни, этиологическими факторами при которых являются средовые влияния, однако частота возникновения и тяжесть течения болезней зависят от наследственной

предрасположенности. К таким болезням относятся атеросклероз, гипертоническая болезнь, язвенная болезнь, псориаз и др.

3. Болезни, в происхождении которых наследственность не играет роли. Это, например, травмы, ожоги, инфекционные болезни. Генетические факторы в этом случае могут влиять только на течение патологических процессов (скорость регенерации, выздоровления, компенсации функций).

Человек как объект генетических исследований сложен и вместе с тем удобен. Сложность связана с существованием ряда ограничений, возникающих при проведении научного эксперимента:

- невозможно использовать основной метод в генетике – гибридологический, невозможно скрещивать в искусственных условиях, т.е. проведения прямых экспериментов;
 - сложный кариотип - большое число хромосом в кариотипе: $2n = 46$
 - большое число групп сцепления – у женщин – 23, у мужчин – 24. Аутосомных – 22 и две по половым хромосомам: по X и Y хромосомам;
 - немногочисленное потомство – невозможно проводить статистический анализ.
- Человек - одноплодная особь (за одну беременность, как правило, рождается один ребенок), исключение - рождение близнецов,
- малое количество детей в браке,
 - невозможность формировать необходимую схему брака, так как люди свободно вступают в брак (в основе браков лежат любые мотивы, кроме научно-исследовательских целей)
 - позднее половое созревание- продолжительность цикла развития до наступления половой зрелости,
 - редкая смена поколений – одно поколение у человека 25 лет
 - продолжительность жизни соизмерима с жизнью исследователя, одновременно можно наблюдать и проанализировать 3 – 4 поколения
 - невозможность создания одинаковых условий, среда для человека более широкое понятие, чем для животных и растений. Наряду с питанием, климатом и др. абиотическими и биотическими факторами, средой для человека являются и социальные факторы, трудно изменяемые по желанию исследователя
 - характерен большой генотипический и фенотипический полиморфизм (наличие в пределах одного вида резко различаться особей друг от друга)

С другой стороны, бурное развитие молекулярной и клеточной биологии существенно расширило наши представления о биохимических, физиологических, молекулярных и других важных процессах, происходящих в организме здорового человека, что позволяет судить о тонких патогенетических механизмах отдельных клинических симптомов и заболеваний. К достоинствам (преимуществам) человека, как объекта генетических исследований можно отнести:

- исчерпывающие знания по анатомии и физиологии человека,
- большое число изученных мутаций, пополняемых и в настоящее время,
- многочисленность человеческой популяции в целом, позволяют всегда выбрать нужную схему брака.

Методы медицинской генетики:

1. Клинико-генеалогический метод.
2. Близнецовый метод.
3. Цитогенетический и молекулярно-цитогенетический методы.
5. Молекулярно-генетические методы.
6. Биохимические методы.
7. Популяционно-статистический метод и др.

Клинико-генеалогический метод был предложен в 1865 г. Ф. Гальтоном, однако как метод изучения наследственности человека его стали применять только с начала XX столетия. Клинико-генеалогический метод дает возможность:

- выявлять наследственный характер признака;
- определять тип наследования;
- определять пенетрантность гена;
- изучать закономерности мутирования отдельных генов;
- устанавливать носительство мутантного гена тем или иным членом семьи;
- определять вероятность генетически обусловленных событий и рассчитывать риск наследования патологического гена (признака) при медико-генетическом консультировании.

Клинико-генеалогический метод лежит в основе медико-генетического консультирования и включает 3 этапа: сбор генетической информации; составление родословной; генетический анализ родословной.

Сбор генетической информации проводится путем опроса, анкетирования, личного собеседования. При составлении родословной сбор сведений о семье начинается с человека, которого называют пробанд (обычно это больной с изучаемым заболеванием или признаком). Чем больше поколений удастся проследить и чем более полно охватить членов родословной при сборе сведений, тем больше вероятность получения достоверных сведений о характере наследования изучаемого признака. В родословную вносят сведения о выкидышах, абортах, мертворожденных, бесплодных браках, внебрачных детях и др. При сборе информации необходимо внимательно анализировать сообщения об инфекциях и травмах, следует учитывать гетерогенность и варьирующую экспрессивность наследственных заболеваний. Необходимо выяснять акушерский анамнез, учитывать наличие и характер профессиональных вредностей, возраст, национальность, место жительства семьи, профессию, наличие хронических заболеваний в семье, причину смерти умерших и др. На основании полученных данных составляется графическое изображение родословной. На рис. 1 изображены стандартные символы, применяемые при составлении родословных (предложено в 1931 г. Г. Юстом).

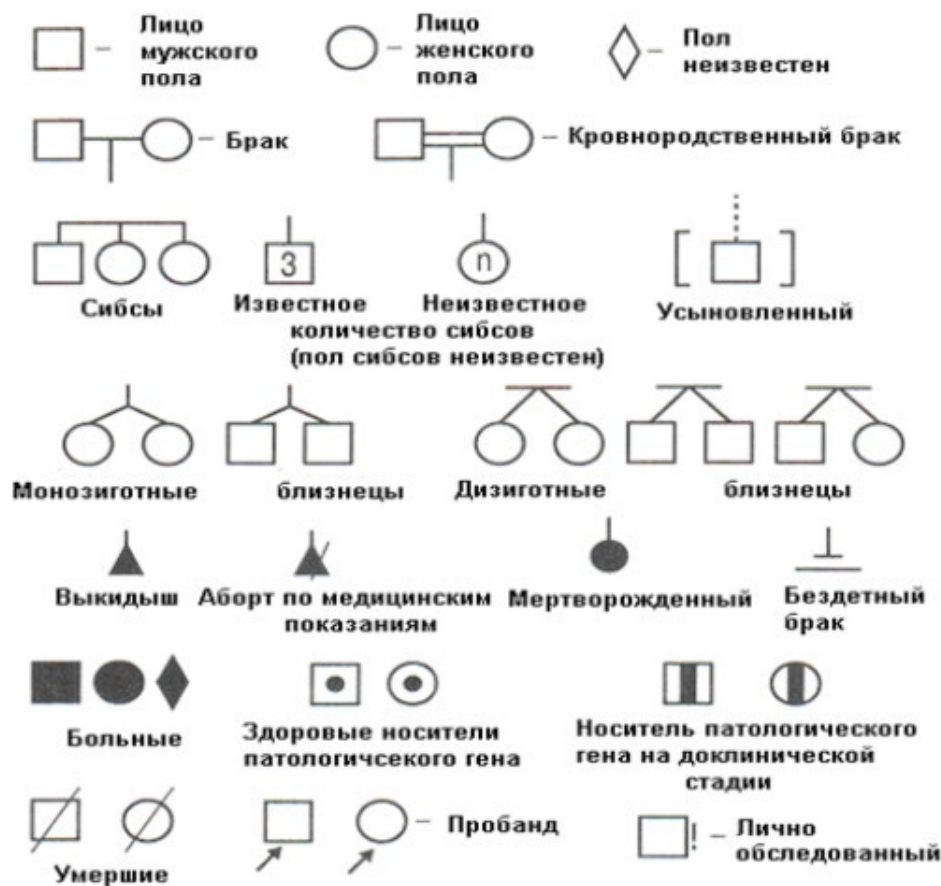


Рис. 1. Символы, используемые при составлении родословных

При составлении графического изображения родословной важно соблюдать следующие правила:

1. Составление родословной начинают с пробанда. Братья и сестры (сibsы) располагаются в порядке рождения слева направо, начиная со старшего.
2. Все члены родословной располагаются строго по поколениям, в один ряд.
3. Поколения обозначаются римскими цифрами слева от родословной сверху вниз.
4. Арабскими цифрами нумеруется потомство одного поколения (одного ряда) слева направо. Благодаря такой нумерации каждый член семьи имеет свой шифр (например: I-1, I-2, II-2, II-4 и др.)
5. Указывается возраст членов семьи (родословной), в связи с тем, что некоторые болезни проявляются в разные периоды жизни.
6. Отмечаются лично обследованные члены родословной. Графическое изображение родословной может быть вертикально-горизонтальным или расположенным по кругу (в случае многочисленных данных). Схема родословной сопровождается описанием обозначений под рисунком (легендой).

Задача генетического анализа – установление наследственного характера заболевания и типа наследования, выявление гетерозиготных носителей мутационного гена, установление генотипа пробанда. Анализ родословной рекомендуется проводить в следующей последовательности:

1. Установление, является ли данный признак (заболевание) наследственным. Если признак встречается несколько раз в разных поколениях (имеет семейный характер), то можно предполагать, что признак имеет наследственную природу.

2. Определение типа наследования признака. Для этого учитывают:

- во всех ли поколениях и как часто среди членов родословной встречается признак;
- одинакова ли частота признака у обоих полов и если нет, то у какого пола встречается чаще;
- детям какого пола передается признак от больного отца и от больной матери;
- есть ли семьи, в которых от больных родителей рождаются здоровые дети, или, наоборот, от здоровых родителей рождаются больные дети;
- какая часть потомства имеет наследуемый признак в семьях, где болен один из родителей.

Близнецовый метод применяется для оценки соотносительной роли наследственности и среды в развитии разнообразных признаков, аномалий строения, мультифакториальных заболеваний и особенно при изучении наследственных болезней с низкой пенетрантностью. Близнецовый метод изучения генетики человека введен в медицинскую практику Ф. Гальтоном в 1876 г. Монозиготные (однояйцевые) близнецы развиваются из одной зиготы вследствие ее дробления с образованием двух эмбрионов, поэтому они генетически идентичны. В связи с этим различия между однояйцевыми близнецами определяются главным образом факторами внешней среды. Дизиготные близнецы (разнояйцевые) возникают при одновременном оплодотворении двух яйцеклеток двумя разными спермиями, поэтому они существенно различаются генетически. Дизиготные близнецы могут быть как однополыми, так и разнополыми. Частота рождений близнецов составляет примерно 1–2,5 % от общего числа родившихся детей, из них около 1/3 приходится на монозиготных близнецов, реже рождается тройня – один случай на 10–15 тыс. родов и еще меньше рождается четверня и т.д. Чаще рождаются дизиготные близнецы и реже монозиготные (1:100). Самая низкая частота рождения близнецов присуща монголоидным популяциям, особенно в Японии. При использовании близнецового метода нужно, прежде всего, установить тип их зиготности, т.е. являются ли они монозиготными или дизиготными. Для этого можно использовать разнообразные критерии, например, метод оценки количества плодных оболочек (плаценты и хориона), но чаще используется «метод сходства», основанный на исследовании у партнеров близнецовой пары генетически обусловленных признаков, мало зависимых от внешнесредовых факторов.

Метод полисимптомного сходства предложили Сименс и Фершуер в 1924 г. Чтобы оценить степень сходства, сравнивают цвет и разрез глаз, форму основания и кончика носа, ушных раковин (завиток, противозавиток, мочка уха), губ, подбородка, разреза рта, профиль спинки носа, величину и форму ресниц и других признаков (всего 19 признаков, принятых в антропологии). Степень выраженности каждого из фенотипических признаков оценивается по балльной системе. Монозиготные близнецы сходны между собой по всем признакам,

дизиготные имеют сходство только по нескольким признакам. Отсюда делается вывод о степени сходства, конкордантности, или дискордантности. Недостатком данного подхода является определенный субъективизм, невозможность внесения возможных изменений признаков с возрастом ребенка, трудная оценка влияния внешнесредовых факторов и непригодность его у детей раннего возраста. В связи с этим для диагностики зиготности используются другой подход, основанный на определении сходства по иммунологическим признакам: группам крови по системе ABO, резус-фактору, системе MN, гаплотипам системы HLA и другим. Эти признаки не меняются в течение жизни и являются надежными маркерами при оценке зиготности. Иногда для оценки зиготности используется метод дерматоглифики (исследование рельефа пальцев рук, ладоней, определение дерматоглифических коэффициентов и др.) Практически определение зиготности с помощью метода подобия производится в случаях, когда близнецы являются однополыми. Разнополые близнецы в норме всегда дизиготные. Исключение составляют крайне редкие случаи, когда у одного из монозиготных близнецов происходит хромосомное нарушение по половым хромосомам, например, у одного из мальчиков-близнецов утрачивается Y-хромосома и вследствие этого он фенотипически развивается как девочка (ХО), страдающая синдромом Тернера. Анализ полученных данных (анамнестических, клинических, функциональных, биохимических, иммунологических и др.) позволяет с помощью разработанных формул оценить соотносительную роль среды и наследственности в развитии того или иного признака или развитии заболевания. Для доказательства роли наследственности в развитии признака сравнивают долю (конкордантность) пар в группе монозиготных и группе дизиготных близнецов. Например, если один из монозиготных близнецов болен шизофренией, то второй заболевает этим же заболеванием в 69 % случаев, т.е. они конкордантны на 69 %. Если один из дизиготных близнецов болен шизофренией, то второй заболевает этим же заболеванием в 10 % случаев, т.е. они конкордантны на 10 %. Следовательно, из этого можно заключить, что в группе генетически идентичных близнецов наследственность как этиологический фактор играет большую роль.

Благодаря близнецовому методу была выяснена наследственная предрасположенность человека к ряду заболеваний: шизофрении, эпилепсии, сахарному диабету и другим. Близнецовым исследованиям принадлежит заметное место в изучении генетики поведения, в частности, таких характерологических (личностных) свойств людей, как агрессивность или склонность к действиям, направленным на отпор насилию, асоциальное (преступное) поведение и законопослушность, лживость и искренность, а также генетики конформизма и лидерства, интеллекта, гениальности. Близнецовый метод остается одним из активно используемых специалистами по общей и медицинской психологии.

Популяционно-статистический метод. В медицинской генетике существует специальный раздел, изучающий распространенность наследственной патологии в зависимости от демографической, этнической и других особенностей популяции, а также различий факторов внешней среды. Этот раздел называется

популяционной генетикой или популяционной геногеографией наследственных болезней. Необходимость выделения популяционного метода связана с тем, что распространенность наследственных заболеваний далеко не одинакова по разным регионам мира или даже отдельной страны или территории. Широкие вариации касаются аутосомно-доминантных, аутосомно-рецессивных и Х-сцепленных наследственных болезней, а также большой группы мультифакториальных заболеваний. Наряду с высокой дифференциацией отдельных болезней по странам, ряд болезней встречаются примерно с одинаковой частотой – ихтиоз, гемофилия, миопатия Дюшена и др., что указывает на наличие равновесия между давлением мутаций и отбором в крупных популяциях. Популяционная генетика не только констатирует разные частоты заболеваний в тех или иных регионах, но и пытается понять причины их неодинакового распределения, выявить закономерности, влияющие на частоту и генетическое разнообразие наследственных заболеваний в разных по структуре популяциях.

Популяционно-статистический метод в генетике человека используется для решения следующих проблем:

1. Выяснение степени гетерозиготности и полиморфизма человеческих популяций.
2. Изучение механизмов поддержания частоты генов в популяции.
3. Выявление различий частот отдельных генов и генотипов между разными популяциями.
4. Изучение генетической структуры популяций.
5. Изучение распространенности наследственных болезней, соотношения между частотами гомозигот и гетерозигот.
6. Установление степени родства между различными расами человека.
7. Изучение механизмов генетического гомеостаза.
8. Изучение генетических преобразований в популяциях (микроэволюция).

Существенным моментом использования этого метода является статистическая обработка полученных данных на основе закона генетического равновесия Харди – Вайнберга, установленный в 1908 г. английским математиком Г. Х. Харди (G. M. Hardy) и немецким врачом В. Вайнбергом (W. Weinberg).

Цитогенетические и молекулярно-цитогенетические методы. Одной из основных фундаментальных задач современной медицинской генетики является изучение закономерностей строения и функционирования материальных носителей наследственной информации – хромосом человека в норме и патологии. Наука, занимающаяся изучением функционирования хромосом на всех уровнях их организации (микроскопическом, субмикроскопическом, молекулярном), называется цитогенетикой. Среди многих методов изучения наследственной патологии человека цитогенетический метод занимает важное место. С помощью цитогенетического исследования в генетике человека можно провести анализ кариотипа в норме и патологии, изучить закономерности мутационного и эволюционного процессов. Все хромосомные болезни у человека были открыты с помощью цитогенетического метода. Анализ

кариотипа человека проводят в культуре лимфоцитов периферической крови, кожных фибробластов, клеток костного мозга, а также половых клеток. Наиболее доступны для исследований лимфоциты периферической крови, которые, в большинстве случаев и служат объектом цитогенетического анализа у человека в постнатальном периоде. Для исследования кариотипа человека достаточно получить образец периферической крови в количестве 1–2 мл. Для анализа кариотипа плода могут быть использованы клетки ворсин хориона (9–11 неделя внутриутробного развития), в более позднем сроке цитогенетическому исследованию подвергают клетки плода, выделенные из амниотической жидкости, пуповинной крови и плаценты. Цитогенетический анализ включает три основных этапа: культивирование клеток; окраска препарата; микроскопический анализ препарата.

После забора образец крови помещают в питательную солевую среду с добавлением фитогемагглютинаина, стимулирующего процесс деления клеток. Для увеличения количества метафазных клеток за полтора часа до окончания культивирования в культуру вводят колхицин, который разрушает клеточное веретено, и процесс деления останавливается на стадии метафазы. Обычно продолжительность культивирования составляет 72 ч. После его окончания клетки с питательной средой центрифугируют и помещают в гипотонический раствор хлорида калия или цитрата натрия, что приводит к разрыву ядерной оболочки и межхромосомных связей и свободному перемещению хромосом в цитоплазме. После фиксируют клетки смесью метанола и уксусной кислоты в соотношении 3:1, после чего клеточную суспензию раскапывают на охлажденные влажные предметные стекла и высушивают на воздухе. В зависимости от целей исследования, то есть от того, какой именно тип перестроек необходимо выявить, можно использовать различные виды окрашивания. В медико-генетической практике используется световая микроскопия (главным образом в проходящем свете), в том числе люминесцентная микроскопия. Для адекватного выявления хромосомных аномалий необходимо проанализировать не менее 30 метафазных пластинок. Цитогенетики в своей повседневной работе сравнивают образцы со стандартами, полученными при изучении нормальных кариотипов человека.

Последние успехи молекулярной цитогенетики человека позволили разработать новые высокоинформативные методы изучения хромосом. Среди них в первую очередь следует назвать метод флюоресцентной гибридизации *in situ*, или так называемый FISH-метод. С помощью этого метода идентифицируются не только индивидуальные хромосомы или отдельные гены, но и расшифровываются сложные межхромосомные перестройки. FISH-метод нашел широкое применение в картировании генома, хромосомной локализации генов и последовательностей ДНК и РНК, анализе идентификации хромосомных аномалий, включая микроделеции и микродупликации. Благодаря своей уникальности и специфичности метод гибридизации в последнее время широко применяется при проведении преимплантационной, пренатальной или постнатальной диагностики. Его используют в клинической цитогенетике, онкогенетике, гематологии, при оценке мутагенных воздействий (физических,

химических, биологических), диагностике врожденных пороков развития и умственной отсталости. Сочетание молекулярно-генетических и цитологических методов делает почти неограниченными возможности диагностики хромосомных аномалий, как очень сложных, так и очень мелких.

Биохимические методы в генетике человека используются для диагностики наследственных болезней обмена веществ (НБО). Они направлены на выявление аномальных белковых продуктов генов или патологических метаболитов внутри клетки и во внеклеточных жидкостях больного. Объектами биохимической диагностики могут быть моча, пот, плазма и сыворотка крови, форменные элементы крови. Предметом биохимической диагностики могут быть различные классы органических и неорганических веществ (аминокислоты, углеводы, липиды, мукополисахариды, ионы металлов и др.) и их метаболиты, концентрация и отклонения в активности ферментов. Биохимические методы подразделяют на качественные, количественные и полуколичественные. Качественные реакции позволяют обнаружить избыточные концентрации субстратов блокированной ферментной реакции или их производных. Качественные тесты чувствительны, просты в применении, отличаются низкой себестоимостью и не дают ложноотрицательных результатов. Полуколичественные и количественные тесты проводятся как с мочой, так и с кровью (газы крови, глюкоза, ионы аммония, молочная кислота, кетоновые тела, пировиноградная кислота, холестерин, триглицериды) и могут иметь различную степень сложности. Наиболее простые из них: измерение концентрации лактата, пирувата, кетоновых тел, ионов аммония, а также определение кислотно-щелочного равновесия. Решающее значение в диагностике нарушений обмена играют более сложные и высокоточные количественные методы, такие как флуориметрические, хроматомассе-спектрометрия, спектрофотометрия, различные виды хроматографии и электрофорез гликозаминогликанов (ГАГ).

В Медико-генетическом научном центре РАМН разработана программа селективного скрининга на наследственные болезни обмена веществ с острым течением и ранним летальным исходом. Первый этап программы включает 14 качественных и количественных тестов с мочой и кровью на белок, на кетокислоты, на цистин и гомоцистеин, креатинин, ионы аммония и др. Второй этап включает методы тонкослойной хроматографии мочи и крови для выявления аминокислот, фенольных кислот, моно- и дисахаридов и других соединений. С помощью электрофореза мочи выявляют гликозаминогликаны.

Молекулярно-генетические методы предназначены для выявления вариаций в структуре исследуемого участка ДНК (аллеля, гена, региона хромосомы) вплоть до расшифровки первичной последовательности оснований. В основе этих методов лежат манипуляции с ДНК и РНК. В медицинской генетике целью этих методов является диагностика мутаций, исследование их ассоциации с наследственными заболеваниями, а также выявление гетерозиготных и гомозиготных носителей мутации. Преимуществом ДНК-диагностики является использование унифицированного набора методов, практически не зависящего от целей проводимого исследования. Это методы выделения ДНК, ПЦР, электрофорез, рестрикция ДНК, гибридизация со

специфическими ДНК-зондами и секвенирование. Таким образом, в пределах одной лаборатории можно заниматься ДНК-диагностикой широкого спектра заболеваний.

Источником геномной ДНК могут быть любые ядродержащие клетки. Выделенная из клеток ДНК представляет собой весь геном организма, поэтому такие образцы называют геномной ДНК. На практике чаще используют периферическую кровь (лейкоциты), хорион, амниотические клетки, культуры фибробластов. Для одного анализа необходимо иметь (в зависимости от используемого метода) от нескольких нанограммов до нескольких микрограммов ДНК. Для этого требуется небольшое количество биологического материала, например, 1 мл крови, 5–10 мг культуры клеток 20–40 мг хориона, соскоб эпителия со слизистой оболочки щеки либо несколько волосных луковиц. Обработанную особым образом фракцию высокомолекулярных ДНК отделяют от низкомолекулярных соединений, таких как фрагменты белков, липиды, углеводы, осаждают и отбирают ДНК, выпавшую в осадок.

Полимеразная цепная реакция. ПЦР – это метод амплификации (умножения) ДНК *in vitro*. За несколько часов можно размножить определенную последовательность ДНК в количестве, превышающем исходное в миллион раз и более. Для проведения ПЦР нужно знать нуклеотидную последовательность амплифицируемого фрагмента. В соответствии с нуклеотидной последовательностью концов 5' и 3' исследуемого участка синтезируется два олигонуклеотидных праймера (затравки).

Рестрикция ДНК на фрагменты. Осуществляется рестриктазами (эндонуклеазами), которые способны разрывать двухцепочечную ДНК в пределах строго определенных для каждого фрагмента последовательностей нуклеотидов протяженностью 4–6 пар оснований (редко больше). При обработке геномной ДНК рестриктазой получается закономерный для данного фермента набор фрагментов различной длины.

Электрофорез фрагментов ДНК обеспечивает разделение этих фрагментов при их распределении на поверхности полиакриламидного геля. Фрагменты ДНК движутся в геле, помещенном в постоянное электрическое поле, от отрицательного полюса к положительному в зависимости от размеров (чем больше относительная молекулярная масса фрагмента, тем медленнее он движется в электрическом поле). После окончания электрофореза каждый фрагмент ДНК занимает определенное положение в виде дискретной полосы в конкретном месте геля. Длину каждого фрагмента можно определить путем сравнения пройденного фрагментом расстояния с расстоянием, пройденным стандартным образцом ДНК с известными размерами. Визуализация и идентификация фрагментов ДНК в геле становятся либо конечным этапом диагностики, либо элементом дальнейшего анализа. Идентификацию конкретных фрагментов в геле среди геномной ДНК провести труднее. Из-за больших размеров генома человека после рестрикции образуется так много рестриктных фрагментов, что агарозный гель после электрофореза и окраски этидия бромидом в ультрафиолетовых лучах выглядит более или менее

равномерно окрашенным. Специфические фрагменты ДНК выявляют путем блот-гибридизации по Саузерну.

Заключительным этапом анализа мутаций является их секвенирование, т.е. определение нуклеотидной последовательности фрагмента ДНК.

Принципиально различают прямую и косвенную ДНК-диагностику моногенных наследственных болезней.

Прямые методы используются при условии, что ген заболевания клонирован, известна его экзон-интронная организация или нуклеотидная последовательность полноразмерной комплементарной ДНК. При прямой диагностике предметом анализа являются мутации гена. Если мутации известны, то можно их выявлять либо с помощью ферментов-рестриктаз, которые распознают строго определенные нуклеотидные последовательности, либо на основе ДНКгибридизации. К числу таких методов относят рестрикционный анализ. Его суть состоит в том, что рестрикционные эндонуклеазы) разрезают двойную нить ДНК в определенных последовательностях из 4–8 нуклеотидов. Разрезание мутантной ДНК дает участки, отличающиеся по длине от нормальных участков, что и выявляется на электрофореграмме. Если в состав сайта рестрикции входит полиморфный нуклеотид, эту мутацию можно выявить абсолютно достоверно. Если полиморфные нуклеотиды лежат в неузнаваемых рестриктазой участках, то метод рестрикционного анализа неприменим. Аллельспецифичная ПЦР используется для выявления точковых мутаций, небольших делеций и инсерций в исследуемых генах. ПЦР позволяет многократно увеличить уникальную последовательность ДНК, а затем проанализировать ее на предмет мутации. С помощью специфических олигонуклеотидных праймеров проводят амплификацию кодирующих участков геномной ДНК. Наряду с двумя разобранными выше прямыми методами детекции известных мутаций широко применяется ПЦР в реальном времени.

Если характер мутации неизвестен, а клиническая картина заболевания позволяет предположить, в каких генах могла произойти мутация, то в лабораторной диагностике применяются следующие методы мутационного скрининга: анализ перестроек ДНК-блотингом по Саузерну; анализ полиморфизма конформации одноцепочной ДНК; гетеродуплексный анализ; электрофорез двухцепочечной ДНК в градиенте денатуранта и др.

Преимущества прямых методов:

- практически 100%-я точность диагностики;
- отсутствие необходимости ДНК-анализа всех членов ядерной семьи;
- возможность выявления гетерозиготного носительства патологических мутаций у родителей умершего больного и его родственников, что особенно актуально для аутосомно-рецессивных заболеваний.

Недостатки:

- требуется знание точной локализации патологического гена в геноме, его экзон-интронной структуры и спектра его мутаций (такая информация на сегодняшний день доступна далеко не для всех моногенных болезней человека).

Косвенные методы ДНК-диагностики применяют в том случае, если ген, повреждение в котором приводит к заболеванию, не идентифицирован, а лишь

локализован на определенной хромосоме, или когда методы прямой ДНК-диагностики не дают результата (например, при значительной протяженности и сложной молекулярной организации гена, а также широком спектре патологических мутаций в нем).

Косвенные методы ДНК-диагностики основаны на анализе сегрегации в семье аллелей полиморфных маркеров, находящихся в том же хромосомном регионе или тесно сцепленных с локусом заболевания. Полиморфные маркеры, используемые для косвенной ДНК-диагностики, представляют собой точковые замены, делеции/ инсерции, повторы, полиморфизм которых обусловлен различным количеством элементов в блоке. Наиболее удобными для косвенной ДНК-диагностики признаны микросателлитные (мономер до 5 п.н.) и минисателлитные (мономер повтора состоит из 5–60 п.н.) полиморфные маркеры, широко распространенные в геноме человека. Для большинства известных в настоящее время полиморфных сайтов такого типа был строго показан менделевский характер наследования. Технические приемы в косвенной диагностике те же самые, что и в прямой (получение ДНК, рестрикция, электрофорез и т.д.). К этому приему добавляется математический анализ сцепления признаков.

Преимущества:

- не требуют знания структуры гена и спектра мутаций в нем, необходимо только иметь сведения о его локализации;
- информативны практически для всех обратившихся семей, поскольку всегда есть возможность среди полиморфных маркеров, сцепленных с локусом заболевания, найти информативный для данной семьи.

Недостатки:

- нет 100%-й точности;
- необходимость семейного анализа и обязательная уверенность в клиническом диагнозе;
- могут быть применены только для монолокусных заболеваний и неэффективны для моногенных полилокусных болезней.

Пренатальная диагностика наследственных болезней – комплексная дородовая диагностика с целью обнаружения патологии на стадии внутриутробного развития. Пренатальная диагностика связана с решением ряда биологических и этических проблем до рождения ребенка, так как при этом речь идет не об излечении болезни, а о предупреждении рождения ребенка с патологией, не поддающейся лечению (обычно путем прерывания беременности с согласия женщины). При современном уровне развития пренатальной диагностики можно установить диагноз всех хромосомных болезней, большинства врожденных пороков развития, энзимопатий. Часть из них можно установить практически в любом сроке беременности (хромосомные болезни), часть — после 12-й недели (редукционные пороки конечностей, атрезии, анэнцефалию), часть — только во второй половине беременности (пороки сердца, почек).

Показания для пренатальной диагностики:

- возраст 35 лет и старше (мужчин 45 лет и старше);

- наличие в семье наследственной болезни;
- неблагоприятный акушерский анамнез (повторные спонтанные прерывания беременности или рождение ребенка с врожденными пороками развития);
- сахарный диабет, эпилепсия, инфекции у беременной;
- лекарственная терапия;
- контакты с тератогенными факторами.

Пренатальная диагностика должна включать два этапа. Первый этап – выявление и отбор семей с повышенным риском неблагоприятного в генетическом плане исхода беременности. Второй этап – уточняющая пренатальная диагностика. Любые методы уточняющей диагностики применяют только у женщин с факторами риска.

Методы пренатальной диагностики:

- скрининговые (медико-генетическое консультирование, определение уровня α -фетопротеина (АФП) в сыворотке крови беременной, хорионического гонадотропина (ХГЧ), неконъюгированного эстриола, ацетилхолинэстеразы и др.).
- неинвазивные (просеивающее и уточняющее УЗИ, магнитнорезонансная томография, кардиомониторное исследование сердечной деятельности плода с одновременной регистрацией его двигательной активности и тонуса матки). Просеивающие УЗИ, согласно приказу Минздрава России, должны проводиться всем беременным женщинам трехкратно: в 10–13, 20–22, 30–32 недели беременности. Возможно использование УЗИ начиная с 6–8 недели.
- инвазивные (амниоцентез, биопсия хориона, биопсия плаценты, кордоцентез, биопсия тканей плода и др.) – проводятся по строгим показаниям, после проведения просеивающего УЗИ.

Для нескольких болезней уже разработаны не только теоретические основы диагностики (до развития клинической картины), но и методы профилактического лечения. Поскольку отдельные формы наследственных болезней редки (распространенных генных болезней немного), для их выявления должны быть простые и дешевые методы просеивающей диагностики. С их помощью можно проводить идентификацию нераспознанных болезней с помощью быстро осуществляемых проверок (тестов). Это обеспечивает отбор лиц с вероятным заболеванием. Людей с высокой вероятностью заболевания повторно обследуют с применением уточняющих диагностических методов, позволяющих либо отвергнуть предполагавшийся на первом этапе диагноз, либо уверенно подтвердить его. Идея просеивающего обследования новорожденных на унаследованную комбинацию аллелей, обуславливающую развитие наследственной болезни, стала проверяться в 60-х годах. К настоящему времени уже окончательно сложились основные положения массовой диагностики наследственных болезней на доклинической стадии (критерии наследственных болезней и диагностические методы).

На сегодняшний день программы массового скрининга новорожденных осуществляются в отношении фенилкетонурии, врожденного гипотиреоза, врожденной гиперплазии надпочечников, галактоземии и муковисцидоза. Основная цель этих программ – раннее выявление наследственного заболевания

на доклинической (досимптоматической) стадии и организация своевременного профилактического лечения.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ ПРОВЕРКИ

1. Укажите правильные варианты ответа.

1.1. Пробанд это:

- А) родственник больного;
- Б) тот, кто собирает сведения;
- В) человек, родословную которого изучают;
- Г) человек, изучающий родословную

1.2. Благодаря генеалогическому методу, были (о) установлены(о):

- А) сцепленное наследование признаков;
- Б) строение генов;
- В) механизмы возникновения генных, геномных и хромосомных мутаций;
- Г) морфология и количество хромосом в геноме.

1.3. С помощью ... метода было показано, что продолжительность жизни, и творческие способности человека, в большей степени определяются наследственностью, а не влиянием воспитания и действием окружающей среды:

- А) генеалогического;
- Б) близнецового;
- В) цитогенетического;
- Г) биохимического

1.4. Дискордантность определяет:

- А) сходность по многим признакам;
- Б) отличие по многим признакам;
- В) разнородность;
- Г) дизиготность

1.5. Цитогенетическим методом изучаются хромосомы на стадии ... митоза:

- А) профазы;
- Б) метафазы;
- В) анафазы;
- Г) телофазы

1.6. Наследственные болезни обмена изучает метод:

- А) популяционно-статистический;
- Б) биохимическим;
- В) близнецовым;
- Г) цитогенетическим

1.7. Амниоцентез - это метод:

- А) генеалогический;
- Б) дерматоглифический;
- В) пренатальной диагностики;
- Г) близнецовый

1.8. Кариотипирование использует метод:

- А) биохимический;

- Б) генеалогический;
- В) цитогенетический;
- Г) близнецовый.

1.9. Селективный скрининг используется при:

- А) проверке биохимических аномалий обмена у пациентов;
- Б) подозрении на генные наследственные болезни;
- В) проверка цитогенетических болезней;
- Г) А и Б верны

1.10. Показания к применению биохимического метода генетики человека:

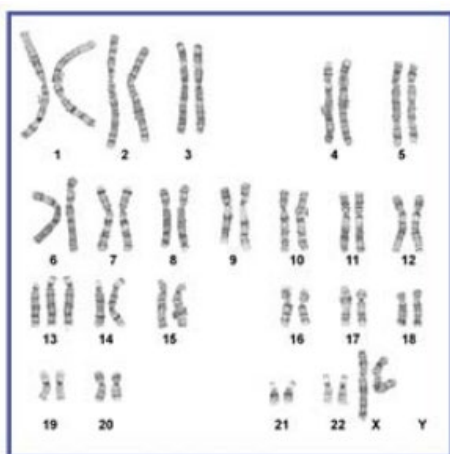
- А) непереносимость некоторых продуктов питания;
- Б) множественные пороки развития;
- В) привычные выкидыши;
- Г) подозрения на семейную транслокацию.

2. Решите ситуационные задачи.

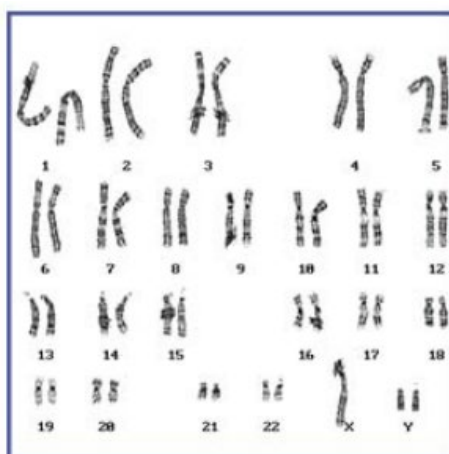
2.1. Пробанд – женщина, страдает ахондроплазией. Ее брат и сестра здоровы. Мать пробанда больна, а отец здоров. Дедушка по линии матери пробанда болен и имеет здоровую и больную сестру, у которой есть здоровый сын. Прадедушка болен, а прабабушка здорова. Составьте родословную семьи и определите тип наследования заболевания. Определите вероятность рождения у пробанда здорового ребенка, если эта женщина выйдет замуж за здорового мужчину. Укажите генотипы всех членов семьи.

2.2. По данным анамнеза, мать здорова и происходит из благополучной по одной из форм ихтиоза (Х-сцепленный рецессивный тип наследования) семьи, а отец болен этой формой ихтиоза. Дочь этих родителей выходит замуж за здорового юношу. Определите степень генетического риска рождения в этой молодой семье ребенка, больного данной формой ихтиоза. Какие методы диагностики могут быть использованы для обнаружения данного заболевания? Какие рекомендации должен дать врач-генетик?

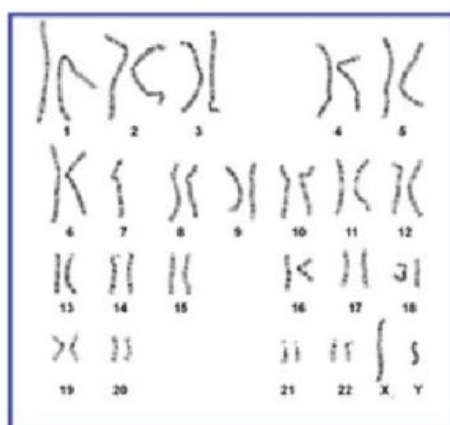
2.3. Проведите анализ следующих кариограмм



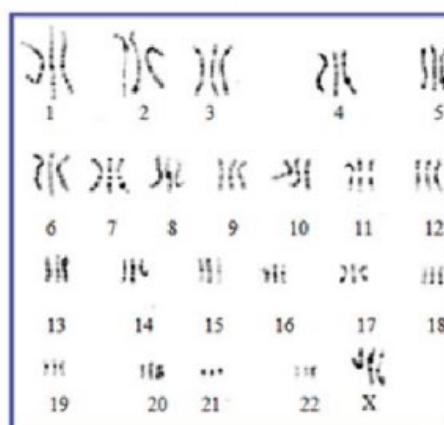
(а)



(б)



(в)



(г)

ЛИТЕРАТУРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ

1. Биология : учебник для студентов вузов / МЗ РФ, ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова; под ред. Н. В. Чебышева. - Москва : МИА, 2016. - 635 с.ил. - ISBN 978-5-9986-0229-0.
2. Биология : учебник : в 2 т.. Т. 1 / под ред. В. Н. Ярыгина. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2018. - 725 с.ил. - ISBN 978-5-9704-4568-6.
3. Биология : учебник : в 2 т.. Т. 2 / под ред. В. Н. Ярыгина. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2018. - 553 с.ил. - ISBN 978-5-9704-4569-3.
4. Биология : учебник : в 2 т.. Т. 2 / В. Н. Ярыгин, В. В. Глинкина, И. Н. Волков [и др.] ; под ред. В. Н. Ярыгина. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2015. - 553 с. : ил. - ISBN 978-5-9704-3565-6.
5. Биология : учебник : в 2 т.. Т. 1 / В. Н. Ярыгин, В. В. Глинкина, И. Н. Волков [и др.] ; под ред. В. Н. Ярыгина. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2015. - 725 с. : ил. - ISBN 978-5-9704-3564-9.
6. Биология : учебник : в 2 томах: Т. 2 / под редакцией В. Н. Ярыгина. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2020. - 553 с. : ил. - ISBN 978-5-9704-5308-7.
7. Биология : учебник : в 2 томах: Т. 1 / под редакцией В. Н. Ярыгина. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2020. - 725 с. : ил. - ISBN 978-5-9704-5307-0.

8. Практикум по биологии: учебно-методическое пособие / Ю.В. Мякишева, Р.А. Щепеткова, Д.С. Громова, А.Ф. Павлов, И.С. Павлов, Ю.А. Халитова ; ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. - Самара: ИД «Би Групп», 2023. - 100 с.
9. Биология. Т. 1.: учебник: в 2 т. / под ред. В. Н. Ярыгина. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2023. - 736 с. - ISBN 978-5-9704-7494-5. - Текст: электронный // ЭБС "Консультант студента" : [сайт]. - URL : <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970474945.html>
10. Биология. Т. 2. : учебник : в 2 т. / под ред. В. Н. Ярыгина. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2023. - 560 с. - ISBN 978-5-9704-7495-2. - Текст : электронный // ЭБС "Консультант студента" : [сайт]. - URL : <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970474952.html>