**Дисциплина «Генетика человека с основами медицинской генетики»**

**Преподаватель Левенец О.В.**

**Тема «Методы генетики человека»**

1. ГЕНЕАЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

Генеалогия - это учение о родословных. Суть генеалогического метода сводится к выявлению родословных связей и прослеживанию признака или болезни среди близких и дальних прямых и непрямых родственников.

Технически он складывается из двух этапов:

1) составление родословной схемы;

2) собственно генеалогический анализ.

Пробанд - лицо, с которого начинают составление родословной.

Обычно родословная составляется по одному или нескольким признакам заболевания. Может быть полной или ограниченной. Фигуры в родословной располагаются по поколениям. Каждое поколение занимает отдельную строку, обозначается слева римской цифрой. Арабскими цифрами нумеруются члены одного поколения (весь ряд) слева направо в порядке рождения. Все индивидуумы должны располагаться строго по поколениям в один ряд.

Поскольку большинство наследственных заболеваний проявляется в детском возрасте в основном производится расспрос родителей пробанда (чаще всего мать или других лиц, окружающих ребенка). Детально собранный анамнез часто содержит опорные пункты для диагноза, который можно предположить сбора анамнеза. Он проводится по определенной схеме. После получения паспортных данных врач должен выяснить:

1) анамнез настоящего заболевания, его начало, течение, характер жалоб;

2) тщательный анамнез жизни ребенка, включая здоровье и возраст родителей, течение беременности и акушерский анамнез матери:

- случаи абортов, мертворождений, ранней детской смерти,

- точные сведения о кровном родстве супругов,

- возможность внебрачного зачатия.

Большую роль играет вскармливание на первом году жизни, темпы физического и психомоторного развития ребенка.

3) сведения о сибсах пробанда (порядковый номер рождения, возраст, состояние здоровья);

4) данные о родственниках пробанда I и II степеней родства.

После составления родословной (обычно достаточно трех-пяти поколений) переходят к генеалогическому анализу, целью которого является установление наследственного характера признака.

Генеалогический метод относится к наиболее универсальным методам

медицинской генетики. Он широко применяется при решении теоретических и прикладных проблем:

1) для установления наследственного характера признака;

2) при определении типа наследования и пенетрантности гена;

3) при анализе сцепления генов и картировании хромосом;

4) при изучении интенсивности мутационного процесса;

5) при расшифровке механизмов взаимодействия генов;

6) при медико-генетическом консультировании.

2. ПОПУЛЯЦИОННО-СТАТИСТИЧЕСКИЙ МЕТОД

Метод находит широкое применение в клинической генетике, т.к. внутрисемейный анализ заболеваемости не отделим от изучения наследственной патологии как в странах с большим населением, так и в относительно изолированных популяционных группах.

Сущность метода заключается в изучении (с помощью методов вариационной статистики) частот генов и генотипов в различных популяционных группах, что дает необходимую информацию о частоте гетерозиготности и степени полиморфизма у человека. В частности, в гетерозиготном состоянии в популяциях находится значительное количество рецессивных аллелей, что обуславливает развитие различных наследственных заболеваний, частота которых зависит от концентрации рецессивного гена в популяции и значительно повышается при заключении близкородственных браков. Мутации могут передаваться потомству во многих поколениях, что приводит к генетической гетерогенности, лежащей в основе полиморфизма популяций.

Согласно закону Харди-Вайнберга (1980) - в популяции сохраняется постоянное соотношение частоты генотипов из поколения в поколение, если никакие факторы не нарушают это равновесие.

Формула Харди-Вайнберга:

Р - частота, с которой встречается доминантный ген "А";

q - частота, с которой встречается рецессивный аллель "а".

Сумма Р+q всегда равна 1.

Соотношение генотипов АА, Аа, аа

выражается формулой: (Р+q)2 =Р2+2pq+q2.

Статистический анализ распространенности отдельных генов и контролируемых ими признаков в популяционных группах позволяет определить адаптивную ценность конкретных генотипов. Среди людей невозможно найти генетически одинаковых лиц (за исключением монозиготных близнецов, для которых предполагается 100% общих генов), хотя общность генов хорошо прослеживается у близких и дальних родственников.

3. БЛИЗНЕЦОВЫЙ МЕТОД

Сущность метода состоит в выяснении наследственной обусловленности признаков и установления связей между генотипом и внешней средой.

Принцип применения метода заключается в сравнении монозиготных и дизиготных близнецов. Среди всех близнецов примерно 1/3 приходится на долю монозиготных и 2/3 - на долю дизиготных близнецов.

При этом вычисляются показатели соответствия (конкордантность) или несоответствия (дискордантность), а также определяется частота возникновения заболевания (признака) одновременно у обоих близнецов каждой пары. Степень конкордантности по наследственно обусловленным признакам будет выше у идентичных близнецов. Если однояйцевые близнецы (ОБ) даже в разных средах существования обнаруживают более высокую конкордантность, чем двухяйцевые (ДБ) в однотипных средах, то можно предположить, что конкордантность обусловлена генетическими, а не средовыми факторами.

Близнецовый метод имеет несколько основных направлений:

1. Диагностика зиготности - изучение сходства и различия партнеров близнецовой пары по совокупности ряда признаков, изменяющихся под воздействием окружающей среды. В этом случае используется метод полисистемного сходства или подобия по внешним признакам.
2. Методы экспериментального изучения:

- иммуногенетический - сравнение по антигенам, белкам сыворотки крови, т.е. по менделирующим признакам, которые не изменяются в течение всей жизни, несмотря ни на какие воздействия окружающей среды;

- исследование дерматоглифики;

- изучение наследуемых способностей (например, чувство вкуса

фенилтиокарбамида);

- изучение данных ЭКГ и ЭГ;

- трансплантация кожного лоскута.

1. Статистическое исследование близнецовой выборки - анкетирование близнецов, которое целесообразно в популяционных исследованиях с большими выборками.
2. Метод контроля по партнеру - используется только у монозиготных близнецов. При этом возможно точно оценить то или иное внешнее воздействие, если ему подвергся только один партнер (например, лекарственный препарат).

Такие исследования выгодны в экономическом плане, так как позволяют ограничивать выборку всего двумя-тремя десятками пар близнецов. В дальнейшем перспективно применение близнецового метода в сочетании с другими (цитогенетические, биохимические и др.).

4. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Эти методы помогают обнаружить целый ряд заболеваний с нарушениями обмена веществ (энзимопатии). Исследованию подлежат кровь, моча, ликвор, пунктаты костного мозга, амниотическая жидкость, сперма, пот, волосы, ногти, кал и др.

На первом этапе обследования (экспресс-диагностика) применяются методы массового биохимического скрининга: пробы Феллинга (на фенилкетонурию),

Альтгаузена (гликогенозы), Бенедикта (галактоземия, фруктоземия), проба на гипераминоацидурию, микробиологический тест Гатри (ФКУ и др. аминоацидопатии). Разработаны простые качественные биохимические тесты для эксперсс-диагностики гипотиреоза, муковисцидоза, для выявления нарушений обмена билирубина, болезни Тея-Сакса, гепатолентикулярной дегенерации, АГС. Эти пробы достаточно просты и используют легко доступный биологический материал (кровь, моча).

На втором этапе (уточняющая диагностика) применяют молекулярно-цитогенетические, молекулярно-биологические методы, более сложные методы аналитической биохимии:

* исследование метаболического пути (количественное определение метаболитов, их кинетики и накопления);
* прямое измерение концентрации (иммунохимические методы), активности (энзимо-диагностика), физико-химических и кинетических параметров мутантных белков;
* исследование мутантных белков с помощью нагрузочных проб мечеными субстратами и гибридизации соматических клеток;
* исследование структуры мутантного гена методами рестрикционного анализа.

Большие перспективы открываются с применением жидкостной и газовой хроматографии, позволяющей определить аминокислотный состав исследуемого субстрата в течение нескольких минут.

Показания для биохимического исследования:

1) умственная отсталость, психические нарушения;

2) нарушение физического развития - аномальный рост и строение волос или ногтей; неправильный рост с искривлением костей туловища и конечностей, чрезмерное отложение жира, гипотрофия или кахексия, тугоподвижность или разболтанность суставов;

3) плохое зрение или полная слепота, тугоухость или глухота;

4) судороги, мышечная гипотония, гипер- и гипопигментация, фото-чувствительность, желтуха;

5) непереносимость отдельных пищевых продуктов и лекарственных препаратов, нарушение пищеварения, частая рвота, диарея, жидкий стул, гепато- и спленомегалия;

6) почечно-каменная болезнь, холестаз;

7) гемолитические анемии и др. состояния.

Биохимический метод широко применяется в медико-генетическом консультировании для определения риска рождения больного ребенка. Успехи в области биохимической генетики способствуют более широкому внедрению диагностики гетерозиготного носительства в практику. Еще недавно можно было диагностировать не более 10-15 гетерозиготных состояний, в настоящее время - более 200. Однако следует отметить, что до сих пор имеется немало наследственных заболеваний, для которых методы гетерозиготной диагностики еще не разработаны.

5. ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД.

Метод позволяет идентифицировать кариотип (особенность строения и число хромосом), путем записи кариограммы. Цитогенетическое исследование проводится у пробанда, его родителей, родственников или плода при подозрении на хромосомный синдром либо другое хромосомное нарушение.

Объектом исследования служат культуры лимфоцитов периферической крови, фибробластов кожи, клеток других тканей.

С помощью метода определяется наличие Х и У-полового хроматина, определяющего истинную половую принадлежность. Половой хроматин (тельце Барра) - в виде компактной глыбки в ядрах соматических клеток имеется только у женщин. Он определяется в эпителиальных клетках ротовой полости, вагинальном эпителии и клетках волосяной луковицы.

Показания для цитогенетического обследования больного:

1) множественные пороки развития (с вовлечением трех и более систем); наиболее постоянные нарушения - пороки развития головного мозга, опорно-двигательной системы, сердца и мочеполовой системы;

2) умственная отсталость в сочетании с нарушениями физического развития, дисплазиями, гипогенитализмом;

3) стойкое первичное бесплодие у мужчин и у женщин при исключении гинекологической и урологической патологии;

4) привычное невынашивание беременности, особенно на ранних стадиях;

5) нарушение полового развития (гипогонадизм, половые инверсии);

6) небольшая масса ребенка, рожденного при доношенной беременности.

Применение цитогенетического метода в клинической генетике обусловило развитие нового направления - клинической цитогенетики, которая позволяет:

- установить происхождение структурно перестроенных хромосом и их точную классификацию;

- выделить синдромы, обусловленные дисбалансом по участкам индивидуальных хромосом;

- накапливать сведения об изменениях хромосом в опухолевых клетках, у больных с наследственными заболеваниями крови и т.д.

**Определение X- и Y-хроматина.**

Определение X- и Y- хроматина - метод экспресс-диагностики, определяющий истинную половую принадлежность.

Исследуют клетки слизистой оболочки ротовой полости, вагинального эпителия или волосяной луковицы. В ядрах клеток женщин в диплоидном наборе присутствуют две хромосомы X, одна из которых полностью инактивирована (спирализована, плотно упакована) уже на ранних этапах эмбрионального развития и видна в виде глыбки гетерохроматина прикреплённого к оболочке ядра. Инактивированная хромосома X называется половым хроматином или тельцем Барра, для его выявления в ядрах клеток мазки окрашивают ацетарсеином и препараты просматривают с помощью обычного светового микроскопа. В норме у женщин обнаруживают одну глыбку Х-хроматина, а у мужчин её нет.

Для выявления мужского Y-полового хроматина (F-тельце) мазки окрашивают акрихином и просматривают с помощью люминисцентного микроскопа. Он обнаруживается в ядрах клеток мужского организма.

Определение полового хроматина используется в экспресс-диагностике хромосомных синдромов, при неясном поле новорожденного после 1 мес. жизни, первичной аменореи, нарушении менструального цикла, бесплодии у мужчин и женщин, при нарушении набора половых хромосом, в судебной медицине для определения пола индивида. Определение Х- и Y-хроматина – скрининговый метод, окончательный диагноз хромосомной болезни ставят только после исследования кариотипа.

**Кариотипирование.**

Для изучения хромосом используют клетки крови, костного мозга и культуры фибробластов. В метафазе митоза клетки обрабатывают колхицином, фиксируют и окрашивают. Для окраски хромосом используют краситель Романовского-Гимзы, 2% ацеткармин или 2% ацетарсеин (рутинный метод) для выявления численных аномалий хромосом человека.

Для получения детальной картины структуры хромосом, идентификации (определения) отдельных хромосом или их сегментов используют способы дифференциального окрашивания (метод Гимза, G- и Q-бендинга).

Метафазные пластинки фотографируют. Из фотографий вырезают хромосомы, наклеивают их по порядку на лист бумаги - составляют кариограмму.

Для описания кариотипа человека разработана специальная номенклатура. Нормальный кариотип мужчины и женщины обозначают как 46, XY и 46, XX соответственно. При синдроме Дауна, характеризующемся наличием дополнительной хромосомы 21 (трисомия 21), кариотип женщин описывают как 47, XX 21+, а мужчины - 47, ХУ, 21+. При наличии структурной аномалии хромосомы указывают изменённое длинное или короткое плечо: буквой р - короткое плечо, q - длинное плечо, t - транслокация. Так, при делеции короткого плеча хромосомы 5 (синдром «кошачьего крика») женский кариотип - 46, XX, 5р-.

Каждое плечо разделяется на районы, а они в свою очередь - на сегменты, и те и другие, обозначают арабскими цифрами. Центромера хромосомы является исходным пунктом для отсчёта районов и сегментов.

Таким образом, для топографии xpoмосом, используют четыре метки: номер хромосомы, символ плеча, номер района и номер сегмента в пределах данного района. Например, запись 6р21.3 означает, что речь идёт о хромосоме 6-й пары, её коротком плече, районе 21, сегменте 3.

Существуют ещё дополнительные символы, в частности pter - конец короткого плеча qter – конец длинного плеча.

Цитогенетический метод исследования позволяет обнаружить делеции и другие изменения в хромосомах размером приблизительно в 1 млн. оснований (нуклеотидов).

6. МЕТОД ДЕРМАТОГЛИФИКИ

Сущность метода состоит в анализе кожных узоров (рисунков) на ладонях и стопах. Метод наиболее информативен при хромосомных синдромах, когда выявляются дистальный осевой трирадиус, избыток дуг на пальцах, отсутствие дистальной межфаланговой складки, радиальные петли на I, IV и V пальцах, четырехпальцевая (обезьянья) складка (при болезни Дауна на коже ладоней у ребенка отмечается в 40-60% случаев).

В настоящее время метод применяется в основном в судебной медицине.

7. МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕТЕРОЗИГОТНОГО НОСИТЕЛЬСТВА

Для человека, чье гетерозиготное состояние по тому или иному заболеванию установлено, чрезмерно важно не встретиться в браке с носителем подобного рецессивного гена, т.к. риск рождения у них больного ребенка составляет 25% как при первой, так и последующих беременностях.

Предположения о гетерозиготности женщины:

1) если у женщины поражен отец наследственной болезнью;

2) если женщина родила двух или нескольких пораженных сыновей;

3) если у женщины поражен брат (или братья), и, кроме того, она имеет пораженного сына или внука (от дочери);

4) если женщина имеет двух дочерей, причем у каждой из них родился пораженный сын (или сыновья).

Пути исследования:

Клиническое изучение микросимптомов заболевания с выявлением аномалий развития.

Использование нагрузочных тестов (прием фенилаланина выявляет повышение его содержания в крови - предположение о гетерозиготности по фенилкетонурии).

Микроскопическое исследование клеток крови и тканей.

Биологическое определение активности того или иного фермента, пострадавшего в результате мутации гена.

8. МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Это большая и разнообразная группа методов исследования молекулярной структуры ДНК, основные дифференциально-диагностические тесты, необходимость разработки, которых обусловлена генетической природой наследственных заболеваний, их выраженным клиническим полиморфизмом, а также существованием генокопий и фенокопий.

Особое место в этой группе занимают методы ДНК-диагностики (зондовой).

Они позволяют диагностировать заболевание на уровне первичного молекулярного дефекта - патологического гена. Ее точность в установлении причины наследственного дефекта абсолютна.

Среди основных методов ДНК-диагностики выделяются:

- дозовый блот-гибридизационный анализ;

- анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ);

- полимеразная цепная реакция (ПЦР);

- анализ полиморфизма микросателлитных последовательностей.

Благодаря этим методам у врачей появились уникальные возможности эффективного применения в различных областях медицины самых совершенных технологий. В настоящее время в ДНК-диагностике выделяют 4 подхода. Они применяются в зависимости от того: известен или не известен ген данного заболевания (1), клонирован или нет этот ген или ДНК-копия его тРНК или кодирующей ДНК (2), известна или нет природа мутации, вызывающей заболевание (3), насколько широко распространена данная мутация в различных случаях данного заболевания в данной популяции, данном географическом регионе (4).

Виды ДНК-диагностики: подтверждающая, пресимптоматическая, носительства, пренатальная. Принципиально различают прямую и косвенную диагностику моногенных наследственных болезней. Прямые методы возможны лишь 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. Главным преимуществом прямых методов диагностики является почти 100% эффективность. Прямые методы основаны на технологии ПЦР.

Однако в большинстве случаев наследственных заболеваний ген не клонирован или заболевание является генетически гетерогенным, т.е. обусловлено повреждением в разных генах, либо молекулярная организация гена не позволяет использовать прямые гены. Эти трудности могут быть преодолены с помощью косвенных методов ДНК-диагностики, основанных на использовании сцепленных с геном полиморфных маркеров. В этом случае определяется гаплотип хромосомы, несущей мутантный ген в семьях высокого риска, т.е. у родителей больного и его ближайших родственников. Такой подход возможен практически для всех моногенных заболеваний с известной локализацией гена. Основной недостаток косвенных методов диагностики - обязательное предварительное изучение генотипа (гаплотипа) хотя бы одного пораженного родственника. В случае отсутствия пораженных родственников, “доступных” для обследования, проведение диагностики (за редким исключением) становится невозможным.