



**Учреждение образования
«Международный государственный
экологический институт
имени А. Д. Сахарова»
Белорусского государственного университета**



Г. А. Писарчик, Ю. В. Малиновская

МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНЕТИКА



Учреждение образования
«Международный государственный экологический
институт имени А. Д. Сахарова»
Белорусского государственного университета

Г. А. Писарчик, Ю. В. Малиновская

МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНЕТИКА

Учебно-методическое пособие

Минск
«ИВЦ Минфина»
2017

УДК 575:61(075.8)

ББК 52.5 я 7

П 34

Рецензенты:

кандидат биологических наук, доцент кафедры общей биологии
и ботаники БГПУ *Н. Д. Лисов*;

кандидат биологических наук, доцент кафедры иммунологии
МГЭИ им. А.Д. Сахарова БГУ *Е. Р. Грицкевич*

Писарчик, Г. А.

П 34 Медицинская генетика: учебно-методическое пособие /
Г. А. Писарчик, Ю. В. Малиновская. – Минск: ИВЦ Минфина,
2017 – 156 с.

ISBN 978-985-7168-61-3.

В пособии представлены материалы по основным разделам предмета. Включены вопросы изменчивости в популяциях человека, клинико-морфологического осмотра больных с наследственными заболеваниями, применяемые в общей практике, и современные методы генотипирования, показания к их проведению. Даны указания по выполнению контрольных работ и поэтапности их описания. В издании приведен словарь генетических терминов и понятий, а также современные выпуски литературы и статьи из научных журналов.

Предназначается студентам-биологам при изучении курса «Медицинская генетика», а также для дальнейшего использования в практической деятельности.

УДК 575:61(075.8)

ББК 52.5 я 7

ISBN 978-985-7168-61-3

© Писарчик, Г. А., Малиновская Ю. В., 2017
© Оформление. УП «ИВЦ Минфина», 2017

ВВЕДЕНИЕ

Достижения современной медицинской науки изменили структуру заболеваемости человека. На первый план вышли патологические процессы, в развитии которых ведущая роль принадлежит генетическим факторам. Хромосомные и моногенные болезни, врожденные пороки развития характеризуются длительным и хроническим течением, вовлеченностью в процесс многих органов и систем. Они приводят к инвалидности, а в ряде случаев к ранней смерти. Лечение таких пациентов, как правило, дорогостоящее, зачастую бесперспективное, а для большинства видов наследственной патологии в настоящее время отсутствуют эффективные методы коррекции.

Решением задач, связанных с наследственным здоровьем человека, в настоящее время занимается одно из важнейших направлений генетики человека – медицинская генетика.

Генетика человека – это наука о наследственности и изменчивости в приложении к человеку. В настоящее время в рамках генетики человека выделяют клиническую и медицинскую генетику.

Медицинская генетика рассматривает в связи с патологией наследственные механизмы, поддерживающие гомеостаз организма и определяющие здоровье индивида; значение наследственных факторов в этиологии болезней; соотношение наследственных и средовых факторов в патогенезе болезней; роль наследственных факторов в определении клинической картины болезней; роль наследственности в ответной реакции организма на фармакологическое и другие виды лечения.

Клиническая генетика в строгом смысле слова – применение знаний и разработок в области медицинской генетики для решения клинических проблем у пациентов или в их семьях (диагностика, лечение, прогноз и профилактика).

В настоящее время известно более 5 тыс. наследственных болезней, поражающих все органы, системы и функции организма. Структура наследственной и врожденной патологии человека неоднородна. В соответствии с данными ВОЗ 2,5–3 % всех новорожденных имеют различные пороки развития. При этом около 1 % составляют генные болезни, примерно 0,5 % –

хромосомные болезни и в среднем 1,5–2 % приходится на долю врожденных пороков развития. С возрастом частота встречаемости выявленных патологий развития увеличивается и к 10 годам может достигнуть 5–7 % за счет пороков развития органов слуха, зрения, нервной и эндокринной систем, не зарегистрированных при рождении. Более половины случаев среди них составляют тяжелые, хронически текущие формы, приводящие к ранней смерти или инвалидизации ребенка.

Таким образом, причиной пери- и неонатальной смертности до 50% являются врожденные пороки развития, наследственные болезни (генные болезни – 8–10 %, хромосомные – 2–3 %, мультифакториальные – 35–40 %), другие «генетические» причины и негенетические причины – 50 %.

Наследственными болезнями человека называют такие патологические состояния, причиной которых является изменение генетического материала.

Существуют различные классификации наследственных заболеваний. Одна из них – **классификация наследственных болезней по типу наследования**. На основе этого принципа наследственные заболевания подразделяют на хромосомные и генные.

Хромосомные болезни возникают, если изменения затрагивают число хромосом или их структуру.

Генные болезни (моногенные или молекулярные) наследуются по законам Г. Менделя, возникают, если мутации происходят в отдельных генах. К настоящему времени описано несколько тысяч моногенных наследственных болезней. Большинство моногенных наследственных болезней встречается редко, однако суммарно они создают довольно заметный груз в любой популяции человека.

Мультифакториальные болезни. К наследственным болезням относят также заболевания, в развитии которых, одинаково важны как гены, так и факторы окружающей среды. Их называют *мультифакториальными* заболеваниями. К ним относят все такие хронические неинфекционные заболевания, как сахарный диабет, атеросклероз, гипертензия, бронхиальная астма, язвенная болезнь и др. Частота этих заболеваний в популяции высокая.

Выделяют также заболевания, обусловленные действием преимущественно *внешнесредовых факторов*. К ним относят травмы, частые инфекционные болезни. Многие исследователи полагают, что возникновение этих заболеваний также зависит от генетической конституции, хоть и в небольшой степени. Известно, что во время эпидемий часть населения не заболевает, обладая генетически обусловленной невосприимчивостью к соответствующей инфекции.

В последние годы созданы компьютерные информационные базы данных и компьютерные программы диагностики наследственных болезней. Их назначение – ускорить и объективизировать выбор диагноза из множества генетически разнородных, но клинически сходных синдромов и болезней.

Наиболее информативны OMIM и OMD базы данных.

Менделирующая наследственность человека (*Mendelian Inheritance in Man*, V.A. McKusick, сокращенно – MIM). Интернет-версия «On-Line Mendelian Inheritance in Man – OMIM» (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>) – информационно-поисковая мультимедийная система. 3-е издание OMIM переведено на русский язык в 1976 г. под названием «Наследственные признаки человека».

Каталог имеет следующие разделы:

- Молекулярные дефекты при менделирующих нарушениях (перечень нарушений и перечень продуктов патологических генов).
- Краткий обзор генетических карт человека (аутосомные, X- и Y-хромосомные, митохондриальные).
- Каталог аутосомно-доминантных генов.
- Каталог аутосомно-рецессивных генов.
- Каталог X-хромосомных генов.
- Каталог Y-хромосомных генов.
- Каталог митохондриальных генов.

Каждый менделирующий признак имеет шестизначный номер, который сохраняется за ним, даже если обнаружены новые гены. Например, фенилкетонурия – MIM (OMIM) 261600. За названием признака и синонимами следует лаконичное описание болезни и ее генетика. Статья заканчивается списком наиболее важных источников литературы по теме. Каталог снабжен полным предметным указателем.

Оксфордская медицинская база данных (*Oxford Medical Database* для Windows, сокращенно – OMD) состоит из двух баз данных: 1. Лондонская база данных по дисморфологии (*London Dysmorphology Database* – LDDB); 2. Лондонская нейрогенетическая база данных (*London Neurogenetics Database* – LNDB). Адрес в интернете – <http://dhmhd.mdx.ac.uk/LDDB/lddb.html>. Обе базы были созданы М. Baraitser и R. Winter как инструменты для клинической диагностики врожденных аномалий и нейрогенетических синдромов соответственно.

В настоящее время имеется несколько русскоязычных систем компьютерной диагностики. Наиболее значимые из них:

СИНГЕН – *SYNGEN* (синдромы генетические) представляет собой иллюстрированную информационную диагностическую систему примерно по 2 тыс. синдромов врожденных пороков развития человека. По каждому синдрому имеется достаточно полная база данных и библиография. Система осуществляет поиск синдромов по набору симптомов и выстраивает ряд сходных синдромов (диагнозы-кандидаты), дает справочное описание выбранного синдрома из базы данных. Таким образом, СИНГЕН можно использовать для дифференциальной диагностики различных синдромов врожденных пороков развития.

ХРОДИС – *CHRODYS* (хромосомные дисморфии) – информационно-поисковая система по нарушениям развития хромосомной этиологии. Она включает в себя данные о клинической картине каждого больного (более 2 тыс. больных) с моно- и трисомиями. ХРОДИС позволяет «выбрать» из компьютера характеристику клинической картины пациентов с определенной хромосомной или геномной мутацией, провести поиск описаний синдрома, как он представлен в публикациях. В системе есть цитогенетическая номенклатура и словарь терминов. Система предназначена для врачей-генетиков и научных работников.

Занятие 1

КЛИНИКО-ГЕНЕАЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Цель занятия: ознакомиться с основными приемами и методами клинико-генеалогической диагностики наследственных заболеваний

Клиническая диагностика наследственных болезней основывается на данных клинического, генеалогического и параклинического обследования.

Обследование больных с наследственной патологией проводится в два этапа: первый – *клинический* и второй – *параклинический*.

Клинический этап включает общее клиническое обследование больного в соответствии с требованиями, описанными в соответствующих руководствах. На этом этапе применяются основные и дополнительные клинические, а также основные клинико-инструментальные и клинико-лабораторные методы.

При общем клиническом обследовании больного постановка диагноза завершается одним из трех заключений:

- 1) четко поставлен диагноз ненаследственного заболевания;
- 2) четко поставлен диагноз наследственной болезни;
- 3) имеется подозрение, что основная или сопутствующая болезнь наследственная. Третья группа, как правило, требует применения специальных, дополнительных методов обследования (параклинических, лабораторно-генетических).

Параклиническое обследование проводится при подозрении на конкретную наследственную болезнь. На параклиническом этапе применяют специальные лабораторные, а также цитогенетические, молекулярно-генетические и биохимические методы, а в определенных ситуациях еще и популяционно-статистический метод.

Клинико-генеалогическая диагностика включает три основных этапа: *клиническое обследование, составление родословной и генеалогический анализ.*

1. Клиническая диагностика наследственных заболеваний

Объективный осмотр начинается с изучения внешнего вида пробанда (человека, который обратился в генетическую консультацию). Методической основой такого осмотра является *семиотика* – наука о знаках (символах) патологического процесса в организме, правильном их обозначении, морфологических и функциональных изменениях органов и частей тела, динамике клинических проявлений. Идентификация символов наследственной патологии – это обязательное условие для ее успешного выявления у пробанда.

С этой целью широко используют разные предметно-образные знаки для обозначения разнообразных признаков, например: «барабанные палочки», «веслообразные ребра», «капельное сердце» и т. п. С их помощью обозначают главные симптомы наследственного или врожденного заболевания.

Во многих случаях у больного с наследственной патологией наблюдается характерный внешний вид или «знаки» генетического заболевания, например: «лицо эльфа» (синдром Вильямса), «кошачий крик» (синдром делеции короткого плеча хромосомы 5) и т. д. При внешнем осмотре пробанда внимание должно быть направлено также на выявление соответствующих предметно-образных знаков у близких родственников.

Один и тот же признак часто встречается при нескольких формах заболеваний. Например, деформация грудной клетки встречается не менее чем при 30 наследственных болезнях, искривление позвоночника встречается более чем при 50 наследственных синдромах. При осмотре специалист генетик может выявить признаки существенно облегчающие дифференциальную диагностику. Например, у человека с врожденным пороком сердца нужно тщательно осмотреть руки: укорочение I пальца кисти или наличие трех фаланг вместо двух сразу наводит на мысль о доминантно наследуемом синдроме Холт–Орама (или синдроме «рука–сердце»). Гипоплазия или дисплазия ногтей может наблюдаться при 25 различных наследственных болезнях. Больные с этими синдромами являются частыми пациентами отделений сердечно-сосудистой хирургии.

Важное место в диагностике наследственных болезней занимает лицевая часть черепа. Например, запавшая переносица может быть признаком мукополисахаридоза или ахондроплазии.

Умственная отсталость результат патологии более чем при 100 наследственных синдромах, среди которых много хромосомных.

Около 200 внешних симптомов и признаков можно выявить при наследственной патологии без применения специальных дополнительных методов обследования. Однако эти признаки выявляются только в тех случаях, когда их целенаправленно.

После внешнего осмотра генетик выявляет у пробанда другие характерные особенности заболевания: время манифестации или возраст больного, на который приходится появление первых признаков болезни, прогрессивный характер течения, множественность (полисистемность) поражения, сегрегацию заболевания и/или его симптомов в родословной, резистентность к терапии и др.

Общие признаки наследственных болезней, позволяющие специалисту-генетику заподозрить роль наследственных факторов в этиологии и патогенезе рассматриваемого заболевания:

- *Определенный комплекс признаков болезней.*
- *Хроническое, прогрессивное, рецидивирующее течение.*
- *Множественные патологические изменения органов и систем.*
- *Плейотропное действие гена.*
- *Врожденный характер заболевания.* Не менее 25 % форм генных заболеваний и почти все хромосомные болезни начинают формироваться уже внутриутробно.
- *Резистентность к наиболее распространенным методам терапии.*
- *Семейный характер заболевания.* Следует помнить, что термин «*семейный случай*» не всегда отражает наследственное происхождение болезни, но может свидетельствовать об общности средовых воздействий, характерных для многих членов семьи (например, туберкулез). При наличии семейных случаев заболевания проводится второй этап обследования больного – дифференциальная диагностика конкретной наследственной болезни.

1.1. Особенности осмотра и обследования пациентов, а также их родственников

На первичном обследовании отмечают: врожденные пороки развития, признаки дизморфогенеза, антропометрические признаки, течение беременности и ее особенности.

Врожденные пороки развития – наиболее очевидные признаки наследственной патологии. Врожденные пороки развития (ВПР) – это патологические состояния, которые представляют собой стойкие структурные или морфологические дефекты органа или его части, возникающие внутриутробно и нарушающие функцию пораженного органа. Понятие «врожденный порок» включает в себя также врожденные нарушения обмена веществ.

ВПР могут возникать вследствие мутаций, воздействия тератогенных факторов или развиваться в результате совместного действия тех и других. Формирование большинства пороков развития происходит в течение первых 8–10 недель беременности.

Выделяют большие пороки развития и малые аномалии развития.

Большие пороки развития (БПР), или *крупные пороки*, представляют грубые дефекты, нарушающие функцию пораженного органа. Изучены и описаны подробно. Например, анэнцефалия, гидроцефалия, микроцефалия, спинномозговые грыжи, расщелины губы и нёба, отсутствие пальцев, конечностей, атрезия кишечника и т. д. Они, как правило, приводят к значительным медицинским, социальным и косметическим проблемам.

Малые аномалии развития (МАР), или *признаки дизморфогенеза*, представляют собой небольшие отклонения в строении органа, не сопровождающиеся нарушением его функции (эпикант, короткая уздечка языка, деформация ушной раковины и др.), – микроаномалии развития. Они встречаются у здоровых людей. Но наличие одновременно нескольких микроаномалий указывает на необходимость более внимательного обследования больного на предмет врожденной или наследственной патологии.

Признаки дизморфогенеза (МАР) часто встречаются при многих наследственных синдромах (а также и в общей популяции). Они создают в своей совокупности фон диспластичного развития ребенка – *стигмы* и играют значительную роль в диагностике наследственной и врожденной патологии. Диагностическая значимость отдельно взятого признака этой группы относительно невелика, однако сочетание нескольких таких признаков может помочь в определении правильного диагноза, особенно если у ребенка наблюдается задержка физического, интеллектуального и полового развития.

Антропометрические признаки. Для диагностики наследственных болезней полезными оказываются следующие антро-

пометрические сведения: рост, масса тела, телосложение, длина конечностей (иногда отдельных их частей), окружность груди и черепа, соотношение сагиттального и латерального размеров черепа. Все эти данные сравниваются с кривыми распределения указанных параметров в популяции.

К врожденным порокам развития не следует относить постнатальные нарушения пропорций или размеров органов, являющихся проявлением эндокринных расстройств (гипофизарная карликовость, гигантизм, акромегалия).

Наследственные заболевания характеризуются различными сочетаниями отдельных признаков (симптомов). По четкости регистрации они подразделяются на три группы:

альтернативные – либо есть, либо нет (примеры – преаурикулярные папилломы, четырехпальцевая складка ладони и др.);

измерительные – признаки, определяемые абсолютным или относительным количественным значением (удлинение, укорочение, увеличение, уменьшение, примеры – брахидактилия, микроцефалия и др.);

описательные – признаки, характеризующиеся изменениями кожи, волос, мягких тканей и др., к которым трудноприменимы количественные оценки. В отличие от признаков первой группы, они требуют в своем обозначении сравнительных характеристик (примеры – пятна на коже цвета «кофе с молоком», клювовидный нос, воронкообразная грудная клетка и др.).

Патологический фенотип определенного наследственного синдрома складывается из более или менее устойчивого сочетания отдельных симптомов. Таким образом, **синдром** – совокупность внешних и внутренних, морфологических и функциональных аномалий и врожденных пороков, вызванных единым морфологическим фактором. Обычно тот или иной синдром имеет от 1–2 до 5 (редко) соответствующих признаков.

Задача генетика-консультанта состоит в том, чтобы увидеть данные аномалии и правильно их интерпретировать.

Клинико-морфологическое обследование (внешний осмотр или паспортная диагностика) предполагает определенную последовательность, примерная схема которого представлена в «Карте фенотипа».

Карта фенотипа позволяет выявить практически весь спектр больших и малых аномалий развития при «поэтажном» осмотре.

Причем на каждом «этаже» можно обнаружить значительное число типов МАР.

После выявления аномалий развития подсчитывается их количество: сначала отдельно БАР и МАР, затем их общая сумма, а также число дополнительных аномалий, регистрация которых не была предусмотрена картой фенотипа.

После всех подсчетов определяется вариант развития про-банда (гипопластический, гипотрофический или диспластический) и оценивается отставание массы тела от нормы при данном гестационном возрасте и росте, трофические нарушения и снижение тургора кожи, нарушения гомеостаза, иммунологической реактивности и изменения функционального состояния ЦНС.

Затем ставится предварительный диагноз врожденного заболевания, по возможности выделяя моногенные пороки, наследственные синдромы, множественные ВПР, пороки мультифакториальной природы, пороки при хромосомных нарушениях и пороки неустановленного генеза.

Большую помощь в постановке диагноза наследственного и врожденного заболевания может оказать метод предварительного диагноза с помощью компьютерных баз данных

2. Генеалогический метод диагностики наследственных заболеваний

Генеалогический метод – составление родословной и последующий ее анализ. Метод предложен Ф. Гальтоном в 1865 г. Он позволяет выявить наследственный характер признака, определить тип наследования признака, тип взаимодействия генов и пенетрантность аллелей.

Генеалогический метод основан на данных, полученных у пробанда или его родственников. Составление родословной начинается с *пробанда*, с лица, обратившегося в генетическую консультацию. Чаще всего им оказывается больной или носитель признака, наследование которого необходимо проследить при анализе родословной. Всех детей одной супружеской пары называют *сибсами*. В родословной сибсы располагаются в порядке рождения горизонтально слева направо, начиная со старшего. Желательно получить максимальные сведения о родственниках 3–4 поколений. Минимальный объем информации должен включать не менее трех поколений. Большое значение

для консультирования имеет выявление кровного родства между консультирующимися супругами, изучение состояния здоровья монозиготных близнецов, если такие есть в родословной; обследование не только больных членов родословной, но и здоровых; сведения о выкидышах, мертворождениях. При сборе семейного анамнеза желательно использовать также и другие источники медицинской и генеалогической информации (выписки из истории болезни, домовые книги, церковные записи и т. д.). Члены одного поколения располагаются в одном ряду. Ряды поколений обозначают римскими цифрами. Представители одного поколения нумеруются арабскими цифрами, последовательно – слева направо. Таким образом, каждый член родословной имеет свой шифр двоичной системы, например, I-1, II-1, II-2 и т. д. Чаще всего родословная бывает представлена последовательными, соединенными между собой горизонтальными рядами.

При составлении родословной принято использовать символы, представленные на рис. 1.

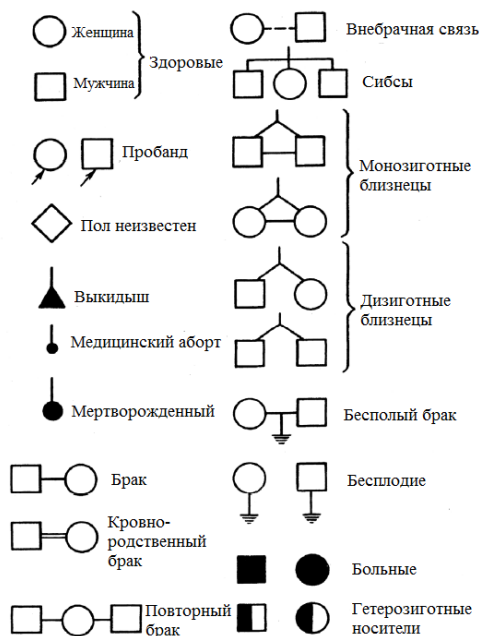


Рис. 1. Символы, используемые при составлении родословных

В случае, если членов родословной оказывается очень много, эти ряды могут быть представлены в виде концентрических окружностей (рис. 2).

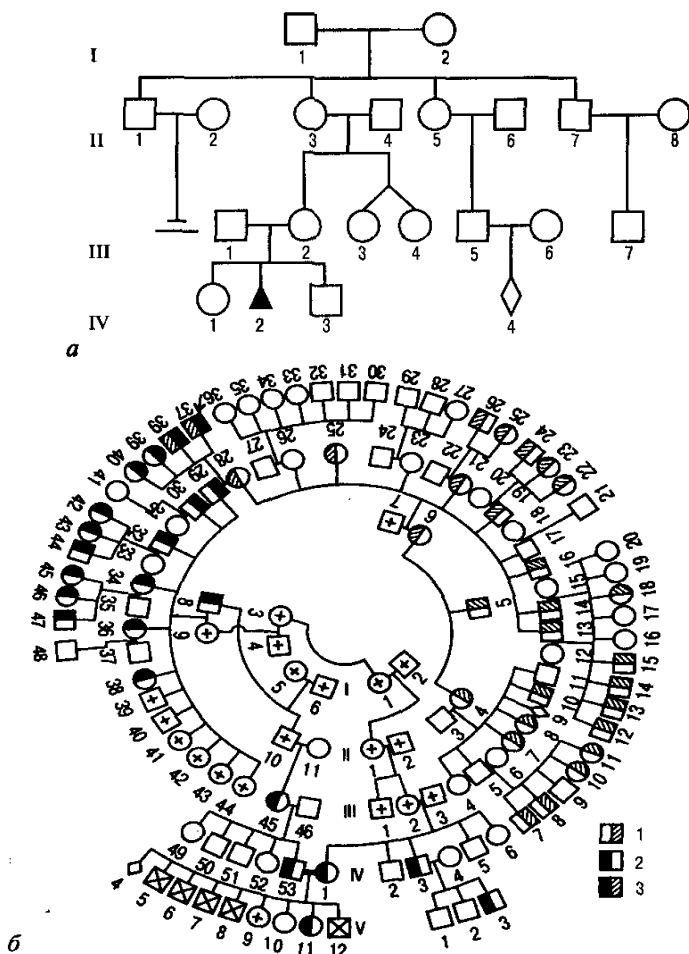


Рис. 2. Примеры составления родословных:
 а – классическая родословная, б – концентрическая родословная (1 – больные гемофилией; 2 – больные талассемией; 3 – больные гемофилией и талассемией)

3. Генеалогический анализ

Генетический анализ родословной включает несколько этапов.

Первая задача при анализе родословной – установление наследственного характера признака (болезни). Если в родословной встречается один и тот же признак несколько раз, то можно думать о его наследственной природе.

После того как обнаружен наследственный характер признака, необходимо установить тип наследования признака – доминантный или рецессивный, наследуется сцепленно с полом или аутосомно – в зависимости от того, как он проявляется у лиц разных полов и разных поколений.

Анализ родословной – это заключительный этап клинико-генеалогической диагностики. Он требует хорошего знания критериев типов наследования.

Аутосомно-доминантное наследование обусловлено тем, что мутантный ген связан с аутосомой и проявляется у гетерозиготных носителей гена. В силу этого он характеризуется следующими особенностями:

- 1) патологический признак встречается в каждом поколении (передача болезни по вертикали);
- 2) болеют в равной пропорции оба пола;
- 4) здоровые члены семьи обычно имеют здоровое потомство;
- 5) отец и мать одинаково передают мутантный ген дочерям и сыновьям;
- 6) часто наблюдается неполная пенетрантность; в случае неполной пенетрантности при передаче признака одно поколение иногда пропускается, причем признак не проявляется у того индивида, который, судя по родословной, должен быть гетерозиготным, о чем свидетельствует появление болезни у части его детей;
- 7) клинические проявления некоторых доминантных болезней могут проявиться только во время или после репродуктивного периода (рис. 3).

Аутосомно-рецессивный тип наследования. При **аутосомно-рецессивном** типе наследования мутантный ген проявляется только в гомозиготном состоянии. Большинство браков, наблюдаемых при рецессивных заболеваниях, происходит между фенотипически нормальными гетерозиготами. В потомстве такого брака вероятность того, что ребенок окажется поражен-

ным, составит 25 %. При данном типе наследования заболевание встречается в родословной редко и не во всех поколениях. Вероятность заболевания у девочек и мальчиков одинакова (рис. 4).

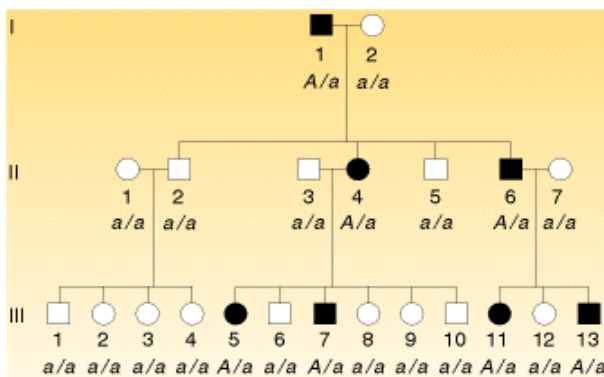


Рис. 3. Аутосомно-доминантный тип наследования

Наиболее типичные болезни: муковисцидоз, фенилкетонурия, галактоземия, адено-генитальный синдром, мукополисахаридозы.

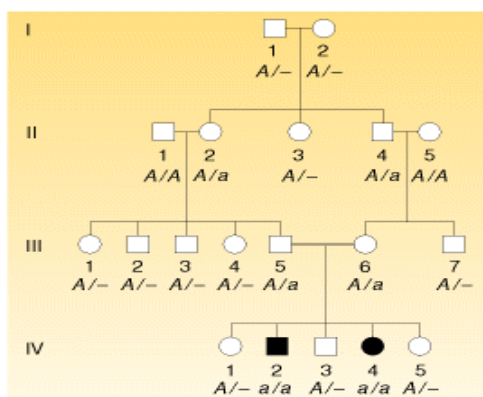


Рис. 4. Аутосомно-рецессивный тип наследования

Наследование заболеваний, сцепленных с полом, определяется тем, что мутантный ген локализован в X или Y-хромосоме.

X-сцепленный рецессивный тип наследования характеризуется тем, что обычно пораженными являются мужчины. Все их фенотипически здоровые дочери являются гетерозиготными носительницами. Среди сыновей гетерозиготных матерей соотношение пораженных и непораженных 1:1. Все сыновья пораженных мужчин здоровы (рис. 5).

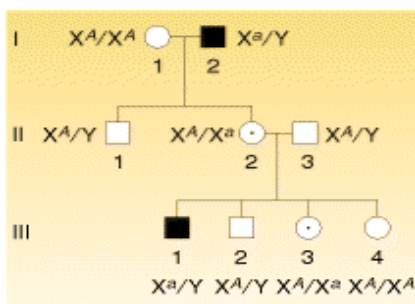


Рис. 5. X-сцепленный рецессивный тип наследования

X-сцепленный доминантный тип наследования проявляется у гемизиготных мужчин и гетерозиготных женщин. Все сыновья пораженных отцов и здоровых матерей не несут патологических признаков, здоровы и их дети. С другой стороны, все дочери пораженных отцов, поражены. Среди детей пораженных матерей наблюдается отношение 1:1, независимо от пола ребенка так, как и при аутосомно-доминантном типе наследования (рис. 6).

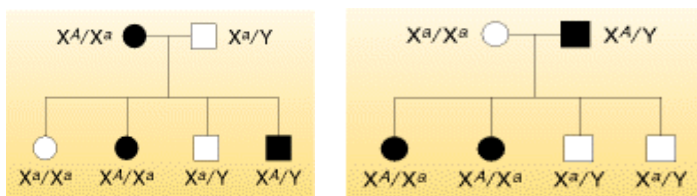


Рис. 6. X-сцепленный доминантный тип наследования

Голандрический тип наследования. В Y-хромосоме у мужчин локализованы гены, детерминирующие развитие семенников, контролирующие сперматогенез, определяющие безбидный при-

знак – оволосение ушной раковины и др. Они передаются только сыновьям – *голандрический тип наследования* с передачей признака от отца к сыновьям (рис. 7).

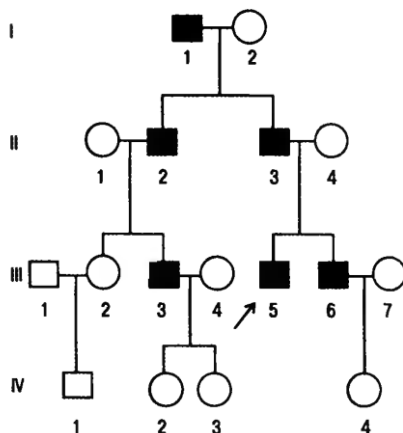


Рис. 7. Голандрический тип наследования

Митохондриальная наследственность. Митохондрии передаются с цитоплазмой яйцеклеток. В каждой яйцеклетке содержится около 25 000 митохондрий. Каждая митохондрия имеет кольцевую хромосому. Описаны мутации различных генов митохондрий. Для митохондриальной наследственности характерны следующие признаки:

1. Болезнь передается только от матери.
2. Больны и девочки, и мальчики.
3. Больные отцы не передают болезни ни сыновьям, ни дочерям (рис. 8).

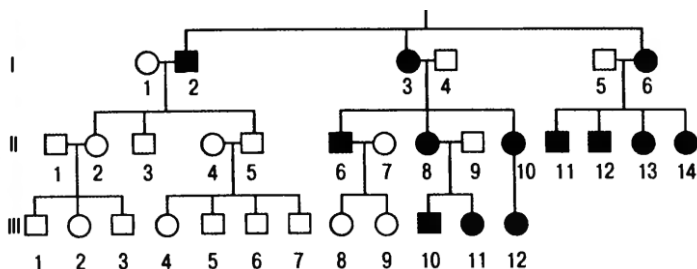


Рис. 8. Митохондриальный тип наследования

Практические задания и указания по их выполнению

Задание 1. Морфологический осмотр индивидуума. Составление карты фенотипа

Цель работы: получить навыки морфологического осмотра пациента, научиться составлять карту фенотипа.

Оборудование, приборы и материалы: измерительные приборы, линейки, весы, схема карты фенотипа.

Проведение работы: заполнить карту фенотипа.

При проведении работы необходимо учитывать:

1. Особенности телосложения и роста

Варианты:

– без отклонений от нормальных значений для данной возрастной группы и пола;

– аномально высокий (низкий) рост; асимметрия тела (гемипатрофия, гемигипертрофия, гемимикросомия), брахи- и долихоморфия, диспропорциональное телосложение, макросомия, мышечный тип сложения, ожирение и др.

2. Кожа, ее придатки, подкожная клетчатка

Варианты:

– без изменений;

– *диффузные изменения* – сухость, ихтиоз, распространенная экзема, истончение кожи, кожа плотная, гипер- или гипопластичная и др.;

– *очаговые изменения* – участки гипоплазии (атрофии), гиперкератоз, стрии (полоски истонченной кожи), аномальные рубцы, вдавления и др.;

– *нарушения пигментации кожи (дисхромии)* – диффузное (очаговое) уменьшение (усиление) пигментации, пигментный невус, пятна цвета «кофе с молоком», пятна депигментированные, витилиго и др.;

– *сосудистые изменения кожи* – петехии, телеангиоэктазии, гемангиомы и др.;

– *опухолевидные образования* – бородавки, ксантомы, нейрофибромы, подкожные узелки и др.;

– *волосы* – тонкие, грубые, ломкие, курчавые, гипер- и гипотрихоз, алоpecia (тотальная, очаговая), высокая или низкая линия роста волос на лбу, низкая линия роста волос на шее, оча-

говая (полиоз) или тотальная депигментация волос и др.;

– *ногти* – тонкие, гипопластичные, выпуклые, бороздчатые, утолщенные, вросшие и др.;

– *потовые железы* – гипер- и гипогидроз, ангидроз и др.;

3. Мышечная система

Варианты:

– без изменений;

– атрофия, гипотрофия, гипертрофия, псевдогипертрофия, гипоплазия, аплазия и др.;

4. Лицо и мозговой череп

Варианты:

– без изменений;

– *мозговой череп* – акроцефалия, брахицефалия, долихоцефалия, гидроцефалия, макроцефалия, микроцефалия, позднее закрытие родничков, широкие швы, теменные бугры, выступающий затылочный бугор, плоский затылок и др.;

– *лицо* – плоское, овальное, длинное, круглое, квадратное, треугольное, узкое, асимметричное, старческое, гротескное, амимичное, «птичье», «свистящее» др.;

– *лоб* – выступающий, выпуклый, высокий, покатый, широкий, узкий, скошенный;

– *ушные раковины* – большие или маленькие, деформированные, гипопластичные, выступающие, низко или высоко расположенные, и др.;

– *область глаз, век, бровей* – гипер- и гипотелоризм, монголоидная или антимонголоидная направленность глазных щелей, экзофтальм, энофтальм, микрофтальм, макрофтальм, птоз, эктропион, эпикант, телекант, катаракта, гетерохромия радужных оболочек, корэктопия – смещение зрачка, выступающие (уплощенные) надбровные дуги и др.;

– *нос* – маленький (большой), короткий (длинный), широкий (узкий), седловидный, плоский, вздернутый, грушевидный, клювовидный, шаровидный, с раздвоенным кончиком, и др.;

– *губы, полость рта, зубы, язык, небо* – микро- и макростомия, рот открытый, впалый, губы тонкие (толстые), губа отвислая, вывернутая, полная, приподнятая, изогнутая, небо узкое, широкое, высокое, арковидное и др.;

– *верхняя и нижняя челюсти* – микрогнатия, ретрогнатия, микрогения, прогнатизм и др.

5. Шея, плечевой пояс, грудная клетка, позвоночник

Варианты:

- без изменений;
- *шея* – длинная (короткая), с широким основанием, шейный птеригиум, кривошея спастическая и др.;
- *плечи* – узкие, покатые и др.;
- *ключицы* – гипоплазия и др.;
- *грудная клетка* – узкая (широкая), короткая (длинная), бочкообразная, щитовидная, воронкообразная, килевидная, асимметрия грудной клетки, недоразвитие грудной мышцы и др.;
- *ребра* – короткие, аномалии числа (добавочные), формы и др.;
- *молочные железы* – гипертелоризм сосков, ателия, множественные соски (полителия), добавочные (рудиментарные) грудные железы, гинекомастия;
- *лопатки* – выступающие, крыловидные лопатки и др.;
- *позвоночник* – кифоз, кифоз-горб, сколиоз, кифосколиоз, лордоз, ограниченная подвижность позвоночника, люмбализация (у больного 6 поясничных позвонков и др.;

6. Область живота и наружных половых органов

- *живот* – диастаз, гипо- или аплазия мышц передней брюшной стенки, расположение пупка, врожденные грыжи (белой линии живота, паховые, бедренные, пупочная);
- *наружные половые органы* – гипогонадизм, крипторхизм, анорхизм, монорхизм, макроорхизм, шалевидная мошонка, гипертрофия клитора, гипоплазия малых половых губ, недоразвитие больших половых губ, незаращение пахового канала и др.;

7. Верхние и нижние конечности

Варианты:

- без изменений;
- долихостеномелия, брахи- и долихомелия, фокомелия, симптом трезубца (2, 3, 4 пальцы имеют одинаковую длину), сандалевидная щель между 1 и 2 пальцами стопы, брахидактилия, арахнодактилия, изодактилия, плоская стопа, асимметрия стоп, косолапость

Провести самостоятельный осмотр студента; данные осмотра внести в карту фенотипа. Сделать заключение. В заключении выделить основные признаки дисморфогенеза, стигмы дизэмбриогенеза, их значимость и общее количество.

Задание 2. Составление родословных

Цель работы: научиться составлять родословные по данным клинико-генеалогического обследования.

Оборудование, приборы и материалы: задачи на составление родословных.

Проведение работы:

1. Составьте родословную семьи по короткопалости и определите характер наследования этого признака и генотипы, указанных в родословной лиц. Пробанд – женщина с короткопалостью – имеет троих здоровых братьев и одну здоровую сестру. Отец пробанда – короткопалый. Со стороны отца дядя и одна тетя – короткопалые, а вторая имеет нормальную кисть. У дяди из четырех детей – двое с короткопалой кистью (сын и дочь), а два сына – с нормальной кистью. Бабушка по отцу была короткопалой, а все родственники по матери – нормальные.

2. Составьте родословную семьи по ахондроплазии. Пробанд – мужчина нормального роста. Известно, что его сестра и отец страдают ахондроплазией, а мать – здорова. По линии отца у пробанда дед карлик, бабушка нормального роста, две нормальные тети, одна тетя и один дядя карлики. Тетя с карликовостью вышла замуж за мужчину нормального роста и имеет сына карлика. Здоровая тетя в браке со здоровым мужчиной имеет четырех здоровых детей.

3. Мужчина, чей дедушка болел галактоземией (редкая аутосомная рецессивная болезнь) женился на женщине, сестра которой имела галактоземию. Женщина теперь беременна их первым ребенком.

а) Нарисуйте родословную этой семьи.

б) Какова вероятность, что ребенок будет иметь галактоземию?

в) Если первый ребенок болен галактоземией, какова вероятность, что второй ребенок также будет болен?

КАРТА ФЕНОТИПА

Студент _____
Возраст _____ лет Пол _____ Масса _____ Рост _____
Телосложение _____
Кожа: _____
Ногти: _____
Волосы: _____
Подкожная клетчатка: _____
Мышечный тонус: _____
Голова: окружность _____ см; форма _____; лоб _____;
затылок _____; рост волос на лбу _____; рост волос на
затылке _____; расположение _____; характер изме-
нений _____.
Ушные раковины: продольный размер _____;
поперечный размер _____.
Область глаз и глазное яблоко: расстояние между внутренними
углами глаз _____; расстояние между наружными угла-
ми глаз _____; расстояние между зрачками _____;
брови и надбровные дуги _____; веки _____; ресницы
_____; глазная щель _____; разрез глаз _____
Нос: форма _____;
характер изменений _____.
Губы и область рта: ширина рта _____; фильтр _____;
характер изменений _____.
Верхняя челюсть: _____
Нижняя челюсть: _____
Зубы: прикус _____; форма _____;
цвет эмали _____.
Язык: _____ **Небо:** _____
Шея: _____
Туловище: _____
Позвоночник: _____
Грудная клетка: _____
Пояса конечностей: _____
Верхние конечности: плечо _____;
предплечье _____; ладонь _____;
пальцы _____ суставы _____
Нижние конечности: бедро _____;
голень _____; стопа _____;
пальцы _____; суставы _____.
Число малых аномалий — _____.

Задание 3. Анализ наследования признака по родословным

Цель работы: научиться делать правильное заключение о типе наследования признака на основе анализа имеющейся родословной.

Оборудование, приборы и материалы: схемы родословных

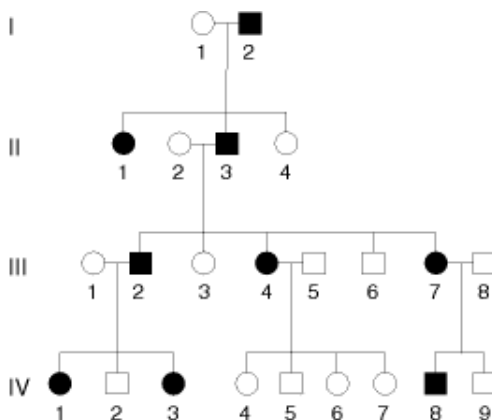
Проведение работы:

1. Редкий рецессивный аллель, наследуемый по менделевской схеме, вызывает болезнь кистозный фиброз. Фенотипически нормальный человек, отец которого имел кистозный фиброз, женился на фенотипически нормальной женщине из другой семьи, и пара ожидает рождение ребенка.

а) Нарисуйте родословную данной семьи.

б) Если первый ребенок действительно имеет кистозный фиброз, какова вероятность, что второй ребенок будет нормальным?

2. Ниже представлена родословная для редкого, но относительно умеренного заболевания кожи.



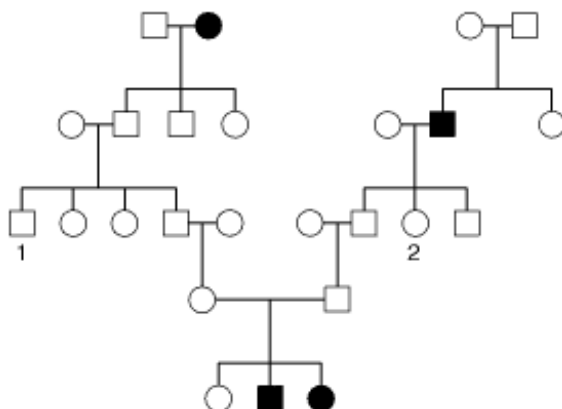
а) Заболевание наследуется как рецессивный или доминантный фенотип? Приведите обоснование вашего ответа.

б) Определите генотипы для возможно большего числа лиц в родословной; введите символы аллелей.

в) Рассмотрите четырех незатронутых болезнью детей родителей.

г) Проанализируйте все поколение IV и определите ожидаемую вероятность незатронутых болезнью детей?

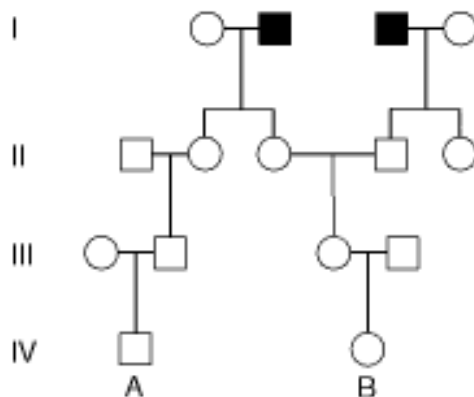
3. Представленная ниже родословная получена для редкой почечной болезни.



а) Объясните наследование этого признака.

б) Если индивидуумы 1 и 2 женятся, то какова вероятность, что их первый ребенок будет иметь почечную болезнь?

4. Рассмотрите родословную редкой аутосомной рецессивной болезни, фенилкетонурии (ФКУ).



а) Установите генотипы по возможности большего количества членов семьи.

б) Если индивидуумы А и В женятся, какова вероятность, что их первый ребенок будет иметь ФКУ?

в) Если их первый ребенок болен, то какова вероятность, что их второй ребенок будет здоров?

Задание 4. Дайте определение понятиям и терминам

<i>пробанд</i>	<i>стигмы дизэмбриогенеза</i>	<i>карта фенотипа</i>
<i>сиссы</i>	<i>сагиттальный размер черепа</i>	<i>гемангиомы</i>
<i>талассемия</i>	<i>латеральный размер черепа</i>	<i>макросомия</i>
<i>гемиатрофия</i>	<i>гипоплазии</i>	<i>нейрофибромы</i>
<i>ихтиоз</i>	<i>брахи- и долихоморфия</i>	<i>acroцефалия</i>
<i>стрии</i>	<i>гиперкератоз</i>	<i>брахицефалия</i>
<i>дисхромии</i>	<i>пигментный невус</i>	<i>долихоцефалия</i>
<i>витилиго</i>	<i>атрофия,</i>	<i>гидроцефалия</i>
<i>петехии</i>	<i>гипотрофия,</i>	<i>макроцефалия</i>
<i>алопеция</i>	<i>гипертрофия</i>	<i>микроцефалия</i>
	<i>телеангиоэктазии</i>	<i>гемигипертрофия</i>

Отчет должен быть представлен в тетради и сдается в конце работы преподавателю.

Рекомендуемая литература

1. Асанов, А. Ю. [и др.] Основы генетики и наследственные нарушения развития у детей / А. Ю. Асанов, Н. С. Демикова, С. А. Морозов. – Москва: Изд. центр «Академия», 2003. – 224 с.

2. Бочков, Н. П. Клиническая генетика: учебник / Н. П. Бочков, В. П. Пузырев, С. А. Смирнихина; под ред. Н. П. Бочкова. – 4-е изд. – Москва: Наука, 2011. – 592 с.

3. Врожденные и наследственные заболевания / под ред. П. В. Новикова. – Москва: Издательский Дом «Династия», 2007. – 544 с.

4. Гинтер, Е. К. Медицинская генетика: учебник / Е. К. Гинтер. – Москва: Медицина, 2003. – 448 с.

5. Козлова, С. И. Наследственные синдромы и медико-генетическое консультирование / С. И. Козлова, Н. С. Демикова, Е. Семанова, О. Е. Блиникова. – Москва: Практика, 1996. – 416 с.

6. Мутовин, Г. Р. Клиническая генетика. Геномика и протеомика наследственной патологии : учеб. пособие. – 3-е изд. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 832 с.

7. Новиков, П. В. Семиотика наследственных болезней у детей (симптом–синдром–болезнь). – Москва: «Триада-Х», 2009. – 432 с.

8. Пузырев, В. П. Патологическая анатомия генома человека / В. П. Пузырев, В. А. Степанов – Новосибирск: Наука, 1997. – 224 с.

9. Фогель Ф., Мотульски, А. Генетика человека. Т. 1–3 / Ф. Фогель, А. Мотульски. – Москва: Мир. 1990.

Занятие 2

ХРОМОСОМНЫЕ БОЛЕЗНИ

Цель занятия: ознакомиться с основными хромосомными заболеваниями, их этиологией и методами диагностики.

Хромосомы — нуклеопротеидные структуры в ядре эукариотической клетки, которые становятся легко заметными в определенных фазах клеточного цикла (во время митоза или мейоза). Хромосомы представляют собой высокую степень конденсации хроматина, постоянно присутствующего в клеточном ядре.

Хромосомные болезни — это заболевания, обусловленные изменением числа хромосом или их структуры.

1. Нормальный кариотип человека

Кариотип — это совокупность хромосом в ядре соматической клетки. Кариотип каждого вида характеризуется определенным числом хромосом, их величиной и морфологией. У человека в ядре каждой соматической клетки имеется 46 хромосом, из них 44 аутосомы и две половые хромосомы (у женщин 44А + XX, у мужчин 44А + XY).

Термин «хромосома» ввел В. Вальдейер в 1888 г. для обозначения окрашенных нитевидных структур, видимых в клетке в ходе митоза. Хромосомы под световым микроскопом удобно изучать на стадии метафазы. В этот период хромосомы в наибольшей степени укорочены, утолщены и хорошо видимы в микроскоп. Метафазная хромосома состоит из двух *хроматид*, которые соединяются при помощи *центромеры*. Центромера делит хромосому на два плеча — короткое (p) и длинное (q). В зависимости от значения **центромерного индекса** (отношения длины короткого плеча к длине всей хромосомы) различают — **метацентрические** (центромера делит хромосому на два почти равных плеча, центромерный индекс 48–49 %), **субметацентрические** (неравноплечие, центромерный индекс 26–46 %) и **acroцентрические** хромосомы (резко неравноплечие, центромерный индекс 15–30 %) (рис. 1). Концевые участки хромосомы называют *теломерами*, они играют решающую роль в сохранении стабильности хромосом. В настоящее время показано, что в теломере находятся повторяющиеся последовательности ДНК (теломерная ДНК), препятствующие укорочению хромосомы при ее репликации.

Некоторые хромосомы имеют **вторичные перетяжки**, отделяющие от плеча хромосомы участок, называемый **спутником**. Спутники соединены с основной частью хромосомы хроматиновой (или спутничной) нитью. Наличие спутников и спутничных нитей наиболее характерно для акроцентрических хромосом в области их коротких плеч. **Спутник** – это хромосомный сегмент, чаще всего гетерохроматический, расположенный дистально от вторичной перетяжки. По классическим определениям, спутник – сферическое тельце с диаметром, равным диаметру хромосомы, или меньше его, связанное с хромосомой тонкой нитью. Выделяют 5 типов спутников: *микроспутники* – сфероидальной формы, маленькие спутники с диаметром вдвое или еще меньше диаметра хромосомы; *макроспутники* – довольно крупные формы спутников с диаметром, превышающим половину диаметра хромосомы; *линейные спутники* – спутники, имеющие форму длинного хромосомного сегмента. Вторичная перетяжка значительно удалена от терминального конца; *терминальные спутники* – спутники, локализованные на конце хромосомы; *интеркалярные спутники* – спутники, локализованные между двумя вторичными перетяжками.

Область вторичной перетяжки называют также **ядрышковым организатором**, поскольку в этом участке хромосомы происходит формирование и сборка ядрышек. Спутник вместе со вторичной перетяжкой составляют **спутничный район**.

В ходе метафазы и прометафазы хромосомы можно увидеть в световом микроскопе как дискретные удлинённые структуры, размеры которых колеблются от 1,5 – 2 мкм (хромосомы 21, 22 и Y) до 11 до 12 мкм (хромосома 1).

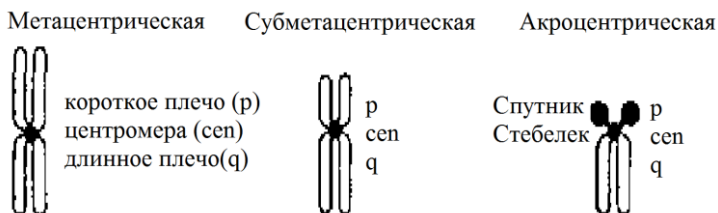


Рис. 1. Метацентрическая, субметацентрическая, акроцентрическая хромосомы. В акроцентрических хромосомах стебельки и спутники располагаются на коротких плечах

Для характеристики кариотипа используют систематизированные определенным образом видеоизображения гомологичных хромосом всего хромосомного набора – **кариограммы**, либо схематичные изображения каждого гомолога – **идиограммы** (рис. 2).

Описание нормального кариотипа человека. Для описания нормального кариотипа человека, а также для обозначения количественных и структурных перестроек хромосом используется определенная универсальная схема и специальные символы. Описание кариотипа начинают с указания общего количества хромосом в клетке, после чего ставится запятая и обозначается набор половых хромосом, указывающий пол обследованного. Например, запись 46, XX характеризует нормальный кариотип женщины, а 46, XY – нормальный кариотип мужчины. Если хромосомных перестроек у обследованного не выявлено, то запись на этом заканчивается.

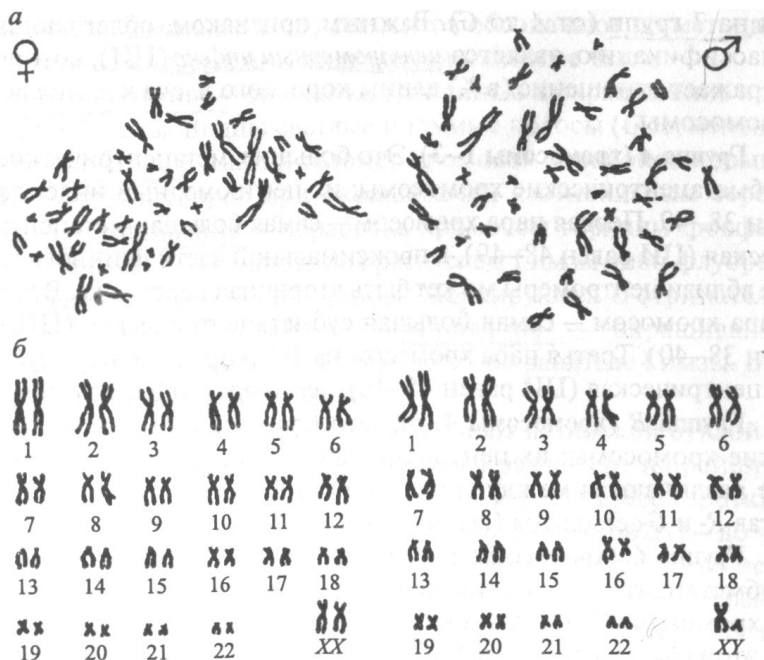


Рис. 2. Кариотип (а) и кариограмма (б) хромосом человека

В ряде случаев при обследовании обнаруживают, так называемый, нормальный полиморфизм хромосом – индивидуальные особенности их строения (рис. 3).

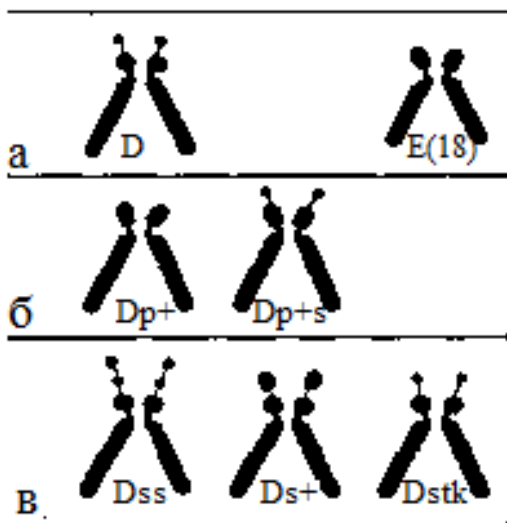


Рис. 3. Нормальный полиморфизм акроцентрических хромосом (группа D или G) человека: а – нормальные хромосомы из групп D и E (18 хромосома); б – $Dp+$ – удлинённые короткие плечи хромосомы из 7 группы D (их длина такая же, как у хромосомы 18); $Dp+s$ – на удлинённых коротких плечах расположены спутники нормальных размеров; в – D-хромосомы со структурными вариантами спутничного района: ss – двойные спутники; s+ – увеличенные спутники; stk – удлинённые спутничные нити

Полиморфизм наиболее характерен для акроцентрических хромосом и, как правило, отражает вариабельность размеров гетерохроматиновых сегментов, наличие спутников и спутничных нитей в области коротких плеч и их величину.

Система описания хромосом:

– Короткое плечо хромосом обозначают латинской буквой p, длинное – q.

– Каждое плечо хромосомы разделяют на районы, нумеруемые от центромеры к теломере.

– В некоторых коротких плечах выделяют один такой район, в других (длинных) – до четырех.

– Полосы (сегменты, подсегменты) внутри районов нумеруются по порядку от центромеры.

– Если локализация гена точно известна, для ее обозначения используют индекс полосы. Например, локализация гена, кодирующего эстеразу D, обозначается 13p14 – четвертый сегмент первого района короткого плеча хромосомы 13 (рис. 4).

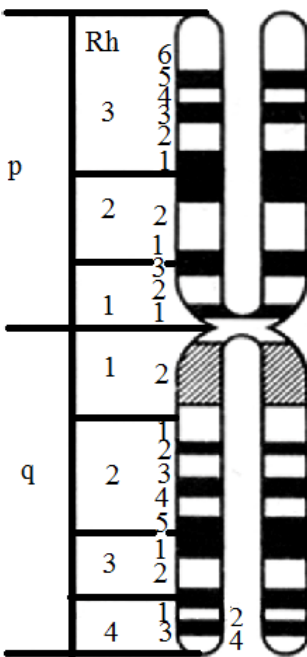


Рис. 4. Рисунок сегментации в первой хромосоме в соответствии с Парижской классификацией: 1 – порядковый номер аутосомы; p – короткое плечо; q – длинное плечо; в p и q плечах выделяются и нумеруются районы (от центромеры к теломерам), которые состоят из сегментов – светлых и темных полос (нумерация сегментов также идет от центромеры)

Денверская классификация хромосом (1960) учитывает размеры и форму хромосом, положение центромеры и наличие вторичных перетяжек и спутников.

46 хромосом человека в кариотипе делятся на 7 групп – А, В, С, D, E, F, G и половые хромосомы X и Y (рис. 5).

К первой группе А относятся хромосомы 1, 2 и 3. Центромерный индекс (ЦИ) 38 – 49). Хромосома 1 (11мкм, ЦИ 48 – 49) – метацентрическая, Хромосома 2 (ЦИ 38 – 40) – по размерам почти равна хромосоме 1 и является субметацентрической. Хромосома 3 (ЦИ 45 – 46) – практически метацентрик.

К группе В относятся хромосомы 4 и 5 – крупные субметацентрические хромосомы (ЦИ 24 – 30), которые не различаются ни размерами, ни положением центромера.



Рис. 5. Денверская классификация хромосом человека

К группе С относятся хромосомы с 6 по 12 и X-хромосома. В основном, это субметацентрические хромосомы крупных и средних размеров (ЦИ 27 – 43). Хромосомы 6, 7 и X – наиболее крупные хромосомы группы С. Инактивированная хромосома X формирует в интерфазном ядре женщины тельце хроматина X (или, по старому названию, полового хроматина). Хромосома X является самым поздним репликантом в хромосомном наборе.

К группе D относятся хромосомы 13, 14 и 15 (ЦИ около 15) – акроцентрические хромосомы средних размеров с почти терминально расположенными центромерами. Ни размерами, ни морфологически после *рутинного окрашивания* эти хромосомы между

собой не различаются. Короткое плечо всех трех пар хромосом потенциально может формировать спутники, однако не в каждой клетке и не у всех индивидуумов обнаруживают спутники.

К группе E относятся хромосомы 16, 17 и 18 (ЦИ 26 – 40).

Группа F представлена хромосомами 19 и 20 (ЦИ 36 – 46) – короткие метацентрические хромосомы, которые неразличимы между собой без дифференциального окрашивания.

Хромосомы 21 и 22 относятся к **группе G** (ЦИ 13 – 33). Хромосома 21 (2,3 мкм) наиболее короткая акроцентрическая хромосома в кариотипе. Короткое плечо обладает способностью формировать спутники.

Хромосома Y (2,3 мкм) – маленькая акроцентрическая хромосома, сходная по размерам с хромосомами 21 и 22, но не имеющая спутников. Она отличается также гетерохроматиновым районом большего размера и является поздним репликантом.

Дифференциальное окрашивание хромосом. Парижская классификация хромосом человека (1971). В начале 70-х гг. XX в. цитогенетики обнаружили высокую специфичность метафазных хромосом в отношении их способности к дифференциальной исчерченности после окрашивания акрихин-ипритом и другими красителями типа Гимза, что связано с чередованием эухроматиновых и гетерохроматиновых районов хромосом по их длине. После этих исследований для всех хромосом человека составлены карты, позволяющие по рисунку полос не только идентифицировать отдельные хромосомы, но также их участки в случаях перестроек. Для медицинской цитогенетики это имело большое значение, так как давало возможность определить природу дефектов развития при нарушениях в системе хромосом большого.

В основе Парижской классификации хромосом человека лежат *методы окрашивания (бэндинга)*, позволяющие выявить комплекс поперечных полос (*бэндов*) на хромосоме (рис. 6).

Идентификация хромосом человека с помощью различных типов окрашивания по длине. В практике клинической цитогенетики выделены три основных типа дифференциального окрашивания хромосом по длине: **G-, C-, Q-методы**. К часто применяемому методу относится **R-окрашивание**. Разные типы окрашивания определяют единую линейную дифференциацию

структуры хромосом в метафазе митоза, при этом каждая окраска делает это по-своему.

Структуры, выявляющиеся по длине хромосом, рекомендуются называть в соответствии с типом окрашивания G-, C-, Q-, R-сегментами (по-английски – bands). Каждый из методов существует в нескольких модификациях по техническому выполнению. Данные методы не являются альтернативными, особенно это относится к C-окрашиванию, с помощью которого выявляется часть линейной структуры хромосом – структурный гетерохроматин. Кратко рассмотрим теоретических аспекты этих методов.

G-окрашивание хромосом. G-окрашивание хромосом – самый распространенный метод в клинично-цитогенетической практике, базируется на предварительной обработке препаратов хромосом перед окраской и на использовании нефлюоресцентных красителей или их смесей типа Романовского–Гимзы. Предварительная (постфиксационная) обработка связана с инкубацией в солевых растворах и в растворах протеолитических ферментов (трипсина, различных протеаз) при определенной температуре и pH. Идентификацию хромосом обеспечивает чередование темно и светло окрашенных полос. Темные полосы (G-полосы, G-бэнды) образуются в местах локализации интерстициального гетерохроматина. Число полос на кариотип при G-окрашивании варьирует, но в метафазной клетке их число не менее 320, а на стадии прометафазы может достигать и 1250 на гаплоидный набор. Этот способ окрашивания позволяет идентифицировать хромосомы, выявлять делеции, инверсии, инсерции, транслокации, ломкие участки и более сложные перестройки.

Q-окрашивание хромосом. При этом типе окрашивания хромосомы обрабатывают различными флюорохромами и анализируют их с помощью флюоресцентной микроскопии. Из флюорохромов чаще всего применяют производные акридина: акрихин (атебрин) и акрихин-иприт [Caspersson et al., 1970]. Рисунок каждой хромосомы специфичен по числу, положению и размеру полос по-разному светящихся сегментов, что обеспечивает идентификацию всех хромосом. Стабильность рисунка определяется степенью конденсации хромосом, так как в прометафазных (длинных) хромосомах крупные однородные полосы разделены на более мелкие. Однако существует истинная вариабельность Q-рисунка, которая определяется выраженностью ярко светящихся сегментов хромосом 3, 4, 13–15, 21, 22 и Y. Самый

крупный ярко светящийся сегмент проявляется в хромосоме Y. Он хорошо виден в интерфазных клетках разных тканей и может служить цитологическим показателем пола индивидуума.

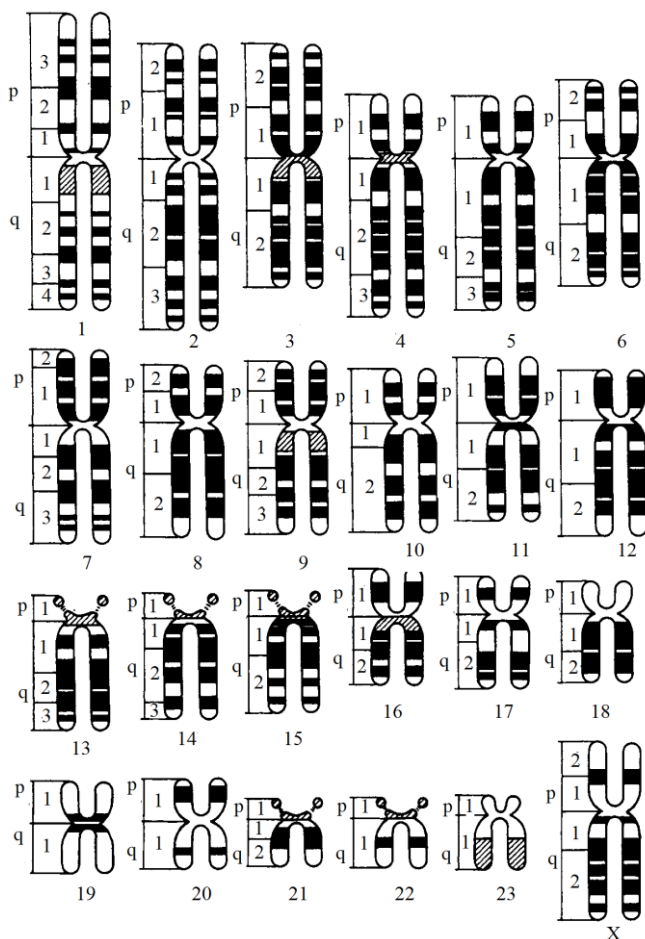


Рис. 6. Парижская классификация хромосом человека (G-окрашивание)

С-окрашивание хромосом. При С-окрашивании в хромосомах определяются лишь центромерные и околоцентромерные районы хромосом и длинное плечо хромосомы Y.

Смысл этого метода в том, что он выявляет структурный гетерохроматин во всех хромосомах и тем самым позволяет оценить хромосомный полиморфизм, а также уточнить характер хромосомных перестроек, особенно при идентификации перичентрических инверсий.

Р-окрашивание хромосом. Рисунок при R-окрашивании противоположен рисунку G-окрашивания: R-положительные полосы соответствуют G-отрицательным, и наоборот, R-отрицательные сегменты соответствуют G-положительным. Интенсивность окраски всех хромосом при этом методе обычно значительно слабее, чем при G-окрашивании, поэтому исследователям рекомендуют проводить микроскопию под фазовым контрастом. При модификации этого метода можно добиться так называемой **Т-окраски**, когда более активно выделяются теломерные районы при интенсивном окрашивании по Романовскому-Гимзе. В настоящее время метод R-окрашивания довольно редко используется в клинической практике отдельных лабораторий для уточнения хромосомных аномалий в спорных случаях после G-окрашивания.

2. Этиология хромосомных болезней

В основе возникновения хромосомных болезней лежат геномные мутации, а также изменение структуры хромосом – хромосомные aberrации.

Геномные мутации – изменение числа хромосом в геноме.

Полипloidия – изменение числа хромосом, кратное гаплоидному и **гетеропloidия (анеупloidия)** – изменение числа хромосом, не кратное гаплоидному. У человека описано два вида полипloidий – трипloidия и тетрапloidия. Полипloidии у человека, как правило, несовместимы с жизнью и встречаются у абортусов и мертворожденных. В основе появления геномных мутаций лежит нарушение расхождения хромосом при делении клетки, главным образом, в мейозе.

Анеупloidия возникает при нерасхождении отдельных пар гомологичных хромосом в анафазе деления клетки или утрате отдельных хромосом, вследствие отставания одной хромосомы во время анафазы. Это происходит чаще во время мейоза при гаметогенезе, но может происходить и в митозе. При нарушении

расхождения хромосом в процессе мейоза могут возникать гаметы с лишними хромосомами и тогда при последующем слиянии с нормальными гаплоидными гаметами образуются зиготы $2n+1$, или трисомики по определенной хромосоме. Если в гамете оказалось меньше на одну хромосому, то последующее оплодотворение приведет к образованию зиготы $2n-1$, или моносомика по какой-либо хромосоме. У человека моносомики по всем аутосомам обладают летальным эффектом. Следует отметить, что у человека по неизвестным пока причинам акроцентрические хромосомы имеют тенденцию чаще вовлекаться в нерасхождение. Если нерасхождение происходит во время митоза, наблюдается мозаицизм (присутствие в организме двух и более клонов клеток) с наличием нормальных клеток, моно- и трисомиков.

Хромосомные мутации – изменение структуры хромосом. Различают внутривхромосомные и межхромосомные мутации.

Внутривхромосомные мутации – это делеции, дупликации, инверсии, инсерции.

Делеция (del) или нехватка – потеря участка хромосомы. У млекопитающих делеции в гомозиготном состоянии обычно летальны. *Примером делеции у человека* является наследственное заболевание *синдром «кошачьего крика»*. Больной гетерозиготен по делеции короткого плеча 5-ой хромосомы.

Цитологически делеции можно выявить по появлению петли при конъюгации гомологичных хромосом в мейозе. Петля содержит гены недефицированной (нормальной) хромосомы. Судьба делеции зависит от того, теряется ли центромерный район, без центромеры хромосома элиминируется.

Дупликация (dup) (повтор) – удвоение (умножение) одного и того же участка хромосомы. Дуплицированные участки часто расположены друг за другом и образуют тандем.

Цитологически дупликации можно обнаружить по появлению петли при конъюгации гомологичных хромосом в мейозе, петля несет дуплицированные гены.

Многие дупликации и делеции возникают в результате разрывов хромосом. Причиной разрывов может служить ионизирующая радиация, химические вещества, вирусы. Дупликации и делеции могут возникать при неравном кроссинговере. Дупликация небольших участков молекулы ДНК, состоящих из

нескольких нуклеотидов, происходит в процессе эволюции весьма часто. Например, показано, что гены глобинов человека гомологичны, то есть они произошли от общего предкового гена путем дупликации, но в процессе эволюции накопили различия и теперь кодируют несколько различные белки

Инверсия (inv) – поворот на 180° отдельных участков хромосомы. При этом число генов не меняется. У гетерозигот по инверсии при мейозе образуется петля, которая включает взаимно инвертированные участки. По отношению к центромере инверсии делят на *перичентрические*, захватывающие центромеру, и *парацентрические*, не включающие центромеру в инвертированный участок.

Инсерция (ins) (транспозиция) – вырезание фрагмента ДНК из одного участка хромосомы и вставка в другой участок. Регистрируется по изменению фенотипа. Считают, что инсерции, возможно, способствуют включению в геном новых, «чужих», генов, а также индуцируют хромосомные перестройки, в том числе делеции и инверсии.

Межхромосомная перестройка – транслокация (t). Различают *реципрокные* и *нереципрокные* транслокации.

Реципрокные транслокации – взаимный обмен участками между двумя негомологичными хромосомами. На цитологических препаратах у гетерозигот по реципрокным транслокациям в профазе мейоза можно наблюдать характерную фигуру – крест. Это обусловлено тем, что гомологичные участки, оказавшись в разных хромосомах, притягиваются. В диакинезе хиазмы сползают к концам и крест превращается в кольцо. Иногда хромосомы кольца перестраиваются и образуют фигуры типа восьмерки.

Реципрокная транслокация – это сбалансированная транслокация, которая, как и инверсия, она не вызывает аномальных эффектов у носителя. Однако в результате кроссинговера и редукции числа хромосом при образовании гамет у носителей сбалансированных транслокаций и инверсий могут образовываться несбалансированные гаметы, гаметы с частичной дисомией или с частичной нуллисомией, либо с той и другой аномалией.

Нереципрокная транслокация – односторонний перенос фрагмента одной хромосомы на другую.

Транслокация между двумя акроцентрическими хромосомами с потерей их коротких плеч приводит к образованию одной мета- или субметацентрической хромосомы вместо двух акроцентрических. Такие транслокации называются **робертсоновскими** (rob). Носители робертсоновских транслокаций здоровы, потому что потеря коротких плеч двух акроцентрических хромосом не приводит к реальной утрате генетического материала. Транслокационный синдром Дауна возникает именно таким образом. У носителей робертсоновских транслокаций может образовываться 6 типов гамет (рис. 7), но нуллисомные гаметы должны приводить к моносомии по аутосомам в зиготе, а такие зиготы не развиваются.

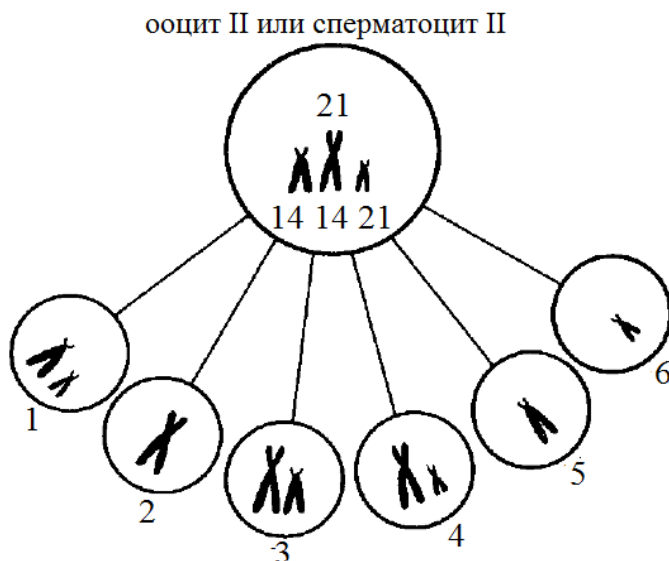


Рис. 7. Типы гамет у носителей робертсоновской транслокации 21/14. 1 – моносомия 14 и 21 (норма); 2 – моносомия 14 и 21 с робертсоновской транслокацией; 3 – дисомия 14 и моносомия 21; 4 – дисомия 21, моносомия 14; 5 – нуллисомия 21; 6 – нуллисомия 14

В случае концевых делеций в обоих плечах хромосомы возникает **кольцевая хромосома** (r). У индивида, унаследовавшего кольцевую хромосому от одного из родителей, будет частичная моносомия по двум концевым участкам хромосомы.

Иногда разрыв хромосомы проходит через центромеру. Каждое плечо, разъединенное после репликации, имеет две сестринские хроматиды, соединенные оставшейся частью центромеры. Сестринские хроматиды одного и того же плеча становятся плечами одной хромосомы (рис. 8). Со следующего митоза эта хромосома начинает реплицироваться и передаваться из клетки в клетку как самостоятельная единица наряду с остальным набором хромосом. Такие хромосомы называют **изохромосомами**. У них одинаковые по набору генов плечи. Наличие изохромосом вызывает хромосомную патологию, потому что это одновременно и частичная моносомия (по отсутствующему плечу), и частичная трисомия (по присутствующему плечу).

Недавно у человека обнаружено явление **однородительских дисомий**. У таких индивидов число хромосом по всем парам нормальное, но одна пара представлена хромосомами от одного родителя. В основе этого явления могут лежать несколько механизмов: нуллисомная по определенной хромосоме набора гамет сливается с дисомной по этой же хромосоме другой гаметой; у первоначально трисомного по какой-либо хромосоме зародыша (или даже в зиготе) теряется единственная хромосома, происходящая от одного из родителей, а две хромосомы от другого родителя сохраняются (редукция трисомии); у моносомной по какой-либо хромосоме зиготы при митозах в процессе дробления данная хромосома дублируется и воспроизводится в последующих делениях в двойном от одного родителя наборе (постзиготическая дупликация моносомии).

Схема записи численных и структурных аномалий хромосом. При описании **аномального кариотипа** используют дополнительные символы, указывающие тип и характер хромосомной перестройки.

- Триплоидный кариотип: 69, XXУ или 69, XXX.
- Трисомия по 21 хромосоме у мальчика: 47, XY, + 21.
- Моносомия по 13 хромосоме у девочки: 45, XX, – 13.
- Моносомия по X-хромосоме: 45, X0.
- Трисомия по X-хромосоме: 47, XXX.
- Полисомия по Y-хромосоме: 47, XYУ.

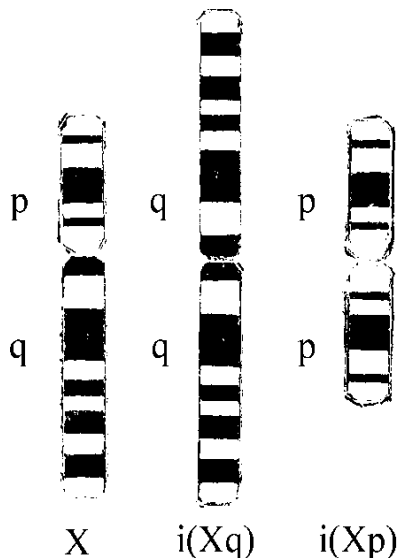


Рис. 8. Изохромосомы X по длинному [$i(Xq)$] и короткому [$i(Xp)$] плечу

При описании **структурных аномалий** указывают общее количество хромосом, затем набор половых хромосом, запятая, описание характера структурной перестройки, в скобках номер хромосомы – например, 46, XY, del(2), а при межхромосомных обменах – номера хромосом, вовлеченных в перестройку. Так, например, запись 46, XY, del(2)(2q 14.1) означает, что речь идет о разрыве в первом субсегменте (субполосе) четвертого сегмента (полосы) первого района (участка) длинного плеча второй хромосомы.

Появление **мозаицизма** обусловлено возникновением мутаций в зиготе, сформированной нормальными гаметам в процессе клеточного деления во внутриутробном периоде. При обнаружении мозаицизма обозначения кариотипов различных клеточных клонов разделяются косой чертой (/). Например, запись кариотипа mos45, X/47, XXX (50% / 50%) означает, что при цитогенетическом исследовании препарата обнаружены два клон клеток – один с моносомией по X-хромосоме, а другой с трисомией по X-хромосоме, в соотношении 1:1.

3. Хромосомные болезни

Хромосомные болезни – большая группа врожденных наследственных болезней, клинически характеризующиеся множественными врожденными пороками развития. В основе их лежат *геномные или хромосомные мутации*.

3.1. Общие закономерности клинических проявлений хромосомных синдромов

- Недостаток хромосомного материала приводит к более выраженным клиническим проявлениям, чем его избыток.

- Частичные моносомии (*делеции*) сопровождаются более тяжелыми клиническими проявлениями, чем частичные трисомии (*дупликация*), что обусловлено потерей ряда генов. Чаше обнаруживаются у абортусов и мертворожденных, поскольку часто затрагиваются гены, необходимые для роста и дифференцировки клеток.

- К гибели эмбриона на ранней стадии развития приводят полные моносомии по аутосомам, а также трисомии по 1, 5, 6, 11 и 19 хромосомам. Среди новорожденных наиболее часто встречаются трисомии по 13, 18 и 21 хромосомам.

- Для большинства хромосомных синдромов, обусловленных аномалиями аутосом, характерны *малый вес ребенка при доношенной беременности, пороки развития двух и более органов и систем, а также задержка темпов раннего психомоторного развития, олигофрения и снижение показателей физического развития ребенка*. У детей с хромосомной патологией часто выявляют увеличение количества, так называемых, *стигм* дизэмбриогенеза или малых аномалий развития. В случае наличия пяти и более таких стигм говорят о повышении порога стигматизации у человека. К стигмам можно отнести наличие сандалевидной щели между первым и вторым пальцами на ногах, диастему (увеличение расстояния между передними резцами), расщепление кончика носа и другие.

- При дисбалансе *половых хромосом, в противоположность аутосомным синдромам*, не характерно наличие выраженного интеллектуально дефицита, некоторые больные имеют нормальное умственное развитие.

- У большинства больных с аномалиями половых хромосом возникает бесплодие и невынашивание беременности. Необходимо отметить, что бесплодие и невынашивание беременности при ано-

маниях половых хромосом и аутосом имеет различные причины. При аномалиях аутосом прерывание беременности часто обусловлено наличием хромосомных перестроек, несовместимых с нормальным эмбриональным развитием, или элиминацией несбалансированных по хромосомному материалу зигот, эмбрионов и плодов. При дисбалансе половых хромосом в большинстве случаев наступление беременности невозможно по причине аномалии сперматозоидов или аплазии, или резкой гипоплазии как наружных, так и внутренних половых органов. В целом, аномалии половых хромосом приводят к возникновению менее выраженных клинических симптомов, чем аномалии аутосом.

– Полные формы хромосомных аномалий характеризуются более тяжелыми клиническими проявлениями, чем мозаичные.

Наиболее частые геномные мутации у живорожденных – это трисомии по 13, 18 и 21 аутосомам и половым хромосомам, частичные трисомии по 8, 9 хромосомам и моносомия по X-хромосоме.

3.2. Показания к исследованию кариотипа

Учитывая все клинико-генетические данные больных с хромосомными синдромами, показания к исследованию кариотипа у детей и взрослых следующие:

- Малый вес новорожденного при доношенной беременности.
- Врожденные пороки развития двух и более органов и систем.
- Врожденные пороки развития двух и более органов и систем в сочетании с олигофренией.
- Недифференцированная олигофрения.
- Бесплодие и привычное невынашивание беременности.
- Наличие сбалансированной хромосомной перестройки у родителей или сибсов пробандов.

3.3. Характеристика некоторых хромосомных болезней

3.3.1. Полиплоидия

Полиплоидией называется наличие в кариотипе клетки одного или нескольких добавочных гаплоидных наборов хромосом (у человека гаплоидный набор включает 23 хромосомы). Например, при триплоидии клетка имеет 69 хромосом. Эта аномалия иногда выявляется при самопроизвольных абортах и очень редко – у живых новорожденных.

У ребенка с такой патологией наблюдаются тяжелые отклонения в развитии, включая отставание в росте, сращение третьего и четвертого пальцев, у него несоразмерно большая голова по сравнению с туловищем, низко посаженные уши, врожденные пороки сердца. Дети обычно умирают вскоре после рождения. Продолжительность жизни таких детей в среднем равна 9 дням. Некоторые мозаики мужчины выживают. Они характеризуются глубокой умственной отсталостью, в сочетании с аномалиями гениталий, асимметрией.

Считают, что причиной появления полиплоидов у человека является *диандрия* (двойное оплодотворение) или *отсутствие первого мейотического деления ооцита*. У матерей детей с полиплоидией во 2-й половине беременности наблюдают токсикоз и многоводие.

3.3.2. Анеуплоидии

Нозологическое выделение по меньшей мере трех хромосомных болезней как клинических синдромов было сделано еще до выяснения их хромосомной природы. Это синдром Дауна (описан в 1866 г. английским педиатром Л. Дауном), синдром Шерешевского–Тёрнера (первое описание X0 синдрома было сделано русским клиницистом Н. А. Шерешевским в 1925 г., а в 1938 г. Г. Тёрнер также описал этот синдром). В 1942 г. Г. Клайнфельтер описал аномалии половых хромосом у мужчин (трисомия XXУ) как клинический синдром. Эти три заболевания стали объектом первых клинико-цитогенетических исследований, проведенных в 1959 г. Расшифровка этиологии синдромов Дауна, Шерешевского–Тёрнера, Клайнфельтера открыла новую главу в медицине – хромосомные болезни.

Различают *аутосомные и гоносомные анеуплоидии*

Аутосомные синдромы разделяют на **три группы**: полные трисомии, частичные анеуплоидии и микроцитогенетические аномалии.

Трисомии

Аутосомные трисомии среди живорожденных описаны лишь для 8, 9, 13, 18, 21 и 22 хромосом, по остальным хромосомам они летальны. Из них наиболее частым и клинически значимым является синдром Дауна (трисомия 21). С меньшими частотами встречаются синдромы Эдвардса (трисомия 18) и Патау (трисомия 13), причем продолжительность жизни больных

с синдромами Эдвардса и Патау, обычно, не превышает года. Остальные аутосомные трисомии являются еще более редкими, и их носители погибают в раннем неонатальном возрасте.

Синдром Дауна (СД). Трисомия 21. СД – наиболее частое хромосомное заболевание человека. Его частота среди новорожденных 1–2/1000 новорожденных. Эта болезнь впервые описана английским врачом Дауном в 1866 г. как своеобразная форма олигофрении, резкое снижение интеллекта, сочетающееся с характерным внешним видом. В 1959 г. французский ученый И. Лежен обнаружил в кариотипе больных лишнюю 21-ю хромосому.

Таким образом, в 94 % случаев болезнь Дауна обусловлена трисомией по 21-й хромосоме.

В дальнейшем было показано, что в 4 % случаев болезнь Дауна может быть обусловлена не только трисомией 21, но и транслокацией 21-й хромосомы на другие (чаще на 13, 14, 15, 21, 22 хромосомы).

В 2 % случаев наблюдается мозаицизм, когда половина клеток имеет кариотип 46 хромосом, другая половина – 47 хромосом. При синдроме Дауна, вызванном мозаицизмом, симптомы заболевания выражены менее резко.

Молекулярно-генетический анализ показал, что за развитие характерного фенотипа отвечает дистальный район длинного плеча хромосомы 21, а именно сегмент 21q 22. Предполагают, что ключевая роль в возникновении умственной отсталости при синдроме Дауна принадлежит увеличению дозы гена фермента супероксиддисмутазы, ген локализован в области 21q 22.3. Наиболее часто (примерно в 80 % случаев) нерасхождение хромосом происходит во время первого мейотического деления, причем, в 2/3 случаев в женских половых клетках.

Больные СД имеют некоторые общие морфологические черты. Они больше похожи один на другого, чем на своих родителей. У них круглая голова с уплощенным затылком, скошенным узким лбом, плоским лицом, косым, монголоидным разрезом глаз, толстыми губами, широким уплощенным языком с глубокой продольной бороздой. Ушные раковины уменьшены в вертикальном направлении с приросшей мочкой. Отмечается

неправильный рост зубов, высокое нёбо, низкий рост, румянец на щеках, низкая граница роста волос на шее.

Отмечаются изменения со стороны внутренних органов, особенно сердца (53 %), пищеварительного канала (15 %). Часто встречаются комбинированные пороки развития различных органов и систем, врожденные уродства.

У маленьких детей резко выражена гипотония, из-за чего в лежачем положении живот принимает форму «лягушачьего». Характерное изменение конечностей: укорочение и расширение кистей, стоп (акромикрия). На ладони – одна поперечная борозда (четырепальцевая).

В радужной оболочке глаз отмечаются белые очаги (пятна Брушфильда), которые с возрастом становятся менее заметными.

Наблюдается глубокая умственная отсталость – от имбецильности (IQ 21–51 балл) до идиотии (IQ 0–20 баллов). При синдроме Дауна коэффициент интеллекта колеблется в границах 20–60 баллов, средние значения – 40–50 баллов. Они послушны, повышенно внушаемы.

Многих больных можно научить читать и писать, у них плохо развита способность к подражанию. Хорошая память на людей, музыку, ситуации. Отсутствуют малейшие попытки к абстрагированию.

При исследовании мозга погибших отмечают его недоразвитость, плохую выраженность борозд и извилин. Желудочки мозга часто недоразвиты, полости их уменьшены. Нервные клетки недостаточно дифференцированы. Нарушены процессы миелинизации головного и спинного мозга.

В целом, продолжительность жизни больных сокращена. Примерно 31 % больных умирает в конце первого года жизни, 46 % – в конце третьего года. Считают, однако, что крайние значения продолжительности жизни для них не будут большими, они редко доживают до 40-летнего возраста. Предполагается, что больные с синдромом Дауна стареют быстрее, чем нормальные люди. Смерть часто наступает от сердечной недостаточности, инфекций, а в ряде случаев – от онкологических заболеваний, прежде всего, лейкемии.

В большинстве случаев в семье регистрируется только один больной, в очень небольшом числе семей наблюдаются повторные случаи рождения детей с болезнью Дауна. Кариотип роди-

телей ребенка с синдромом Дауна, как правило, нормальный. Медицинские аборт и предшествующие беременности, не влияют на частоту рождения больных.

При болезни Дауна, вызванной транслокацией, у одного из родителей обычно отмечается транслокация 21 хромосомы на одну из хромосом группы D (13, 14, 15) или на 22 хромосому. При этом риск рождения больных детей в данной семье может достигать 33 %. При болезни Дауна, обусловленной мозаицизмом, последний может быть обнаружен у одного из родителей, но мозаицизм может возникнуть и на ранних стадиях дробления зигот.

Установлено, что частота синдрома увеличивается с возрастом матери. Эмпирический риск рождения больного ребенка в 19 лет – 1 : 1640; 40 – 41 год – 1 : 84; после 45 лет – 1 : 31.

В последние годы показано, что нерасхождение хромосом может происходить и при сперматогенезе в 20–25 % случаев). Особенно большой риск рождения ребенка с болезнью Дауна в семьях, где отцу больше 50 лет, а матери 40.

Диагностика заболевания осуществляется на основании клинического осмотра и анализа кариотипа больного. При обнаружении транслокационной формы заболевания необходимо медико-генетическое консультирование семьи.

Профилактика заболевания осуществляется на основании дородовой диагностики, основанной на ультразвуковом и цитогенетическом обследовании плода. Такое обследование необходимо проводить в двух случаях: если беременная женщина старше 35 лет и если у одного из родителей больного выявлена транслокация с вовлечением 21 хромосомы.

Синдром Патау (СП). Частота встречаемости – 1:4000–6000 новорожденных. Цитогенетически различают три формы: трисомная (75 %), транслокационная (20 %) и мозаичная.

В 1961 г. К. Патау описал трисомию по 13-й хромосоме. Для СП характерны множественные врожденные пороки развития головного мозга и лица. Это патогенетическая единая группа ранних и, следовательно, тяжелых нарушений формирования головного мозга, глазных яблок, костей мозговой и лицевой частей черепа. Окружность черепа обычно уменьшена. Лоб скошенный, низкий; глазные щели узкие, переносье запавшее, ушные раковины низко расположенные и деформированные. Типичный

признак СП – это расщелины верхней губы и неба (обычно двухсторонние). Отмечаются также поли- и синдактилия кистей и/или стоп, пороки развития почек, половых органов и кишечника. Дети погибают в первые 3 месяца после рождения (~ 70 %), 95 % погибают в возрасте до года, чаще погибают до рождения. Это подтверждается при исследовании кариотипа при спонтанных абортах. Причина смерти – сердечная недостаточность, нарушение дыхания, пневмония.

Синдром Эдвардса – трисомия по 18 хромосоме. Описана Дж. Эдвардсом в 1960 г. 1:3000–7000 новорожденных. Чаще бывает у мальчиков. Характерны множественные врожденные пороки развития. Как и при синдроме Патау, у детей наблюдаются большие изменения со стороны черепа и скелета. Такие дети обычно рождаются переносимыми, в асфиксии, с долихоцефалией, расщеплением неба и др. Отмечается деформация пальцев рук с характерным расположением пальцев (второй палец перекрывает третий, а пятый – четвертый), уплощение свода стопы (из-за чего стопа имеет форму качалки), пальцы ног и рук укорочены. Кожа очень подвижна, образует складки. Выражены дефекты внутренних органов (сердца, пищеварительного канала). Мальчики погибают вскоре после рождения, девочки живут до года.

В последние годы описаны трисомии по 3, 8, 9, 10, 14, 16, 20, 22 хромосомам. Описаны у спонтанных абортусов. Как и следовало ожидать, эти весьма редкие хромосомные аномалии вызывают тяжелые и комплексные пороки развития. Открытие 8, 9, 22 синдромов связано с освоением дифференциальной окраски хромосом.

3.4. Гоносомные синдромы

Гоносомные синдромы обусловлены изменением количества половых хромосом.

Между X-хромосомными и аутосомными анеуплоидиями отмечены серьезные различия. При X-хромосомных анеуплоидиях умственное развитие в среднем хотя и ниже нормы, но аномалии развития мозга выражены не столь отчетливо, как при аномалиях аутосом. Многие пробанды имеют нормальное умственное развитие. Фенотипические нарушения затрагивают в большей степени развитие половых органов и гормонозависи-

мый рост. Наблюдаются и другие пороки развития, особенно при синдроме Тернера, но встречаются они реже и по масштабам менее тяжелые.

Объяснение, по-видимому, состоит в том, что в норме женщина имеет две, а мужчина только одну X-хромосому, в связи с чем в эволюции сформировался механизм компенсации различий в дозе генов, сцепленных с X-хромосомой. Этот механизм оказался фактором, благоприятствующим носителям X-хромосомных анеуплоидий.

3.4.1. Синдромы с мужским фенотипом – это синдром полисомии по X-хромосоме и синдром полисомии по Y-хромосоме.

Синдромы полисомии по X-хромосоме объединены общим названием – *синдром Клайнфельтера*, который включает следующие цитогенетические варианты:

- кариотип: 47, XXУ – «классическая форма»; составляет 80 % случаев синдрома; частота в популяции – 1:500–700 мужчин;

- на оставшиеся 20 % случаев приходятся кариотипы: 48, XXXУ (встречается крайне редко – 1:2500 мужчин); 49, XXXХУ – глубокая умственная отсталость, сильное недоразвитие половых органов и другие пороки развития. Встречается очень редко (1:25 тыс. мужчин));

- варианты мозаичной формы синдрома: а) 46, ХУ / 47, XXУ; б) 45, ХО / 46, ХУ / 47, XXУ; в) 46, ХУ / 46, ХХ / 47, XXУ.

Фенотип включает триаду признаков: гинекомастия, атрофия или гипоплазия тестикул и бесплодие.

Вышеназванный синдром описан Клайнфельтером в 1924 г. как синдром первичного мужского гипогонадизма (кариотип 47, XXУ). В клетках букального эпителия обнаружен половой хроматин, как у нормальных женщин. До достижения половой зрелости синдром может быть не обнаружен. При половом созревании отмечают признаки евнухоидности. У больных недоразвиты половые железы при хорошем развитии полового члена, отсутствует растительность на лице, выражена гинекомастия, отложение жира на бедрах по женскому типу. Больные обычно высокого роста за счет удлинённых конечностей, рост волос на лобке по женскому типу, высокий голос.

При гистологических исследованиях отмечена склеротизация семенных канальцев и другие отклонения. *Бесплодны* из-за отсутствия сперматогенеза.

Дебильность выражена в разной степени. Чем больше X-хромосом в кариотипе, тем больше выражены симптомы заболевания и степень дебильности.

Такие дети обычно рождаются у пожилых матерей с нормальным кариотипом. Больные не оставляют потомства.

Синдром полисомии по Y. Выделяют следующие цитогенетические варианты данного синдрома: 47, XY_Y (частота – 1:1000); 48, XXYY; 49, XYYYY_Y (редкие).

Кариотип 47, XY_Y (дисомия по Y). Описан как у фенотипически здоровых мужчин, так и у мужчин с гипогонадизмом, крипторхизмом, умственной отсталостью и развитой мускулатурой. Несбалансированность по половым хромосомам приводит к особенностям развития нервной системы, снижению интеллекта, что может явиться причиной агрессивности и криминальных поступков.

Степень умственной отсталости увеличивается с числом Y-хромосом.

В качестве экспресс-метода диагностики дополнительной Y-хромосомы исследуют буккальный соскоб с помощью люминесцентной микроскопии. Обнаружение двойного Y-хроматина говорит о лишней Y-хромосоме.

3.4.2. Синдромы с женским фенотипом

Синдром полисомии по X-хромосоме, или синдром трипло-Х (кариотип: 47, XXX), встречается с частотой 1:770 у новорожденных девочек. Он протекает бессимптомно в раннем детском возрасте и трудно выявляется (в основном при массовом обследовании новорожденных).

В подростковом возрасте у девочек иногда наблюдаются нарушение менструального цикла, умеренная умственная отсталость. Фенотипических изменений может и не быть, поскольку две X-хромосомы спирализованы и представляют собой половой хроматин. Могут иметь здоровое потомство.

Описаны синдромы полисомии, включающие от 7 до 12 X-хромосом (48, XXXX – физически нормальные, редкий; 49, XXXXX – тяжелая умственная отсталость, редкий). При этом наблюдается прямая связь числа хромосом с тяжестью клинических проявлений. Чем больше X-хромосом в кариотипе,

тем больше выражен дефект умственного развития, а также изменения фенотипа и половой инфантилизм. При кариотипе 48, XXXX дети маложизнеспособны и рано умирают.

Синдром полной моносомии по X-хромосоме. Синдром Шерешевского–Тернера. Кариотип 45, X0; 1:1400 новорожденных девочек.

Н. А. Шерешевский (1925 г.); Х. Х. Тернер (1938 г.); Г. К. Форд (1959 г.) установили, что у этих больных имеется только одна X-хромосома.

Цитогенетически выделяют 6 вариантов синдрома:

- кариотип: 45, X0 – «классический вариант» (55 % всех случаев);

- мозаики: 45, X0/46, XX; 45, X0/47, XXX; 45, X0/46, XX/47, XXX (10 %);

- изохромосома: 45, X0, iso(X) – 20 %;

- делеция: 45, X0, del (X) – 5 %;

- кольцевая хромосома: 45, X0, r(X) – 5 %;

- другие варианты или кариотипы: 46, XY; 46, X0/XY; 46, X0/XYY.

В последнем случае изменена именно Y-хромосома, в которой в результате мутации утрачен ген SRY (Sex-determining Region Y).

Низкий рост, аномалии половых органов, недоразвиты матка и яичники, половой инфантилизм. Месячных не бывает или они однократны. Грудные железы отсутствуют, на их месте иногда определяются складки жира. Ушные раковины деформированы, располагаются низко, шея короткая, по ее бокам отмечается широкая кожная складка. Отмечаются изменения со стороны внутренних органов. Рост прекращается в 15–18 лет. Интеллект нарушен мало или вообще не страдает. Резко снижено выделение эстрогенов, повышена экскреция гонадотропина.

При рождении не всегда возможно установить правильный диагноз. Часто рождаются недоношенными с малым ростом. Обычно диагноз устанавливается позже, когда наблюдается отставание девочки в росте и половой инфантилизм. Важнейшим для диагностики является исследование полового хроматина. Если его не обнаруживают, то это свидетельствует о моносомии по X-хромосоме. При мозаицизме 46, XX/45, X0 могут быть матерями.

Возраст родителей роли не играет. Но чаще рождаются у родителей низкого роста с нормальным кариотипом. «Винновыми» могут быть как мать, так и отец. Причиной могут быть инфекционные болезни во время беременности, например, краснуха.

3.5. Синдромы, связанные со структурными аномалиями аутосом

Синдром «кошачьего крика». Частота синдрома – 1:40000–50000.

Среди детей с задержкой умственного развития – 1:350. Описал Лежен в 1963 г. Этот делеционный синдром обусловлен делецией короткого плеча хромосомы 5 (del 5 p–). Другими словами – это частичная моносомия по короткому плечу хромосомы 5(del 5–).

Цитогенетически в большинстве случаев выявляется делеция с утратой от 1/3 до 1/2 длины короткого плеча хромосомы 5. Потеря всего короткого плеча или, наоборот, незначительного участка встречается редко. Для развития клинической картины синдрома 5p– имеет значение не величина утраченного участка, а конкретный фрагмент хромосомы. За развитие полного синдрома ответствен лишь незначительный участок в коротком плече хромосомы 5 (5p15.1-15.2). Помимо простой делеции, при этом синдроме обнаружены и другие цитогенетические варианты: кольцевая хромосома 5 (с делецией соответствующего участка короткого плеча); мозаицизм по делеции; реципрокная транслокация короткого плеча хромосомы 5 (с потерей критического участка) с другой хромосомой.

Клиническая картина синдрома 5p–. Кроме обычных признаков аутосомных заболеваний (общее отставание в развитии, низкий вес, уродства развития, микроцефалия, короткая шея, четырехпалость, сердечно-сосудистые нарушения), у этих детей имеются те или иные изменения мозговой части черепа и лица: лунообразное лицо, микроцефалия, гипертелоризм, микрогения, эпикант, антимонголоидный разрез глаз, высокое нёбо, плоская спинка носа. Ушные раковины деформированы и расположены низко.

Клиническая картина синдрома 5p– довольно сильно различается у отдельных больных по сочетанию врожденных пороков развития органов. Наиболее характерный признак– «кошачий

крик» – обусловлен изменением гортани (сужение, мягкость хрящей, уменьшение надгортанника, необычная складчатость слизистой оболочки). Вследствие аномалии развития гортани их плач напоминает мяуканье кошки.

Выраженность отдельных признаков и клинической картины в целом меняется с возрастом. Так, «кошачий крик», мышечная гипотония, лунообразное лицо с возрастом исчезают почти полностью, а микроцефалия выявляется более отчетливо, становятся заметнее психомоторное недоразвитие, косоглазие.

Продолжительность жизни больных с синдромом 5p– зависит от тяжести врожденных пороков внутренних органов (особенно сердца), выраженности клинической картины в целом, уровня медицинской помощи и повседневной жизни. Большинство больных умирают в первые годы, около 10 % больных достигают 10-летнего возраста. Имеются единичные описания больных в возрасте 50 лет и старше.

Во всех случаях больным и их родителям показано цитогенетическое обследование.

Таким образом, в результате изучения хромосом человека и хромосомных болезней в современной медицине сложилось учение о хромосомной патологии. Данное направление в медицине включает не только хромосомные болезни, но и патологию внутриутробного периода (спонтанные аборты, выкидыши), а также соматическую патологию (лейкозы, лучевая болезнь). Число описанных типов хромосомных аномалий приближается к 1000, из них более 100 форм имеют клинически очерченную картину и называются синдромами.

3.6. Цитогенетические методы лабораторной диагностики наследственных заболеваний человека

Цитогенетические методы наследственной патологии человека применяются на втором этапе диагностики. Наиболее распространенным методом цитогенетической диагностики является метод метафазного анализа хромосом, который позволяет провести кариотипирование и цитогенетический анализ хромосомного набора пробанда, его больных и здоровых родственников.

В начале 80-х годов большое распространение получил более информативный метод – анализ прометафазных хромосом. Прометафазный метод выявил существование микрохромосомных мута-

ций: микроделений, микродупликаций, парацентрических инверсий, лежащих в основе ряда наследственных болезней.

Анализ кариотипа проводят в культуре делящихся соматических клеток. Наиболее часто используют культуру клеток периферической крови, прежде всего лимфоцитов, костного мозга и фибробластов. Для анализа кариотипа плода используют различные клеточные культуры; их выбор определяется сроком беременности (до 12 недель – используют клетки ворсин хориона, в более поздние сроки – клетки плода, выделенные из амниотической жидкости, пуповинной крови и плаценты).

Цитогенетический анализ включает три основных этапа: культивирование клеток; окраска препарата; микроскопический анализ препарата.

Культивирование. Образец помещают в питательную солевую среду с добавлением цельной сыворотки крупного рогатого скота и белка бобовых растений – фитогемагглютинаина, стимулирующего процесс деления клеток. Для увеличения числа метафазных клеток (кариотип изучают в метафазных клетках, где хромосомы достигают наибольшей спирализации и наиболее четко проявляется их форма) за 1,5 часа до окончания культивирования в культуру вводят колхицин ($C_{22}H_{25}NO_6$), который разрушает клеточное веретено, приостанавливает деление клеток на стадии метафазы и увеличивает конденсацию (спирализацию) хромосом. Обычно культивирование составляет 72 часа. После этого клетки отделяют центрифугированием и помещением в гипотонический раствор хлорида калия или цитрата натрия. В гипотонической среде происходит разрыв ядерной оболочки и межхромосомных связей и хромосомы свободно перемещаются в цитоплазму. Затем производится фиксация клеток в фиксаторе Карнуа (3:1): 3 части составляет 96 % этиловый спирт ректификат, 1 часть – ледяная уксусная кислота.

После фиксации клеточную суспензию раскапывают на обезжиренные, охлажденные влажные предметные стекла и высушивают на воздухе.

Окраска. Наиболее простой метод окраски хромосом – это сплошная окраска по Гимза. Сплошная окраска применяется для определения количества хромосом, выявления геномных мутаций и анеуплоидии.

Для выявления структурной перестройки хромосом (хромосомные мутации) используют дифференциальную окраску, в результате которой хромосомы приобретают поперечную исчерченность. Расположение и длина темных и светлых полос строго индивидуальна для каждой хромосомы, благодаря этому можно провести более точную идентификацию гомологичных пар и выявить перестройки хромосом.

Наиболее эффективен G-метод дифференциального окрашивания. Для этого можно использовать краситель Гимзы после предварительной обработки хромосом раствором трипсина. При таком окрашивании количество полос на хромосомах в метафазных пластинках достигает 400. Для дифокраски используют также R-метод, и Q-метод. После окраски объект заключают в Канадский бальзам, препарат становится постоянным и может храниться десятки лет.

Практические задания и указания по их выполнению

Задание 1. Денверская классификация хромосом человека.

Цель работы: углубить и закрепить знания классификации хромосом человека.

Оборудование, приборы и материалы: рисунки, схемы и описание Денверской классификации хромосом человека.

Проведение работы: описать в виде таблицы Денверскую классификацию хромосом.

Группа	Номер пары хромосом	Центромерный индекс	Размеры и форма хромосом
А	1	0,48–0,49	Самые крупные, метацентрики
	2	0,38–0,40	Самые крупные, субметацентрики
	3	0,45–0,46	Самые крупные, метацентрики
В	4,5	0,24–0,30	Крупные, субметацентрики
С	6–12 Х-хромосома	0,27–0,43	Среднего размера, метацентрики и субметацентрики. Группа включает 7 пар аутосом и Х-хромосому
Д	13, 14, 15	до 0,15	Среднего размера, акроцентрики, характерна межиндивидуальная вариабельность и наличие спутников на коротких плечах
Е	16–18	0,26–0,40	Относительно короткие метацентрики и субметацентрики
F	19,20	0,36–0,46	Небольшие метацентрики
G	21,22 Y-хромосома	0,13–0,33	Небольшие акроцентрики. Для аутосом характерно наличие спутников на коротких плечах

Задание 2. Изучение препарата хромосом нормального кариотипа человека.

Цель работы: изучить морфологию хромосом человека, освоить методику подсчета хромосом в клетках крови человека.

Оборудование, приборы и материалы: окрашенные препараты культивируемых лимфоцитов периферической крови человека; микроскоп; таблицы – схема строения хромосом и хромосомный набор человека.

Проведение работы:

1. С помощью микроскопа изучите готовый окрашенный препарат лимфоцитов периферической крови. При малом увеличении микроскопа найдите интенсивно окрашенные метафазные хромосомы (метафазную пластинку).

2. Используя иммерсионное увеличение микроскопа, рассмотрите и изучите хромосомный набор отдельной клетки, находящейся в метафазе. Подсчитайте число хромосом, обратите внимание на морфологическое разнообразие хромосом кариотипа человека.

Отметьте, что каждая хромосома состоит из двух хроматид, соединенных между собой в области их центромеры.

3. Найдите и зарисуйте в тетрадь по паре хромосом, характеризующихся определенным морфологическим типом, –метacentрические, субметacentрические и акроцентрические. На рисунке укажите морфологический тип хромосомы и обозначьте центромеру.

Задание 3. Составление кариограммы нормального хромосомного набора человека по фотографиям (фотокопиям) метафазных пластинок.

Цель работы: получить представление о классификации хромосом человека в процессе составления кариограммы нормального кариотипа в соответствии с Денверской классификацией хромосом.

Оборудование, приборы и материалы: фотографии хромосом нормального кариотипа человека, пинцеты, измерители, линейки, схема Денверской классификации хромосом.

Проведение работы:

Составить кариограмму человека с использованием фотокопий хромосомного набора на бумаге. При выполнении работы следует иметь в виду, что идентификация отдельных хромосом кариотипа человека в процессе его микроскопического изучения связана со значительными трудностями, некоторые пары хромосом при рутинном окрашивании весьма сходны по морфологии и размеру. Поэтому в практике цитогенетического анализа обычно прибегают к фотографированию метафазных пластинок в препаратах клеток, делящихся митозом. В дальнейшем, получив фотокопию хромосомного набора (на бумаге), вырезают изображения отдельных хромосом с помощью ножниц, анализируют и попарно раскладывают на чистом листе бумаги в соответствии с общепринятой классификацией, то есть составляют кариограмму исследуемого индивида.

Для составления кариограммы выполните следующую работу:

- получите фотографию метафазной пластинки хромосом человека на бумаге;

- с помощью ножниц аккуратно вырежьте каждую хромосому кариотипа;

– дифференцируйте отдельные хромосомы попарно, определяя их общие размеры, размеры каждого плеча и центромерный индекс;

– разложите хромосомы на листе бумаги в соответствии с принятой классификацией, приклейте и пронумеруйте хромосомы и подпишите полученную кариограмму, указав пол индивидуума.

Задание 4. Дифференциальное окрашивание хромосом человека.

Цель работы: ознакомиться с наиболее распространенными способами дифференциального окрашивания хромосом и возможностями их практического использования в диагностике хромосомной патологии человека.

Оборудование, приборы и материалы: фотографии хромосом человека, окрашенных с помощью G-окраски, пинцеты, измерители, линейки, схема Парижской классификации хромосом.

Проведение работы:

1. Ознакомьтесь с методикой и техникой G-окраски хромосом.
2. Рассмотрите и проанализируйте готовые фотокопии дифференциально окрашенных хромосом с использованием G-окраски.

3. Составьте кариограмму хромосом человека. Получите фотографию G-окрашенных хромосом человека на бумаге; с помощью ножниц аккуратно вырежьте каждую хромосому кариотипа; дифференцируйте хромосомы попарно на основе их размеров, морфологии и особенной поперечной исчерченности, полученной в результате дифференциальной окраски.

4. Разложите хромосомы на листе бумаги в соответствии с принятой классификацией, приклейте, пронумеруйте хромосомы и подпишите полученную кариограмму, указав пол индивидуума.

Задание 5. Составление и анализ кариограмм индивидуумов с различными хромосомными болезнями.

Цель работы: научиться составлять и анализировать фотокардиограммы больных с хромосомной патологией.

Оборудование, приборы и материалы: микрофотографии дифференциально окрашенных хромосом индивидуумов с различными трисомиями и моносомиями; фотоизображения карио-

грамм больных с разными хромосомными нарушениями (анеуплоидиями, хромосомными абберациями); линейки, измерители; таблицы – кариотип человека, геномные и хромосомные мутации.

Проведение работы:

1. По аналогии с заданием 3, составьте кариограммы людей с различными трисомиями (синдромы Дауна, Патау, Эдвардса, Шерешевского–Тернера, Клайнфельтера и др), используя фотокопии соответствующих хромосомных наборов на бумаге. Вырежьте хромосомы и распределите их в соответствии с Парижской классификацией. Проанализируйте кариотип, определите характер мутации, которая привела к развитию болезни.

2. Рассмотрите и проанализируйте фотокопии кариограмм индивидуумов с разными хромосомными нарушениями (геномными и хромосомными мутациями). Сделайте вывод о возможности развития соответствующего заболевания в каждом конкретном случае.

3. Сравните кариограммы больных с синдромом Дауна, обусловленным простой трисомией 21, и с транслокационной формой этого синдрома.

4. Рассчитайте вероятность повторного рождения больного с синдромом Дауна в семье, в которой у одного из родителей 21 хромосома транслоцирована на 13.

Задание 6. Изучение препаратов хромосом человека с различными структурными мутациями.

Цель работы: ознакомиться с методикой исследования хромосом человека с различными структурными абберациями.

Оборудование, приборы и материалы: микроскопы, готовые окрашенные препараты хромосом лимфоцитов периферической крови человека, иммерсионное масло; таблицы – кариотип человека, хромосомные мутации.

Проведение работы:

1. Изучите готовые окрашенные препараты, полученные после облучения культивируемых лимфоцитов человека различными дозами ионизирующего облучения. Анализ проводите на иммерсионном увеличении микроскопа.

2. Рассмотрите хромосомные наборы отдельных клеток, найдите и зарисуйте в тетрадь хромосомы с различными типами

аббераций, возникших под воздействием мутагенного фактора (хромосомы с делециями отдельных фрагментов, кольцевые хромосомы, фрагментированные хромосомы и др.)

Задание 7. Определение полового хроматина в клетках здоровых людей

Цель работы: научиться выявлять половой хроматин в клетках слизистой оболочки ротовой полости человека.

Оборудование, приборы и материалы: предметные и покровные стекла, стерильные шпатели, бюксы с раствором красителя (ацетоорсеина), пипетки, микроскопы с иммерсионными объективами, иммерсионное масло.

Проведение работы:

Половой хроматин (тельце Барра) является продуктом гетерохроматинизации одной из двух X-хромосом нормальных соматических клеток организма женщины. Выявляется в ядрах интерфазных клеток. Количественный учет телец Барра используется в цитогенетической диагностике пола индивидуума и различных аномалий, связанных с изменением нормального числа X-хромосом в кариотипе. При выполнении работы следует иметь в виду, что при анализе женского кариотипа (46, XX) тельце полового хроматина обычно выявляется в ядрах 20–70 % нормальных клеток эпителия слизистой оболочки рта, тогда как у лиц с нормальным мужским кариотипом (46, XY) оно обнаруживается очень редко (у менее 5 % исследованных клеток). Однако в патологических случаях (при изменении числа X-хромосом в кариотипе обследуемого) картина может существенно меняться: в случае трисомии X в соматических клетках женщины выявляется два тельца Барра, при синдроме Шерешевского – Тернера в женских клетках тельце Барра не обнаруживается, регистрируется половой хроматин у мужчин с синдромом Клайнфельтера.

Определение полового хроматина в клетках слизистой оболочки ротовой полости здоровых людей.

1. Приготовьте временный препарат клеток слизистой оболочки ротовой полости. Для этого вначале с помощью стерильной марлевой салфетки тщательно протрите участок слизистой оболочки щеки в целях удаления слоя слущивающегося поверхностного эпителия. Затем шпателем с тонким загнутым концом

сделайте соскоб слоя эпителия слизистой щеки. Полученный материал поместите в виде мазка на поверхность сухого обезжиренного предметного стекла. Нанесите на мазок каплю красителя и накройте препарат покровным стеклом.

2. Изучите приготовленный препарат при малом увеличении микроскопа для обнаружения эпителиальных клеток (клетки имеют крупные ядра, слабо окрашивающиеся ацеторсеином).

3. Используя иммерсионное увеличение микроскопа, проведите исследование отдельных клеток в препарате на наличие (отсутствие) в них полового хроматина, который в виде интенсивно окрашивающихся глыбок локализуется под ядерной оболочкой.

4. Подсчитайте число телец полового хроматина в ядрах 100 эпителиальных клеток. Учитывать необходимо только ядра с четкими контурами, слабо окрашенные ацеторсеином и имеющие целую (не разрушенную) ядерную оболочку. На основе наблюдаемой цитологической картины сделайте заключение о половой принадлежности исследуемого индивидуума.

Задание 8. Принципы генетического картирования хромосом. Решение ситуационных задач.

Цель работы: ознакомиться с принципами составления и анализа хромосомных карт человека; научиться определять положение отдельных генов на схеме дифференциально окрашенных хромосом человека; расшифровывать записи, указывающие место локализации гена в хромосоме.

Оборудование, приборы и материалы: задачи, схемы хромосом, таблицы.

Проведение работы:

1. Постройте хромосомную карту гипотетического организма, если на основании результатов анализирующих скрещиваний были установлены следующие частоты кроссинговера на участках между парами условных генных локусов: А и В – 3 %, А и С – 4 %, А и К – 6 %, А и М – 8 %, В и С – 7 %, В и К – 9 %, В и М – 5 %, К и М – 14 %.

2. Зарисуйте в тетрадь схемы дифференциально окрашенных хромосом человека 3 и 4. Найдите и отметьте стрелками на рисунках: 1) восьмой сегмент второго района длинного плеча

хромосомы 3; 2) пятый сегмент первого района короткого плеча хромосомы 4; 3) третий сегмент первого района длинного плеча хромосомы 4.

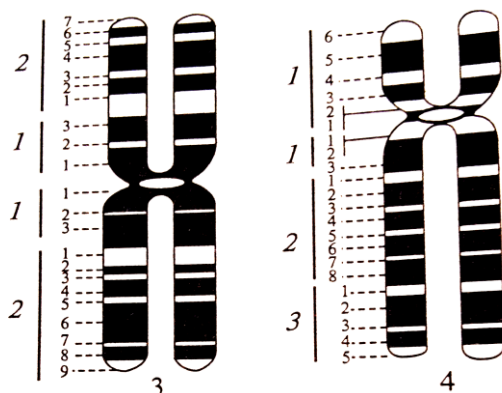


Рис. 9. Схематическое изображение дифференциально окрашенных хромосом 3 и 4

3. Расшифруйте следующие условные обозначения и отметьте стрелками соответствующие сегменты хромосом на рисунках: 1) 3p13; 2) 3q29; 3) 3p26; 4) 4p15 5) 4q26.

4. С помощью современных молекулярно-генетических методов в ДНК 4-й хромосомы человека был обнаружен локус (4q11–22), в котором могут быть локализованы гены человека, ответственные за синтез сывороточного альбумина и α -фетопротеина. Выделите этот участок на схеме хромосомы 4. Обозначьте стрелкой на этой же схеме расположение гена, мутация которого приводит к появлению ахондроплазии (диспропорциональной карликовости), координаты гена 4p16.

Задание 9. Дайте определение понятиям и терминам.

кариотип	гипотония	микроцефалия
кариогамма	четырёхпальцевая бородка	микрoгеня
идиограмма	пятна Брушфильда	крипторхизм
гипертелоризм	гоносомные синдромы	микрoгеня
олигофрения	гипогонадизм	эпикант

Отчет должен быть представлен в тетради и сдается в конце работы преподавателю.

Рекомендуемая литература

1. *Бочков, Н. П.* Клиническая генетика: учебник / Н. П. Бочков, В. П. Пузырев, С. А. Смирнихина; под ред. Н. П. Бочкова. – 4-е изд. – 2011. – 592 с.

2. *Ворсанова, С. Г.* Медицинская цитогенетика: учебное пособие / С. Г. Ворсанова, Ю. Б. Юров, В. Н. Чернышев. – Москва: ИД Медпрактика-М, 2006. – 300 с.

3. *Гинтер, Е. К.* Медицинская генетика: учебник / Е. К. Гинтер. – Москва: Медицина, 2003. – 448 с.

4. *Жимулёв, И. Ф.* Общая и молекулярная генетика: учебное пособие / И. Ф. Жимулев; под ред. Е. С. Беляева, А. П. Акифьева. – 4-е изд. Новосибирск: Сиб. унив. изд., 2007. – 479 с.

5. *Иванов, В. И.* Генетика: учебник. – Москва: ИКЦ «Академкнига», 2007. – 638 с.

6. *Козлова, С. И.* Наследственные синдромы и медико-генетическое консультирование / С. И. Козлова, Н. С. Демикова, Е. Семанова, О. Е. Блинникова. – Москва: Практика, 1996. – 416 с.

7. *Мutowин, Г. Р.* Клиническая генетика. Геномика и протеомика наследственной патологии : учеб. пособие. – 3-е изд. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 832 с.

8. *Фогель, Ф.* Генетика человека: в 3-х т. / Ф. Фогель, А. Мотульски. – Москва: Мир, 1990.

9. *Щипков, В. П.* Практикум по медицинской генетике: учебное пособие / В. П. Щипков, В. П. Зипков, Г. Н. Кривошеина. – Москва: Изд. центр «Академия», 2003. – 112 с.

10. *Korf, B.* Human Genetics and Genomics. – Blackwell Publishing, 2007. – 278 p.

11. *Lewis, Ricki.* Human Genetics: concepts and applications. – 8th ed. – 2008. – 442 p.

12. *Strachan, T.* Human molecular genetics / Tom Strachan, Andrew P. Read. – New York, Garland Science. – 4th ed. – 2011. – 704 p.

Занятие 3

ГЕННЫЕ БОЛЕЗНИ С ТРАДИЦИОННЫМ И НЕТРАДИЦИОННЫМ НАСЛЕДОВАНИЕМ

Цель занятия: изучить молекулярные механизмы генных болезней; ознакомиться с принципами диагностики наследственных болезней, обусловленных мутациями в единичных генах и в случае наследственной предрасположенности.

Генные болезни – это группа наследственных болезней, обусловленных мутациями в отдельных генах.

В настоящее время в медицинской генетике выделяют два варианта наследования генов и признаков: моногенный и полигенный тип наследования. Моногенное наследование, в свою очередь, включает традиционное (классическое) и нетрадиционное (неклассическое) наследование.

Моногенное наследование подразумевает наследование одного гена (одной пары признаков) и относится к взаимодействию аллельных генов.

Полигенное наследование основано на взаимодействии неаллельных генов. Полигенное наследование нередко называют мультифакториальным, имея в виду наследование одновременно не одного, а нескольких определенных генов, проявляющих свое действие в специфических условиях окружающей среды.

Нетрадиционное наследование – наследование генов и признаков, выходящее за рамки моногенного и полигенного вариантов; включает митохондриальное наследование, геномный импринтинг, экспансию нуклеотидных повторов, болезни накопления, пероксисомные болезни, прионные болезни.

1. Этиология генных болезней

Большинство исследователей полагают, что почти все наследственные заболевания человека, в конечном итоге – следствие мутаций. Причиной генных болезней являются мутации, затрагивающие структуру отдельного гена.

Мутации у человека, как и у всех других организмов, возникают постоянно в процессе обычных физиологических функций

организма (спонтанный или естественный мутагенез) и в результате воздействий на наследственные структуры физических, химических и биологических факторов (индуцированный мутагенез).

Генные мутации можно разделить на два больших класса: 1 – мутации, связанные с заменой оснований; 2 – мутации, обусловленные вставкой или выпадением нуклеотида. Существует два типа *замен пар оснований* – транзиции и трансверсии. *Транзиции* – замена одного пурина на другой пурин, а пириимидина на другой пириимидин: АТ → ГЦ; ТА → ЦГ. При *трансверсии* пурин меняется на пириимидин или наоборот: АТ → ЦГ. При выпадении или вставке нуклеотидов в цепи ДНК формируются мутации, вызывающие *сдвиг рамки считывания*. Показано, что одновременно с выпадением нуклеотида может происходить вставка, в результате чего изменяется последовательность 4–5 аминокислот. Кроме того, часто происходит одновременная вставка 2–3 оснований, которая приводит к замене одной аминокислоты в белке, или к образованию бессмысленного белка, и/или к возникновению нонсенс-кодона на некотором расстоянии от самой мутации и чтение прерывается, что приводит к преждевременной терминации синтеза белка.

Существует несколько классификаций генных мутаций. По типу мутаций выделяют следующие:

1. *Миссенс-мутации* – мутации, изменяющие смысл кодона. *Миссенс-мутация* в кодирующей области гена приводит к замене одной аминокислоты на другую, что не нарушает процесс синтеза белка. Фенотипическое проявление таких замен зависит от природы соответствующих аминокислотных замен в белке и от функциональной значимости того домена, в котором произошло изменение.

2. *Нонсенс-мутации* – образование кодонов, не кодирующих аминокислоты (УАА, УАГ, УГА). *Нонсенс-мутация* в кодирующей области гена приводит к возникновению терминирующего стоп-кодона и преждевременному прекращению синтеза белка.

3. *Мутации в сайтах сплайсинга*. Мутации на границе экзонов и интронов приводят к тому, что нарушается процессинг первичного РНК-транскрипта. В результате могут происходить: а) делеции всего или части экзона; б) интронные области, обыч-

но удаляемые, могут стать смысловыми, что приводит к синтезу бессмысленно удлинённого белка. Наиболее часто мутации затрагивают GT и AG динуклеотиды, локализованные, соответственно, в начале интрона (донорный сайт сплайсинга) и в конце интрона (акцепторный сайт сплайсинга).

По месту локализации в ДНК-последовательности мутации подразделяют на три типа: 1) мутации, затрагивающие кодирующие последовательности генов; 2) мутации, затрагивающие внутригенные некодирующие последовательности генов; 3) мутации в регуляторных последовательностях за пределами экзонов.

По патогенетическому механизму. Значимость генных мутаций для жизнедеятельности организма неодинакова.

Некоторые «молчащие мутации» не оказывают влияния на структуру и функции белка (например, замена нуклеотидов, не приводящая к замене аминокислот).

Наибольшим повреждающим действием обладают **нонсенс-мутации**, вызывающие остановку синтеза белка. Причем, чем ближе мутация к 5'-концу гена (к началу транскрипции), тем короче будут белковые молекулы.

Миссенс-мутации, связанные с заменой нуклеотидов в кодирующей части гена, фенотипически проявляются в замене аминокислоты в белке. В зависимости от функциональной значимости нарушенного участка наблюдается частичная или полная потеря функциональной активности белка.

Сплайсинговые мутации чаще затрагивают сайты на стыке экзонов и интронов. Как правило, такие мутации обуславливают тяжелое течение болезни.

Регуляторные мутации связаны с нарушением в регуляторных областях гена. Белок не изменяется. Меняется его количество. Фенотипически определяется пороговым уровнем концентрации белка, при котором еще сохраняется его функция.

По функциональному значению мутации можно разделить на 5 классов:

1. Мутации, ведущие к полной потере функции белка (loss of function) – любые структурные повреждения генов (точковые мутации, делеции, экспансия тринуклеотидных повторов и др.), приводящие к ингибированию процессов транскрипции/трансляции или нарушению нормальной структуры и функции белка.

2. Мутации, в результате которых происходит изменение количества мРНК и первичных белковых продуктов. Такой механизм наблюдается при локализации мутаций в регуляторных областях гена.

3. Доминантно-негативные, изменяющие свойства белков таким образом, что они ингибируют функцию нормальных белковых молекул.

4. Мутации, ведущие к появлению новой функции белка (gain-of-function), которая оказывает повреждающее действие на жизнеспособность или функционирование экспрессирующихся клеток.

5. Мутации, изменяющие «дозу гена». Такой эффект имеет место при делециях или дупликациях гена, что сопровождается нарушением нормальной цитоархитектоники молекулярного продукта.

1.2. Номенклатура мутаций. В 1992 г. была предложена единая стандартизированная система обозначения различных мутаций как на уровне геномной ДНК и кодирующей ДНК (кДНК), так и на уровне РНК и белка (с. – кДНК, г. – геномная ДНК, г. – РНК, т. – митохондриальная ДНК, р.– аминокислотная последовательность). Мутации гена на уровне ДНК имеют основной порядок обозначения:

1. Отсчет нуклеотидов в молекуле кДНК начинается с первого смыслового ATG кодона. Таким образом, нуклеотид под номером +1 соответствует первому нуклеотиду в молекуле кДНК.

2. Кодирующая область (экзоны) обозначается заглавными буквами нуклеотидов (AGT), а не кодирующие районы (интроны) – прописными (agt).

3. При обозначении мутаций сайтов сплайсинга записывают номер крайнего нуклеотида в ближайшем к мутации экзоне, число нуклеотидов (со знаком «+» в случае 3'-конца экзона и со знаком «-» в случае 5'-конца) и характер нуклеотидной замены. Иногда для записи мутаций в сайте сплайсинга используют обозначение IVS (intron variant sequence), номер интрона и измененного нуклеотида.

4. Изменения, связанные с делецией или инсерцией нескольких нуклеотидов, обозначаются символами «del» или «ins» соответственно. При делении или инсерции одного-двух нуклео-

тидов приводится их буквенное обозначение, при делеции или инсерции более трех нуклеотидов указывается только их число.

5. При точковых однонуклеотидных заменах (миссенс- и нонсенс-мутациях) слева от номера записывается нормальный, справа измененный нуклеотид.

6. Замена одного нуклеотида на другой, которая не приводит к изменению аминокислоты, считается полиморфизмом и записывается через косую черту.

Примеры обозначения мутаций на уровне ДНК: c.2052delA означает, что произошла делеция аденина в позиции 2052-го нуклеотида кодирующей области гена; c.1521_1523delCTT означает, что произошла делеция трех нуклеотидов, начиная с 1521-го нуклеотида в последовательности кДНК; c.351G/A означает, что произошла замена нуклеотидов в позиции 351 кДНК, которая не привела к изменению аминокислоты; c.1585-1G > A (IVS10-1G > A) означает, что произошла замена гуанина на аденин в акцепторном сайте сплайсинга за один нуклеотид до начала 11-го экзона; c. 1766 + 1G > A (IVS12 + 1G > A) означает, что произошла замена гуанина на аденин в позиции первого интронного нуклеотида сразу после 12-го экзона в донорном сайте сплайсинга.

При записи мутационного изменения на уровне белкового продукта используется аналогичная запись, но имеется ряд особенностей:

1. Нумерация обозначает не нуклеотиды, а кодоны (триплеты нуклеотидов).

2. В случае обозначения изменения на белковом уровне каждой аминокислоте соответствует однобуквенный или трехбуквенный символ (табл.), слева записывается нормальный вариант аминокислоты, справа – мутантный, а расположенный в центре номер соответствует месту замены в цепочке продукта трансляции.

3. Буквой X обозначается терминирующий стоп-кодон, то есть место остановки синтеза полипептидной цепи при нонсенс-мутациях.

4. Делеция одной или нескольких аминокислот обозначается символом Δ– «дельта».

5. Замены аминокислот, равноценные по функциональной значимости и встречающиеся в норме, считаются полиморфизмами и записываются через косую черту.

Например, запись p.A455E означает замену аланина на глутаминовую кислоту в позиции 455 кодона; p.R553X означает, что вместо аргинина в позиции 553 кодона образовался стоп-кодон; Δ F508 означает делецию фенилаланина в позиции 508 белкового продукта.

Таблица 1

Общепринятая номенклатура аминокислот

Однобуквенное обозначение аминокислот	Трехбуквенное обозначение аминокислот	Аминокислота	Возможные кодоны
A	Ala	Аланин	GCA, GCC, GCG, GCT
B	Asx	Аспарагин или аспарагиновая кислота	AAC, AAT, GAC, GAT
C	Cys	Цистеин	TGC, TGT
D	Asp	Аспарагиновая кислота	GAC, GAT
E	Glu	Глутаминовая кислота	GAA, GAG
F	Phe	Фенилаланин	TTC, TTT
G	Gly	Глицин	GGA, GGC, GGG, GGT
H	His	Гистидин	CAC, CAT
I	Ile	Изолейцин	ATA, ATC, ATT
K	Lys	Лизин	AAA, AAG
L	Leu	Лейцин	CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, TTG
M	Met	Метионин	ATC
N	Asn	Аспарагин	AAC, AAT
P	Pro	Пролин	CCA, CCC, CCG, CCT
Q	Gln	Глутамин	CAA, CAG
R	Arg	Аргинин	AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGT

Продолжение табл. 1

Однобуквенное обозначение аминокислот	Трехбуквенное обозначение аминокислот	Аминокислота	Возможные кодоны
S	Ser	Серин	AGC, AGT, TCA, TCC, TCG, TCT
T	Thr	Треонин	ACA, ACC, ACG, ACT
V	Val	Валин	GTA, GTC, GTG, GTT
W	Trp	Триптофан	TGG
X	X	Стоп-кодон	TAA, TAG, TGA
Y	Tyr	Тирозин	TAC, TAT
Z	Glx	Глутамин или глутаминовая кислота	CAA, CAG, GAA, GAG

2. Моногенные болезни (МБ)

Моногенные болезни обусловлены мутациями в единичных генах. Нередко считают, что наследование их осуществляется по типу простого менделевского наследования. На основе представлений о диаллельной модели структуры гена наследование механизмов взаимодействия между отцовским и материнским геномами рассматривается отдельно для каждой аллельной и неаллельной пары.

2.1. Клиническая и генетическая характеристика МБ

Моногенные болезни обусловлены точковыми мутациями в единичных генах. По данным ВОЗ, среди новорожденных детей МБ встречаются с частотой 30 на 1000 (3 %). Известно более 4500 нозологий МБ. В настоящее время, картировано на хромосомах 1500 нозологий, тогда как идентифицировано 1100 генов МБ. В этом несоответствии нет противоречий, ибо идентифицированы разные нозологии МБ, связанные с разными точковыми мутациями в одних и тех же генах.

Для 500 генов МБ установлен первичный генный дефект (замена основания, внутригенная делеция и др.) или биохимический дефект (ошибка синтеза или модификации белковой молекулы).

С клинической точки зрения – это очень разные, в большинстве своем тяжелые неизлечимые болезни, характеризующиеся

тяжелым течением и ранним дебютом. Для лечения в большинстве случаев используют методы симптоматической коррекции. Причиной этих заболеваний является мутация одного гена. Следствием мутации может быть нарушение структуры или синтеза кодируемого геном белка, изменение его количественного содержания вплоть до полного отсутствия. Мутации генов нередко приводят к нарушению обмена целой метаболической системы, что ведет к необратимым патологическим состояниям.

Мутации *могут передаваться* из поколения в поколение, но порой могут возникать в половых клетках родителей *спонтанно*. Причина спонтанных мутаций в большинстве случаев остается неизвестной.

Среди моногенных болезней значительный процент составляют ферментопатии, различные формы умственной отсталости, дефекты органов слуха, зрения, скелетные дисплазии, врожденные пороки развития, болезни нервной, эндокринной, соединительно-тканной, иммунной и других систем.

Большинство мутаций, ассоциированных с моногенными заболеваниями, жестко детерминируют развитие болезни, при этом факторы окружающей среды не оказывают или оказывают небольшое влияние на развитие заболевания. Поэтому они так трудно поддаются коррекции

Моногенные заболевания встречаются достаточно редко. Это объясняется двумя обстоятельствами. Далеко не все гены человека, а только около 5 % связаны с моногенными заболеваниями. Кроме того, частоты распространения среди населения мутаций, ассоциированных с моногенными заболеваниями, достаточно низки.

К числу наиболее известных моногенных болезней относятся фенилкетонурия, муковисцидоз, галактоземия, адреногенитальный синдром, гемофилия А и В, миодистрофия Дюшенна–Беккера, проксимальная спинальная мышечная атрофия и многие другие болезни.

Частоты заболеваний варьируют в пределах от 1 на 2–3 тыс. до 1 на 10–20 тыс. новорожденных. Другие моногенные заболевания встречаются с еще более низкими частотами – 1 на 100–300 тыс. или 1 на млн. Однако, поскольку таких заболеваний достаточно много, суммарно они составляют значительный процент в перина-

тальной и детской смертности, поэтому большой процент педиатрических коек занят такими больными.

Общие черты моногенных болезней, касающиеся возраста начала заболевания и характера его течения.

Большинство моногенных болезней распознаются в перинатальном или раннем детском возрасте. Около 25 % этих болезней развиваются в эмбриональном периоде, и еще около 50 % проявляются к 3 годам. К концу пубертантного периода диагностируются примерно 90 % всех моногенных болезней.

Известны наследственные болезни с поздними сроками проявления, такие как спинно-мозжечковые атаксии, хорея Гентингтона, моногенные формы болезней Паркинсона и Альцгеймера и др.

Типичными чертами многих наследственных заболеваний являются хронический характер и прогрессиентность течения, то есть постепенное ухудшение общего состояния с нарастанием негативных симптомов.

Для большинства МБ характерна:

– *множественность поражения*, обусловленная плеiotропным действием гена;

– *генетическая гетерогенность* – это означает, что одно и то же по клиническим проявлениям заболевание может быть обусловлено различными генетическими дефектами: мутации в нескольких генах (*локусная гетерогенность*), или разные мутации в одном и том же гене (*аллельная гетерогенность*). Пример локусной гетерогенности – группа наследственных заболеваний сетчатки – пигментных ретинитов, приводящих к снижению остроты зрения, что обусловлено нарушениями процессов фоторецепции. В настоящее время известно минимум 24 различных гена, кодирующих белки фоторецепции. Аллельная гетерогенность характерна практически для всех МБ. Различные мутации в одном и том же гене приводят к возникновению заболеваний со сходной клинической симптоматикой с небольшими вариациями в степени тяжести проявления. Показано, что клинические проявления заболеваний, вызванных нонсенс-мутациями или сплайсинговыми мутациями более выражены, чем в случае миссенс-мутаций.

– *клинический полиморфизм* – в ряде случаев, мутации в различных участках одного гена могут обуславливать возник-

новение совершенно разных болезней. Пример, спинально-бульбарная мышечная атрофия Кеннеди и синдром тестикулярной феминизации обусловлены различными мутациями в гене андрогенного рецептора, картированного на X-хромосоме. Первое заболевание – спинально-бульбарная мышечная атрофия Кеннеди – связано с поражением двигательных нейронов спинного и стволовой части головного мозга, проявляющаяся мышечной слабостью, атрофией мышц плечевого пояса, нарушением глотания и дыхания и др. симптомами. Тип мутаций в гене при этой форме спинальной атрофии относится к группе «динамических» и характеризуется увеличением количества тринуклеотидных CAG-повторов в первом экзоне гена. Второе заболевание – синдром тестикулярной феминизации – относится к группе синдромов нарушения половой дифференцировки, основные проявления которого связаны с нечувствительностью андрогеновых рецепторов к дигидротестостерону. При этом у человека с мужским кариотипом (46, XY) наружные половые органы сформированы по женскому типу, однако влагалище заканчивается слепом, матка отсутствует. Тип мутации в гене при этой патологии – однонуклеотидные точковые замены, приводящие к инактивации андрогенового рецептора.

2.2. Моногенные болезни с традиционным типом наследования

В зависимости от локализации мутантного гена и характера доминирования выделяют болезни:

- аутосомно-доминантные;
- аутосомно-рецессивные;
- X-сцепленные доминантные;
- X-сцепленные рецессивные;
- Y-сцепленные.

2.2.1. Аутосомно-доминантный тип наследования

Аутосомно-доминантный тип наследования характеризуется проявлением заболевания у гетеро- и гомозигот по патологической мутации. **Особенности проявления аутосомно-доминантных заболеваний.** Первая особенность – *позднее проявление*. Иногда тяжелое доминантное заболевание проявляется поздно, только во время или после репродуктивного периода.

В этом случае, несмотря на тяжесть заболевания, можно составить обширные родословные. Классический пример – хорея Гентингтона. Впервые описана в 1872 г. Частота 2,3–6,7:100 000 в популяции. Это тяжелое дегенеративное заболевание нервной системы с отсроченным сроком проявления, приводящее к непроизвольным движениям конечностей и лица (*гиперкинезы*), изменению личности и постепенному нарастанию слабоумия (*деменции*).

Подавляющая часть пораженных вступала в брак, когда у них уже проявились клинические симптомы. Мужчины болеют несколько чаще. Пенетрантность высокая. Возраст больных 25–45 лет. Течение болезни прогрессирующее, длительность болезни примерно 15 лет.

Другой феномен, характерный для аутосомных доминантных признаков, – это **неполная пенетрантность**. Пенетрантность – статистическое понятие, которое определяется как доля индивидов с конкретным генотипом, у которых соответствующий этому генотипу фенотип проявился. В случае неполной пенетрантности при передаче признака иногда одно поколение пропускается (пропуск поколений), причем признак не проявляется у того индивида, который, судя по родословной, должен быть гетерозиготным.

Пример заболевания с неполной пенетрантностью – **ретинобластома** – злокачественная опухоль глаз у детей. Пенетрантность мутантного гена от 60 до 90 %, частота заболевания 0,4:100000. Ген ретинобластомы картирован на 13 хромосоме. Первые признаки болезни – свечение зрачков, вялая реакция зрачка на свет, потеря зрения.

Выделены две формы заболевания: наследственная и спорадическая. У 10 % больных ретинобластома возникает вследствие делеции участка хромосомы 13q14.1, у остальных – в результате структурных и функциональных нарушений в гене *RB1*, который в последние годы выделен и клонирован благодаря использованию молекулярных маркеров. Белковый продукт этого гена функционирует в нормальных тканях и в опухолях, и только при ретинобластоме он оказывается измененным. Предрасположенность к возникновению ретинобластомы в настоящее время связывают с наличием терминальной мута-

ции в одном из аллелей гена *RB1*, который наследуется по ауто-сомно-доминантному типу и обнаруживается у 60–75 % больных.

Третий феномен – *варьирующая экспрессивность гена*. Проявляется различной тяжестью клинических симптомов болезни у пораженных членов родословной. Пример, нейрофиброматоз – проявляется пигментными пятнами и опухолями на коже и по ходу нервных волокон при рождении или в детском возрасте. У некоторых больных признаки заболевания выражены отчетливо, у других можно обнаружить лишь пятна. Заболевание описано в 1882 г. как болезнь Реклингаузена, частота заболевания 1:2000, мужчины болеют чаще.

Ген *нейрофиброматоза типа I* локализован на 17q11.2; *типа II* – на 22q11.21 – q13.1. Заболевание обусловлено мутацией гена нейрофиброматоза I в 17q-хромосоме. Ген проявляется у всех гетерозигот, но в разной степени. Мужчины и женщины поражаются одинаково часто. Существует предположение, что ген нейрофиброматоза I входит в группу генов, подавляющих рост опухолей. Снижение или отсутствие белка нейрофибромина, выработка которого контролируется геном нейрофиброматоза I, приводит к перерождению клеток.

Четвертая особенность – *гетерозиготность*. Почти все носители доминантных мутаций гетерозиготны. Иногда случается, что два носителя доминантных мутаций вступают в брак и имеют детей. Тогда $\frac{1}{4}$ из них будут гомозиготами по доминантному аллелю (*AA*). Например, в кровнородственном браке носителей брахидактилии родился ребенок *AA*, у него недоставало пальцев на руках и ногах, имелись множественные пороки скелета. Ребенок умер в возрасте одного года.

Брахидактилия (короткопалость) – первое описание родословной с аутосомно-доминантным наследованием (Фараби, 1905). Частота встречаемости брахидактилий различных типов 1,5:100 000. Брахидактилия – наследственный дефект, характеризующийся недоразвитием фаланг и укорочением пальцев на руках или ногах, иногда редуцировано число самих фаланг, иногда наблюдается гипоплазия ногтевых пластин, ригидность суставов (симфалангия), синдактилия, полидактилия. К частным случаям брахидактилии относятся эктродактилия и адактилия. При *эктродактилии* наблюдается недоразвитие дистальных

(ногтевых) фаланг; в тяжелых случаях – отсутствие ногтевых и средних фаланг. Развитие пястных костей не страдает. При *адактилии* имеет место врожденное отсутствие фаланг пальцев с частичным или полным сохранением пястных костей.

Пораженные брахидактилией характеризуются низким ростом (средний рост мужчин 159 см), по-видимому, вследствие укорочения ног, а также короткими руками. Во всем остальном они совершенно нормальны. Репродуктивная функция не нарушается. Большинство заболеваний, вызываемых генными мутациями и наблюдаемых в нынешних поколениях, имеют сравнительно недавнее происхождение; часто они являются результатом вновь возникших мутаций в гаметах одного из родителей.

Брахидактилии классифицируются на подтипы А–Е. Брахидактилия типа В (Brachidactyly Type В – BDB В) является самой тяжелой формой в группе наследственных доминантных брахидактилий. BDB В обусловлена гетерозиготными мутациями в гене тирозин-киназного рецептора *ROR2*, который локализован на хромосоме 9 (9q22) и состоит из 9 экзонов. Белок ROR2 образован внеклеточным, трансмембранным и внутриклеточным доменами. Мутации, затрагивающие внутриклеточный домен, приводят к фенотипу аутосомно-доминантной брахидактилии типа В. Доминантную брахидактилию типа В обуславливают нонсенсмутации, локализующиеся преимущественно в экзонах 8 или 9 гена и приводящие к дефекту внутриклеточной части белка ROR2.

Пятая особенность аутосомно-доминантных болезней – существование *антиципации*, то есть, нарастания тяжести заболевания у больных последующих поколений.

2.2.2. Аутосомно-рецессивный тип наследования

Большинство больных с рецессивным типом заболевания рождаются в браках между фенотипически нормальными гетерозиготами. В потомстве такого брака вероятность того, что ребенок окажется пораженным составит 25 %. В большинстве случаев риск аутосомно-рецессивного заболевания в потомстве больного низкий, что связано с редкостью этих заболеваний. Если больной (*aa*) вступает в брак с гетерозиготным носителем мутации (*Aa*) риск заболевания у потомства в этом случае составляет 50 % и не отличается от такового при аутосомно-доминантном наследовании.

Вероятность рождения больного ребенка значительно увеличивается при кровнородственном браке, когда оба супруга имеют определенную долю общих генов, полученных ими от общего предка.

Наиболее частыми и значимыми в клиническом отношении являются такие болезни с аутосомно-рецессивным типом наследования, как муковисцидоз (кистозный фиброз поджелудочной железы), фенилкетонурия, адреногенитальный синдром, пигментная ксеродерма, многие формы нарушения слуха или зрения. На сегодняшний день известно более 1600 аутосомно-рецессивных заболеваний.

Характеристика отдельных нозологий с аутосомно-рецессивным типом наследования, к которым относятся:

Пигментная ксеродерма. Описана в 1968 г. Частота 1:25000. Заболевание формируется вследствие неспособности клеток больного репарировать повреждения ДНК, вызванные УФ-излучением.

Генетический дефект связан с первым этапом эксцизионной репарации ДНК. В зависимости от степени и характера нарушений ДНК выделяют 9 групп заболеваний, что свидетельствует о вовлечении в этот этап репарации не менее 9 генов. Гены картированы на 2, 3, 9, 13 и 16 хромосомах. Например, ген группы С локализован в 3 хромосоме. В локусе 3p25 обнаружили замену С на Т в нуклеотиде 1840 в экзоне 8, что привело к образованию стоп-кодона в положении 579. Эта мутация привела к синтезу усеченного белка, состоящего из 579 аминокислот (нормальный белок 940 аминокислот). Аллель *R579X* ассоциирован с тяжелыми клиническими проявлениями заболевания – рак кожи. В легких случаях развивается эритема. Средний возраст появления заболевания 8 лет.

Муковисцидоз (кистозный фиброз). Описал американский патологоанатом Д. Андерсон в 1938 г. как «кистозный фиброз поджелудочной железы». Муковисцидоз (МВ) занимает первое место по распространенности в группе аутосомно-рецессивных заболеваний и встречается в среднем с частотой 1:6000 новорожденных.

Основной патогенетический механизм болезни – **увеличение вязкости секрета**, выделяемого слизеобразующими железами бронхов, кишечника, поджелудочной железы, семенников

и придаточных пазух носа, что приводит к их закупорке. В результате нарушается процесс естественного **очистения бронхов**, в них активно размножается патогенная флора, развивается воспаление. Воспаление в свою очередь приводит к отеку слизистой бронхов и увеличению продукции вязкого секрета. Таким образом, запускается порочный круг патогенеза. Из-за нарушения функции бронхиальных желез наблюдается эмфизема легких, пневмосклероз, бронхоэктазы и др. В поту больных повышено выделение хлоридов, что легко может обнаружить мать при поцелуе в губы.

В патогенетическом механизме расстройства желудочно-кишечного тракта важную роль играют изменение водно-электролитного компонента панкреатического сока, его сгущение и затруднение выделения в просвет кишечника. Это, с одной стороны, приводит к нарушению формирования каловых масс и кишечной непроходимости, а с другой – к фиброзно-кистозному изменению ткани поджелудочной железы. В ряде случаев возникновение кишечной непроходимости наблюдается в первые дни жизни ребенка.

В зависимости от типа мутаций и их локализации функции белкового продукта гена могут быть нарушены полностью или частично. Это приводит к различиям в характере клинических проявлений и течения болезни.

Ген муковисцидоза (трансмембранного регулятора хлоридного канала – *CFTR*) картирован на 7 хромосоме (7q31-q32) и содержит 24 экзона. Основной тип мутаций – короткие делеции и однонуклеотидные замены. От 50 до 70 % всех мутаций приходится на долю делеции 3 п.н. в кодоне 508-ΔF-508, (delF508), приводящей к делеции фенилаланина в 508 положении полипептида. К настоящему времени идентифицировано более 800 патологических мутаций, обуславливающих МВ, причем, существенный процент больных являются компаундами по двум различным мутациям. При муковисцидозе показана некоторая зависимость тяжести заболевания от типа мутации. Поэтому детекция мутации в какой-то мере дает возможность прогнозирования течения болезни и помогает правильно выбрать тактику лечения.

Белковый продукт гена, обозначаемый как «муковисцидозный трансмембранный регулятор проводимости» (МТРП), со-

держит 1480 аминокислот, обеспечивает нормальное функционирование хлорного канала, через который осуществляется транспорт ионов хлора и натрия через клеточную мембрану.

Выделяют три основных клинических формы МВ: 1) *легочную* (15–20 % случаев); 2) *кишечную форму* (10 %); 3) *смешанную*, протекающую с сочетанным поражением легких и кишечника (75–80 %); 1–4 % – стертые формы заболевания.

В большинстве случаев первые клинические симптомы появляются на первом году жизни, а у ряда больных – в первые месяцы жизни. Чаще всего самым ранним клиническим признаком МВ является *кашель*. Он носит приступообразный характер и не приводит к отделению мокроты. По мере течения болезни и присоединения воспалительного процесса при кашле больной отхаркивает слизисто-гнойную, зловонную мокроту. У больного появляется одышка и сердечно-легочная недостаточность. В большинстве случаев поражение бронхов сопровождается нарушением функции кишечника (запорами, выпадением прямой кишки и др.) и поджелудочной железы (сахарный диабет). Часто у больных наблюдается задержка физического развития, снижение роста и уменьшение мышечной массы.

Диагностика осуществляется на основании: 1) наличия клинических симптомов поражения бронхолегочной системы, кишечных расстройств, дисфункции поджелудочной железы; 2) увеличения концентрации хлоридов в поте больного выше 60ммоль/л; 3) обнаружение мутаций в гене *CFTR*.

2.2.3. Сцепленные с полом заболевания

Х-хромосома человека содержит около 150 миллионов пар оснований, что составляет примерно 5 % ДНК в клетках женщин, 2,5 % в клетках мужчин. Несет более 1400 генов. Одна из двух Х-хромосом женщины в соматических клетках деактивирована и образует тельце Барра.

Y-хромосома состоит из 58 миллионов пар азотистых оснований, и несет приблизительно 2 % ДНК клетки человека. В Y-хромосоме картировано 86 генов. Содержит ген *SRY* (sex-determining region of the Y), определяющий мужской пол организма, а также гены, необходимые для нормального формирования сперматозоидов. *SRY*-ген работает только в семенниках. Y-хромосома не рекомбинирует с X-хромосомой, за исключени-

ем небольших участков на теломерах, которые составляют около 5 % длины хромосомы. Это реликтовые участки древней гомологии между X и Y хромосомами. Большая часть (около 60 %) длинного плеча Y-хромосомы представляет собой функционально неактивный гетерохроматин. Основная часть Y-хромосомы, которая не подвержена рекомбинации, называется *NRV* (non-recombining region of the Y chromosome). Эта часть Y-хромосомы позволяет посредством оценки однонуклеотидного полиморфизма определить прямых предков по отцовской линии.

X-сцепленный доминантный тип наследования проявляется у гемизиготных мужчин и у гетерозиготных женщин. Все сыновья пораженных отцов здоровы, здоровы и их дети. Все дочери пораженных отцов поражены. Мужчины поражены более тяжело, чем женщины.

Примером такого типа наследования является **устойчивый к витамину D рахит** с гипофосфатемией. Все дочери больных отцов больны. Пораженные матери имеют как больных, так и здоровых сыновей и дочерей. **Фолликулярный гиперкератоз** – потеря ресниц, бровей, также наследуется по X-сцепленному доминантному типу.

X-сцепленный рецессивный тип наследования

К настоящему времени известно более 850 X-сцепленных заболеваний; подавляющее их большинство относится к X-сцепленным рецессивным, намного меньше – к X-сцепленным доминантным и еще меньше – к доминантным с летальным исходом для гемизиготных плодов мужского пола. Обычно поражены мужчины, а для редких X-сцепленных заболеваний почти всегда. Все их фенотипически здоровые дочери больных мужчин являются носительницами (гетерозиготами); сыновья пораженных мужчин здоровы.

Наиболее известный пример – **гемофилия А**. Гемофилия А возникает в результате нарушения синтеза гуморального фактора, необходимого для первой стадии свертываемости крови – антигемофилического глобулина (фактор VIII – белок). У нормальных индивидов активность этого белка колеблется от 40 % до 300 % (среднее значение принято за 100 %).

В гене фактора VIII (VIII – ген *F8C*) обнаружен полиморфизм. У больных гемофилией активность этого белка резко снижена или полностью отсутствует. 50 % больных гемофилией

А не имеет фактора VIII, 5 % имеет нормальное количество не работающего белка. У остальных снижено количество белка VIII при нормальной активности.

Мышечная дистрофия Дюшенна–Беккера – X-сцепленное неизлечимое заболевание (есть и другие формы – аутосомно-рецессивная, аутосомно-доминантная). Это одна из частых форм многочисленных наследственных нервно-мышечных заболеваний. Мышечные дистрофии характеризуются прогрессирующими дегенеративными изменениями в поперечнополосатой мускулатуре без первичной патологии периферического мотонейрона. Миодистрофия Дюшенна–Беккера вызвана мутацией в гене, ответственном за синтез белка дистрофина. Этот белок находится в больших количествах в области сарколеммы, поддерживая, по видимому, целостность мембраны.

Ген дистрофина локализован в коротком плече X-хромосомы в области Хр21.2. Он клонирован и секвенирован. Это самый длинный ген из всех изученных. В нем более 2×10^6 пар нуклеотидов (более 60 интронов): длина матричной РНК – 16 000 п. н. В связи с большой длиной гена в нем часто наблюдаются перестройки, ведущие к мутациям. Доля «свежих» мутаций в общем числе случаев миодистрофии Дюшенна–Беккера составляет 30 %. Поскольку ген секвенирован, молекулярно-генетическая диагностика гомо- и гетерозиготных состояний возможна почти во всех семьях. В 65–70 % у больных миодистрофией Дюшенна–Беккера диагностируются протяженные внутригенные делеции, затрагивающие несколько соседних экзонов. Их молекулярная диагностика проводится с использованием ПЦР. Специальные более сложные методы разработаны для выявления гетерозиготных носителей мутаций, что позволяет во многих семьях высокого риска проводить профилактику этих тяжелейших заболеваний на базе пренатальной диагностики.

Генетически единая форма миодистрофии Дюшенна–Беккера клинически разделяется на миодистрофию Дюшенна и миодистрофию Беккера.

Миодистрофия Дюшенна встречается с частотой 3:10000 живорожденных мальчиков. Болезнь проявляется рано. Выраженные симптомы появляются у детей уже в 2–3-летнем возрасте в виде изменения походки («утиная»), псевдогипертрофии икроножных мышц. Процесс атрофии мышц постепенно приобретает

восходящее направление: мышцы бедра – тазовый пояс – плечевой пояс – руки. Атрофический процесс развивается и в сердце (кардиомиопатия). Острая сердечная недостаточность – причина летальных исходов. Интеллект у больных детей снижен. Корреляции между тяжестью мышечного дефекта и степенью снижения интеллекта нет. На самой последней стадии атрофия мышц (слабость) захватывает мышцы лица, глотки и дыхательные мышцы. Больные умирают на 2–3-м десятилетии жизни.

Миодистрофия Беккера – доброкачественная форма нервно-мышечных болезней. Частота миодистрофии Беккера у новорождённых мальчиков составляет 1:20000. По клиническим симптомам миодистрофия Беккера напоминает миодистрофию Дюшенна, но в менее выраженной форме. Начало болезни – не ранее 10–15 лет, течение мягкое, больные сохраняют работоспособность в возрасте 20–30 лет. Фертильность у больных не снижена. Нарушения интеллекта и кардиомиопатии не отмечаются. «Мягкая» (или доброкачественная) форма миодистрофии Беккера объясняется тем, что в отличие от миодистрофии Дюшенна (полностью прекращается синтез дистрофина), при миодистрофии Беккера синтез дистрофина детерминируется, но либо белка вырабатывается мало, либо продуцируется аномальный дистрофин.

Специфическое лечение миодистрофии Дюшенна и Беккера не существует. Умеренные упражнения поощряются до тех пор, пока они возможны. Пассивные упражнения могут продлить период, когда пациент может ходить и не нуждается в инвалидной коляске. Генная терапия на сегодняшний день недоступна.

У-сцепленное наследование или голландрическое наследование. Примером такого наследования является вполне безобидный признак – ороше́нность ушной раковины. Патологические мутации, обуславливающие нарушения формирования семенников или сперматогенеза, не наследуются в связи со стерильностью их носителя.

2.2.4. Наследственные болезни обмена веществ (НБО) также относятся к моногенным болезням.

Среди наследственных болезней обмена выделяют:

– *болезни аминокислот* (фенилкетонурия, алкаптонурия, альбинизм);

– *болезни углеводов* (галактоземия, гликогенозы, мукополисахаридозы);

- *болезни липидов* (гиперлипидемия, гиперхолестеринемия, муколипидозы);
- *болезни пуринов и пиримидинов* (подагра, синдром Леша–Найяна);
- *болезни биосинтеза кортикостероидов* (адреногенитальный синдром)
- *болезни лимфоцитов и лейкоцитов* (недостаточность аденозиндезаминазы);
- *болезни металлов* (болезни Вильсона–Коновалова, Менкеса);
- *болезни транспорта систем почек* (витамин D-резистентный рахит);
- *болезни эритрона* (анемия Фанкони, гемолитические анемии, недостаточность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы);
- *болезни накопления*, связанные с дефицитом ферментов лизосом (наследуются с цитоплазмой по материнской линии). Такие НБО проявляются прогрессирующим накоплением предшественников метаболических реакций в клетках разных тканей, например, отложением макромолекул гликогена, гликопротеинов, гликолипидов, мукополисахаридов, сфинголипидов, которые в условиях нормального обмена веществ «самоперевариваются» лизосомальными ферментами, что необходимо при очищении организма от продуктов жизнедеятельности и мертвых клеток.

Особенности проявления нарушений метаболизма

- Младенцы с врожденными нарушениями метаболизма обычно выглядят болезненно уже в первые недели жизни.
- Они часто плохо сосут грудь, сонливы и вялы, вплоть до коматозного состояния. В некоторых случаях развиваются судороги.
- Эти признаки не являются специфичными для данной группы заболеваний.
- Характерной особенностью пациентов с врожденными метаболическими нарушениями является необычный запах кожи.

Скрининг новорожденных – это массовое обследование всех родившихся живыми детей с помощью специальных лабораторных тестов для выявления некоторых тяжелых наследственных болезней до развития клинической картины заболевания.

Основные условия проведения скринирующих программ:

1. Заболевание встречается в популяции с высокой частотой (1:10000 новорожденных и более).

2. Без лечения данное заболевание приводит к резкому снижению трудо- и жизнеспособности.

3. Существуют эффективные методы лечения.

4. Разработан эффективный просеивающий тест.

5. Программа должна быть экономически выгодной

Во всех странах проводят скрининг на два заболевания – фенилкетонурию и врожденный гипотиреоз, в некоторых странах – на 4–6 заболеваний. Суммарно во всем мире осуществляется скрининг примерно на 40 наследственных болезней.

С целью скринирования у новорожденного на 4–5 день жизни берут несколько капель крови из пятки на бланк особой фильтровальной бумаги с указанием фамилии, даты рождения и веса ребенка. Кровь высушивается и отправляется в биохимическую лабораторию скрининга. Родители узнают о результатах тестирования ребенка только в том случае, если возникнут проблемы.

Болезни аминокислотного обмена – это группа заболеваний, обусловленных наследственными нарушениями метаболизма различных аминокислот, также дефектами синтеза мочевины.

Важнейшим проявлением нарушения обмена аминокислот является *гипераминоцидурия* – увеличение содержания соответствующих аминокислот в крови и моче.

Клинические проявления: многие аномалии аминокислотного обмена характеризуются общими чертами: упорная рвота, отказ от еды, гипотрофия, отставание больного ребенка в нервно-психическом развитии, многообразными изменениями со стороны нервной системы и других органов и систем.

Особенности наследственных болезней аминокислотного обмена состоят в проявлении их после определенного периода кажущегося благополучия, через некоторое время после рождения. В связи с этим многообразные отклонения в развитии ребенка – повышенная нервная возбудимость или заторможенность, адинамия, судорожное состояние и т. п. должно возбудить подозрение на патологию обмена аминокислот.

Генеалогический анализ. Заболевания наследуются ауто-сомно-рецессивно (за редким исключением). В родословных больных имеются указания на родство родителей, происхождение их из общей местности, сходная патология или случаи ранней смерти у братьев или сестер пробанда.

Лечение: диета, в первую очередь, исключение из рациона больных продуктов, содержащих белки животного происхождения, ограничение потребления белков растительного происхождения с учетом минимальной суточной потребности в той аминокислоте, метаболизм которой нарушен, применение полусинтетических лечебных продуктов, созданных из смесей аминокислот для восполнения дефицита белка, равномерное распределение диетической белковой нагрузки в течение дня.

Пример нарушения обмена аминокислот – **фенилкетонурия (ФКУ)** – фенилпировиноградная олигофрения. ФКУ впервые описана Фёллингом в 1934 г. Название этой болезни дал Пенроуз в 1935 г. Частота заболевания в мире в среднем 1:10000, в Беларуси 1:6 000 населения. Частота у мужчин и женщин одинакова, однако мальчики погибают чаще на первом году жизни. Больные ФКУ характеризуются прогрессирующим слабоумием, обладают специфическим «мышинным» запахом.

Аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное мутацией гена, кодирующего фенилаланингидроксилазу (*PAH* – phenylalanine hydroxylase gene), приводит при отсутствии своевременной терапии к тяжелой умственной отсталости.

Фенилаланин – незаменимая аминокислота. Основная фракция фенилаланина окисляется до тирозина и, в значительно меньшей мере, до других соединений. Дефицит фенилаланингидроксилазы приводит к накоплению фенилаланина в сыворотке крови. Имеются данные о том, что нарушения обмена фенилаланина приводят к нарушению миелинизации мозга и к недостаточной продукции адреналина, норадреналина, меланина, гормонов щитовидной железы.

PAH-ген (12 хромосома) транскрибируется в гепатоцитах с образованием мРНК. Наиболее распространенный тип мутаций – однонуклеотидные замены (миссенс, нонсенс, мутации в сайтах сплайсинга). В Белоруссии и России, а также на востоке Европы наиболее распространена мутация в экзоне 12, которая приводит к замене аргинина на триптофан в 408 положении полипептидной цепи (R408W). Внутри *PAH*-гена локализовано более 10 полиморфных сайтов рестрикции, причем распределения гаплотипов по этим маркерам среди представителей разных рас и этнических групп значительно различаются.

Около 90 % детей – блондины со светлой кожей и голубыми глазами, что обусловлено недостаточностью пигмента. В первые месяцы жизни дети в большинстве случаев выглядят здоровыми. Некоторые же с первых дней жизни вялы, сонливы, реже беспокойны. Отставание становится особенно заметным на 2-ом полугодии жизни. Дети не стремятся к общению с родителями, другими детьми. Большинство нелеченных больных умственно отсталые. Прогрессирование психического дефекта наблюдается до 4-х лет.

Эффективным методом лечения является специальная диета, содержащая дозированное количество фенилаланина. Для предотвращения повреждений мозга лечение надо начинать буквально с первых недель жизни ребенка. Когда ребенок достигает 5-летнего возраста, избыток фенилаланина уже не оказывает такого разрушительного действия на мозг ребенка, как в предыдущий период. Считают, что к этому периоду жизни заканчивается миелинизация мозга.

Нарушения обмена липидов

Липиды – большая группа веществ, включающая триглицериды, холестерол, жирные кислоты, фосфолипиды, сфинголипиды и др.

Общие физико-химические свойства липидов – плохая растворимость в воде. В связи с этим их транспорт в организме возможен в виде липидо-белковых комплексов. Основным переносчиком свободных жирных кислот является альбумин, в то время как другие липиды циркулируют в составе липопротеинов – комплексов липидов со специфическими белками – апопротеинами. Среди липопротеинов выделяют липопротеины низкой плотности (ЛПНП) и липопротеины высокой плотности (ЛПВП). ЛПНП являются главными переносчиками эфиров холестерина. ЛПНП могут связываться с рецепторами ЛПНП на клеточных мембранах. Затем они попадают внутрь клетки, разрушаются в лизосомах с освобождением свободного холестерина. ЛПВП выполняют две важные функции: являются источником апопротеинов и опосредуют обратный транспорт холестерина, захватывая холестерин из стареющих клеток и других липопротеинов и перенося его в остаточные частицы, поглощаемые печенью. Холестерин экскретируется печенью в составе желчи как в форме свободного холестерина, так и в форме желчных кислот.

Примером нарушения обмена липидов является **гиперхолестеринемия**. **Семейная гиперхолестеринемия** возникает вследствие аномалий рецептора к ЛПНП и характеризуется очень высокими концентрациями холестерина в плазме крови с раннего детства.

Аутосомно-доминантное наследование. Частота гетерозигот в популяции 1:500. В основе заболевания лежит дефект гена рецептора к ЛПНП (*LDLR* – low density lipoprotein receptor gene), локализованного в 19p13.2. При заболевании имеет место дефект связывания холестерина вследствие нарушения функции рецепторов с одновременной стимуляцией синтеза эндогенного холестерина. У гетерозигот (0,2 % населения) тенденция к развитию ишемической болезни сердца (ИБС) наблюдается примерно на 20 лет раньше, чем у населения в целом (3–4 десятилетие жизни). У гомозигот (популяционная частота 1:1000 000) вообще отсутствует связывание ЛПНП с рецепторами. У них в детстве развивается ИБС и без надлежащего лечения они редко доживают до взрослого возраста.

Клинические проявления – преждевременный атеросклероз жизненно важных артерий головного мозга, сосудов сердца и др. органов, в том числе раннее развитие инфаркта миокарда.

Общая (полигенная) гиперхолестеринемия. При полигенной гиперхолестеринемии концентрация холестерина в плазме не так высока, как при семейной гиперхолестеринемии, и на нее в большей степени влияют такие факторы окружающей среды, как диета. Данная патология имеет значение опять же в связи с риском развития ишемической болезни сердца. Однако при полигенной гиперхолестеринемии часто приводит к успеху одно лишь лечение с помощью диеты, применение препаратов, понижающих концентрацию липидов, может и не потребоваться.

Нарушения обмена углеводов

Классическим примером нарушения углеводного обмена является **галактоземия**, обусловленная нарушением процесса ферментативного превращения галактозы в глюкозу. Галактоза в норме с помощью фермента галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы (*GALT* – galactose-1-phosphat-uridylyltransferase) (9p13) превращается в галактозо-1-фосфат, который в дальнейшем превращается в галактозо-6-фосфат, включаемый в метаболический путь глюкозы.

Заболевание проявляется в первые две недели жизни ребенка. В организме ребенка накапливается галактоза и возникает дефицит глюкозы. Галактоза частично превращается в галакто-

тиол, который накапливается в тканях мозга, печени, почек, хрусталика, чем и обусловлена соответствующая симптоматика. У детей из-за непереносимости материнского молока наблюдается диспепсия, наступает исхудание, появляется желтуха, увеличивается печень, происходит задержка психического развития (понос и рвота с 16 дней жизни). Дети часто погибают в первые месяцы жизни. Если ребенок остался жив, у него отмечают микроцефалию, снижение тонуса мышц, судороги, увеличение печени, селезенки, меняется картина крови. При своевременном отлучении ребенка от груди и переведении его на специальную диету или коровье молоко + соевое молоко можно добиться значительного терапевтического эффекта. Наследуется заболевание аутосомно-рецессивно, частота 1:15000.

Биохимическая диагностика галактоземии базируется на измерении активности в эритроцитах GALT. **ДНК диагностика** основана на определении мутаций в гене GALT. В европейской популяции наиболее частой является мутация (однонуклеотидная замена) Q188R (Gln188Arg), диагностируемая у 70 % больных (галактоземия I типа).

Нарушения обмена гормонов

Гипотиреоз – клинический синдром, вызванный недостатком гормонов щитовидной железы в организме или снижением их биологического эффекта на тканевом уровне. Частота заболевания – 1: 4000–5000 новорожденных.

Признаки гипотиреоза можно обнаружить у ребенка уже в первые месяцы жизни. Но более явственно они начинают проявляться с того момента, когда прекращается кормление грудью, так как с грудным молоком в организм малыша поступают материнские гормоны. У детей, которых вскармливают искусственно, дефицит тироксина проявляется раньше.

Внимательная мама может уже с первых дней заметить признаки низкой активности щитовидной железы: малыш вяло сосет, у него большой живот, сухая кожа, низкая температура тела, выраженная желтуха. Плач у малыша особый, хриплый. Лицо отечно, особенно веки. Часто у таких детишек выявляется пупочная грыжа.

Причиной врожденного гипотиреоза могут быть как нарушения самой щитовидной железы, так и гипоталамо-гипофизарной системы в целом, врожденный зоб или прием матерью

во время беременности препаратов, подавляющих функцию щитовидной железы.

На сегодняшний день идентифицированы 3 транскрипционных фактора, участвующих в закладке и дифференцировке щитовидной железы – PAX-8 (paired domain homeobox), TTF-1 и TTF-2 (thyroid transcription factors 1 и 2).

Два главных **гормона щитовидной железы** – тироксин (Т4) и трийод-тиронин (Т3). Т4 и Т3 регулируют температуру тела, влияют на частоту пульса и регулируют выработку белка. Также щитовидная железа вырабатывает кальцитонин, который регулирует уровень кальция в крови.

Скорость, с которой тироксин и трийодтиронин выбрасываются в кровь, регулируется гипофизом и гипоталамусом. Гипофиз регулирует деятельность щитовидной железы с помощью тиреотропного гормона (ТТГ) по принципу отрицательной обратной связи, поэтому, если Т3 и Т4 вырабатывается мало, уровень ТТГ повышается, и наоборот

Основные принципы проведения неонатального скрининга

Все варианты врожденного гипотиреоза сопровождаются низкими уровнями тиреоидных гормонов (Т4, Т3), повышение уровней тиреотропного гормона (ТТГ) характерно для первичного гипотиреоза. Но поскольку он представляет собой наиболее распространенный вариант заболевания (до 90 % всех случаев), в большинстве стран в основе скрининга лежит определение ТТГ. В США и Канаде скрининг базируется на определении Т4. Оптимальным было бы определение обоих параметров, однако это значительно увеличивает стоимость обследования.

Основная цель скрининга по врожденному гипотиреозу – раннее выявление всех новорожденных детей с повышенным уровнем ТТГ в крови. Все новорожденные с аномально высоким ТТГ требуют срочного углубленного обследования для окончательной диагностики заболевания и немедленного начала заместительной терапии (оптимально – в первые 3 недели жизни).

Адреногенитальный синдром (АГС) или врожденная гиперплазия коры надпочечников – классический пример наследственного заболевания, связанного с нарушением синтеза гормонов коры надпочечников (чаще **21-гидроксилазы**), вследствие поражения генов, отвечающих за синтез ряда ферментных

систем надпочечников (стероидных гормонов). Биосинтез андрогенов не нарушен, что приводит к избыточной продукции их еще при внутриутробном развитии.

АГС наследуется аутосомно-рецессивно. Частота заболевания составляет 1:5000–6000 новорожденных. Ген, мутации в котором приводят к развитию АГС, картирован на хромосоме 6p21.3. Ген 21-гидроксилазы *CYP21ОНВ* – состоит из 10 экзонов, имеет длину 6.3 т.п.н. 30 % обнаруженных мутаций составляет делеция гена *CYP21ОНВ*. Эта мутация ответственна за развитие сольтеряющей формы заболевания. Другой мутацией, ответственной за развитие сольтеряющей формы, является мутация сайта сплайсинга во втором интроне (35 %).

Лабораторная диагностика: детекция делеции гена *CYP21ОНВ* и мутации сайта сплайсинга во 2 интроне.

Клиника. У новорожденных девочек отмечается различная степень маскулинизации от умеренной гипертрофии клитора до полного сращения губно-мошоночных складок с формированием мошонки, мужского полового члена с отверстием мочеиспускательного канала, наличием предстательной железы. Внутренние половые органы сформированы правильно, кариотип 46, XX.

У мальчиков основным клиническим симптомом является преждевременное половое развитие, преждевременное закрытие зон роста эпифизов, в связи с чем больные имеют низкий рост. При неполном дефиците 21-гидроксилазы отмечаются нормальный электролитный баланс, нормальный уровень кортизола и альдостерона.

Для **диагноза** новорожденных решающее значение имеет обнаружение гипонатриемии, гиперкалиемии, повышение 17-КС (17-кетостероидов) и NaCl в моче, отсутствие нарушенияходимости пилорического отдела желудка.

3. Болезни с нетрадиционным типами наследования

Это группа моногенных наследственных заболеваний, наследование которых не подчиняется законам Менделя. Данные болезни экспансии нуклеотидов, обусловленные динамическими мутациями, митохондриальные заболевания, болезни геномного импринтинга и болезни, обусловленные другими нарушениями эпигенетической регуляции работы генов, связанной не со структурными нарушениями генома, а с изменениями регуляции генной активности.

3.1. Болезни экспансии нуклеотидных повторов (БЭНП)

Экспансия повторяющихся последовательностей или динамические мутации – новый класс патогенных мутаций у человека, впервые описанный в 1991 г. Это достаточно большой класс наследственных заболеваний, характеризующийся *увеличением числа копий тандемных повторов в регуляторной или в транслируемых областях генов*. Нуклеотидные повторы располагаются в разных областях генов, в том числе в промоторной области гена, транскрибируемых, но нетранслируемых областях гена (5', 3'-области), в экзонах и интронах. Последовательности ДНК разнообразны по спектру: ди-, три-, тетра-, пента-, гекса- и полинуклеотидные. В экзонах обнаруживаются чаще три- и гексануклеотидные последовательности. В норме нуклеотидные повторы полиморфны по числу содержащихся в них копий повторов, они обнаруживаются в генах нормальных индивидов. Однако при увеличении числа повторов выше крайнего значения нормы человек заболевает. Такой тип мутаций обнаружен пока только в генах человека. В настоящее время насчитывается более 20 болезней экспансии, подавляющее большинство из них связаны с экспансией тринуклеотидных повторов.

Возникновение динамических мутаций – *двуступенчатый процесс*. На *первом этапе* происходит увеличение количества повторов выше характерного для популяции уровня при прохождении клетки через мейоз. Для одних заболеваний характерно увеличение количества повторов в мейозе женских половых клеток, для других – в мужских, для третьих – такой зависимости не выявлено. Таким образом, на *первом этапе* возникает аллель гена, содержащий увеличенное по сравнению с нормой количество тринуклеотидных повторов, но не достаточное для возникновения заболевания. Это состояние принято называть *премутацией*. Содержащий такую «премутацию» аллель становится нестабильным, что в ряде случаев приводит к *возникновению полной мутации* – увеличению количества повторов до критического уровня, необходимого для развития заболевания.

Общие клинико-генетические характеристики БЭНП:

– **Антиципация**, то есть *утяжеление клинических проявлений заболевания* из поколения в поколение в пределах одной родословной. Феномен антиципации объясняется нарастанием

количества тринуклеотид-ных повторов в цикле мейотических и митотических клеточных делений. Для одних заболеваний, например хорей Гентингтона, антиципация наблюдается при передаче заболевания *от отца* к детям (увеличение количества повторов в мужском мейозе), для других, например, миотонической дистрофии, – при передаче гена *через матерей* (появление более протяженной экспансии в женском мейозе).

– **Корреляция** между тяжестью клинических проявлений и количеством тринуклеотидных повторов.

– **Парадокс Шермана** – возможность увеличения количества пораженных лиц в каждом последующем поколении в зависимости от того, кто из родителей передал мутацию потомкам. Этот феномен обусловлен наличием здоровых носителей «премутации» в семье.

Различия БЭНП, обусловленные типом и локализацией нуклеотидных повторов в структуре гена:

Первая группа – болезни, при которых экспансия тринуклеотидных повторов возникает *в транслируемой* части гена. Например, экспансия CAG-повторов, кодирующих глутамин, приводит к включению в структуру экспрессируемого им белка *полиглутаминового трека* (выявляемого при электрофорезе). Экспансия тринуклеотидных повторов при этой группе заболеваний относительно невелика, их количество у больных колеблется от 40 до 80. При этом транскрипция и трансляция мутантных генов не нарушена, а патология возникает, по-видимому, в результате неправильного функционирования увеличенного в размере белка. Продукты экспрессии этих генов обнаружены в различных тканях и органах. Заболевания этой группы, описанные в настоящее время, представляют собой наследственные нейродегенерации, характеризующиеся поздним началом и неуклонным прогрессированием. К таким заболеваниям относится хорей Гентингтона.

Вторую группу составляют заболевания, при которых экспансия тринуклеотидных повторов возникает в *нетранслируемой* части гена. В этом случае для появления клинических симптомов необходима большая, чем в первой группе, экспансия повторов (от нескольких сотен до нескольких тысяч), а характер клинических проявлений зависит от функции мутантного

белка. Резкое увеличение количества тринуклеотидных повторов делает ген нестабильным, что приводит к возникновению феномена антиципации в родословных больных. К заболеваниям этой группы относят синдром **Мартина–Белл**.

Клинико-генетические особенности некоторых БЭНП

Хорея Гентингтона – тяжелое нейродегенеративное заболевание. Тип наследования аутосомно-доминантный с полной пенетрантностью мутантного гена. Ген картирован в 4 хромосоме (4p16), содержит 67 экзонов и кодирует **белок гентингтин**.

Причиной заболевания являются относительно небольшие экспансии **CAG**-повторов, локализованных в *кодирующей* области гена. В первом экзоне гена у здоровых людей обнаруживается от 3 до 32 **CAG**-повторов. Заболевание возникает при увеличении количества таких повторов до 36–180. Экспансия тринуклеотидных повторов происходит во время мужского гаметогенеза, то есть антиципация аллеля происходит во время сперматогенеза. Возраст начала болезни коррелирует с количеством повторов. **CAG**-триплет кодирует глютамин. Поэтому в каждом из соответствующих этим генам белков имеется цепочка из последовательно расположенных глютаминов – полиглютаминовый трек. Болезнь развивается тогда, когда длина этого полиглютаминового трека становится больше допустимой нормы. Оказалось, что удлинненные полиглютаминовые треки сами по себе или в составе полипептидных цепей способствуют агрегации белков в нейрональных клетках с образованием нерастворимых комплексов. По мере накопления этих белковых агрегатов происходит гибель нейронов по типу апоптоза. Этот процесс носит медленно прогрессирующий характер. Клинически нейродеградация проявляется тогда, когда погибает около 70 % нейронов определенного типа. Дальнейшее развитие заболевания идет очень быстро, так как в оставшихся 30 % нейронах также произошло накопление нерастворимых белковых комплексов, что и приводит к их резкой деградации. Поэтому для всех нейродегенеративных заболеваний, обусловленных удлиннением полиглютаминовых треков, характерны поздний дебют и тяжелое течение, достаточно быстро приводящее к летальному исходу. Признаки классического варианта хореи Гентингтона возникают на 4–5 десятке жизни; заболевание характеризуется гиперкинезами, деменцией и психиче-

скими нарушениями. Болезнь прогрессирует, приводя к смерти больных спустя 15–20 лет.

Другой вариант болезни (10 % от всех случаев) возникает в молодом возрасте (в 1–2 десятилетия жизни).

Диагностика проводится на основании клинических проявлений и молекулярно-генетического анализа.

Синдром ломкой X-хромосомы, или синдром Мартина–Белл. Синдром описан в 1943 г. J. Martin и J. Bell, а его детальная характеристика дана J. Cantu и соавт. в 1976 г. Это самый распространенный синдром, сопровождающийся умственной отсталостью у мужчин. Частота в различных популяциях колеблется от 1:1000 до 1:2000 новорожденных мальчиков, то есть это вторая по встречаемости форма умственной отсталости после синдрома Дауна.

Основной фактор заболевания – увеличение количества тринуклео-тидных **CGG**-повторов в промоторной области гена **FMR1** (fragile mental retardation), содержащего 17 экзонов и локализованного в хромосоме **Xq27.3**.

У здоровых индивидов число этих повторов в X-хромосоме колеблется от 6 до 54, а увеличение этого числа свыше 200 повторов приводит к феномену ломкой X-хромосомы и клиническому проявлению заболевания. **Премутационное** состояние – количество повторов **CGG** от 55 до 200: заболевание у таких людей в типичной форме не проявляется, но высока вероятность того, что оно проявится у их потомков. Носители премутации имеют повышенный риск рождения больного ребенка с полной мутацией в гене, приводящей к возникновению клинических признаков синдрома Мартина–Белл.

Для синдрома Мартина–Белл характерны варьирующая экспрессивность, неполная пенетрантность и доминантный характер наследования. При наследовании синдрома Мартина–Белл **экспансия** тринуклеотидных повторов происходит во время женского гаметогенеза. Переход от состояния премутации к полной мутации возможен только при передаче гена от матери, то есть «утяжеление» (антиципация) аллеля происходит во время овогенеза.

Увеличение количества **CGG**-повторов выше определенного уровня приводит к возникновению **гиперметилирования** всей **GC**-насыщенной регуляторной (промоторной) области гена и вызывает полный блок его транскрипции.

Ключевым звеном патогенеза следует считать гиперметилирование гена, что приводит к снижению уровня его транскрипции. Показано, что основным патогенетическим механизмом классического варианта заболевания служит отсутствие белка **FMR1**. Показано, что этот белок в качестве нейромедиатора участвует в работе синапсов.

Клинические проявления заболевания характеризуются триадой признаков: олигофренией (IQ больных составляет 35–50); дисморфией (прогнатизм, оттопыренные уши); макроорхизмом, выявляемым после периода полового созревания.

Главным симптомом синдрома является интеллектуальное недоразвитие и своеобразная речь. Такие больные говорят быстро, сбивчиво, имеются выраженные эхолалии и персеверации (бормочущая речь). Также могут быть нарушения поведения в виде агрессивности, двигательной расторможенности. В качестве одной из частых психопатологических особенностей отмечена шизофреноподобная симптоматика, включающая в себя подпрыгивания, похлопывания руками, повороты вокруг своей оси, встряхивание кистями, «манежный» бег, разнообразные гримасы, монотонное хныканье. Кроме вышеописанного у таких детей могут быть признаки раннего детского аутизма.

Диагностика синдрома Мартина–Белл:

– **цитогенетический метод**. Ломкий участок X-хромосомы в дистальном конце длинного плеча обнаруживается в среде бедной фолатами. При культивировании лимфоцитов больных мужчин в среде, лишенной фолата, в них обнаруживаются цитогенетические изменения в виде перетяжек района 27–28 длинного плеча X-хромосомы. Данный цитогенетический феномен получил название фрагильности (ломкости) X-хромосомы и он служит цитогенетическим маркером заболевания – **marXq28**. Эта аномалия, хотя и в меньшей степени, выявляется также у женщин – носительниц мутантного аллеля.

– **молекулярно-генетический** (ПЦР) В настоящее время, благодаря молекулярно-генетическим методам, стала возможной эффективная профилактика повторных случаев заболевания в отягощенных семьях. Молекулярный анализ позволяет диагностировать синдром ломкой X-хромосомы не только при наличии клинических проявлений заболеваний, но и выявлять носителей «премутации» среди родственников больных.

Миотоническая дистрофия

В основе развития **миотонической дистрофии** лежит другая динамическая мутация – **экспансия CTG-повтора**, локализованного в **3'-нетранслируемой области гена DM** (*myotonic dystrophy gene*), 19 хромосома. Болезнь дебютирует иногда в детском возрасте, но чаще во втором-третьем десятилетии жизни с признаками миотонического спазма и затруднений в разгибании пальцев рук при резких движениях. Течение болезни неуклонно прогрессирующее. Первыми слабеют мышцы лица, особенно круговая мышца глаз, века, жевательные мышцы. А также сгибатели шеи и некоторые мышцы конечностей. Слабость и атрофии мышц возникают одновременно. На ладонях они приводят к своеобразной «обезьяньей лапе». Типичны наличие катаракты и различная степень интеллектуальной недостаточности.

В разных популяциях заболевание встречается с частотой 1 на 8–40 тысяч, наследуется по аутосомно-доминантному типу. Во многих семьях наблюдается антиципация как по дебюту, так и по тяжести течения. Мужчины болеют в 3 раза чаще, чем женщины.

Ген *DM* расположен в области **19q13.2-3**. В норме число *CTG*-триплетов варьирует от **5 до 30-37**. У больных миотонической дистрофией количество *CTG*-триплетов значительно больше и составляет не менее 50 при наиболее мягких формах болезни, от 100 до 1000 у пациентов с классическим течением и дебютом во взрослом возрасте, в то время как при врожденных формах заболевания, оно может достигать 3000.

Наиболее вероятным патогенетическим механизмом миотонической дистрофии является локальное нарушение структуры хроматина в области локализации удлинённого *CTG*-повтора.

3.2. Митохондриальные болезни

Митохондриальная ДНК (мтДНК) представляет собой полуавтономную генетическую систему, работающую под контролем ядерной ДНК. Это кольцевая ДНК, имеющая размер в **16 569 н. п.**

В настоящее время описаны особенности строения и функционирования мтДНК (их не менее 10), отличающиеся от ядерной ДНК. Назовем некоторые из них:

Во-первых, мтДНК поступает в клетку исключительно по материнской линии.

Во-вторых, мтДНК подвергается репликативному отбору как при митозе, так и при мейозе. Поэтому в одной клетке обнаруживается смесь мутантной и нормальной мтДНК (**гетероплазмия**). В ходе митотического и мейотического цитокинеза доля и той, и другой мтДНК значительно варьирует в дочерних клетках, вплоть до образования в них **гомоплазмии**.

Названные механизмы имеют большое значение в развитии митохондриальных болезней, при которых расстройства энергетического метаболизма в клетках прямо пропорциональны доле мутантных копий мтДНК в митохондриях; она составляет от 0 до 100 %.

В-третьих, для мтДНК характерен феномен пороговой экспрессии (доля мутантных копий) в той или иной ткани. Пороговая экспрессия наиболее высока в нервной ткани, поперечно-полосатых мышцах, сетчатке глаз, островках Лангерганса и других тканях.

Митохондриальные болезни. Общие данные

Митохондриальные болезни (МТБ) – это обширная группа заболеваний, обусловленных разобщением процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях. Поэтому их часто называют болезнями окислительного фосфорилирования или ОХРНOS-болезнями. Среди МТБ выделяют четыре класса, включая один класс ненаследственных (приобретенных) и три класса наследственных МТБ.

Первый класс – приобретенные болезни, связанные с токсическим действием на митохондрии.

Второй класс – болезни, обусловленные дефектами ядерной ДНК: дефицит субстратов транспорта; дефицит субстратов утилизации; нарушение цикла Кребса; нарушение процессов окисления и фосфорилирования; дефекты дыхательных цепей; дефекты белков, импортируемых в митохондрии.

Третий класс – болезни, обусловленные дефектами мтДНК: точковые мутации генов, кодирующих структурные белки; большие по размерам делеции генов структурных белков.

Характерной особенностью МТБ у детей является отсутствие какой-либо симптоматики в первые годы жизни, что объясняется гетероплазмией или одновременным присутствием

в клетках растущего организма сотен митохондрий, содержащих как нормальную, так и мутантную мтДНК. С возрастом количество мутантной мтДНК в клетках нарастает, и когда оно достигает некоего «порогового уровня», энергетический метаболизм таких клеток уже не обеспечивает потребности энергоемких тканей и органов в АТФ, что ведет к их дегенерации и появлению ОХРНOS-болезней.

Причины МТБ хорошо изучены: это точковые мутации и обширные делеции в мтДНК или ядерной ДНК, в которой возникают межгеномные сигнальные эффекты, прямо или косвенно приводящие к феномену деплеции или истощения митохондрий.

Основные симптомы МТБ связаны с поражением нервной системы, что обусловлено высокой потребностью в энергии нервной ткани и высокой чувствительностью нейронов к недостатку их энергоснабжения. Характерны раннее начало болезни на втором-третьем году жизни ребенка, прогрессирующее течение и вовлечение многих систем организма.

Митохондриальный тип наследования называют еще материнским. Известно, что около 5 % ДНК находятся в митохондриях. Митохондрии наследуются ребенком от матери с цитоплазмой ооцитов, все дети больной женщины унаследуют заболевание независимо от пола ребенка. Мужские половые клетки (сперматозоиды), хотя и содержат очень небольшое количество митохондрий, обеспечивающих их подвижность, но не передают их потомству. Поэтому все митохондрии плода, независимо от его пола, имеют материнское происхождение. Пораженные девочки, выходя замуж, будут рожать только больных детей, тогда как у больных мужского пола все дети будут здоровы. Таким образом, женщина передает свой генетический материал не только через хромосомы, которые находятся в ядре клетки, но и с цитоплазматической митохондриальной ДНК (мтДНК), причем с равной вероятностью как мальчикам, так и девочкам.

В мтДНК, состоящей из 16569 нуклеотидов, содержится более 20 генов тРНК, 2 гена рРНК и 13 генов, кодирующих различные субъединицы комплексов окислительного фосфорилирования. 56 субъединиц этих комплексов кодируются ядерными генами. Изменения митохондриального генома приводят к нарушениям пируватдегидрогеназного комплекса, дефектам ферментов дыхательной цепи, бета-окисления и цикла Кребса.

В клинической картине митохондриальных заболеваний ведущими являются тяжелые поражения ЦНС, органов зрения, сердца и мышц.

Особенности митохондриальных болезней:

– **материнский тип передачи.** Все мтДНК имеют материнское происхождение;

– **феномен гетероплазии.** Клетки больного имеют нормальные и мутантные митохондрии, которые распределяются случайно при делении клетки;

– зависимость тяжести клинического проявления от характера мутации, вызывающей повреждения;

– зависимость клинического проявления заболевания от энергетической потребности органов и тканей. По чувствительности к энергопотреблению органы можно расположить в порядке убывания: ЦС → скелетные мышцы → сердечная мышца → почки → печень → эндокринная система.

– **высокая частота спорадических случаев.** Показано, что одна из причин слабости сердечной мышцы у людей с 24-летнего возраста являются мутации, прежде всего, делеции в митохондриальном геноме.

Основные типы мутаций в мтДНК – крупные делеции и точковые мутации структурных генов.

Клинико-генетические особенности основных митохондриальных заболеваний

Синдром Лебера – наследственная атрофия зрительного нерва, часто сочетается с неврологической симптоматикой в виде ранней дистонии, периферической полиневропатии, тремора, атаксии. Заболеванию могут сопутствовать головные боли и сердечная аритмия. Причина – мутации в одном из 7 генов NADH-дегидрогеназы комплекса I дыхательной цепи митохондрий. Наиболее частыми при синдроме Лебера являются нуклеотидные замены в положениях 11778, 3460, 15257 и 14484 мтДНК.

Синдром Кернс–Сейра. Большинство случаев обусловлено крупными делециями в мтхДНК. **Симптомы** – **офтальмоплегия**, характеризующаяся опущением верхнего века (птозом) и ограничением движения глаз; прогрессирующая **слабость мышц** конечностей; 3) **дегенерация сетчатки.**

По мере прогрессирования болезни к описанным симптомам присоединяются признаки поражения сердца, глухота, эндо-

кринные нарушения. Смерть наступает через 10–20 лет в результате поражения сердечно-сосудистой системы.

Синдром Пирсона – характерно наличие крупных делеций в мтх ДНК, локализованных преимущественно в мтохондриях клеток костного мозга. Клинические проявления возникают в первые дни после рождения и характеризуются злокачественной анемией, в ряде случаев панцитопенией (угнетением всех кроветворных ростков костного мозга) и инсулинзависимым сахарным диабетом. Больные погибают в первые 1–2 года жизни.

Вероятность наследственной передачи митохондриальных болезней от больной матери детям зависит от уровня гетероплазмии и при гомоплазмии она достигает 100 %.

3.3. Генетический импринтинг

Термин «импринтинг» впервые предложил американский генетик Х. Кроуз в 1960 г. для описания элиминации отцовских хромосом у насекомых.

Импринтинг – запечатление, широко распространенный феномен реактивного научения в живой природе. Классическим примером импринтинга могут служить поведенческие акты выводковых птиц: выращенные в течение первой недели жизни в изоляции от сородичей птенцы, предпочитали в будущем следовать за людьми, а не за взрослыми особями своего вида.

Геномный импринтинг – различная экспрессия у потомства гомологичных генов, полученных от отца или матери. Геномный импринтинг – широко распространенное явление, состоящее в том, что некоторые гены в половых клетках родителей особым образом «метятся», например, путем метилирования цитозиновых оснований. «Помеченный» ген у потомства просто не работает. Некоторые гены отключаются в сперматозоидах, другие в яйцеклетках. В результате часть признаков потомство наследует только от матери (если соответствующие гены отключены в сперматозоидах), часть – только от отца (если ген отключен в яйцеклетке). В половых клетках потомства старые метки удаляются и заменяются новыми. Поэтому у внуков могут проявиться признаки деда или бабушки, которые не были выражены у родителей.

Импринтинг – это пример так называемой «**эпигенетической**», или надгенетической наследственности, то есть наслед-

ственных свойств, не связанных с изменением основной структуры генов – последовательности нуклеотидов в молекулах ДНК. Физически он обычно представляет метилирование отдельных нуклеотидов и/или модификацию белков, связанных с ДНК. Ставится эта метка в момент формирования половых клеток – сперматозоидов и яйцеклеток.

Следствием геномного импринтинга является различное течение заболевания в зависимости от прохождения мутантного аллеля через мужской или женский гаметогенез. Для болезней геномного импринтинга характерным является разное клиническое проявление генетических нарушений, затрагивающих один и тот же район генома, в зависимости от того, имеют они материнское или отцовское происхождение. Полученные к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что феномену геномного импринтинга подвержены участки многих хромосом человека – 1, 5, 6, 7, 11, 13, 15, 19, 20, X-хромосома (рис. 1)

Геномный импринтинг у млекопитающих (различия в степени метилирования отцовских и материнских аллелей гена) может обусловить функционирование только одного из аллелей (неметилированного или неометилированного). Дефект функционирующего аллеля приводит к наследственным заболеваниям. Классическим примером такого наследования являются синдромы Ангельмана и Прадера–Вилли, связанные с различными вариантами метилирования отцовских и материнских аллелей двух генов, расположенных близко друг к другу на длинном плече хромосомы 15.

Синдром Прадера–Вилли связан с инактивацией генов хромосомы **15q11 -13**, в 75 % случаев с делецией критического района хромосомы 15 *отцовского происхождения*, а в остальных 25 % наблюдаются однородительские дисомии материнского происхождения. И в том и другом случае инактивированными оказываются гены отцовского происхождения, локализованные в области 15q11-13.

Клиника: малый вес при рождении, мышечная гипотония, психомоторное развитие замедлено, у многих приступы апноэ во сне. После 6 месяцев наблюдается гиперфагия (повышенный аппетит), что приводит к ожирению. У многих развивается сахарный диабет, наблюдается снижение чувствительности к бо-

ли, половое развитие отстает от нормы, олигофрения разной степени выраженности.

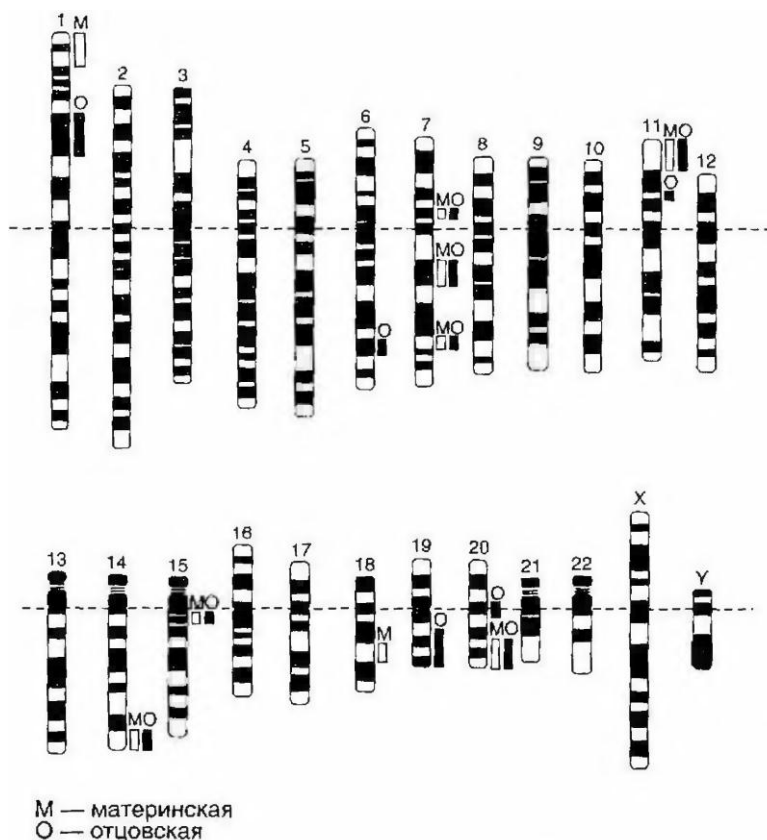


Рис. 1. Карта импринтированных генов генома человека. Хромосомные регионы, содержащие один ген или более, экспрессируемые только с материнской копии, отмечены белым; регионы, содержащие один или более генов, экспрессируемых только с отцовской копии, отмечены темным. Некоторые регионы содержат кластеры импринтированных генов: материнский импринтинг (экспрессируется только отцовский аллель) и отцовский импринтинг (экспрессируется только материнский аллель)

Синдром Ангельмана – аномалия того же участка 15q11-13, однако локализованного в материнской хромосоме. Причиной

развития синдрома Ангельмана в 68 % является делеции в области 15q11-13 материнского происхождения, в 7 % – однородительские дисомии отцовского происхождения, в 11 % – мутации гена *UBE3A (ubiquitin-protein ligase E3A)*, локализованного в том же цитогенетическом районе, 3 % – инактивация импринтингового центра и в остальных случаях причины не установлены. Но во всех случаях, когда причины известны, они связаны с инактивацией генов материнского происхождения, локализованных в импринтинговой области.

Синдром Ангельмана проявляется грубой задержкой психомоторного развития, выраженной олигофренией с недоразвитием речи. Больные поздно начинают ходить, и их походка напоминает движения куклы. Типичным являются приступы насильственного смеха, поэтому заболевание называют «синдромом лица счастливой куклы».

Таким образом, оба синдрома обусловлены нарушением эпигенетического контроля экспрессии генов, локализованных в цитогенетической области, подвергающейся геномному импринтингу.

Синдром Тернера. Другим ярким примером роли геномного импринтинга служит **синдром Тернера**, при котором, наряду с инактивацией практически всей X-хромосомы, у женщин наблюдается и родительский импринтинг отдельных генов X-хромосомы. Так, импринтингу подвергается ген человека, определяющий социальные контакты. Нарушение гена приводит к аномалии в поведении и к снижению величины IQ.

Больные с синдромом Тернера получают единственную X-хромосому либо от отца, либо от матери. Оказалось, что пациенты с X-хромосомой, полученной от отца, имеют существенно *меньше аномалий* в социальном поведении, они менее подвержены аутизму – уходу в себя, неспособности контактировать с внешним миром. Несомненно, велико влияние окружения и приобретенных навыков обучения, однако проведенный статистический анализ указывает на генетическую природу выявленных различий.

Сопоставление результатов психологических тестов с материнским или отцовским происхождением X-хромосомы у больных с синдромом Тернера позволило заключить, что в X-хромосоме

человека расположен ген, подвергающийся родительскому импринтингу и определяющий особенности поведения и уровень интеллекта.

Связь геномного импринтинга с другим наследственными патологиями человека на уровне хромосом или отдельных генов в настоящее время широко изучается. Так, например, при *хорее Гентингтона* и *спинно-мозжечковой атаксии I* заболевание возникает раньше и протекает тяжелее, если унаследованные гены имеют отцовское происхождение. При *нейрофиброматозе I и 2, миотонической дистрофии*, наоборот, заболевание имеет более раннее начало и тяжелое течение при унаследовании мутантных генов от матери. Не вызывает сомнения причастность геномного импринтинга к этиологии опухолевого роста.

4. Генетический контроль предрасположенности к мультифакториальной патологии

В последние годы большое внимание уделяется изучению генетических механизмов широко распространенных болезней, вносящих основной вклад в структуру заболеваемости и смертности человека. Доказана существенная роль генетических факторов в возникновении атеросклероза, гипертензии, сахарного диабета, бронхиальной астмы, различных форм рака, психических болезней и др.

Большинство заболеваний этой группы имеет *мультифакториальную природу*, то есть их клинические проявления возникают только в результате совместного действия некоторого числа генетических и средовых факторов. Такие болезни принято называть *болезнями с наследственной предрасположенностью* (БНП). Эта патология в настоящее время приобретает все большее значение для практического здравоохранения, так как в среднем около 10 % населения страдает болезнями с наследственной предрасположенностью.

В большинстве случаев наследственная предрасположенность формируется специфической комбинацией аллелей нескольких генов, вносящих вклад в развитие клинических проявлений болезни. *Гены могут контролировать болезнь в форме аддитивного (суммарного) действия, либо один из генов окажется главным, а остальные будут иметь модифицирую-*

щее влияние. Механизм развития заболеваний, обусловленных аддитивным действием генов, может быть описан с помощью различных моделей, главная из которых – **полигенная модель с пороговым эффектом**. Предполагается, что существует непрерывный ряд значений таких признаков, которые можно измерить у больных и здоровых людей. В этом случае **термином «порог» обозначают определенную границу в кривой распределения, за которой располагаются больные индивиды**. Заболевание возникает в том случае, когда совокупность наследственных и средовых факторов приводит к нарушению гомеостаза и превышению этого «порога», в результате чего возникает заболевание.

В последние годы в результате интенсивного развития молекулярно-генетических методов удалось идентифицировать гены, мутации в которых вносят существенный вклад в предрасположенность к развитию различных мультифакториальных болезней. При анализе ряда БНП можно говорить об эффекте «главного гена», однако считают, что наличие данного гена необходимо, но недостаточно для развития заболевания. В качестве примера можно привести значительный вклад двух генов *BRCA1* и *BRCA2* в предрасположенности к семейным формам рака молочной железы.

4.1. Клинико-генетические особенности некоторых болезней с наследственной предрасположенностью

В настоящее время картировано множество локусов, обнаруживающих сцепление с рядом таких широко распространенных БНП, как бронхиальная астма, атеросклероз, гипертензия, и др. Однако до настоящего времени ни при одном мультифакториальном заболевании не удалось выявить все гены, участвующие в формировании генетической предрасположенности. Это связано с существованием сложной цепи патогенеза болезней с наследственной предрасположенностью.

Артериальная гипертензия (АГ) – гетерогенная группа заболеваний, основным клиническим проявлением которых является повышение уровня артериального давления и связанные с этим осложнения (инфаркты, инсульты, почечная недостаточность). К настоящему времени известно более 100 генов, про-

дукты которых могут прямо или косвенно участвовать в сложном патогенезе различных форм АГ. Прежде всего, это компоненты ренин-ангиотензиновой и калликреин-кининовой систем; продукты, обеспечивающие поддержание сосудистого тонуса (эндотелины, синтазы закиси азота, компоненты кальциевых каналов) и структуры сосудов (эластин, фибриллин, коллаген-связывающий белок); рецепторы адренергической системы (например, дофамина); продукты метаболизма стероидных гормонов (11- β -гидроксилазы, 17- α -гидроксилазы и др.) и водно-солевого гомеостаза (аквапорины, рецепторы вазопрессинов, ионные каналы).

Атеросклероз. Показано, что ряд генов, формирующих предрасположенность к гипертензии, вносят вклад в этиологию другого широко распространенного заболевания – **атеросклероза**. Это связано со сходством ряда патогенетических механизмов данных заболеваний, в частности обусловленных нарушением функционирования ренин-ангиотензиновой, калликреин-кининовой систем. Однако ведущее значение в патогенезе атеросклероза отводится повышению концентрации липидов в плазме крови, нарушению процессов свертывания крови и целостности сосудистой стенки. В связи с этим в качестве основных генов кандидатов рассматриваются гены, продукты которых обеспечивают липидный обмен.

Бронхиальные болезни (ББ). Количество генов, контролирующих развитие и функционирование бронхолегочной системы человека, достигает 2000. Связанные с этими генами бронхолегочные болезни выявляются у 60 % пациентов пульмонологических стационаров. На долю моногенных болезней бронхов и легких приходится от 5 до 35 % контингента больных с специфическими болезнями легких.

Вместе с тем гетерозиготные носители генов этих ББ являются, как правило, практически здоровыми людьми, но при воздействии на них и их потомство неблагоприятных экологических и социальных факторов у них наблюдается повышенный риск развития бронхолегочной патологии. Одной из частых причин развития такой патологии служит **недостаточность альфа-1-антитрипсина**, которая может проявиться как самостоятельное моногенное заболевание или стать ведущим клиническим симптомом при таких ББ, как бронхиальная астма, хроническая эмфизема легких и хронические бронхиты.

В настоящее время выявлен ряд генов, обнаруживающих сцепление с другими распространенными мультифакториальными заболеваниями, такими как ревматоидный артрит, рассеянный склероз, остеопороз, ожирение, эндометриоз, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки и др. Однако, пока ни для одного заболевания с наследственной предрасположенностью невозможно выделить спектр генов для скрининга на предрасположенность.

Таким образом, в основе наследственной предрасположенности к болезням лежит широкий генетический сбалансированный полиморфизм популяций человека по ферментам, структурным и транспортным белкам. В популяциях человека не менее 25–30 % локусов (из 30 000) представлены двумя аллелями и более. Следовательно, индивидуальные комбинации аллелей невероятно многообразны. Они обеспечивают **генетическую уникальность каждого человека**, которая выражается не только в способностях, физических отличиях, но и в реакциях организма на патогенные факторы окружающей среды. **Болезни с наследственной предрасположенностью возникают у лиц с соответствующим генотипом (сочетание «предрасполагающих» аллелей) при провоцирующем действии факторов среды.** Генетические факторы предрасположенности представлены, по видимому, генами не из одной, а нескольких систем. Это так называемые **полигенные системы предрасположенности.**

5. Основные современные молекулярно-генетические методы диагностики наследственных болезней

Наследственные болезни развиваются вследствие повреждения наследственного материала на геномном, хромосомном или генном уровне. Для диагностики этих повреждений используют цитогенетические, молекулярно-цитогенетические и молекулярно-генетические методы.

С помощью молекулярно-цитогенетических методов были выявлены микроделеции, микродупликации, парацентрические инверсии, небольшие транслокации, не обнаруженные на метафазных хромосомах при кариотипическом исследовании. Благодаря этим методам была выделена группа генетических заболеваний, называемых микроделеционными синдромами. Было показано, что часть случаев синдромов Прадера–Вилли, Ангельмана, Видемана–Беквита и ряд других можно отнести к этой группе.

Для выявления точковых мутаций, небольших делеций и инсерций в исследуемых генах используется множество различных подходов, основанных на методе полимеразной цепной реакции (ПЦР), благодаря которому возможно многократно увеличить уникальную последовательность ДНК, а затем проанализировать ее на наличие или отсутствие мутации в исследуемом локусе.

Принципиально различают прямую и косвенную ДНК-диагностику моногенных наследственных болезней. **Прямые методы ДНК-диагностики** используются в случаях, когда известен ген, ответственный за возникновение наследственного заболевания и основные типы его патологических мутаций. Используются для таких заболеваний как муковисцидоз (мажорная мутация delF508), фенилкетонурия (R408W), хорея Гентингтона (экспансия CTG-повторов) и др.

При молекулярной диагностике известных мутаций, как правило, анализируют амплифицированные фрагменты геномной ДНК, предположительно содержащих мутации, а затем при необходимости секвенируют только эти участки ДНК.

Преимущество прямых методов диагностики ДНК – высокая, практически 100 %, точность диагностики и отсутствие необходимости ДНК-анализа всех членов ядерной семьи.

Основной недостаток прямых методов состоит в том, что для их применения требуется знание точной локализации патологического гена в геноме, его экзон-интронной структуры и спектра его мутаций. Такая информация на сегодняшний день доступна не для всех моногенных болезней человека.

Наиболее просто обнаруживаются мутации, изменяющие длину амплифицированных фрагментов ДНК, так как подобные нарушения легко выявляются при электрофоретическом анализе.

Большинство методов поиска и анализа мутаций основано на ПЦР-технологии с последующим электрофорезом в агарозных или акриламидных гелях.

Косвенные методы ДНК-диагностики применяют в случае, если ген, повреждение в котором приводит к заболеванию, не идентифицирован, а лишь локализован на определенной хромосоме. Косвенные методы основаны на анализе сегрегации в семье аллелей полиморфных маркеров, находящихся в том же хромосомном регионе, или тесно сцепленных с локусом заболевания. 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 сайтов такого типа показан менделевский характер наследования.

Основной недостаток косвенных методов – их не 100 % точность. К недостаткам косвенной диагностики следует отнести необходимость семейного анализа и обязательную уверенность в клиническом диагнозе. Кроме того, косвенные методы ДНК-диагностики могут быть применены только для монолокусных заболеваний и неэффективны для моногенных полилокусных болезней.

5.1. Принципы и механизмы полимеразной цепной реакции

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод амплификации ДНК *in vitro*, с помощью которого в течение нескольких часов можно выделить и многократно размножить определенную последовательность ДНК. Возможность получения огромного количества копий одного строго определенного участка генома значительно упрощает исследование имеющегося образца ДНК.

В основе метода ПЦР лежит природный процесс – комплементарное достраивание ДНК.

Основные компоненты реакционной смеси. Для инициации полимеразной реакции в заданных участках ДНК используют две олигонуклеотидные затравки, называемые **праймерами** (англ. primer). **Праймеры** – синтетические олигонуклеотиды, состоящие из 15–30 оснований. Праймеры комплементарны последовательностям ДНК на «левой» и «правой» границах специфического фрагмента и ориентированы таким образом, что достраивание новой цепи ДНК в последовательных циклах ПЦР протекает только между ними (рис. 2). Праймер к 5'-концу гена называют прямым (forward, For), к 3'-концу гена – обратным или встречным (reverse, Rev).

Правильно подобранные праймеры обеспечивают специфичность и чувствительность тест-системы и должны отвечать ряду критериев:

- Быть специфичными. Особое внимание уделяют 3'-концам праймеров, так как именно с них Таq-полимераза начинает достраивать комплементарную цепь ДНК. Если их специфичность недостаточна, то высока вероятность, что в пробирке с реакционной смесью будут происходить процессы неспецифического связывания, а также синтеза фрагментов различной длины, отличных от искомым.

- Не должны образовывать димеры и петли, то есть не должны образовываться устойчивые двойные цепи в результате отжига (комплементарного присоединения) праймеров самих на себя или друг с другом.

- Область отжига праймеров должна находиться вне зон мутаций, делеций или инсерций в пределах видовой или иной специфичности, взятой в качестве критерия при выборе праймеров. При попадании на такую зону, отжиг праймеров не происходит и, как следствие, возникает ложноотрицательный результат.

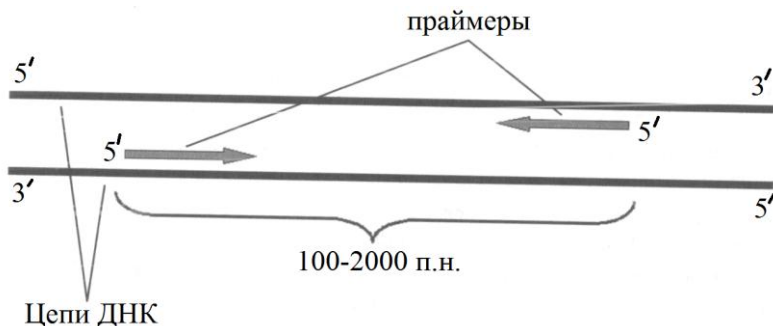


Рис. 2. Расположение праймеров на ДНК-матрице

Тaq-полимераза – термостабильный фермент, обеспечивающий достраивание 3'-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности. В настоящее время в ПЦР в подавляющем большинстве случаев используют ДНК-полимеразу термофильной бактерии *Thermus aquaticus* (Тaq-полимераза), выделенную и охарактеризованную в 1980 г. советскими учёными А. С. Калединым, А. Г. Слюсаренко и С. И. Городецким из ВНИИ генетики. Важнейшими свойствами Тaq-полимеразы, позволяющими использовать ее в ПЦР, являются: 1) температурный оптимум реакции, направляемой Тaq-полимеразой, который находится в районе +70–72 °С; 2) важное свойство то, что данная полимераз не инактивируется после длительной инкубации при +95°С.

Используя Тaq-полимеразу, удалось решить сразу две проблемы:

Во-первых, термостабильная полимераз не инактивируется на этапе денатурации ДНК, поэтому нет необходимости после каждо-

го цикла реакции добавлять новую порцию фермента. Это упрощение процедуры позволило автоматизировать проведение ПЦР.

Во-вторых, высокий температурный оптимум реакции, катализируемой Taq-полимеразой, позволяет подбирать жесткие температурные условия отжига, обеспечивающие гибридизацию праймеров только в заданном районе изучаемого генома, что существенно повышает специфичность и чувствительность метода.

Однако у Taq полимеразы есть и свои недостатки, например, сравнительно низкая точность, а также способность добавлять аденозинмонофосфаты к 3'-концу ДНК.

Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) – дезоксиаденозин-трифосфата (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфата (дГТФ), дезоксицитозин-трифосфата (дЦТФ) и дезокситимидинтрифосфата (дТТФ) – «строительный материал», используемый Taq-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК.

Буфер – смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающей оптимальные условия для реакции, а также стабильное значение pH.

Анализируемый образец – подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, который может содержать искомую ДНК, служащую мишенью для последующего многократного копирования. При отсутствии ДНК-мишени специфический продукт амплификации не образуется.

ПЦР включает три циклически повторяющиеся стадии реакции, протекающие при различных температурах (рис. 3):

1) стадию денатурации цепей ДНК – расплетение двойной спирали и расхождение полинуклеотидных цепей (94–95 °C);

2) стадию отжига праймеров (50–60 °C) – гибридизацию праймеров и одноцепочечной ДНК-мишени;

3) стадию элонгации цепи ДНК (72–75 °C).

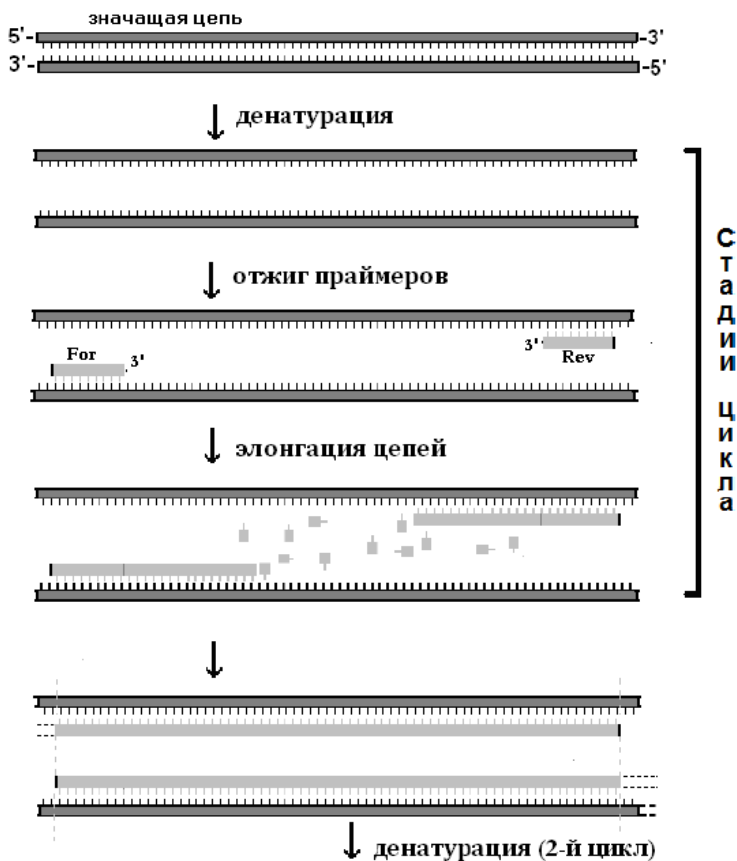


Рис.3. Стадии ПЦР

В ходе одного цикла ПЦР количество фрагмента, ограниченного местами отжига праймеров, увеличивается в два раза. За N циклов реакции количество амплифицируемого фрагмента увеличивается в 2^N раз (рис. 4). Протекание ПЦР, то есть переход от стадии к стадии и от цикла к циклу, регулируется изменением температуры. Для получения достаточного количества копий искомого фрагмента ДНК амплификация включает несколько (20–40) циклов.

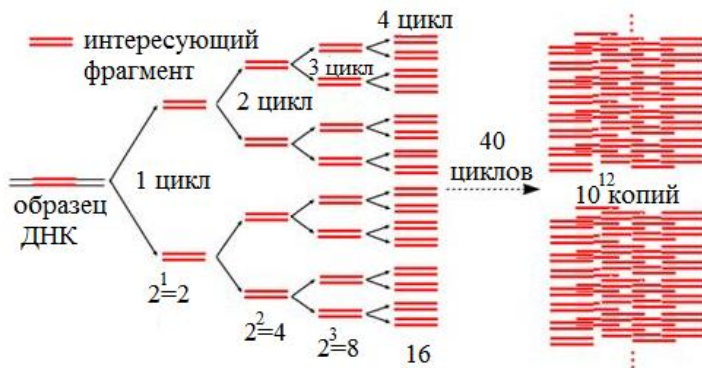


Рис. 4. Общая схема ПЦР

Помимо амплификации ДНК, ПЦР позволяет производить множество других манипуляций с нуклеиновыми кислотами (введение мутаций, сращивание фрагментов ДНК) и широко используется в биологической и медицинской практике, например, для диагностики заболеваний (наследственных, инфекционных), установления отцовства, клонирования генов, выделения новых генов.

Существует ряд модификаций ПЦР. Наиболее распространенными в клиничко-диагностических лабораториях модификациями ПЦР являются:

ПЦР с «горячим» стартом (hot-start PCR) – модификация, суть которой состоит в предотвращении возможности начала реакции до момента достижения в пробирке условий, обеспечивающих специфический отжиг праймеров.

Для этого полимеразная активность фермента в момент постановки ПЦР блокируется антителами или имитирующими антитела небольшими молекулами (типа Affibody) до наступления первой денатурации (проводится при $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 10 мин).

Кроме того, для предотвращения преждевременного взаимодействия фермента с компонентами реакционной смеси и, как следствие, образования неспецифических продуктов реакции до момента полного прогрева, используется легкоплавкий парафин или специальные масла, отделяющие полимеразу от реакционной смеси.

Таким образом, ПЦР с «горячим» стартом позволяет минимизировать вероятность образования неспецифических продуктов ПЦР и возможность получения ложноположительных результатов анализа.

ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР, RT-PCR) – используется для амплификации, выделения или идентификации известной последовательности РНК. На первом этапе с помощью ревертазы (обратной транскриптазы), используя в качестве матрицы мРНК, проводят синтез одноцепочечной молекулы ДНК (кДНК), которая используется для последующей ПЦР.

Возможность использования РНК в качестве мишени для ПЦР существенно расширяет спектр применения этого метода, например, геномы многих вирусов (гепатит С, вирусы гриппа, ВИЧ и др.) представлены именно РНК.

ПЦР с анализом результатов «по конечной точке» (End-point PCR) – это модификация метода ПЦР, которая позволяет учитывать результаты реакции по наличию флуоресценции после амплификации, не открывая пробирки. Таким образом, решается одна из основных проблем ПЦР – проблема контаминации ампликонами.

Одним из таких вариантов является метод «FLASH» (FLuorescent Amplification-based Specific Hybridization – специфическая гибридизация в процессе амплификации с ДНК-зондами, меченными флуорофорами).

Зонды добавляют в реакционную смесь наряду с праймерами и остальными компонентами реакции. Поскольку в структуре зонда флуорофор и гаситель находятся в непосредственной близости друг от друга, то перед началом реакции флуоресценция отсутствует.

Во время реакции зонды гибридизуются с ДНК-мишенью. На стадии элонгации Taq-полимераза разрушает зонд благодаря 5'-экзонуклеазной активности, и флуорофор оказывается свободным от гасителя. Таким образом, количество разрушенных зондов и, соответственно, уровень флуоресценции оказываются пропорциональными количеству образовавшихся ампликонов.

ПЦР в режиме «реального времени» (Real-Time PCR, ПЦР-РВ) – используется для одновременной амплификации и измерения количества искомой молекулы ДНК. Преимуществом данного подхода является возможность совмещения детекции

и количественного определения специфической последовательности ДНК в образце в реальном времени после каждого цикла амплификации.

Для этого используют флуоресцентные красители, интеркалирующие в двуцепочечные молекулы ДНК или модифицированные дезоксинуклеотиды, которые флуоресцируют после гибридизации с комплементарными участками ДНК.

Часто ПЦР в реальном времени комбинируют с ОТ-ПЦР для измерения малых количеств мРНК, что позволяет получать количественную информацию о содержании искомой мРНК в клетке и судить об уровне экспрессии гена в отдельной клетке или ткани.

Отличительными чертами ПЦР-РВ являются не только возможность количественного определения ДНК/РНК в исследуемом материале, но и отсутствие стадии электрофореза, что позволяет минимизировать риск контаминации продуктами ПЦР и таким образом резко уменьшить число ложноположительных результатов.

Мультиплексная (мультипраймерная) ПЦР – это одновременная амплификация двух и более последовательностей ДНК в одной пробирке. Преимуществом данного метода заключается в возможности выявления ряда патогенов, генетических модификаций организмов или генотипирования множественных аллелей и т. д., поместив пробу в одну пробирку.

Гетеродуплексный анализ позволяет идентифицировать мутации, находящиеся в гетерозиготном состоянии. Принцип этого метода заключается в том, что при амплификации относительно небольших фрагментов генов гетерозигот мутация может быть локализована лишь в одной из гомологичных нитей матричной ДНК. Поэтому в амплификационной смеси, наряду с двумя типами гомодуплексов, образуются гетеродуплексы между нормальным и мутантным участком цепей ДНК. Наличие в двухцепочечном фрагменте ДНК неспаренных оснований изменяет конформацию такого гетеродуплекса, что проявляется в изменении электрофоретической подвижности фрагмента при проведении гель-электрофореза, и позволяет идентифицировать мутантный компонент (рис. 5).

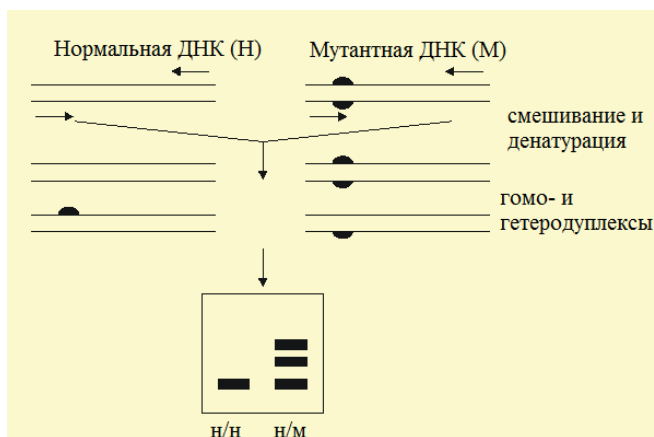


Рис. 5. Схема проведения гетеродуплексного анализа

Кроме того, возможны и другие варианты ПЦР, получившие наибольшее распространение в научно-исследовательских лабораториях.

Анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализ) (Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP analysis). ПДРФ-анализ является одним из самых первых методов генотипирования. Рестриктазы, или рестрикционные эндонуклеазы, – ферменты, обладающие эндонуклеазной активностью – узнают специфическую последовательность (сайт рестрикции) в двухцепочечной молекуле ДНК и осуществляют гидролиз фосфодиэфирных связей в обеих цепях ДНК, как правило, в пределах сайта рестрикции (реже – рядом с ним). Длина распознаваемого участка варьирует от 4 до 12 нуклеотидов. Большинство мутаций, изменяющих последовательность нуклеотидов сайта рестрикции, будет препятствовать его распознаванию рестриктазой, что отразится на картине электрофореза. При отсутствии сайта узнавания в исследуемой области ДНК размеры амплифицированного фрагмента не изменятся после его обработки соответствующей эндонуклеазой, тогда как при полном соответствии полиморфной области сайту рестрикции образуются два фрагмента меньшей длины. У гетерозигот будут присутствовать 3 фрагмента, один из которых по длине будет соответствовать размеру ампликона до рестрикции, плюс 2 маленьких

фрагмента с той же суммарной длиной. Таким образом, трем возможным вариантам генотипа будут соответствовать три различных варианта электрофореграмм.

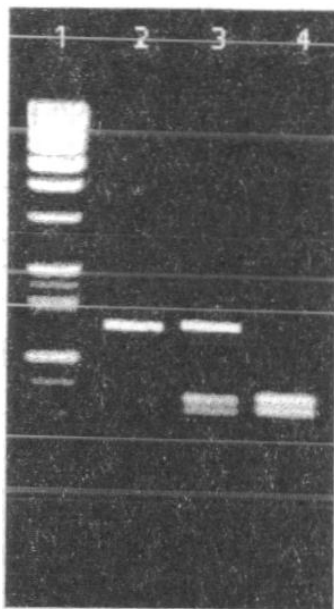


Рис. 6. Электрофореграмма результатов ПЦР-ПДРФ анализа полиморфизма С677Т гена МТНFR. Дорожки: 1 – ДНК-маркер (эквимольная смесь 20 п. н. ДНК-маркер молекулярного веса и п.н.

ДНК-маркер молекулярного веса); 2 – продукт амплификации и рестрикции ДНК индивидуума с генотипом СС; 3 – продукт амплификации и рестрикции ДНК индивидуума с генотипом ТС;

4 – продукт амплификации и рестрикции ДНК индивидуума с генотипом ТТ

Для определения размеров продуктов амплификации, длины рестрикционных фрагментов проводят электрофорез.

5.2. Электрофорез ДНК

Фрагменты ДНК разного размера, полученные при помощи набора ферментов рестриктаз, можно легко разделить с помощью метода **электрофореза в агарозном геле**. ДНК, обработанную одной или несколькими рестриктазами, вносят в лунки

застывшего агарозного геля, который помещается в камеру для электрофореза. В камере создается электрическое поле, под действием которого фрагменты ДНК перемещаются в пористом геле. ДНК имеет отрицательный заряд благодаря фосфатным остаткам нуклеотидов. Поэтому, если поместить ДНК в электрическое поле, то она будет двигаться от минуса к плюсу. Скорость продвижения фрагментов ДНК в геле зависит от их длины. Короткие фрагменты движутся быстрее, чем длинные. Это позволяет цепочкам ДНК разной длины отделиться друг от друга. При этом фрагменты ДНК не повреждаются и их можно выделить из геля без всяких повреждений и провести далее необходимые манипуляции.

Для визуализации фрагментов ДНК гель после электрофореза окрашивают специальным красителем этидиум бромидом, который связывается с ДНК, и помещают под УФ-свет. На геле будут хорошо видны окрашенные в красный цвет, расположенные на различном расстоянии друг от друга светящиеся фракции ДНК. Каждая такая фракция соответствует одному фрагменту ДНК. Длину исследуемых ПЦР фрагментов устанавливают путём сравнения с набором коммерчески доступных фрагментов ДНК, содержащих линейные фрагменты ДНК известной длины (ДНК-маркеры).

Таким образом, электрофорез в агарозном геле позволяет **разделить**, а затем **легко извлечь** любые рестрикционные фрагменты ДНК в чистом виде, для последующего использования. **Электрофорез в агарозном геле** используют для визуальной детекции ПЦР.

В настоящее время используют агарозный и полиакриламидный гель (ПААГ). Варьируя концентрацию, можно получать гели с очень широким диапазоном размеров пор. Кроме того, можно изменять электрические заряды макромолекул путем вариации рН буфера, а их конфигурацию путем введения в буфер денатурирующих агентов или детергентов. Все это придает методу электрофореза исключительную гибкость.

Агарозный гель. Агароза – это особо чистая фракция природного линейного полисахарида агара, который получают из морских красных водорослей (*Gracilaria*, *Gelidium*, *Ahnfeltia*).

При температурах 84–96 °С (а у специальных типов – уже при 70 °С) раствор агарозы переходит в прозрачную жидкость –

«плавится». При более низких температурах (36–42 °С) растворы агарозы затвердевают, образуя гель. У легкоплавких типов агарозы эта температура снижается до 30 °С. Такая особенность облегчает манипуляции с расплавленной агарозой – можно не опасаться преждевременного ее застывания в гель. Более того, расплавленную агарозу предварительно охлаждают до 50–55 °С и уже при этой температуре заливают в формы; это удобно и не связано с возникновением значительных тепловых деформаций.

Агарозные гели имеют поры большого размера и используются преимущественно для разделения больших молекул с молекулярной массой большей, чем 200 кДа.

Разделение в агарозных гелях происходит быстро, но с ограниченным разрешением, так как полосы, образующиеся в агарозных гелях, имеют тенденцию размываться/диффундировать и распространяться в стороны. Это является результатом большого размера пор и не может быть предотвращено.

Выбор концентрации агарозы, то есть пористости ее геля, диктуется размерами фракционируемых макромолекул. Средний размер пор 2 %-го геля агарозы приблизительно соответствует диаметру сферически упакованной молекулы биополимера с массой 50 млн дальтон. Гели с более высоким содержанием агарозы используют для гель-фильтрации. При электрофорезе поры геля должны быть легко проницаемы для молекул биополимеров, чтобы лишь тормозить их миграцию в электрическом поле за счет трения, поэтому для электрофореза применяют агарозные гели с концентрацией 0,4–2 %. Ниже представлены примерные концентрации гелей агарозы (в %) для разделения ДНК различных размеров (табл. 1).

Таблица 1

Рекомендуемая концентрация агарозного геля для разделения линейных молекул ДНК

Концентрация агарозы, %	Длина фрагментов ДНК, п. н.
0,75	10000–15000
1,00	500–10000
1,25	300–5000
1,50	200–4000
2,00	100–2500
2,50	50–1000

Буферы. Для электрофореза обычно применяют трис-ацетат (ТАЕ), трис-борат (ТВЕ), трис-фосфат (ТРЕ) в концентрации 50 мМ рН 7,5–8,5. Запасные растворы готовят в виде концентрированных растворов и хранят при комнатной температуре. Буфер создает и стабилизирует рН носителя и, тем самым, влияет на скорость передвижения разделяемых веществ. В буферах с высокой ионной силой скорость движения образца уменьшается, а при низкой ионной силе увеличивается. Обычно применяют буферные системы с ионной силой в диапазоне 0,05–0,1М.

Скорость движения ДНК зависит от ряда факторов: концентрации агарозы; силы тока; ионной силы буфера; напряженности электрического поля (рисунок 1). Рабочее значение напряжения и тока выбирают так, чтобы напряженность электрического поля в геле не превышала 5В/см. При этом происходит максимальное разделение фрагментов (оптимально 0,5–2 В/см).

Практические задания и указания по их выполнению

Задание 1. Забор биологического материала из буккального эпителия

Цель работы: приобрести навыки отбора биологического материала для последующего выделения ДНК.

Оборудование, приборы и материалы: физиологический раствор, дистиллированная вода, стерильный зонд (тупфер).

Проведение работы:

В качестве проб биологического материала используют буккальный эпителий, забор которого осуществляется с помощью специальных одноразовых стерильных зондов путём соскоба клеток с внутренней стороны щеки. Перед забором производится тщательное полоскание полости рта водой или физиологическим раствором.

Сбор буккального эпителия: после гигиены полости рта чистыми руками взять стерильный зонд (тупфер) и держа его за пластиковый стержень, с легким нажимом, совершая обратнопоступательные движения, потереть с внутренней стороны щечных поверхностей в течение 2–3 мин (избегая контакта с зубами и медленно поворачивая для сбора клеток) (рис. 7). Клетки с внутренней стороны щеки вместе со слюной проникают в по-

ры ваты. Запрещается прикасаться к ватному тампону или касаться им других предметов.

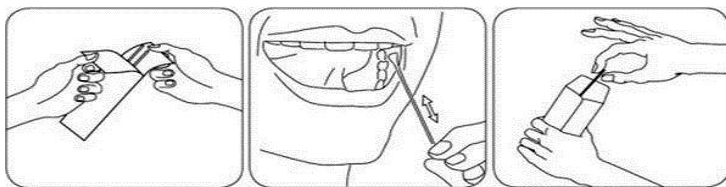


Рис. 7. Правила забора буккального эпителия

ДНК из собранных клеток должна быть выделена в течение 24 часов.

При необходимости транспортировки в ПЦР-лабораторию отобранный материал хранят при температуре 2–4 °С не более 48 ч. Транспортировка образцов осуществляется в термоконтейнерах с холодowymi элементами. При –20 °С образец может храниться в течение нескольких месяцев, а при –70 °С неограниченно долго. Неправильный забор образцов, некачественное хранение и доставка может привести как к ложноположительным, так и ложноотрицательным результатам, несмотря на безупречно проведенную процедуру анализа.

Задание 2. Выделение ДНК перхлоратным методом

Цель работы: ознакомиться с методами выделения ДНК клеток человека, выделить образец ДНК из клеток буккального эпителия.

Оборудование, приборы и материалы: вортекс, центрифуга MiniSpin, дозаторы, полимерные наконечники, пробирки (типа эппендорф) на 1,5 мл., аспиратор с колбой ловушкой FTA-1, перчатки, халат, клетки буккального эпителия.

Растворы: 1×STE буфер, 10 % р-р SDS, протеиназа К, 5М NaClO₄, хлороформ, 96 % и 70 % этанол, буфер для ДНК.

Проведение работы:

В основе метода лежит лизис клеток буккального эпителия додецилсульфатом натрия (ДСН) и деградация белков протеиназой К. Клеточный лизат обрабатывают смесью перхлората натрия, хлороформа, изоамилового спирта. Преципитацию ДНК проводят

этанолом, а затем растворяют в буфере для хранения. ДНК, выделенная данным методом, пригодна для длительного хранения.

Методика:

1. Срезать дистальный конец ватного тупфера в микроцентрифужную пробирку (типа эппендорф) объемом 1,5 мл.

2. Добавить 200 мкл 1×STE буфера, содержащего 100 Мм NaCl, 10 Мм ТРИС-НСl (рН 8,0), 1 Мм ЭДТА (рН 8,0).

3. Добавить 75 мкл 10 % раствора SDS (додецилсульфата натрия) и 11 мкл протеиназы К концентрацией 20 мг/мл. Хорошо перемешать на вортексе.

4. Пробу поместить в термостат на ночь (12–18 ч) при 37 °С.

5. В пробирку с лизатом добавить 50 мкл 5М раствора перхлората натрия (NaClO_4) и 300 мкл смеси хлороформ: изоамиловый спирт (24 части хлороформа:1 часть изоамилового спирта).

6. Тщательно перемешать на вортексе.

7. Центрифугировать 10 мин при 13000 об./мин.

8. Верхнюю ДНК-содержащую фазу (супернатант) осторожно, не затрагивая промежуточного слоя, отбирают с помощью дозатора и переносят в чистую 1,5 мл пробирку.

9. Повторить пункты 5–8.

10. В пробирку с ДНК-содержащей фазой добавляют 500 мкл 96 % этанола, встряхивают на вортексе и центрифугируют 10 мин при 13000 оборотов/мин.

11. Снимают субнатант (ДНК) в чистую пробирку и добавляют 150 мкл 70 % этанола.

12. Через 5–10 мин спирт удаляют и высушивают ДНК до прозрачного состояния.

13. После высушивания, ДНК растворяют в 30 мкл буфера для ДНК, содержащего 0,1–0,2 мМ ЭДТА, 10 мМ Трис-НСl, рН=7,5–8,0.

14. Помещают пробирку с ДНК в морозильную камеру на хранение. Следует избегать нескольких циклов замораживания-оттаивания образца, поэтому, если образец планируется исследовать неоднократно, его необходимо разделить на аликвоты в отдельных пробирках.

Задание 3. Измерение концентрации ДНК

Цель работы: научиться измерять концентрацию выделенной ДНК в растворе.

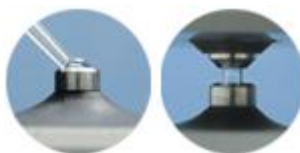
Оборудование, приборы и материалы: спектрофотометр NanoDrop 1000, штатив с наконечниками, дозатор, перчатки, емкость для отработанного материала, фильтровальная бумага, раствор ДНК с неизвестной концентрацией в буфере TE, буфер для разведения ДНК.

Проведение работы:

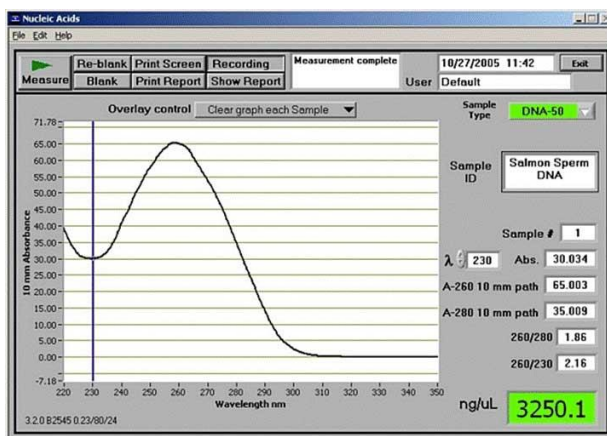
Для определения концентрации ДНК измеряют ее оптическую плотность в УФ-свете с длиной волны 260 нм. Метод определения концентрации ДНК в растворе основан на существовании у ДНК максимума поглощения при длине волны 260 нм. Это означает, что в растворах нуклеиновых кислот максимальная фотометрическая абсорбция наблюдается при 260 нм и прямо коррелирует с концентрацией.

Отношение поглощения при длинах волн 260 нм и 280 нм (260 нм/280 нм) показывает чистоту препарата ДНК или РНК. Препарат считается чистым, если отношение значений 260 нм/280 нм приблизительно равно 1,8 для ДНК ($1,8 < A_{260}/A_{280} < 2$). В случае меньших значений показателя 260нм/280нм препарат содержит большое количество примесей белка, фенола или иных контаминирующих агентов, имеющих значительное поглощение при 280 нм.

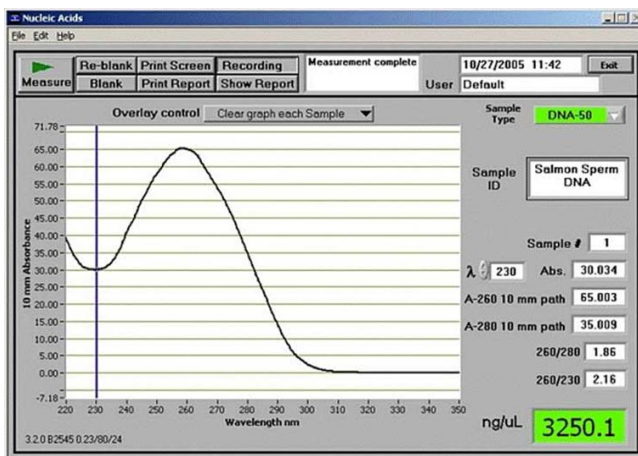
1. Взять дозатором 1 мкл буфера для разведения ДНК и поместить на линзу спектрофотометра. Одним движением опустите верхнее плечо (рычаг) устройства для удерживания образца.



3. На компьютере нажать с помощью мышки «Blank»:



3. Взять дозатором 1 мкл раствора ДНК и поместить на линзу в спектрофотометра. Одним движением опустите верхнее плечо устройства для удерживания образца. Нажать с помощью мышки «Measure»:



4. Показания зафиксировать в журнале «Журнал учета первичных данных НИЛИ».

Задание 4. Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР). Определение полиморфизма Alu I/D гена ACE

Цель работы: Ознакомиться с методами амплификации участка ДНК на примере инсерционно-делеционного полиморфизма в 16 интроне гена *ACE* человека.

Оборудование, приборы и материалы: ПЦР-бокс, амплификатор, центрифуга, дозаторы, полимерные наконечники, пробирки на 0,2 мл, перчатки, халат.

Растворы: деионизованная вода, 10×ПЦР-буфер pH=8,6, раствор $MgCl_2$, смесь четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТФ), прямой и обратный праймеры, Taq-полимераза.

Ген *ACE* находится в 17 хромосоме человека и кодирует аминокислотную последовательность ангиотензин-превращающего фермента (angiotensin converting enzyme, ACE), который является важным физиологическим регулятором артериального давления и водно-солевого обмена. ACE превращает циркулирующий в крови неактивный ангиотензин I в ангиотензин II, обладающий мощным гипертензивным действием за счёт влияния на водно-солевой обмен, сердечно-сосудистую и другие системы организма.

Установлено, что ген *ACE* имеет величину более 23 тыс. нуклеотидных пар и состоит из 26 экзонов и 25 интронов. Оказалось, что в 16-м интроне гена *ACE*, который насчитывает более 1800 н. п., встречается делеция фрагмента ДНК величиной 287 н. п. Иными словами, в популяциях человека имеется полиморфизм по гену *ACE*, который заключается в наличии (I – insertion) или отсутствии (D – deletion) фрагмента длиной 287 пар нуклеотидов в интроне 16.

Фрагмент ДНК из 16-го интрона, в котором локализована делеция амплифицировали. При электрофорезе в агарозном геле фрагменты ДНК, в которых не произошло делеции (I) и с делецией (D), легко отделяются друг от друга, что позволяет определить генотипы людей по двум аллелям I и D гена *ACE*.

Проведение работы:

Рабочие смеси для ПЦР следует готовить непосредственно перед амплификацией. Все компоненты добавлять отдельными наконечниками. После внесения образца пробирки с реакционными смесями необходимо тщательно встряхнуть на вортексе

и непродолжительно центрифугировать для сбора капель реакционной смеси на дно пробирки.

Перед началом работы (за 20–30 мин до приготовления рабочей смеси) достать из морозильника реагенты для ПЦР (за исключением Taq-полимеразы, которая добавляется в последнюю очередь), разморозить содержимое пробирок при комнатной температуре (+18–25 °C). Все пробирки с растворами после оттаивания мягко вортиксировать и непродолжительно центрифугировать.

Амплификация проводится с использованием праймеров: прямой (F) – 5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3', обратный (R) – 5'-ATGTGGCCATCACATTTCGTCAGAT-3'.

Таблица 2

Состав конечной реакционной смеси на 1 пробу

Компоненты реакционной смеси	Объем на одну реакцию	Конечная концентрация
10×ПЦР-буфер pH =8,6	2 мкл	1×
дНТФ (2 мМ каждого)	2 мкл	0,2 мМ
Раствор MgCl ₂ (50 мМ)	0,8 мкл	2 мМ
Прямой праймер (2 мкМ)	1 мкл	0,1 мкМ
Обратный праймер (2 мкМ)	1 мкл	0,1 мкМ
Taq-полимераза (5 ед/мкл)	0,5 мкл	25 ед/мл
ДНК-матрица	1 мкл	2,5-5 мкг/мл
Вода деионизованная	11,7 мкл	до 20 мкл

1. Подготовить и промаркировать соответствующим образом необходимое количество (по количеству образцов ДНК) пробирок вместимостью 0,2 мл.

2. Приготовить реакционную смесь (табл. 2) исходя из количества анализируемых образцов.

3. Реакционную смесь разливать (разлить) по 19 мкл по индивидуальным микропробиркам (количество пробирок определяется количеством образцов ДНК + одна пробирка для отрицательного контроля).

4. Добавить в каждую пробирку 1 мкл выделенной ДНК-матрицы, мягко пипетируя.

5. В качестве отрицательного контроля (холостая проба) вместо образца ДНК в пробирку добавить деионизованную воду.

6. После внесения ДНК-матрицы пробирки с реакционными смесями помещают в программируемый амплификатор. Ампли-

фикация проводится в автоматическом режиме по заданной программе.

7. Запрограммировать термоциклёр.

Таблица 3

Примерный температурно-временной режим реакции

Начальная денатурация	94 °С	3 мин
35 циклов	94 °С	20 с
	$T_{отж}$ (58 °С)	20 с
	72 °С	45 с
Финальная элонгация	72 °С	5 мин
Пауза	4 °С	∞

$T_{отж}$ – температура отжига праймеров.

Задание 5. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Цель работы: Ознакомиться с методами электрофоретического анализа ДНК в агарозном геле на примере инсерционно-делеционного полиморфизма в 16 интроне гена *ACE* человека.

Оборудование, приборы и материалы: агароза, источник тока, камера для горизонтального электрофореза», УФ-трансиллюминатор, дозаторы, полимерные наконечники, перчатки, халат.

Растворы: раствор ДНК, маркер молекулярного веса (50 п. н.), 1×ТВЕ буфер, загрузочный буфер, бромистый этидий.

Проведение работы:

Поскольку продукты реакции в описанной выше методике имеют размер от 200 до 500 п. н. оптимальной для их разделения является 2 %-й агарозный гель (табл. 1). При меньшем размере фрагментов используются более высокие концентрации агарозы.

Приготовление агарозного геля:

1. Агарозу в 1×ТВЕ буфере (2 г. сухой агарозы на 100 мл конечного раствора) расплавить в СВЧ-печи (до полного растворения агарозы) постоянно перемешивая.

2. Медленно охладить расплавленную агарозу до температуры 50–60 °С.

3. В форму для заливки геля вставить гребенку для образования лунок и залить расплавленный гель в форму.

4. После застывания агарозы осторожно удалить гребенку из геля.

5. Окунуть гель в 1×TBE буфер так, чтобы лунки полностью заполнились буфером.

6. Внести микропипеткой в лунки геля смесь из 10 мкл амплифицированной пробы и 2 мкл загрузочного буфера.

7. В одну из свободных лунок внести ДНК-маркер (маркер молекулярного веса) в соответствии с рекомендациями производителя.

8. Поместить гель в электрофоретическую камеру.

9. Заполнить камеру 1×TBE буфером до отметки.

10. Подключить камеру к источнику питания и задать напряжение, соответствующее напряженности электрического поля 10–15 В/см² геля.

11. Провести электрофоретическое разделение продуктов реакции в направлении от катода (–) к аноду (+).

Контроль за электрофоретическим разделением осуществляется визуально по движению полосы красителя. Полоса красителя должна пройти от старта 2–3 см. Время разгонки обычно составляет 10–30 мин.

Окраска ДНК:

1. Достать гель из камеры и поместить в кювету с 0,1 % раствором красителя (50 мкл флюоресцирующего красителя этидиум бромид растворите в 500 мл 1×TBE буфера) на 10–30 мин. Гель необходимо поместить в кювету с раствором бромистого этидия таким образом, чтобы гель был полностью погружен в раствор.

2. После окраски перенести гель на стекло УФ-трансиллюминатора системы гель-документирования. Фрагменты анализируемой ДНК проявляются в виде светящихся оранжевых полос при облучении УФ-излучением с длиной волны 260–310 нм (рис. 8).

3. Сфотографировать гель с ДНК в трансиллюминаторе. Агарозные гели с ДНК следует фотографировать сразу, поскольку при хранении полосы ДНК (ДНК-бэнды) становятся размытыми из-за диффузии.



Рис. 8. Электрофореграмма. Генотипу I/I соответствуют фрагменты длиной 479 п. о., генотипу I/D – два фрагмента длиной 479 и 192 п. о., а генотипу D/D – фрагмент длиной 192 п. о. Дорожки: 1 – ДНК-маркер (50 bp DNA-ladder, CarlRoth); 2 – Продукт амплификации ДНК индивидуума с генотипом I/I; 3 – Продукт амплификации ДНК индивидуума с генотипом I/D; 4 – Продукт амплификации ДНК индивидуума с генотипом D/D

Задание 6. Определение полиморфизма С677Т гена MTHFR

Цель работы: Ознакомиться с методами ПЦР–ПДРФ анализа участка ДНК на примере полиморфизма С677Т гена *MTHFR*.

Ген *MTHFR* кодирует аминокислотную последовательность фермента метилентетрагидрофолатредуктазы (МТГФР), играющего ключевую роль в метаболизме фолиевой кислоты. МТГФР катализирует восстановление 5,10-метилентетрагидрофолата в 5-метилтетрагидрофолат, который является активной формой фолиевой кислоты, необходимой для образования из гомоцистеина метионина и далее – S-аденозилметионина, за счет которого осуществляется метилирование ДНК. Дефицит МТГФР приводит к снижению метилирования ДНК, что ведет к активизации многих клеточных генов, в том числе – онкогенов. Кроме того, происходит избыточное накопление гомоцистеина – промежуточного продукта синтеза метионина. В случае сниженной активности

МТГФР во время беременности усиливается влияние тератогенных и мутагенных факторов внешней среды.

Полиморфизм С677Т связан с заменой 677-го нуклеотида цитозина (С) гена *MTHFR* на тимин (Т), что приводит к замене аминокислотного остатка аланина на валин в позиции 223, относящейся к участку молекулы фермента, ответственному за связывание фолиевой кислоты. У лиц, гомозиготных по данному варианту (генотип *T/T*), фермент МТГФР проявляет чувствительность к температуре (термолабильность) и теряет свою активность примерно на 65 %. Вариант Т связан с четырьмя группами многофакторных заболеваний: сердечно-сосудистыми, дефектами развития плода, колоректальной аденомой и раком молочной железы и яичников. У женщин с генотипом *T/T* во время беременности дефицит фолиевой кислоты может приводить к дефектам развития плода, в том числе к незаращению нервной трубки. У носителей этого генотипа высок риск развития побочных эффектов при приеме некоторых лекарственных препаратов, используемых в раковой химиотерапии, например, метотрексата. Неблагоприятное воздействие варианта Т полиморфизма сильно зависит от внешних факторов – низкого содержания в пище фолатов, курения, приема алкоголя. Сочетание генотипа *T/T* и папилломавирусной инфекции увеличивает риск цервикальной дисплазии. Назначение фолиевой кислоты может значительно снизить риск последствий данного варианта полиморфизма.

C/C – нормальный вариант полиморфизма в гомозиготной форме;

C/T – гетерозиготная форма полиморфизма;

T/T – мутантный вариант полиморфизма в гомозиготной форме.

Проведение работы:

Выделение ДНК

Выделить ДНК по методике, описанной в задании 2.

Амплификация проводится с использованием праймеров:

прямой (F): 5'-CCGTACCAGGGATCTCTG-3';

обратный (R): 5'-CGGTGCAGGCATTACAG-3'

Для определения полиморфизма С677Т гена *MTHFR* проведите ПЦР по методике, описанной в задании 4.

Запрограммируйте термоциклер по программе, представленной в табл. 4.

Таблица 4

Примерный температурно-временной режим реакции

Начальная денатурация	95 °С	5 мин
30 циклов	95 °С	30 с
	56 °С	30 с
	72 °С	30 с
Финальная элонгация	72 °С	4 мин
Пауза	4 °С	∞

Продуктами амплификации в данной ПЦР являются фрагменты ДНК длиной 130 п.н.

Рестрикционный анализ продуктов ПЦР

Оборудование, приборы и материалы: термостат, дозаторы, полимерные наконечники, раствор ДНК, перчатки, халат.

Растворы: эндонуклеаза Tag I, буфер (pH=8,8), BSA (бычий сывороточный альбумин).

Проведение работы:

Для рестрикционного анализа продуктов ПЦР необходимо провести обработку продукта ПЦР рестриктазой TagI при 65 °С в течение 1 ч.

1. В каждую пробирку с амплификатом внести 0,2 мкл эндонуклеазы Tag I, 1,9 мкл буфера, 0,5 мкл BSA.

2. Поместить в термостат на 1 ч при температуре 65 °С.

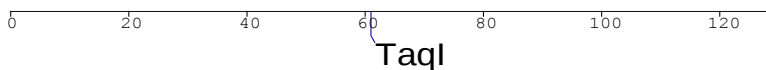
Наличие замены С→Т нуклеотида в 677-м положении 4-го экзона гена *MTHFR* создает сайт распознавания (T↓CGA) для эндонуклеазы *TaqI* (рис. 9).

CGGGAGT↓CGATTT

мутантный аллель

CGGGAGCCGATTT

нормальный аллель

Рис. 9. Полиморфизм C677T гена *MTHFR***Детекция полиморфизма C677T гена *MTHFR* с помощью вертикального электрофореза**

Оборудование, приборы и материалы: источник тока, камера для вертикального электрофореза, УФ-трансиллюминатор, перчатки, халат.

Растворы: раствор ДНК, маркер молекулярного веса (50 п. н.), 10×ТВЕ буфер, 1×ТВЕ буфер, 30 % раствор акриламид-бисакриламид (соотношение акриламид-бисакриламид 29:1), 20 % АПС (персульфат аммония), ТЕМЕД (тетраметилэтилендиамин), загрузочный буфер, бромистый этидий.

Проведение работы:

Электрофоретическую детекцию проводят в 10 % полиакриламидном геле (ПААГ) с использованием 1×ТВЕ буфера в камере для вертикального электрофореза.

Приготовление полиакриламидного геля:

1. В форму для заливки геля вставить гребенку для образования лунок.
2. Смешать компоненты для приготовления 10 % ПААГ (табл. 5).

Таблица 5

Приготовление полиакриламидного геля

Компонент	Объём
30 % раствор акриламид-бисакриламид (соотношение акриламид-бисакриламид 29:1)	11,7 мл
10×ТВЕ буфера (Трис-борная кислота-ЭДТА, рН=8)	3 мл
20% АПС (персульфат аммония)*	120 мкл
ТЕМЕД (тетраметилэтилендиамин)*	46 мкл
Бидистиллированная вода	до объема 35 мл

**Примечание. Добавляется в последнюю очередь.*

3. Все компоненты смеси тщательно перемешать и залить гель в форму.

4. После застывания ПААГ осторожно удалить гребенку из геля.

5. Заполнить лунки 1×ТВЕ буфером.

6. Поместить гель в электрофоретическую камеру.

7. Заполнить камеру 1×ТВЕ буфером до отметки.

8. Подключить камеру к источнику питания

9. Провести префорез в течение 1 ч при постоянном охлаждении (+10°–11 °С) и напряженности электрического поля 240–320 В для кондиционирования геля.

10. Внести микропипеткой в лунки геля смесь из 10 мкл амплифицированной пробы и 2 мкл загрузочного буфера.

11. В одну из свободных лунок внести ДНК-маркер (маркер молекулярного веса) в соответствии с рекомендациями производителя.

12. Поместить гель в электрофоретическую камеру.

13. Заполнить камеру 1×TBE буфером до отметки.

10. Подключить камеру к источнику питания.

11. Провести электрофоретическое разделение продуктов реакции в направлении от катода (–) к аноду (+).

Электрофорез проводить в течение 4–6 ч при постоянном охлаждении (+10°–11 °С) и напряженности электрического поля 240–320 В.

Контроль за электрофоретическим разделением осуществляется визуально по движению полосы красителя.

Окраска ДНК:

1. Достать гель из камеры и поместить в кювету с 0,1 % раствором красителя (50 мкл флюоресцирующего красителя этидиум бромид растворите в 500 мл 1×TBE буфера) на 10–30 мин. Гель необходимо поместить в кювету с раствором бромистого этидия таким образом, чтобы гель был полностью погружен в раствор.

2. После окраски перенести гель на стекло УФ-трансиллюминатора системы гель-документирования. Фрагменты анализируемой ДНК проявляются в виде светящихся оранжевых полос при облучении УФ-излучением с длиной волны 260–310 нм (рис. 8).

3. Сфотографировать гель с ДНК в трансиллюминаторе.

Генотипу *CC* соответствуют нерестрицированные фрагменты длиной 130 п. о., генотипу *TC* – три фрагмента длиной 130, 63 и 67 п. о., а генотипу *TT* – 2 фрагмента длиной 63 и 67 п. о. В связи со сложностью электрофоретического разделения фрагментов 63 и 67 п. о. (разница всего 4 нуклеотида) на электрофореграмме для генотипа *TC* возможно будут заметны только две полосы (130 и ~65 п. о.), а для генотипа *TT* – одна размером ~65 п. о. (рис. 10).

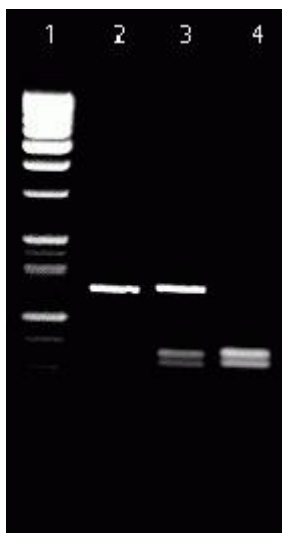


Рис. 10. Электрофореграмма результатов ПЦР-ПДРФ анализа полиморфизма С677Т гена МТНFR. Дорожки: 1 – ДНК-маркер (эквимольная смесь 20 п. н. ДНК-маркера и 50 п. н. ДНК-маркера); 2 – продукт амплификации и рестрикции ДНК индивидуума с генотипом СС; 3 – продукт амплификации и рестрикции ДНК индивидуума с генотипом ТС; 4 – продукт амплификации и рестрикции ДНК индивидуума с генотипом ТТ

Задание 7. Определение мутации 5382insC в гене *BRCA1*

В 1994 г. в области длинного плеча (q21) 17 хромосомы был картирован ген, который впоследствии был назван *BRCA1* (breast cancer predisposition gene 1). Ген *BRCA1* состоит из 22 кодирующих и 2 некодирующих экзонов, разделенных интронами размером от 0,4 до 9,2 тысяч пар нуклеотидов (т. п. н.). Общий размер кодирующих участков составляет 5592 нуклеотида, распределенных в геноме на протяжении более 80 т. п. н. Кодировемый геном белок содержит 1863 аминокислотных остатка. Один из экзонов – одиннадцатый – является самым большим, содержащим более половины кодирующей части гена, и занимает 3427 п. н. Продукт гена *BRCA1* играет важную роль в поддержании целостности генома, в частности в процессах репарации ДНК, в процессах нормального эмбрионального развития.

Кроме того, белок BRCA1 может взаимодействовать с различными факторами транскрипции и ремоделирующими белками хроматина и таким образом выступать в качестве регуляторов транскрипции генов, ответственных за деление и выживаемость клеток.

Есть также весьма убедительные данные, свидетельствующие о роли белка BRCA1 в качестве супрессора инвазивной и метастатической клеточной активности при спорадических формах рака. Группой американских исследователей была обнаружена новая, весьма существенная, функция белка BRCA1: современными методами молекулярно-генетического анализа было показано, что белок BRCA1 способен защищать клетки от оксидативного стресса посредством множественной активации экспрессии генов, ответственных за цитопротекторный антиоксидантный ответ. В их числе – гены, кодирующие ферменты глутатион-S-трансферазу и оксидоредуктазу, а также гены антиоксидантной системы. Таким образом, было доказано, что в условиях *in vitro* гиперэкспрессия гена/белка BRCA1 приводит к повышению устойчивости клеток к действию агентов-окислителей, а его дефицит, наоборот, усиливает чувствительность к воздействию оксидативных факторов. Более того, оказалось, что при оксидативном стрессе (вызванном, в частности, перекисью водорода) ген *BRCA1* и его белковый продукт значительно влияют на окислительно-восстановительный внутриклеточный статус, повышая соотношение восстановленной и окисленной форм глутатиона.

Целевой ген, активность которого регулируется геном *BRCA1*, – это ген, кодирующий эстрогеновый рецептор ER α . В настоящее время накоплено довольно большое количество данных, не только подтверждающих факт регуляции ER α -транскрипционной активности посредством прямого взаимодействия эстрогенового рецептора с белком BRCA1, но и объясняющих как именно это происходит. Считается, что в норме белок BRCA1, напрямую взаимодействуя с комплексом эстроген-эстрогеновый рецептор, сдерживает его транскрипционную активность, в результате чего имеет место умеренная экспрессия стимулирующих клеточную пролиферацию эстроген-зависимых генов. В случае сниженного (по сравнению с нормой) уровня экспрессии гена/белка BRCA1 в организме создаются необходимые предпосылки для активации эстрогеновых рецепторов

при очень низких концентрациях эстрадиола или даже в его отсутствие. Это означает, что при нормальном содержании эстрогенов в крови или даже при их резком падении (что наблюдается в постменопаузальном периоде) на фоне мутации гена *BRCA1* может происходить активация эстрогеновых рецепторов, вследствие чего индуцируется транскрипция целевых генов и генерируются длительные пролиферативные сигналы, вызывающие неконтролируемое клеточное деление.

Выделение ДНК

Выделить ДНК по методике, описанной в задании 2.

Амплификация проводится с использованием праймеров: прямой (F): F: 5'-TGGAAGAAACCACCAAGGTC-3'; обратный (R): R: 5'-GGGGAGTGGAATACAGAGTGGT-3'

Для определения мутации 5382 insC гена *BRCA1* проведите ПЦР по методике, описанной в задании 4.

Запрограммируйте термоциклер по программе, представленной в табл. 5.

Таблица 5

Примерный температурно-временной режим реакции

Начальная денатурация	94 °C	4 мин
30 циклов	94 °C	30 с
	55 °C	30 с
	72 °C	1 мин
Финальная элонгация	72 °C	5 мин
Пауза	4 °C	∞

Детекция полиморфизма мутации 5382insC гена *BRCA1* с помощью вертикального электрофореза

Провести вертикальный электрофорез по методике, описанной в задании 6.



Рис. 11. Результат электрофоретического разделения продуктов гетеродуплексного анализа мутации 5382insC гена *BRCA 1* (А- норма, Б – гетеродуплекс)

Задание 8. Решение генетических задач

Цель работы: научиться решать ситуационные задачи, моделирующие практические вопросы молекулярных болезней.

Оборудование, приборы и материалы: различные ситуационные задачи.

Проведение работы:

Определение типа наследования признака

1. Существует заболевание, при котором в возрасте между 10 и 20 годами начинается постепенная атрофия дистальных отделов мышц ног. Изучение родословных показывает, что во всех случаях той же болезнью страдал один из родителей больного. Каков вероятный механизм наследования этого заболевания?

2. Так называемый «бомбейский феномен» состоит в том, что в семье, где отец имел I группу крови, а мать III, родилась девочка с I группой крови, несмотря на то, что у нее в генотипе обнаружен ген I^B . Она вышла замуж за мужчину, гетерозиготного по II группе крови, и у них родилось две девочки: первая с IV, а вторая с I группой крови. Такое явление было объяснено наличием редкого рецессивного эпистатического гена h , подавляющего проявление генов I^A и I^B . Принимая эту гипотезу, установите вероятные генотипы всех членов этой семьи.

Вероятность

3. Мужчина с полидактилией (лишний палец на руке) женится на женщине, имеющей нормальную кисть. У них рождаются 5 мальчиков и все с полидактилией. Некоторые из них впоследствии женятся на нормальных по этому признаку женщинах и у них рождается много детей. Какова вероятность рождения у них детей с лишними пальцами? Можно ли однозначно определить генотип любого человека с лишним пальцем? Если у обоих супругов есть данный дефект, то с какой вероятностью у них могут родиться дети с нормальным строением руки?

4. Болезнь Гентингтона, прогрессирующая дегенерация нервной системы, обычно развивается после наступления половой зрелости, поэтому заболевшие люди могут иметь потомство. Заболевание обусловлено очень редким доминантным геном (H). Если у молодого человека один из родителей болен, а другой здоров, какова вероятность, что он или она заболеют?

5. Мужчина, дедушка которого со стороны матери имел фавизм (редкое Х-сцепленное рецессивное заболевание, обуславливающее высокую чувствительность к бобам) женился на женщине, чей дядя со стороны ее матери также имел фавизм.

а) Нарисуйте родословную этой семьи.

б) Какова вероятность, что их первый ребенок будет болен фавизмом?

в) Если первый ребенок болен фавизмом, то какова вероятность, что второй ребенок также будет иметь фавизм?

Пенетрантность

6. Ангиоматоз сетчатки глаза обуславливается доминантным аутосомным геном, пенетрантность которого – 50 %. Какова вероятность (в %) рождения больного ребенка в семье, где оба супруга гетерозиготны по данному гену?

7. Аутосомный доминантный ген *E*, обуславливающий раннее облысение, доминантный по отношению к гену *e* – потеря волос в пожилом возрасте. Пенетрантность раннего облысения 100 % у мужчин, но 0 % у женщин. Какими ожидаются фенотипы детей в браке мужчины и женщины, если оба они имеют генотип *Ee*?

Задание 9. Решение задач по молекулярной генетике

Цель работы: На примере решения типовых задач ознакомиться с методами ДНК-генотипирования мутаций, ферментами рестрикции и принципами построения рестрикционных карт; закрепить усвоенный материал.

Оборудование, приборы и материалы: задачи, таблица генетического кода, таблицы рестриктаз и расщепляемых ими последовательностей.

Проведение работы:

1. Покажите, как отразится на последующей трансляции добавление аденилового нуклеотида к началу данной кодирующей последовательности:

5'-ACA CGA CAA GAU AAC UGG CCA -3'

Thr Arg His Asp Asn Trp Pro

Используйте таблицу генетического кода.

2. Рассчитайте среднее расстояние между сайтами рестриктаз *EcoRI* (5'-GAATTC) и *MboI* (5'-GATC) в геномной ДНК.

3. Рестрикционный фермент *Hind III* разрезает ДНК по последовательности ААГЦТТ.

Насколько часто этот фермент будет разрезать двухцепочечную ДНК? Иными словами, какова средняя длина фрагментов разрезанной ДНК?

4. Фрагмент ДНК человека длиной 2 тысячи нуклеотидных пар (2 кб) имеет один сайт рестрикции для фермента EcoRI.

Сколько фракций ДНК будет присутствовать на электрофореграмме, окрашенной этидием бромидом, после электрофореза в агарозном геле образца этой ДНК, обработанной EcoRI?

5. Мутация, вызывающая болезнь серповидно-клеточная анемия, обусловлена заменой всего одного нуклеотида в ДНК β-глобинового гена. Причем в результате этой мутации пропадает сайт рестрикции для фермента MstII, который присутствует в нормальном гене.

Как можно использовать эту информацию для консультации семей, проживающих в районах высокой концентрации этой мутации, на предмет выявления носителей данного наследственного заболевания? Какие молекулярно-генетические эксперименты для этого необходимо провести?

6. Перед молекулярными генетиками стояла задача размножить при помощи ПЦР структурный ген, последовательность которого известна. Ниже приведены только первые и последние 15 нуклеотидов, представляющие соответственно начало и конец данного структурного гена:

5' - АТГГЦЦАААЦАГГАГ... ..АГТАЦГТТГЦЦТТАА -3'

Определите последовательность двух праймеров, с помощью которых можно провести амплификацию указанного гена методом ПЦР.

7. Какая пара праймеров пригодна для амплификации в ходе ПЦР следующей последовательности ДНК:

5' - ATGGACCAGTAC.....CTACAGGTTACTG-3' ?

а) 5' - TACCTGGTCATC -3' и 5' - CTACAGGTTACTG-3'

б) 5' - TACCTGGTCATC -3' и 5' - CAGTACCTGTAG-3'

в) 5' - ATGGACCAGTAC-3' и 5' - CTACAGGTTACTG-3'

г) 5' - CAGTACCTGTAG -3' и 5' - CTACAGGTTACTG-3'

д) 5' - ATGGACCAGTAC-3' и 5' - CAGTACCTGTAG-3'

8. Линейный фрагмент ДНК обработали рестриктазой EcoRI, рестриктазой BamHI и их смесью. Продукты реакций разделили в агарозном геле и окрасили бромистым этидием. Результаты

электрофореза представлены на рис. 12. Цифры справа указывают приблизительные размеры фрагментов в п. н. Постройте рестрикционную карту фрагмента ДНК.

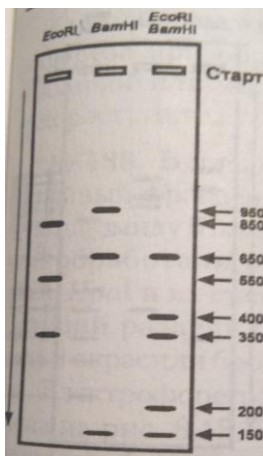


Рис. 12. Электрофореграмма

9. Молекула ДНК величиной 17 кб была разрезана на фрагменты двумя рестриктазами. Результаты электрофоретического анализа в агарозном геле, полученных фрагментов ДНК после окраски этидиум бромидом, представлены на фореграмме (рис. 13). При разрезании рестриктазой № 1 ДНК разрезается на три фракции величиной 8, 6 и 3 кб, а при разрезании рестриктазой № 2 на две фракции – 10 и 7 кб. ДНК, разрезанная сразу двумя рестриктазами № 1 и № 2, состоит из четырех фракций величиной 8, 6, 2 и 1 кб.

В каком порядке полученные рестрикционные фрагменты расположены в исходной молекуле ДНК величиной 17 кб? Постройте рестрикционную карту ДНК величиной 17 кб.

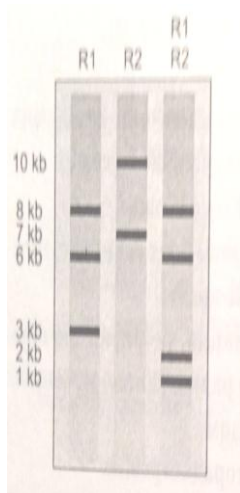


Рис. 13. Электрофореграмма

10. Мутантный ген цистифиброза (ЦФ) был изолирован из клеток больного человека и затем проведено его секвенирование. Аналогичным образом был изолирован нормальный ген ЦФ из клеток здорового человека. Картина электрофоретического разделения нуклеотидов определенного фрагмента мутантного гена и нормального гена представлена на рисунке 14. Сравнение двух образцов позволяет заметить, что нуклеотидная последовательность мутантного гена ЦФ у больного цистифиброзом отличается от нормального гена здорового человека.

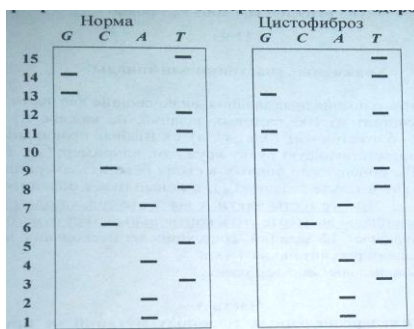


Рис. 14. Электрофореграмма

Предположим, что 5'-конец секвенированного участка начинается слева и первым нуклеотидом является номер 1. Определите тип мутации, которая вызвала заболевание цистозом и найдите правильный ответ:

1) нет никакой гомологии между нормальным геном и мутантным геном (ЦФ);

2) первые восемь нуклеотидов в мутантном гене такие же, как и в нормальном гене;

3) пять нуклеотидов в положении 11–15 нормального гена такие же, как в положении 8–12 мутантного гена;

4) мутантный ген имеет 3-х нуклеотидную вставку;

5) мутантный ген имеет 4-х нуклеотидную делецию;

6) мутантный ген имеет 4-х нуклеотидную вставку;

7) мутантный ген имеет 3-х нуклеотидную делецию.

а) 1, 2, 4, 6; б) 2, 3, 5; в) 2, 3, 7; г) 1, 5, 7; д) 2, 3, 6.

Задание 10. Дайте определение понятиям и терминам

<i>таксия</i>	<i>деплегия</i>	<i>полидактилия</i>
<i>гетероплазмия ги-</i>	<i>дистонии</i>	<i>полиневропатия</i>
<i>пераминоцидурия</i>	<i>олигофрения</i>	<i>синдактилия</i>
<i>гипоплазия</i>	<i>офтальмоплегия</i>	<i>тремор</i>
<i>гомоплазмии</i>	<i>прогрессиентность</i>	<i>эхолалии</i>
<i>деменция</i>	<i>персеверации</i>	

Рекомендуемая литература

1. Бочков, Н. П. Клиническая генетика: учебник / Н. П. Бочков, В. П. Пузырев, С. А. Смирнихина; под ред. Н. П. Бочкова. – 4-е изд. – Москва: Наука, 2011. – 592 с.

2. Введение в молекулярную диагностику в 2-х т. Т. 2 / под ред. академика РАН и РАМН М. А. Пальцева и Д. В. Залетаева. – Москва: Медицина, 2011. – 504 с.

3. Введение в молекулярную медицину / под ред. М. А. Пальцева. – Москва: Медицина, 2004. – 496 с.

4. Глазер В. М. Задачи по современной генетике : учебное пособие / В. М. Глазер, А. И. Ким, Н. Н. Орлова, И. Г. Удина, Ю. П. Алтухов. – Москва: КДУ, 2005. – 224 с.

5. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – Москва: Мир, 2002. – 589 с.

6. Гончаренко Г. Г. Основы генетической инженерии: учеб. пособие / Г. Г. Гончаренко. – Минск.: Вышэйш. шк., 2005. – 183 с.

7. *Гончаренко Г. Г.* Генная инженерия: практическое руководство к выполнению лабораторных работ / Г. Г. Гончаренко, А. А. Сурков, А. Н. Лысенко. – Гомель: ГГУ им. Ф. Скорины, 2012. – 48 с.

8. Горбунова В. Н. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний / В. Н. Горбунова, В. С. Баранов. – СПб: Специальная литература, 1997. – 287 с.

9. *Лебедь Т. Л.* Молекулярно-генетическое типирование полиморфизмов. Сб. метод. рек. / Т. Л. Лебедь, П. М. Лазарев, И. Н. Гейчук. – Пинск: ПолесГУ, 2011. – 72 с.

10. *Маниатис Т.* Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук, – Москва: Мир, 1984. – С. 186–196.

11. Мутовин Г. Р. Клиническая генетика. Геномика и протеомика наследственной патологии : учеб. пособие. – 3-е изд. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 832 с.

12. Пузырев В. П., Патологическая анатомия генома человека / В. П. Пузырев, В. А. Степанов – Новосибирск : Наука, 1997. – 224 с.

13. Фогель Ф. Генетика человека: в 3-х т. / Ф. Фогель, А. Мотульски. – Москва: Мир, 1990.

14. Korf, B. Human Genetics and Genomics / Bruce R. Korf. – Blackwell Publishing, 2007. – 278 p.

15. Kresina T. An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy / Thomas F. Kresina. –Copyright by Wiley-Liss, INC., 2001. – 394 p.

16. Lewis, Ricki. Human Genetics: concepts and applications / Ricki Lewis. – 8th ed., – 2008. – 442 p.

17. Strachan, T. Human molecular genetics / Tom Strachan, Andrew P. Read. – New York, Garland Science. – 4th ed. – 2011. – 704 p.

Занятие 4.

ПРОФИЛАКТИКА НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИИ

Цель занятия: ознакомить студентов с приемами и методами профилактики наследственных заболеваний

Профилактика наследственной патологии и уменьшение «генетического груза» в популяции представляет собой одну из важнейших медицинских и социально-экономических задач, которые стоят перед современным обществом, испытывающим огромное давление неблагоприятных экологических факторов.

Профилактика наследственных заболеваний может быть **первичной** (предупреждение зачатия или рождения больного индивида) и **вторичной** (разнообразные способы коррекции патологического генотипа). На современном этапе развития медицинской генетики возможности вторичной профилактики наследственной патологии (лечения наследственных заболеваний) ограничены, поэтому на первый план выходит предотвращение появления «генетически» больного потомства.

Предупреждение рождения больного индивида (первичная профилактика) включает комплекс мероприятий по предотвращению передачи патологического гена или хромосомной мутации в ряду поколений:

- устранение факторов возникновения новых мутаций – *эколого-генетический подход* или охрана окружающей среды;

- периконцепционная профилактика врожденных болезней мультифакториальной природы. Основное положение периконцепционной профилактики – беременность не должна быть случайной, она должна планироваться;

- планирование семьи на основе медико-генетического консультирования (МГК) направлено на ограничение деторождения среди носителей мутаций;

- искусственная внутриутробная элиминация аномального эмбриона и плода с помощью программы пренатальной (дородовой) диагностики (ПД). Она основана на выявлении эмбрионов и плодов, имеющих генные, хромосомные и геномные мутации и/или ВПР. С этой целью применяется общая программа

дородового обследования беременных. По программе пренатальной диагностики применяется обязательная триада методов: УЗИ плода, скрининг на сывороточные маркеры и инвазивная диагностика с последующим генетическим анализом клеток плода. С их помощью можно с высокой точностью поставить диагноз и предотвратить рождение больного ребенка с аномалиями развития (65–70 % случаев), хромосомными синдромами (80–85 %) и моногенными болезнями (более 50 нозологий).

Основные виды и методы профилактики наследственных болезней:

- медико-генетическое консультирование;
- пренатальная диагностика;
- неинвазивные методы (определение маркеров, прегнатальная диагностика, ультразвуковое исследование (УЗИ), электро(эхо)кардиография плода);
- инвазивные методы (амниоцентез, биопсия хориона, внутриутробная терапия и хирургия плода, кордоцентез, преимплантационная диагностика);
- диагностика гетерозиготных состояний;
- искусственное осеменение спермой донора.

Ранняя диагностика и коррекция патологического генотипа (второе направление) – важнейший этап в предупреждении тяжелых осложнений и формирования инвалидизирующих расстройств у детей. Выделяют два пути выявления наследственной патологии у новорожденных – это либо массовое (тотальное), либо селективное (выборочное) «просеивание» доступного биологического материала, взятого от новорожденных, с целью молекулярно-генетической или биохимической диагностики наиболее распространенных моногенных болезней. *Скрининг новорожденных* – это массовое обследование всех родившихся живыми детей с помощью специальных лабораторных тестов для выявления некоторых тяжелых наследственных болезней до развития клинической картины заболевания.

Массовый скрининг – обследование больших детских контингентов на выявление наследственных болезней независимо от пола, возраста, указаний на заболеваемость и т. д. Проводится чаще на наследственные болезни обмена веществ у новорожденных.

Селективный скрининг – обследование больных детей с определенной клинической симптоматикой (например, среди детей с умственной отсталостью) на наследственные болезни.

Основные условия проведения скринирующих программ:

- заболевание встречается в популяции с высокой частотой (1:10000 новорожденных и более);
- без лечения данное заболевание приводит к резкому снижению трудо- и жизнеспособности;
- существуют эффективные методы лечения;
- разработан эффективный просеивающий тест;
- программа должна быть экономически выгодной.

Список скринируемых заболеваний включает: фенилкетонурию, врожденный гипотиреоз, галактоземию, адреногенитальный синдром, муковисцидоз. В некоторых странах скрининг включает 30 форм наследуемых болезней обмена.

Ранняя диагностика и коррекция патологического генотипа (терапия) включает также комплекс мероприятий, способствующих предупреждению развития симптомов и осложнений болезни, снижению ее тяжести; этиологический фактор при этом не устраняется. В числе подходов этого направления выделяют:

– профилактическое патогенетическое лечение включает ограничение

или исключение определенных веществ из рациона питания, например, при галактоземии, гистидинемии, ФКУ и целиакии; добавление определенных веществ к рациону питания (АГС); возмещение несинтезируемых организмом веществ (гемофилия, сахарный диабет);

– устранение условий и факторов, способствующих экспрессии патологического гена (дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы);

– направленная коррекция патологического гена с помощью генотерапии.

Медико-генетическое консультирование

Генетическое консультирование представляет собой процесс, связанный с решением проблем относительно появления или риска появления наследственных болезней в семье

Задачи медико-генетического консультирования:

- установление точного диагноза наследственной патологии;

- определение типа наследования этого заболевания в данной семье;
- расчет величины риска повторения заболевания в семье;
- объяснение смысла медико-генетического прогноза обратившимся;
- пренатальная (дородовая) диагностика врожденных и наследственных заболеваний различными методами (ультразвуковыми, цитогенетическими, биохимическими, молекулярно-генетическими).

Поводом для медико-генетического консультирования могут быть:

- рождение ребенка с врожденными пороками развития, умственной и физической отсталостью, слепотой, глухотой, судорогами и др.;
- спонтанные аборт, мертворождения;
- близкородственные браки;
- неблагополучное течение беременности;
- работа супругов на вредном производстве;
- несовместимость супругов по резус-фактору;
- возраст женщины старше 35 лет, а мужчины – 40 лет.

Медико-генетического консультирование включает 4 этапа: диагноз, прогноз (оценка генетического риска), заключение и совет.

Для хорошо изученных болезней (например, синдром Дауна) диагноз может быть установлен еще перед направлением в консультацию. Чаще же диагноз не ясен. Основной метод диагностики – генеалогический. В первую очередь он используется относительно супруга, в родословной которого имелась наследственная патология. В более сложных случаях (например, рождение ребенка с множественными пороками развития) правильный диагноз может быть поставлен лишь при использовании специальных методов исследования (цитогенетический, молекулярно-генетический, биохимический). В процессе диагностики нередко необходимо провести обследование не только пациента, но и других членов семьи.

Генетический риск – это вероятность появления определенной аномалии у обратившегося или его потомков, или повторного риска рождения больного ребенка.

Генетический риск до 5 % расценивается как низкий, не являющийся противопоказанием к продолжению деторождения в данной семье.

Риск от 6 до 20 % – средний, и в этом случае рекомендации относительно дальнейших беременностей зависят не только от величины риска, но и от тяжести медицинских и социальных последствий данного заболевания, а также от возможности пренатальной диагностики

Генетический риск больше 20 % – высокий. При отсутствии методов пренатальной диагностики соответствующей патологии дальнейшее деторождение в данной семье не рекомендуется

Пренатальный скрининг – исследования, проводимые беременным женщинам с целью выявления групп риска осложнений беременности. Современные методы пренатальной диагностики наследственных заболеваний включают: **неинвазивные методы** – биохимический скрининг; ультразвуковое исследование плода (УЗИ) и **инвазивные** – амниоцентез (прокол плодного пузыря для получения околоплодной жидкости); биопсия хориона и плаценты; кордоцентез (взятие крови из пуповины); фетоскопия (введение зонда и осмотр плода).

Итогом биохимического скрининга и УЗИ является отбор беременных высокого риска рождения детей с дефектами закрытия нервной трубки и с хромосомными болезнями плода. Таким беременным необходима инвазивная диагностика.

Инвазивные методы пренатальной диагностики – это внутриматочные вмешательства в операционных условиях с целью получения плодного материала для проведения специализированных анализов. Выбор инвазивного метода определяется сроком беременности, показаниями к его проведению, сопутствующими заболеваниями матери, а также – квалификацией врача, производящего забор материала. Если в результате пренатальной диагностики выявляют патологию плода, не поддающуюся внутриутробной или постнатальной терапии, беременность может быть прервана.

Молекулярно-генетические методы пренатальной диагностики. Из более 6000 заболеваний, известных на сегодняшний день, доля заболеваний, заслуживающих пренатальной диагностики, составляет не более 1%. Большая часть патологии,

требующей дородового диагноза, — это сравнительно частые и тяжелые болезни, к которым относятся муковисцидоз, миодистрофия Дюшенна, синдром ломкой X-хромосомы, гемофилия А, фенилкетонурия, поликистоз почек и др. Они выявляются с помощью молекулярно-генетических методов.

Эффективность ДНК-диагностики у плода в значительной мере определяется:

- точностью клинического диагноза: так как молекулярная диагностика проводится на уровне индивидуальных генов. Отсутствие точного клинического диагноза моногенного заболевания, делает, по сути, невозможным применение молекулярных методов;

- своевременным обследованием семьи высокого риска молекулярными методами, определение индивидуальных мутаций, которое в дальнейшем позволит провести качественную пренатальную диагностику.

В случае высокого риска рождения больного ребенка женщине может быть рекомендовано прерывание беременности, однако окончательное решение о сохранении или прерывании беременности всегда остается прерогативой самой пациентки.

Считается, что не более 5–10 % детей с врожденными пороками развития рождаются в семьях «группы риска», а 90–95 из 100 таких детей рождаются в семьях, в которых не было оснований обращаться в медико-генетические кабинеты и консультации. Поэтому существенное снижение частоты пороков развития может быть достигнуто лишь при массовом осмотре всех беременных с помощью наиболее простых тестов: УЗИ, определения биохимических показателей и других неспецифических показателей, связанных с функционированием внутриутробного плода.

Соглашаясь на проведение инвазивной пренатальной диагностики, женщина должна учитывать риски, которые могут сопровождать данные процедуры. Наиболее значительные осложнения: самопроизвольное прерывание беременности после проведения процедуры, отслойка плаценты, кровотечение. Однако если женщина согласится на проведение процедуры, то получит ответ на вопрос, здоров ее будущий ребенок или нет. И в случае, если патология плода подтвердится, у нее будет время и возможность сделать осознанный выбор.

Практические задания и указания по их выполнению

Задание 1. Решение генетических задач

Цель работы: научиться решать ситуационные задачи, моделирующие практические вопросы медико-генетического консультирования.

Оборудование, приборы и материалы: ситуационные задачи, схемы родословных.

Проведение работы:

1. Петр и его сын Иван больны гемофилией. Жена Петра беременна. Опасаясь, что у нее родится сын-гемофилик, она обратилась в медико-генетический центр с целью определить пол внутриутробного плода и прервать беременность, если выяснится, что плод мужского пола. Однако, побеседовав с нею, вы рекомендовали ей сразу прервать беременность, не проводя амниоцентеза. Объясните, почему вы сделали такое заключение.

2. Синдром Ван дер Хеве (голубая окраска склер, ломкость костей, глухота) имеет аутосомно-доминантный тип наследования. Пенетрантность этих признаков изменчива. По данным К. Штерна (1965), она составляет для признака голубых склер почти 100 %, для ломки костей – 63 %, для глухоты – 60 %. Мужчина, имеющий голубой цвет склер, нормальный в отношении двух других признаков, вступил в брак со здоровой женщиной, в родословной которой случаев синдрома Ван дер Хеве не встречалось. Какова вероятность рождения в этой семье детей с признаком ломкости костей, если известно, что отец мужа имел данный синдром. Какой совет вы дадите этой семье относительно деторождения?

3. Гены, определяющие синтез резус-фактора и форму эритроцитов, находятся в одной аутосоме на расстоянии 3 морганид. Женщина получила от отца доминантный ген резус-фактора D и доминантный ген E , определяющий эллиптическую форму эритроцитов, а от матери – рецессивные гены резус-отрицательности d и нормальной формы эритроцитов e . Муж резус-отрицательный и имеет эритроциты нормальной формы. Определите вероятность рождения ребенка фенотипически сходного по этим признакам с отцом.

4. Здоровая женщина, мать которой была дальтоником, а отец страдал гемофилией (гены локализованы в X-хромосоме), вышла замуж за здорового мужчину. Определите, какова вероятность рождения в этой семье фенотипически здорового ребенка; сына, страдающего двумя заболеваниями одновременно.

5. Отец страдает одновременно гемофилией и дальтонизмом. Может ли его сын получить только один из этих патологических генов?

6. Три гена комплекса HLA, обозначенные *B*, *C* и *A*, кодируют антигены гистосовместимости. Каждый ген встречается в нескольких аллельных формах. Предположим, что женщина и ее муж имеют следующие генотипы, соответственно антиген-определяющим генам:

B2C1A2 и *B4C3A4*
B1C2A1 *B3C4A3*

а) определите возможные генотипы детей, не учитывая кроссинговер;

б) будут дети принимать или отторгать ткани каждого из родителей?

7. В семье имеется ребенок с болезнью Дауна, обусловленной транслокацией 21 хромосомы на 13. Такая же мутация обнаружена у здорового в этом отношении отца ребенка. У женщины (матери ребенка) – новая беременность. Опасаясь повторного рождения больного ребенка в семье, она обратилась в медико-генетическую консультацию. Сделайте заключение о возможной патологии плода.

8. Женщине 39 лет. Она беременна. В сыворотке крови этой женщины обнаружено резкое снижение α -фетопротеина, тогда как уровень хорионического гонадотропина повышен. Сделайте заключение о возможной патологии плода.

Задание 2. Принципы расчета генетического риска

1. Мужчина, который страдает нейрофиброматозом, обратился в консультацию за прогнозом для будущего ребенка (рис. 1). Известно, что нейрофиброматоз аутосомно-доминантное заболевание с пенетрантностью равной 8/10 (80 %). На основании этих данных и анализа родословной рассчитайте генетический риск развития данной патологии у потомка больного.

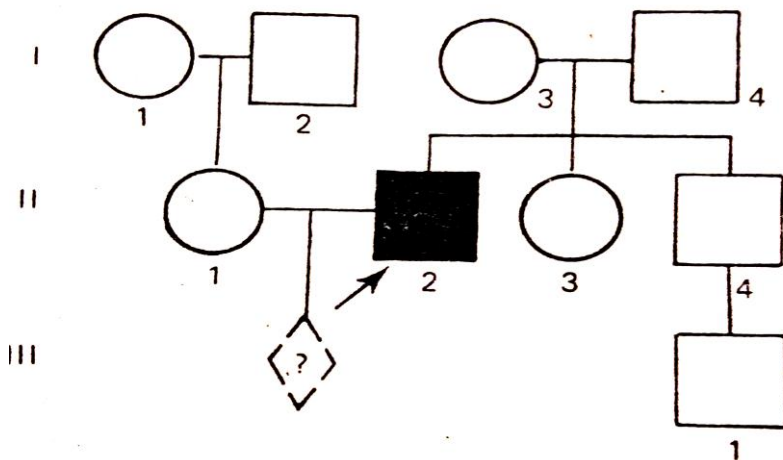


Рис. 1. Фрагмент родословной с нейроброматозом

2. Условный аутосомно-рецессивный ген характеризует заболевание. Частота этого гена в популяции 0,01. Рассчитайте вероятность рождения больного ребенка:

- а) в популяции в целом;
- б) если в браке встретятся двоюродные брат и сестра.

Задание 3. Дайте определение понятиям и терминам

амниоцентез	Генетический риск	Скрининг новорожденных
кордоцентез	Пренатальный	
фетоскопия	скрининг	

Рекомендуемая литература

1. Бочков Н. П. Клиническая генетика: учебник / Н. П. Бочков, В. П. Пузырев, С. А. Смирнихина; под ред. Н. П. Бочкова. – 4-е изд. – Москва: Наука, 2011. – 592 с.

2. Иванов В. И. Генетика: учебник. – Москва: ИКЦ «Академкнига», 2007. – 638 с.

3. Козлова С. И. Наследственные синдромы и медико-генетическое консультирование / С. И. Козлова, Н. С. Демикова, Е. Семанова, О. Е. Блинникова. – Москва: Практика, 1996. – 416 с.

4. Мерфи Э. А. Основы медико-генетического консультирования / Э. А. Мерфи, Г. А. Чейз. – Москва: Медицина, 1979. – 398 с.

5. *Мутовин Г. Р.* Клиническая генетика. Геномика и протеомика наследственной патологии : учебное пособие. – 3-е изд. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 832 с.

6. *Korf B.* Human Genetics and Genomics. – Blackwell Publishing, 2007. – 278 p.

7. *Lewis Ricki.* Human Genetics: concepts and applications / Ricki Lewis – 8th ed., – 2008. – 442 p.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	2
<i>Занятие 1.</i> Клинико-генеалогическая диагностика наследственных заболеваний	7
<i>Занятие 2.</i> Хромосомные болезни.....	28
<i>Занятие 3.</i> Генные болезни с традиционным и нетрадиционным наследованием	65
<i>Занятие 4.</i> Профилактика наследственной патологии	145

Учебное издание

Писарчик Галина Архиповна
Малиновская Юлия Викторовна

МЕДИЦИНСКАЯ
ГЕНЕТИКА

Учебно-методическое пособие

Редактор *Л. М. Корневская*
Компьютерная верстка *Д. В. Головач*
Технический редактор *А. В. Красуцкая*

Подписано в печать 11.09.2017. Формат 60×90 1/16.
Бумага офсетная. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 9,75. Уч.-изд. л. 6,48.
Тираж 100 экз. Заказ № 466.

Республиканское унитарное предприятие «Информационно-
вычислительный центр Министерства финансов Республики Беларусь».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий
№ 1/161 от 27.01.2014, № 2/41 от 29.01.2014.
Ул. Кальварийская, 17, 220004, г. Минск.