

ЛЕКЦИЯ 1

**Тема: МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНЕТИКА КАК
НАУКА. ПРЕДМЕТ И ЗАДАЧИ.
ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ
ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА У
ЧЕЛОВЕКА.**

Предмет и объект исследования медицинской генетики.

Предмет медицинской генетики - все
формы проявления наследственных
патологий человека.

Объект исследования медицинской
генетики - человек.

Задачи медицинской генетики.

1. Изучение этиологии наследственных заболеваний.
2. Изучение патогенеза наследственных заболеваний (от гена к фену).
3. Изучение особенностей клинического проявления наследственного заболевания: симптоматика, синдромология, характер течения заболевания, сопутствующая патология.

Задачи медицинской генетики.

4. Разработка способов лечебной коррекции наследственной патологии.
5. Разработка мероприятий по профилактике проявления наследственных заболеваний у человека.

Введение

Из 1000 возможных зигот только 300 достигают логического завершения. Остальные 700 подвергаются элиминации на различных стадиях.

Из 300 беременностей 45 завершаются спонтанными абортами, 9 – мертворождением и 246 – живорождением.

Введение

В структуре детской смертности до
5 лет

- моногенные болезни составляют 10%,
- болезни мультифакториальной природы - 40%,
- хромосомные болезни - 3-6%,
- средовые воздействия - 44%.

Введение

В Курской области на 10000 новорожденных приходится 600-800 детей с наследственными болезнями. Из них: у 280 детей - генные болезни, 140 детей - хромосомная патология, 200 детей - болезни с наследственной предрасположенностью, у 440 детей - врожденные пороки развития.

По взаимодействию наследственности и средовых влияний выделяют следующие группы болезней:

1. Наследственные болезни, возникновение которых обусловлено патологическим действием генов, причем, заболевания проявляются независимо от условий среды. Среда может влиять лишь на клиническую выраженность.

По взаимодействию наследственности и средовых влияний выделяют следующие группы болезней:

2. Наследственные факторы являются ведущими в патогенезе заболевания, но для их проявления необходимо действие среды.

3. Этиологическим фактором является среда (например, травмы, отравления, инфекции и т.д.).

Исходя из вышеизложенного
Н.П. Бочковым предложена
классификация всей патологии
человека:

1. Генные болезни. Реализуются через нарушение метаболизма.
2. Хромосомные синдромы (хромосомные мутации и геномные aberrации).
3. Болезни с наследственной предрасположенностью или мультифакториальные (моногенные и полигенные).
4. Экзогении.

Клинико-генеалогический

метод



метод родословных с прослеживанием болезней или признаков среди родственников при помощи приемов клинического наблюдения.

Объект исследования — семья и ее родословная.

Сущность метода:

1. сбор генетического анамнеза;
2. построение родословной;
3. написание легенды;
4. анализ, генетическое заключение.

Клинико-генеалогический

метод

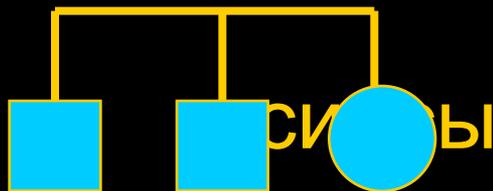
■ - лицо мужского пола

● - лицо женского пола

◆ - пол неизвестен

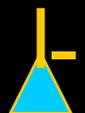
■ - ○ брак

■ = ○ брак кровно-родственный



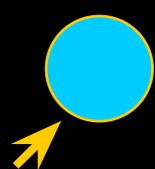
Клинико-генеалогический метод

 умерший

 - самопроизвольный выкидыш

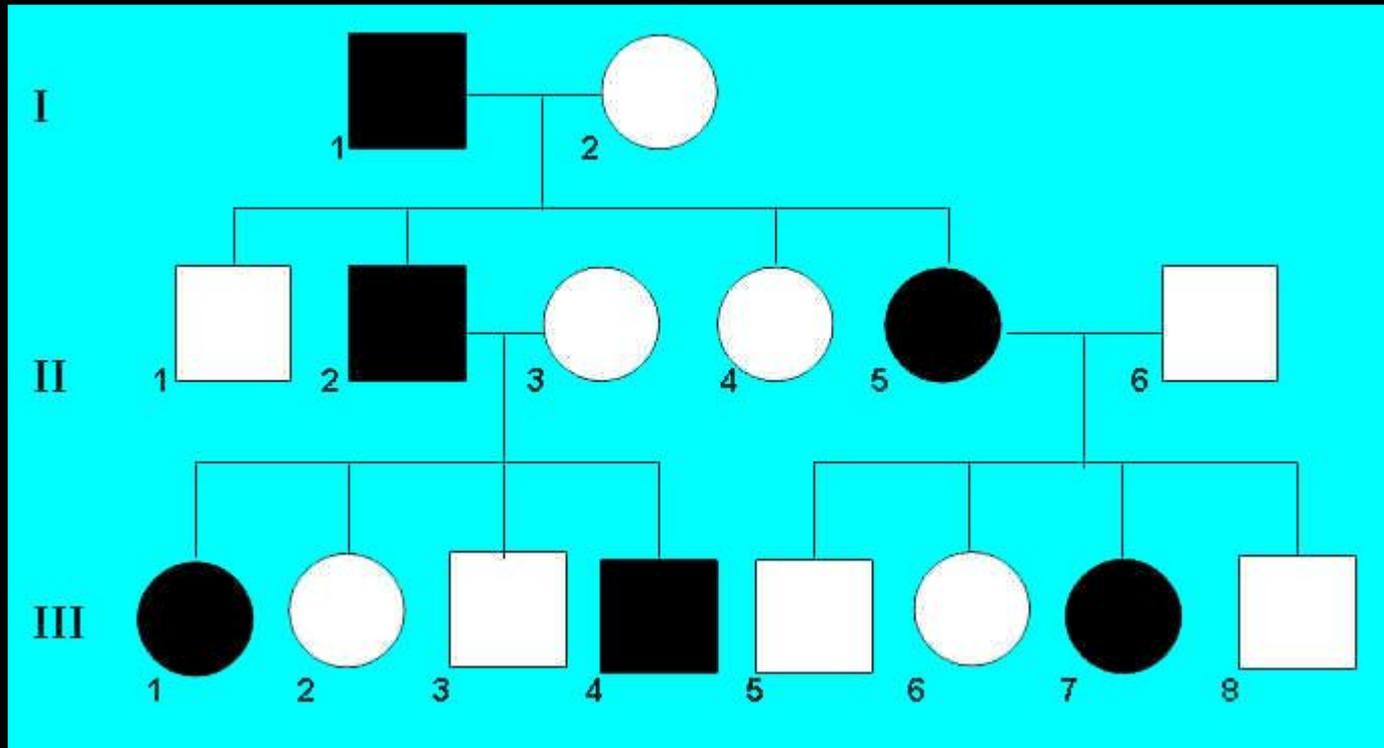
 - медицинский аборт

 - бездетный брак

 пробанд

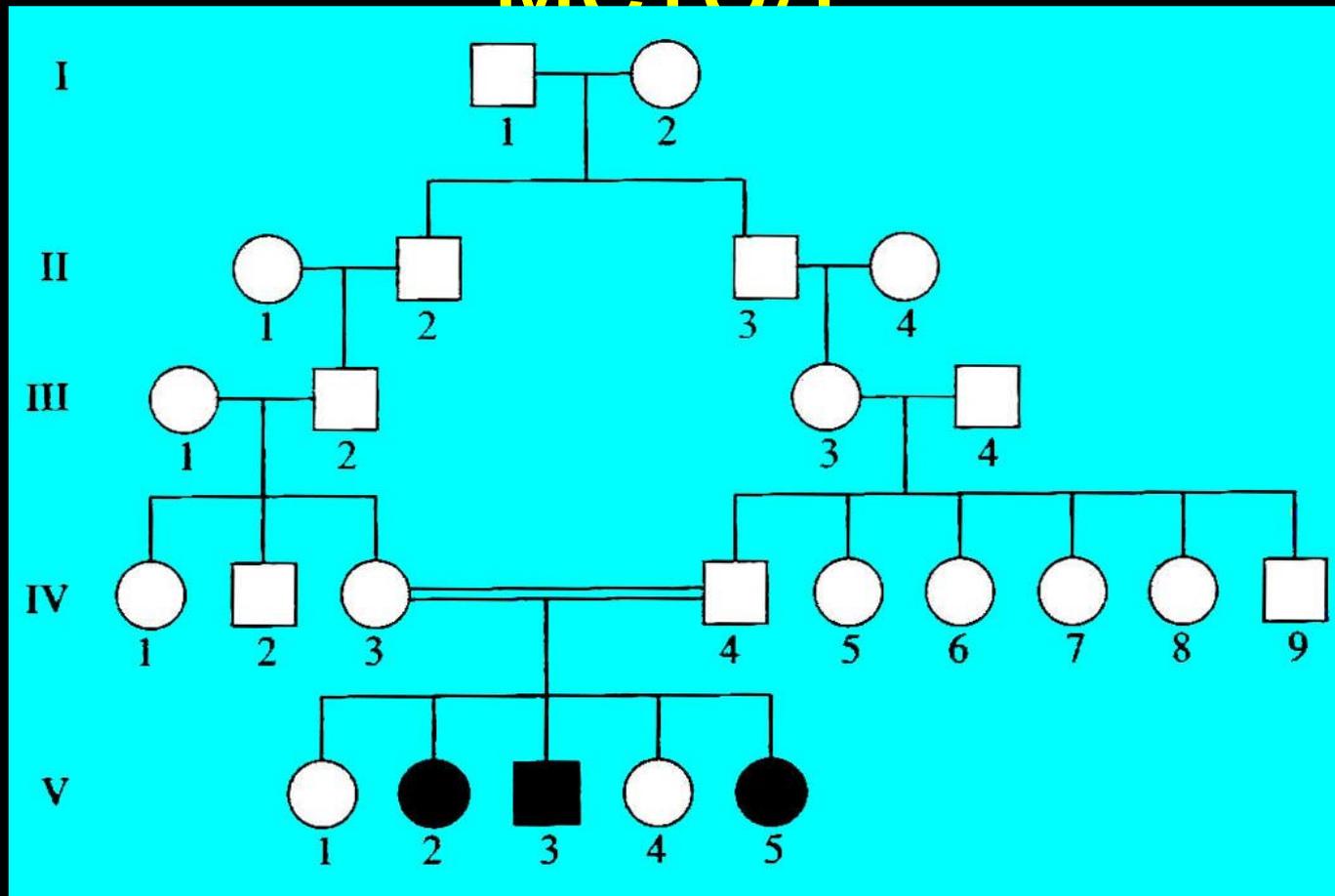
 - лично обследованный

Клинико-генеалогический метод



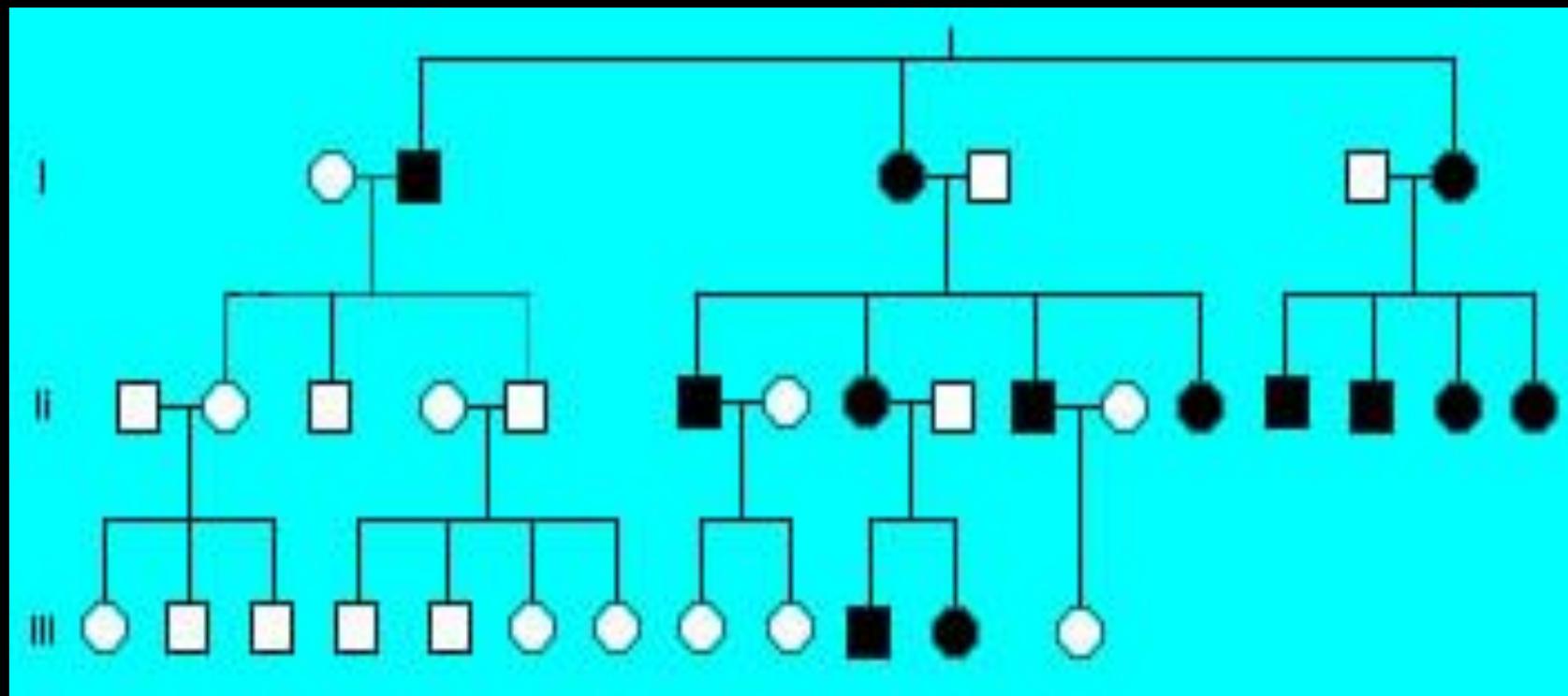
Аутомно-доминантнй тип
наследования

Клинико-генеалогический метод



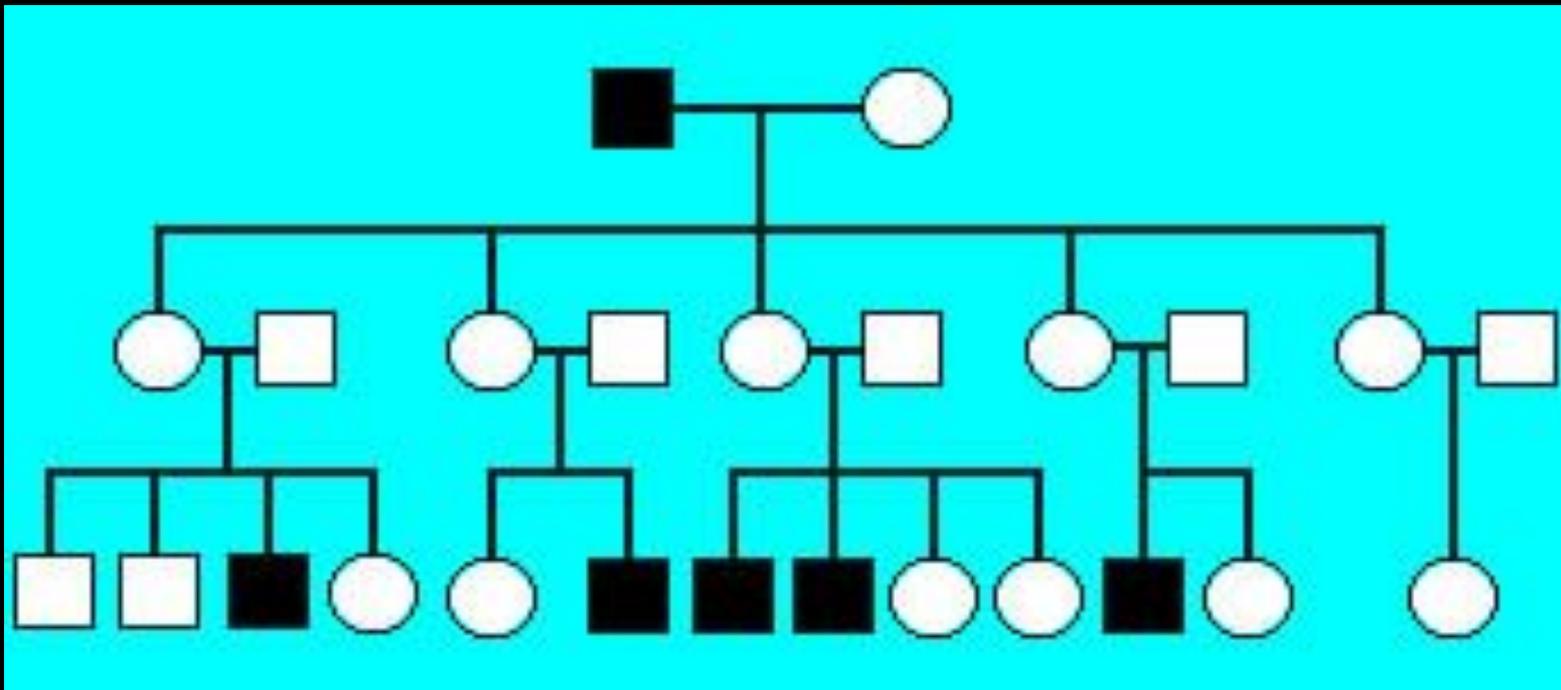
Аутосомно-рецессивный тип наследования

Клинико-генеалогический метод



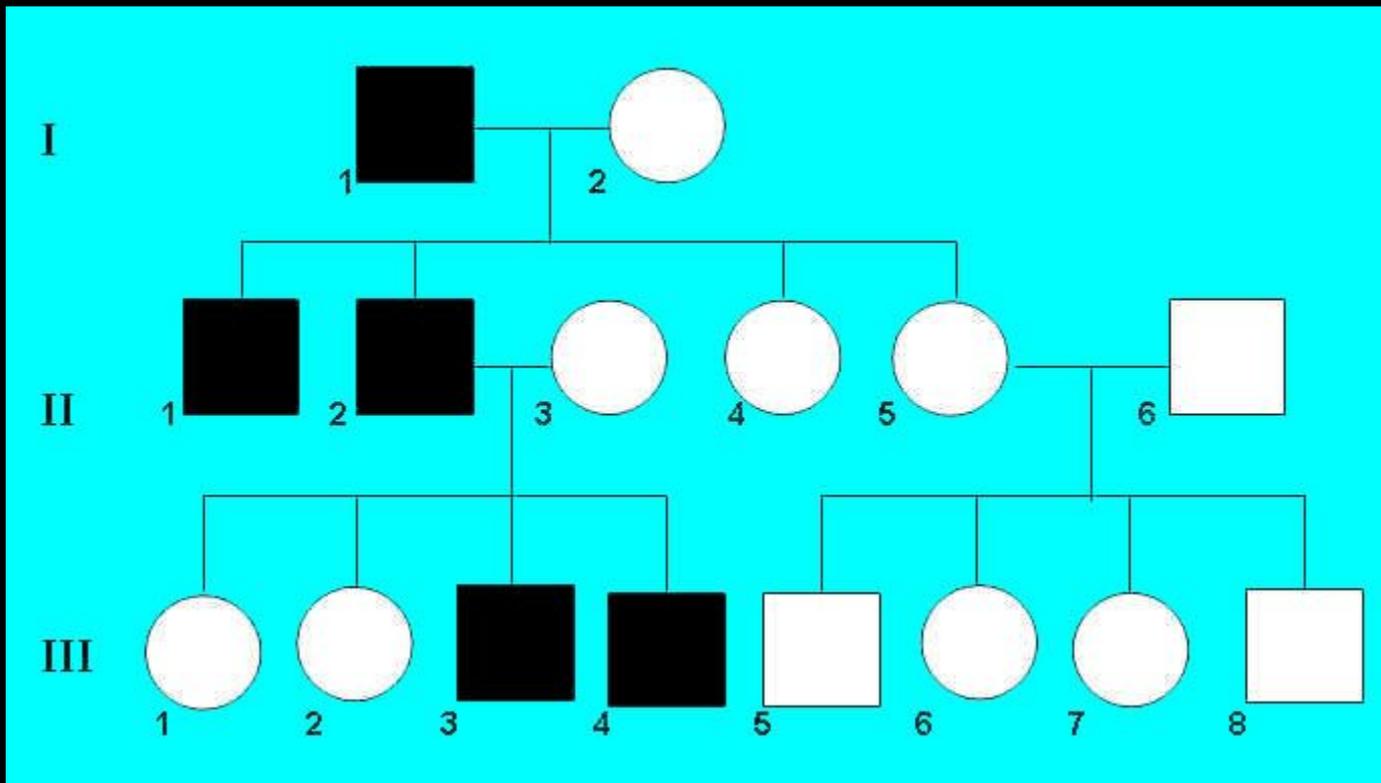
Х-сцепленный доминантный тип
наследования

Клинико-генеалогический метод



X-сцепленный рецессивный тип
наследования

Клинико-генеалогический метод



Y-сцепленный тип наследования

Клинико-генеалогический

метод

Показания:

1. Для установления наследственного характера заболевания или признака (нозологические формы, количество пораженных родственников, их степень родства по отношению к пробанду).
2. Для определения типа наследования.
3. При анализе сцепления генов и картировании хромосом.

Клинико-генеалогический

метод

Показания:

4. При изучении интенсивности мутационного процесса.
5. При расшифровке механизмов взаимодействия генов.
6. При медико-генетическом консультировании.

Клинико-генеалогический метод

Анализ: Метод братьев и сестер (сибсов)

N семьи	S (число всех детей)	R (число больных детей)	$R \times (S-1)$	$R \times (R-1)$
1				
2				
3				
сумма				

КЛИНИКО-ГЕНЕАЛОГИЧЕСКИЙ

МЕТОД

Анализ: Метод пробандов

N семьи	S (число всех детей)	R (число больных детей)	A (число пробандов)	$A \times (S-1)$	$A \times (R-1)$
1					
2					
3					
сумма					

Клинико-генеалогический метод

Математический анализ

$$p = \frac{\sum R \times (R-1)}{\sum R \times (S-1)}; \quad \delta = \sqrt{\frac{p \times (1-p)}{\sum S}}; \quad t = \frac{p^1 - p}{\delta};$$

$$p = \frac{\sum A \times (R-1)}{\sum A \times (S-1)}$$

где S – число всех детей, R – число больных детей, A - число пробандов,

p - сегрегационная частота, δ - дисперсия, t - критерий Стьюдента,
p¹ - ожидаемая сегрегационная частота (для
аутосомно-доминантного типа наследования - 0,5; для
аутосомно-рецессивного - 0,25)

Близнецовый метод

основывается на существовании двух типов близнецов - моно и дизиготных.

Монозиготные близнецы - есть результат расхождения бластомеров на самых ранних этапах антенатального развития, их генотипы имеют 100% сходство.

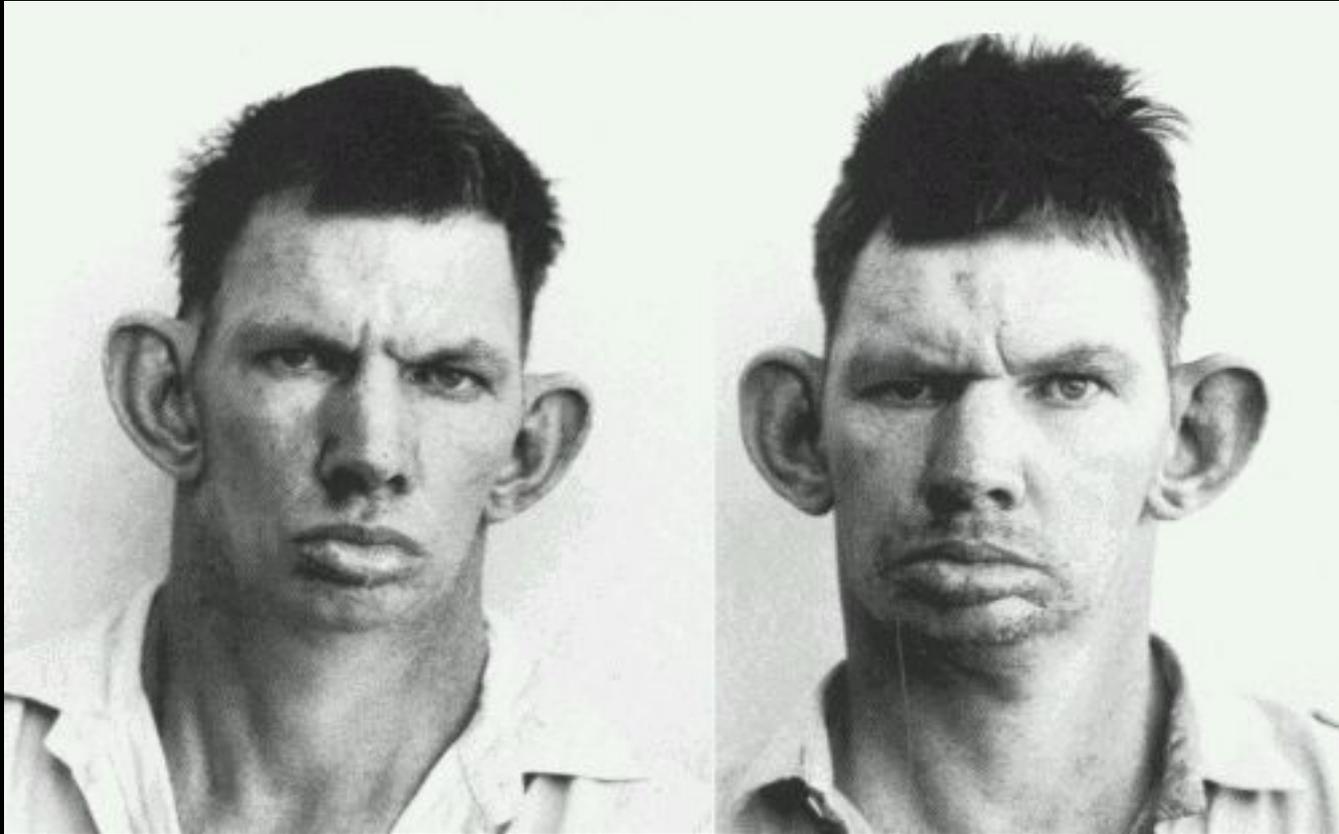
Дизиготные близнецы - результат формирования двух зигот и следовательно наследственность у них мало чем отличается от родных братьев и сестер (общих генов 50%).

Близнецовый метод



Монозиготные близнецы

Близнецовый метод



Дизиготные близнецы

Близнецовый метод



Тройня

Близнецовый метод

Сущность метода: любой признак - результат взаимодействия генотипа и среды, в которой происходит реализация генетической программы. $E + G = 1$, где E - вклад среды, G - вклад наследственности. Сравниваем реализацию генетической программы с учетом действия средовых факторов среди моно и дизиготных близнецов.

В организме человека по характеру фенотипического проявления все признаки могут быть подразделены на качественные и количественные.

Близнецовый метод

Коэффициент наследуемости вычисляется по формулам для признаков:

количественных

качественных

$$H = \frac{(r_{\text{мз}} - r_{\text{дз}})}{(1 - r_{\text{дз}})}$$

$$H = \frac{(C_{\text{мз}} - C_{\text{дз}})}{(100 - C_{\text{дз}})}$$

- где r - коэффициент близнецовой корреляции у монозиготных и дизиготных пар.

- где C - показатель конкордантности (сходства признаков близнецов) отражает удельный вес в процентах близнецовых пар, конкордантных по данному признаку.

Близнецовый метод

Конкордантность у близнецов по ряду нозологических форм (В.П. Ефроимсон):

Нозологическая форма	C_{M3} (в %)	C_{D3} (в %)
шизофрения	67	12
маниакально депрессивный синдром	73	15
недифференцированная олигофрения	94.5	42
эпилепсия	61	12
заячья губа	39	5
врожденный вывих бедра	41	3
стеноз привратника	66	3
первичный туберкулез	66	23
корь	97	95
коклюш	97	92
скарлатина	55	47
ветряная оспа	92	89

Популяционно-статистический метод

(обоснован Харди и Вайнбергом) позволяет оценивать частоты генотипов (в т.ч. патологических) и получать генетическую структуру популяции.

Объект исследования - популяция.

Основной закон - $p+q=1$,

$$(p+q)^{\text{♀}} \times (p+q)^{\text{♂}} = 1$$

$$p^2+2pq+q^2=1 \text{ или } AA+2Aa+aa=1$$

, где p - частота доминантного аллеля (A),

q - частота рецессивного аллеля (a),

$2pq$ - частота гетерозиготных состояний (Aa)

Популяционно-статистический метод

Условия идеальной популяции:

1. Численность не менее 500 особей.
2. Популяция не должна испытывать влияния мутагенных факторов.
3. Популяция должна существовать относительно изолированно от остальных особей данного вида.
4. Гомо- и гетерозиготы должны быть одинаково плодовиты и жизнеспособны.

Популяционно-статистический метод

Пример: из 84000 детей, родившихся в течение 10 лет в родильных домах одного города, у 210 обнаружен патологический рецессивный признак, который проявляется только в гомозиготном состоянии.

Таким образом, частота проявления признака составляет

$$q^2 = 210/84000 = 0.0025, \quad q = \sqrt{0.0025} = 0.05,$$

а доминантный аллель $p = 1 - 0.05 = 0.95$

Следовательно, частоты генотипов:

гомозиготы $PP - p^2 = 0.95^2 = 0.9025$ (90.25%)

гетерозиготы $Pq - 2pq = 2 * 0.95 * 0.05 = 0.095$
или 9,5%

гомозиготы $qq - q^2 = 0.05^2 = 0.0025$ или 0.25%

Популяционно-статистический метод

Пример: в районе с населением 50000 человек при полной регистрации заболеваемости муковисцидозом обнаружено 24 больных.

Муковисцидоз – аутосомно-рецессивное заболевание, следовательно, его частота в популяции составляет $q^2 = 24/50000 = 0.00048$, а частота гена $q = \sqrt{0.00048} = \sim 0.02$, частота доминантного аллеля $p = 1 - 0.02 = 0.98$.

Исходя из вышеизложенного частота гетерозигот по гену муковисцидоза в популяции $2pq = 2 * 0.98 * 0.02 = 0.0392$ (3.92%),
- гомозигот $q^2 = 0.02^2 = 0.0004$ или 0.04%

Цитогенетический метод

- метод исследования хромосомного набора человека.

Объект исследования – хромосомы.

Кариотип – число, размер, форма и структура хромосом.

Существуют прямой и непрямой методы исследования.

Цитогенетический метод

Прямой цитогенетический метод

- анализ кариотипа в быстро делящихся клетках, чаще — в клетках хориона, костного мозга, опухолевых клетках.

Сущность: делают пункцию исследуемой ткани, к небольшому количеству полученного материала (от 5 мг ткани) добавляют гипотонический раствор для осмотического разрыва клеточной мембраны, вводят колхицин (для остановки митоза на стадии метафазы). Затем фиксируют смесью метанола с уксусной кислотой, готовят препараты, красят основным красителем.

Цитогенетический метод

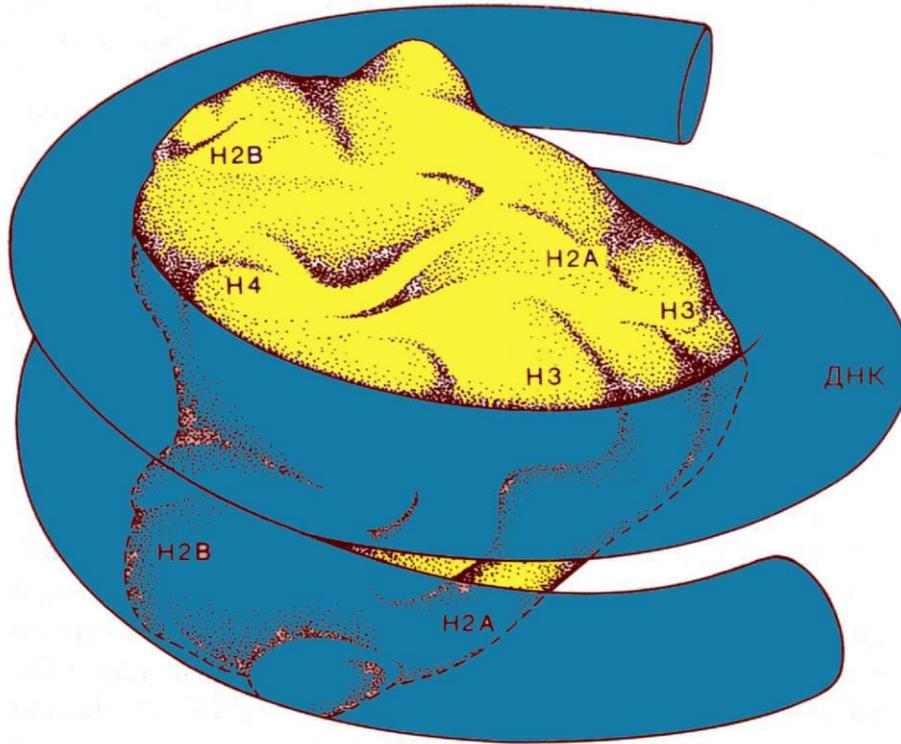
Непрямой цитогенетический метод

- проводят забор крови в количестве 5 мл., культивируют лимфоциты человека (при необходимости - амниоциты, клетки хориона) в смеси среды Игла (199) с сывороткой крупного рогатого скота и фитогемагглютинином (стимулятор клеточного деления) при температуре 37°C на 48 - 72 часа. Добавляют колхицин, гипотонический раствор, фиксируют, красят.

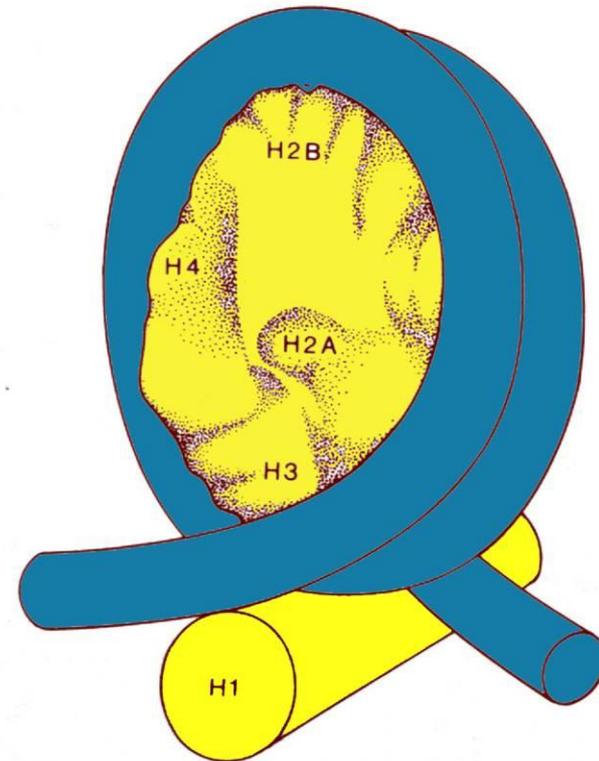
Цитогенетический метод

Дифференциальный способ С- и G-окрашивания хромосом позволил выделить гетеро- и эухроматиновые участки. Начали составляться карты хромосом по их неоднородности. При дифференциальной окраске применяют трипсин (в результате чего эухроматиновые участки обесцвечиваются, а гетерохроматиновые остаются темными). На стадии метафазы анализируется более 200 сегментов (бендов), на стадии прометафазы - 850-1200 сегментов (сегмент - несколько миллионов пар оснований).

Цитогенетический метод



Модель нуклеосомного кора, построенная по данным кристаллографического анализа низкого и высокого разрешения. Сегмент ДНК (145 пар оснований), изображенный в виде трубки, обвивает гистоновый октамер, делая вокруг него $1\frac{3}{4}$ оборота. [R. D. Kornberg, A. Klug, Sci. Amer., **244** (2) (1981), p. 52.]



Гистон H1 «сшивает» ДНК в местах, где она начинает и прекращает наматываться на нуклеосомный кор. [A. Klug, Les Prix Nobel (Stockholm, Sweden, Nobel Foundation, 1982), p. 93.]

Цитогенетический метод

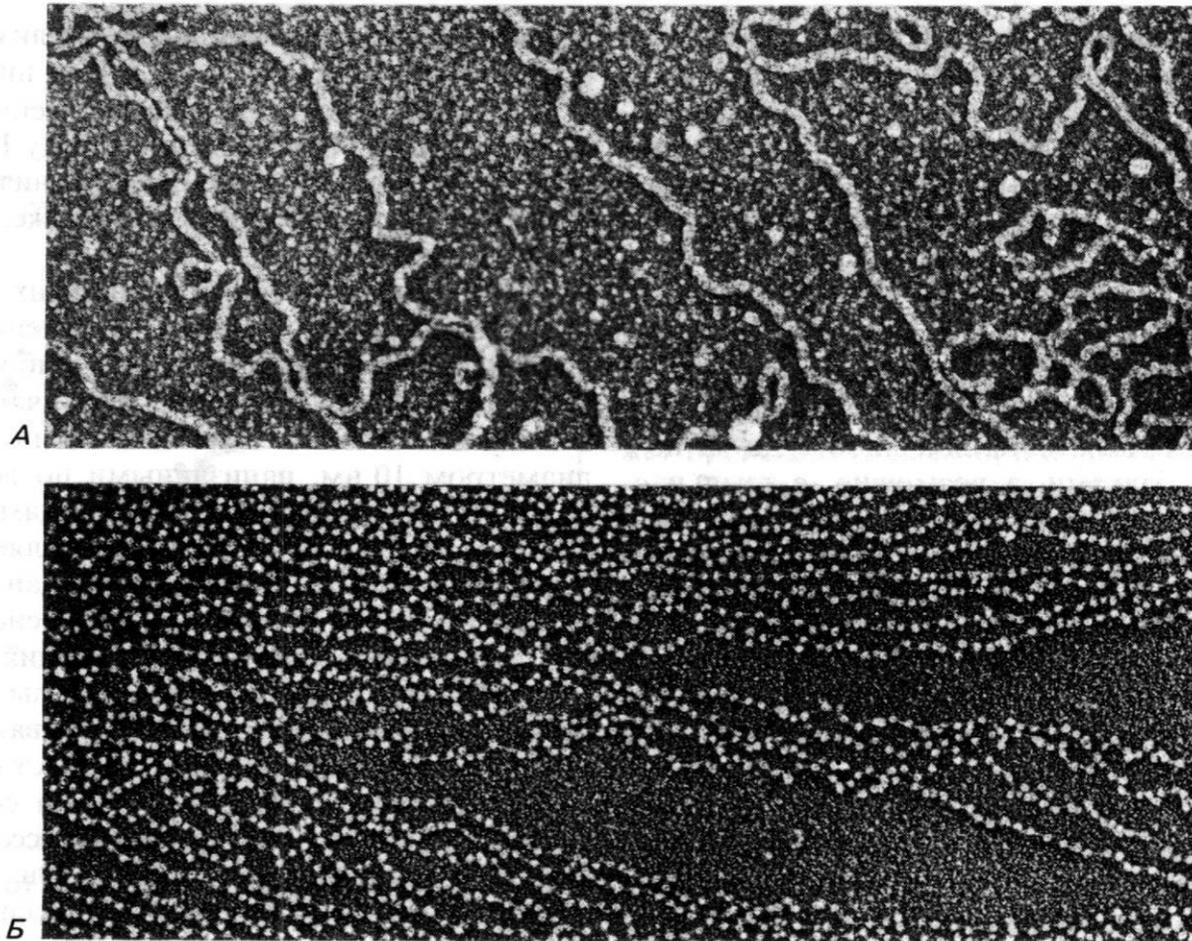
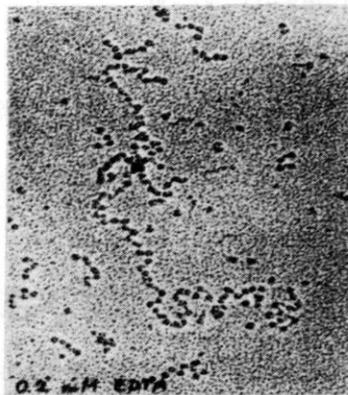
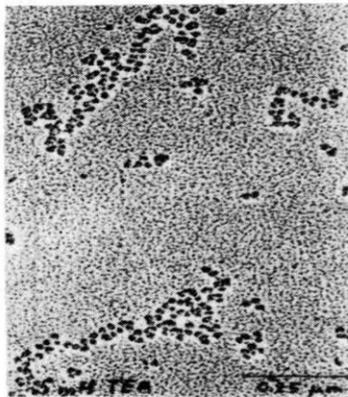
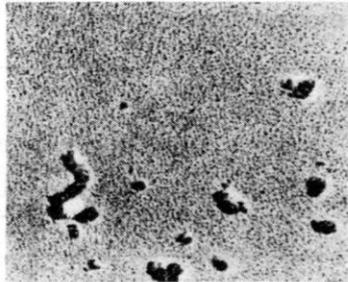


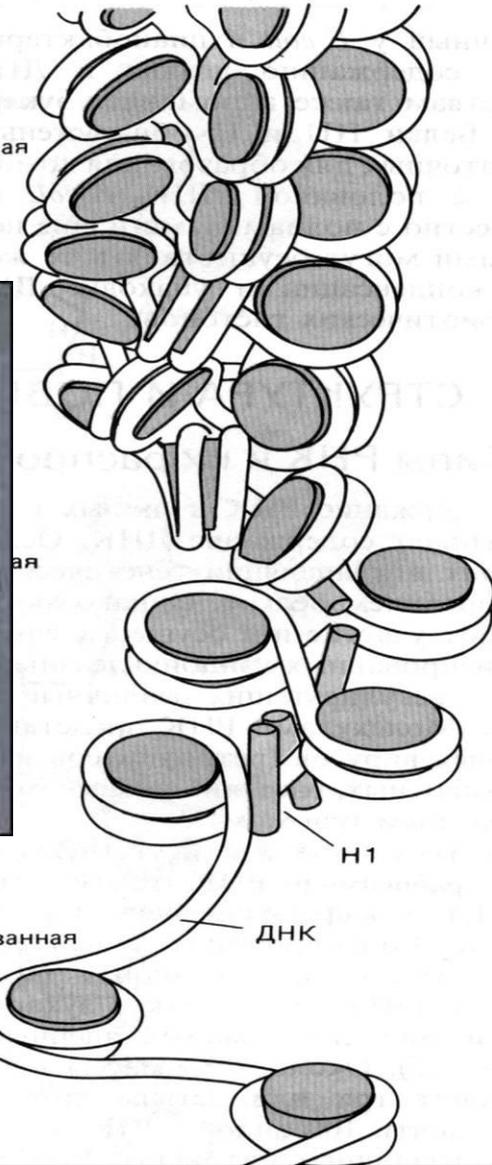
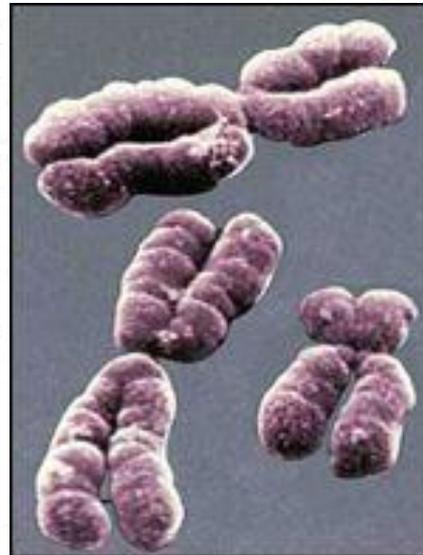
РИС. 1.15.

Электронные микрофотографии хроматина. А. Волокно хроматина диаметром 10 нм из почечных клеток CV1 обезьяны. (С любезного разрешения J. Griffith.) Б. Хроматин из эритроцитов цыпленка, имеющий вид нити с нанизанными на нее бусинками. (С любезного разрешения Н. Zentgraf.)

Цитогенетический метод



Полностью
конденсированная
структура

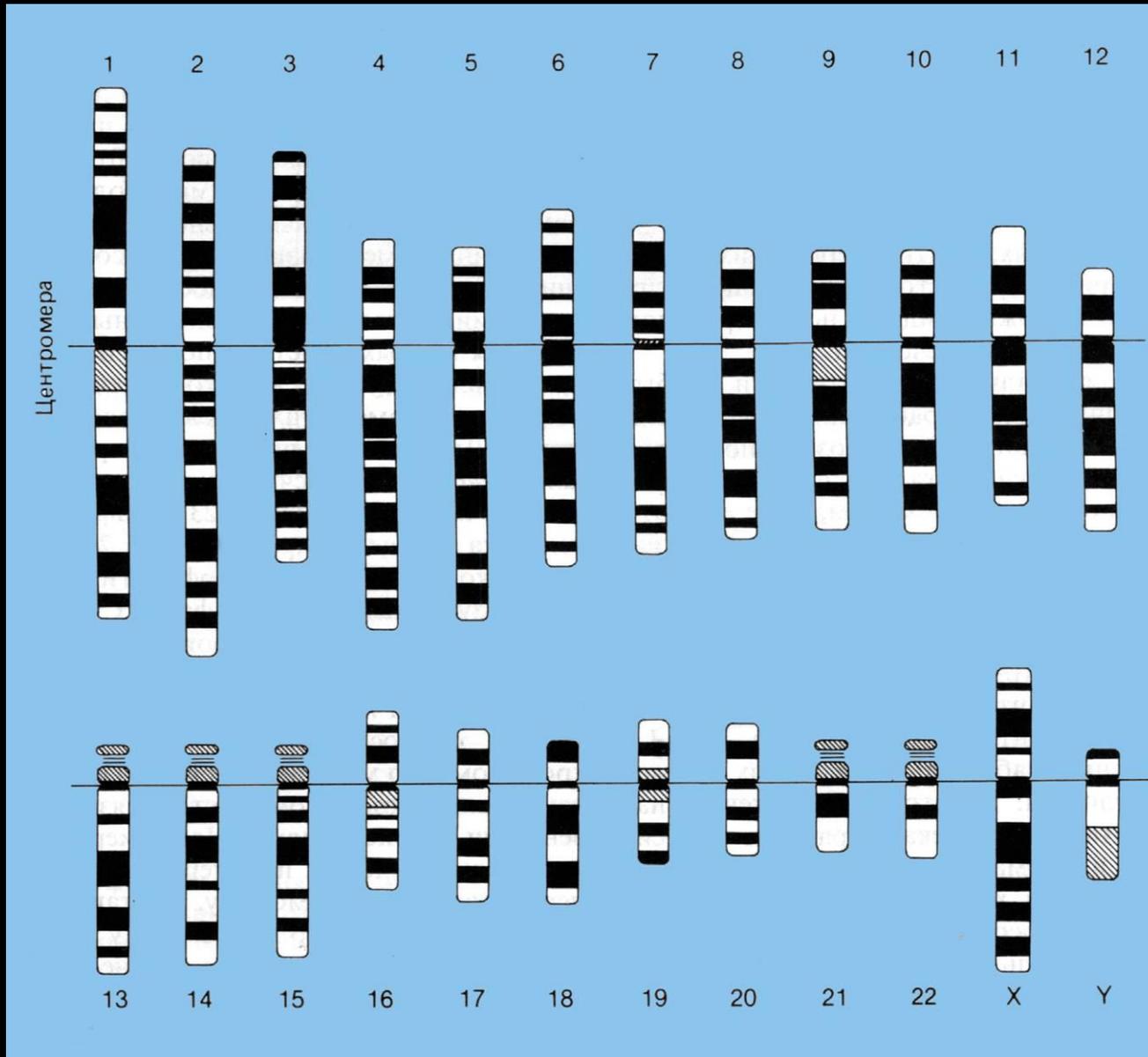


Неконденсированная
структура

ДНК

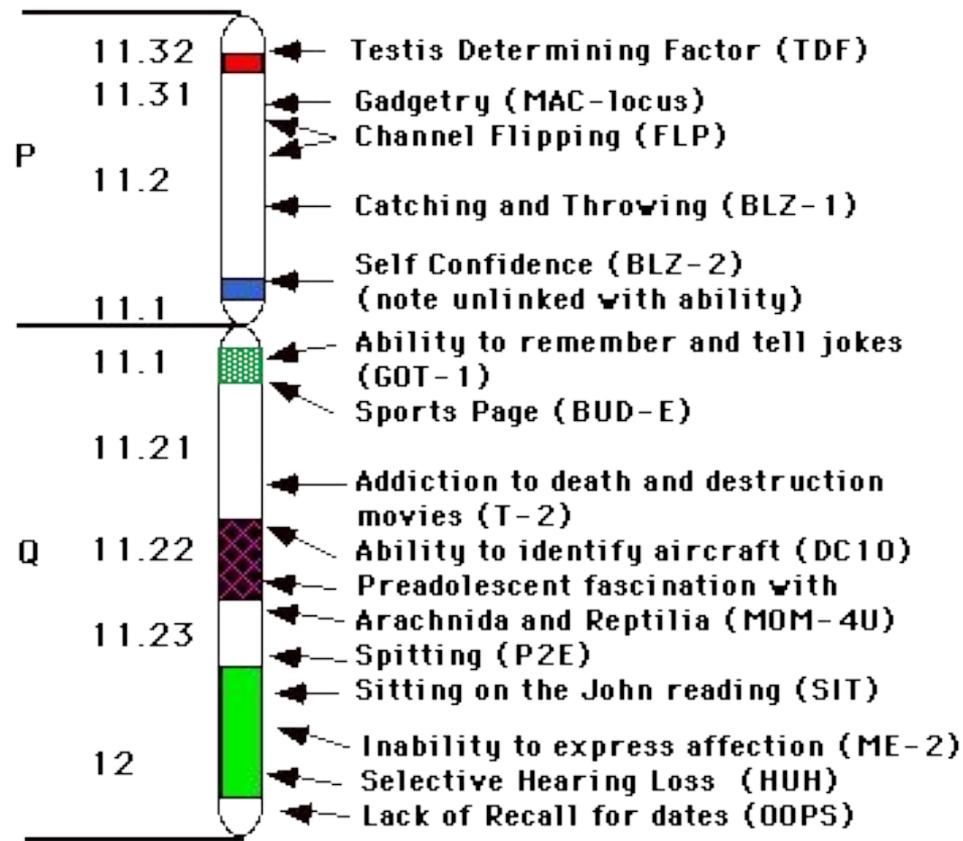
H1

Цитогенетический метод

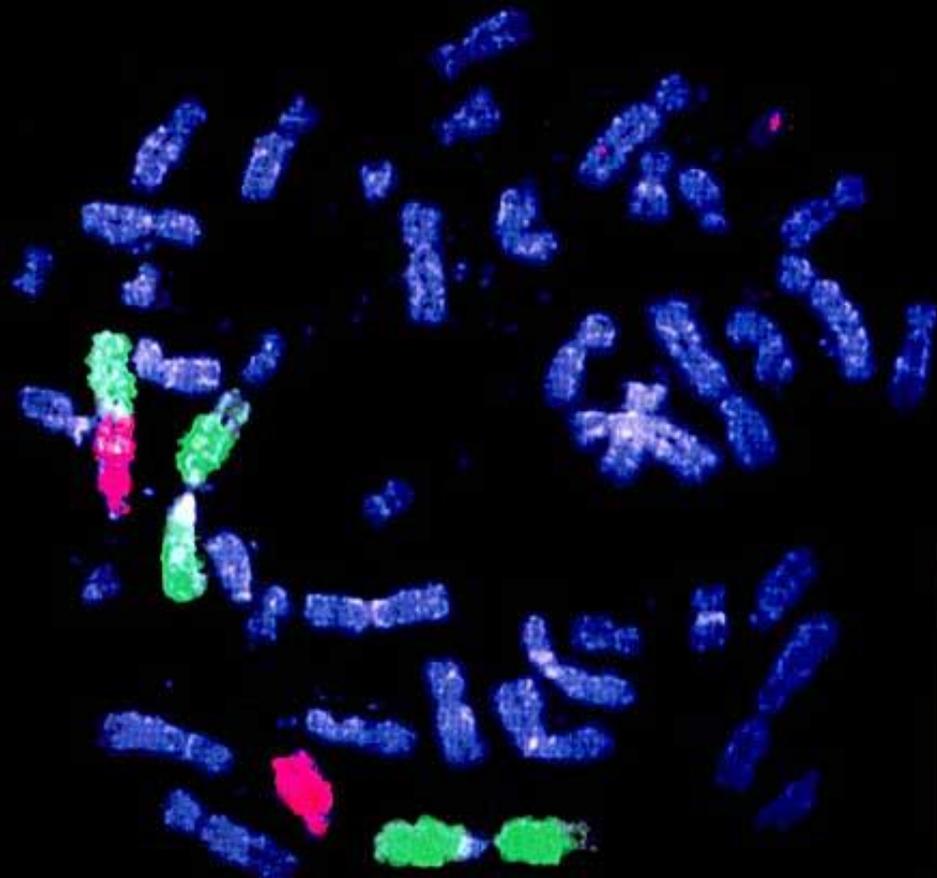
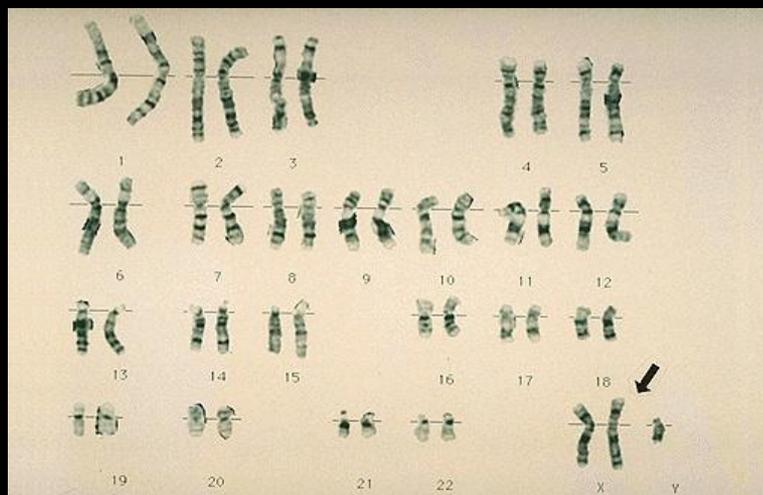
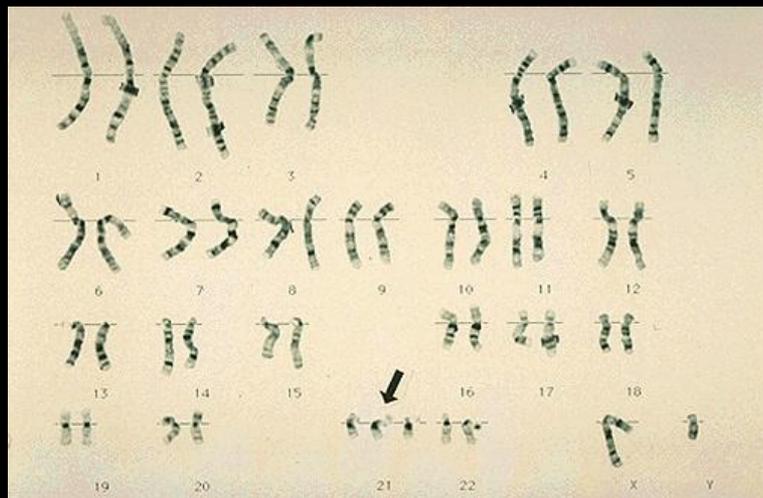


Цитогенетический метод

Y Chromosome map



Цитогенетический метод



Цитогенетический метод

Показания для обследования:

1. Подозрение на хромосомную болезнь по клинической симптоматике (для подтверждения диагноза).
2. Наличие у ребенка множественных врожденных пороков развития.
3. Многократные (более двух) спонтанные аборты, мертворождения или рождения детей с врожденными пороками развития.
4. Нарушение репродуктивной функции неясного генеза у женщин и мужчин (первичная аменорея, первичное бесплодие).

Цитогенетический метод

Показания для обследования:

5. Существенная задержка умственного и физического развития у ребенка.
6. Наличие 5 и более дизморфий развития (дисплазий).
7. Подозрение на синдромы, характеризующиеся хромосомной нестабильностью.
8. Лейкозы (для дифференциальной диагностики, оценки эффективности лечения и прогноза течения).
9. Оценка мутагенных воздействий (радиационных, химических).

Биохимический метод

Объект исследования – биологические жидкости, культуры клеток организма.

Выделяют три основных метода: качественный, полуколичественный, количественный.

Качественный метод используется для экспресс диагностики, для обнаружения того или иного метаболита.

Биохимический метод

Количественным методом определяют концентрацию аминокислот, транспортных и структурных белков, липидов, углеводов, неорганических веществ в организме человека; оценивают активность ферментов. Этот метод позволяет оценивать количественное содержание биохимических продуктов.

Для своевременной диагностики гетерозиготного носительства и скрытых форм наследственных болезней обмена используются нагрузочные тесты.

Биохимический метод

Количественный метод обеспечивается:

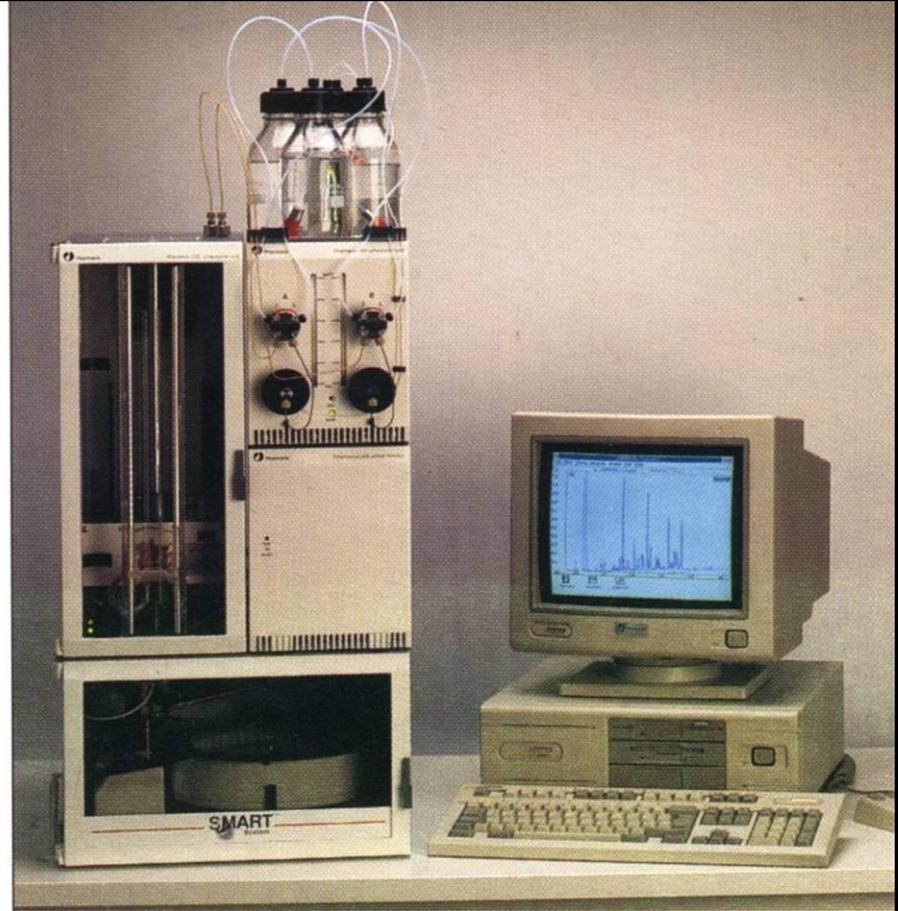
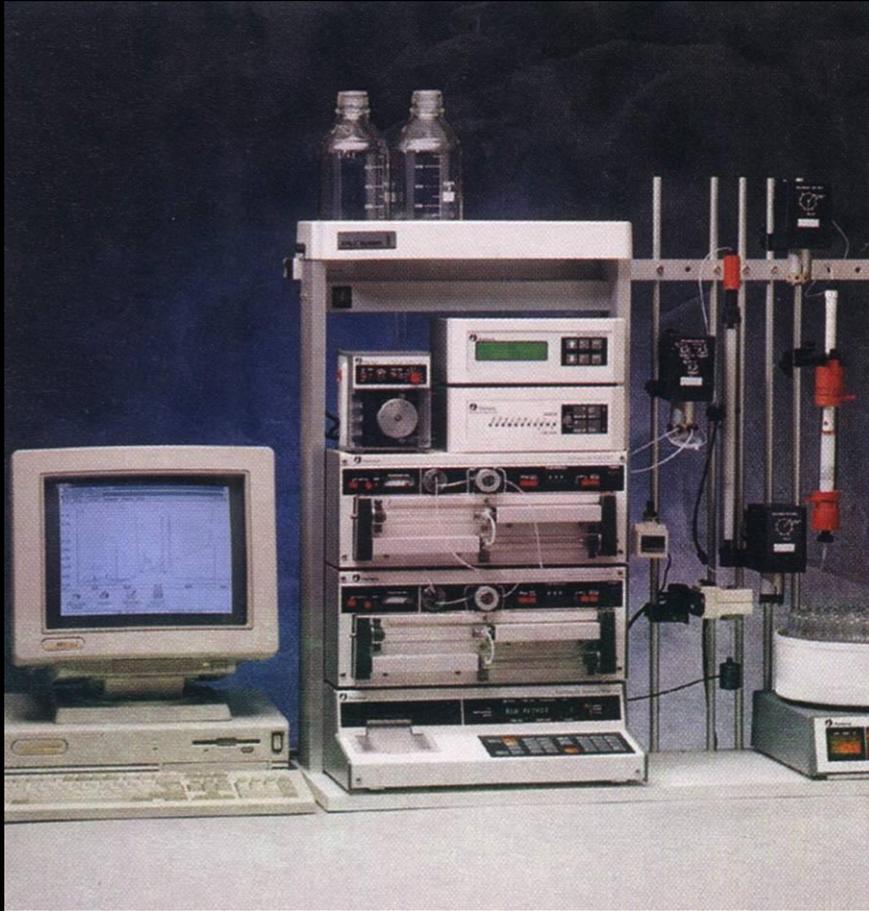
1. высокоразрешающей жидкостной хроматографией,
2. газовой-жидкостной хроматографией,
3. масс-спектрометрией,
4. различными видами электрофореза,
5. радиоиммунным методом,
6. иммуноферментным анализом,
7. иммунофлюоресцентным анализом.

Биохимический метод

Стратегия проведения биохимических исследований:

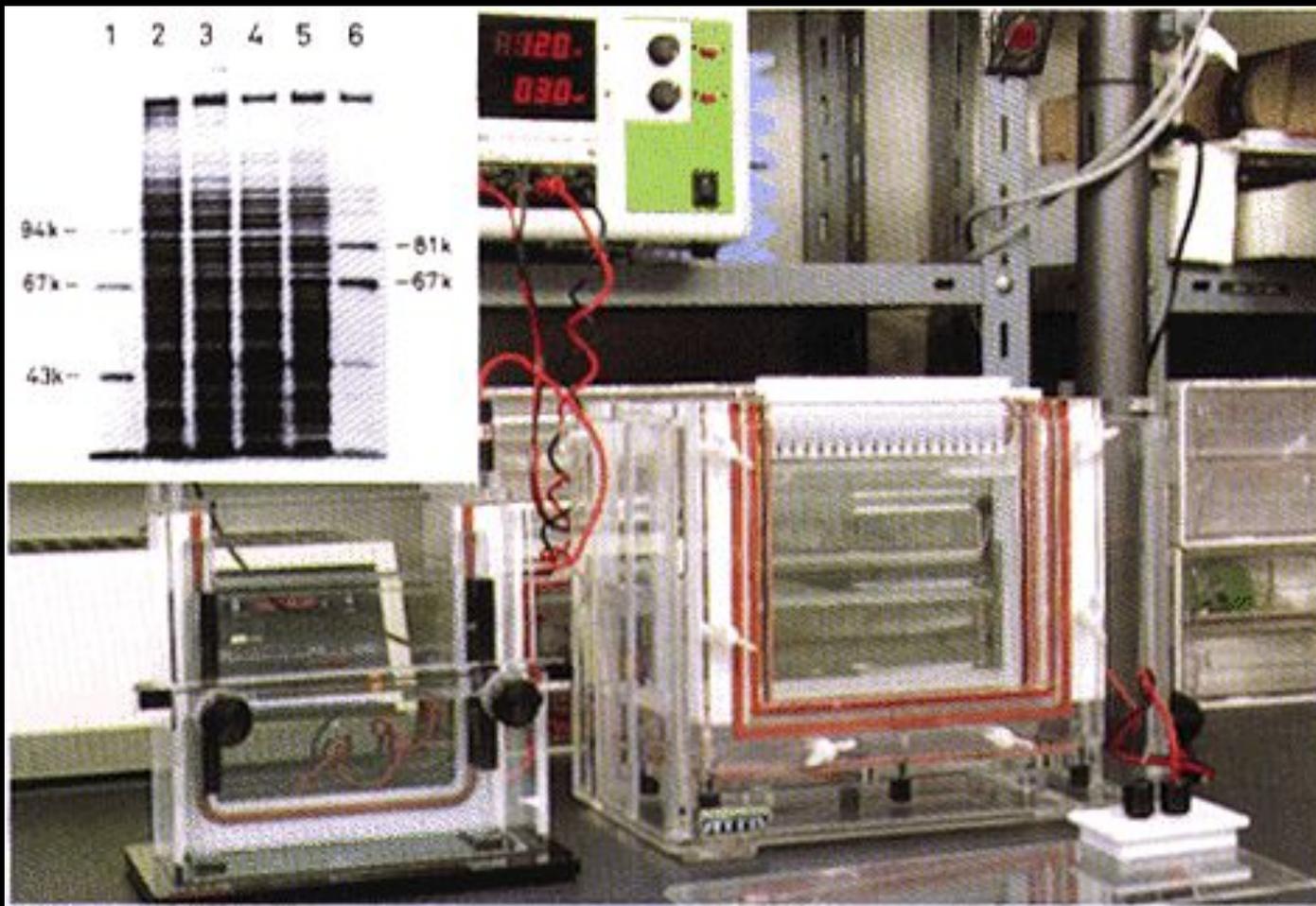
1. Выявление метаболического блока в организме человека через количественную характеристику метаболитов и исследование кинетики метаболитов в организме.
2. Исследование измененных белков путем количественной оценки содержания белков, их функциональной активности.

Биохимический метод



Автоматические анализаторы
белков и аминокислот

Биохимический метод



Аппаратура для электрофореза

МЕТОД

-это группа методов, предназначенная для выявления вариаций в структуре ДНК вплоть до расшифровки первичной последовательности оснований и локализации гена.

Объект исследования - ДНК

МЕТОД

Метод дает возможность диагностировать заболевания еще до их развития (например миопатия Дюшена развивается в юношеском, хорей Гентингтона - в зрелом возрасте). Позволяет обеспечивать ДНК диагностику мультифакториальных болезней (например, сосудистых дистоний). Позволяет установить мутации, их локализацию, изменения, возникающие в ДНК и анализировать его первичный биохимический продукт.

Группы молекулярно-генетических методов:

1. **Секвенирование** - определение нуклеотидной последовательности.

а. химическое (метод Максама-Гильберта) - химическое расщепление ДНК по одному основанию;

б. дидезоксисеквенирование (метод Сенджера) - искусственно синтезируют нужные цепи ДНК - меченные олигонуклеотидные праймеры, гибридизируют с однонитевой исследуемой ДНК с последующим электрофорезом в геле.

Группы молекулярно-генетических методов:

2. Блот-гибридизация по Саузерну

1 этап - рестрикция ДНК на фрагменты. Используются специальные ферменты - рестриктазы, разрывающие 2-цепочечную ДНК в пределах строго определенных для каждого фермента последовательностей (4-6 пар оснований).

2 этап - разделение фрагментов ДНК на поверхности агарозного или полиакриламидного геля, денатурация ДНК.

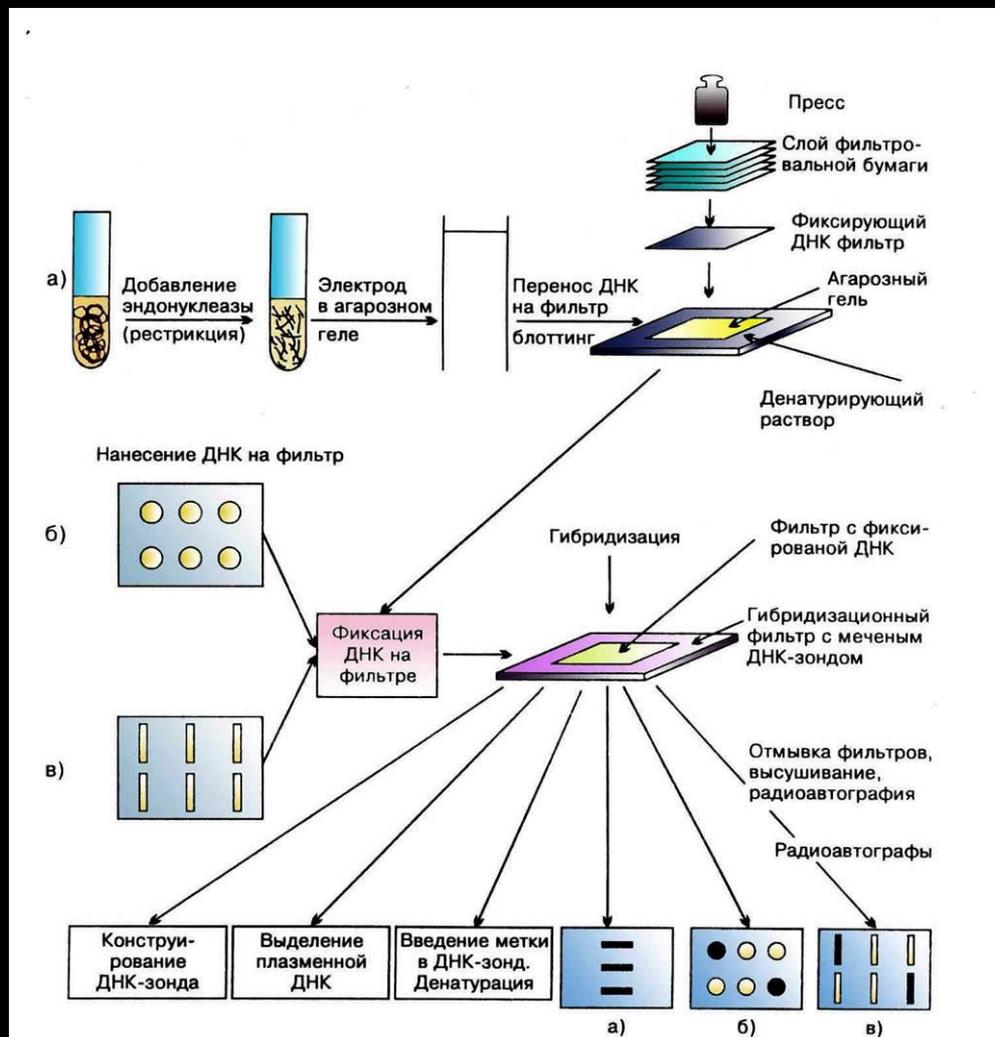
Группы молекулярно-генетических методов:

2. Блот-гибридизация по Саузерну

3 этап - блоттинг или перенос ДНК на нитроцеллюлозный или нейлоновый фильтр в буферном растворе.

4 этап - гибридизация со специальными нуклеотидными последовательностями, меченными радиоизотопной, иммунологической или флуоресцентной меткой. Инкубация, отмывка, визуализация, анализ.

Группы молекулярно-генетических методов:



Блот-гибридизация по Саузерну

Группы молекулярно-генетических методов:

3. Полимеразная цепная реакция

Сущность: использование термофильной ДНК-полимеразы, выделенной из бактерий, живущих в горячих источниках, и поэтому устойчивой к действию высоких температур.

Этапы ПЦР:

а. Двунитевая ДНК переводится в однонитевую кратковременным нагревом до температуры 95 - 98 градусов.

б. Гибридизация ДНК с праймерами (температура 30 - 50 градусов).

Группы молекулярно-генетических методов:

3. Полимеразная цепная реакция

в. Синтез последовательностей, комплиментарных матричной ДНК (температура 60 - 70 градусов).

г. Денатурация образовавшихся структур (температура 80 - 90 градусов).

д. Многократное повторение рассмотренного цикла.

Группы молекулярно-генетических методов:

3. Полимеразная цепная реакция

Стадии ПЦР:

1. Амплификация или умножение определенного участка ДНК. В амплификационную смесь входят два олигонуклеотидных праймера-затравки (для начала и конца считывания), олигонуклеотиды, полимераза, буфер (25-30 циклов, один цикл длится до нескольких минут).

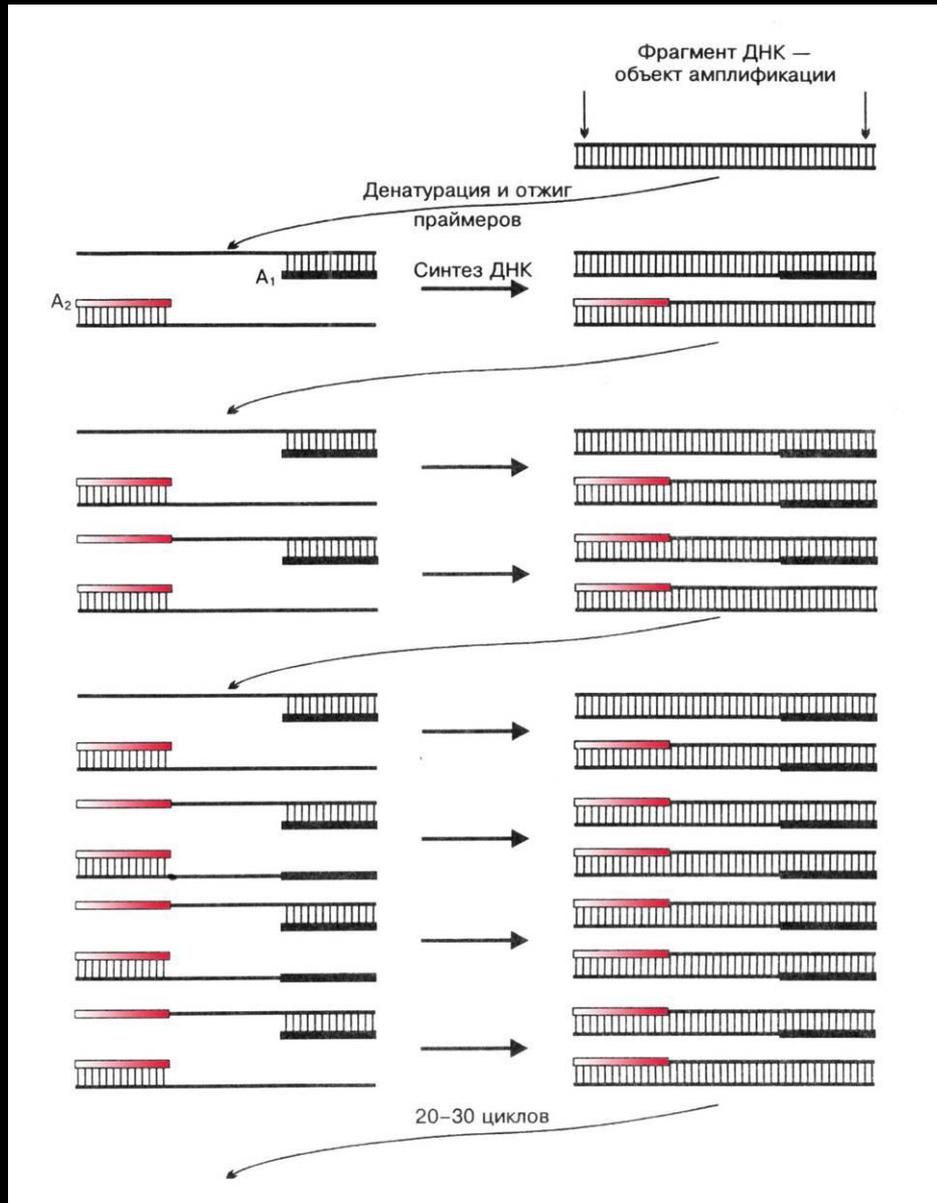
Группы молекулярно-генетических методов:

3. Полимеразная цепная реакция

Стадии ПЦР:

2. Рестрикция ДНК на фрагменты.
3. Разделение фрагментов ДНК.
4. Визуализация и идентификация фрагментов ДНК.

Полимеразная цепная реакция

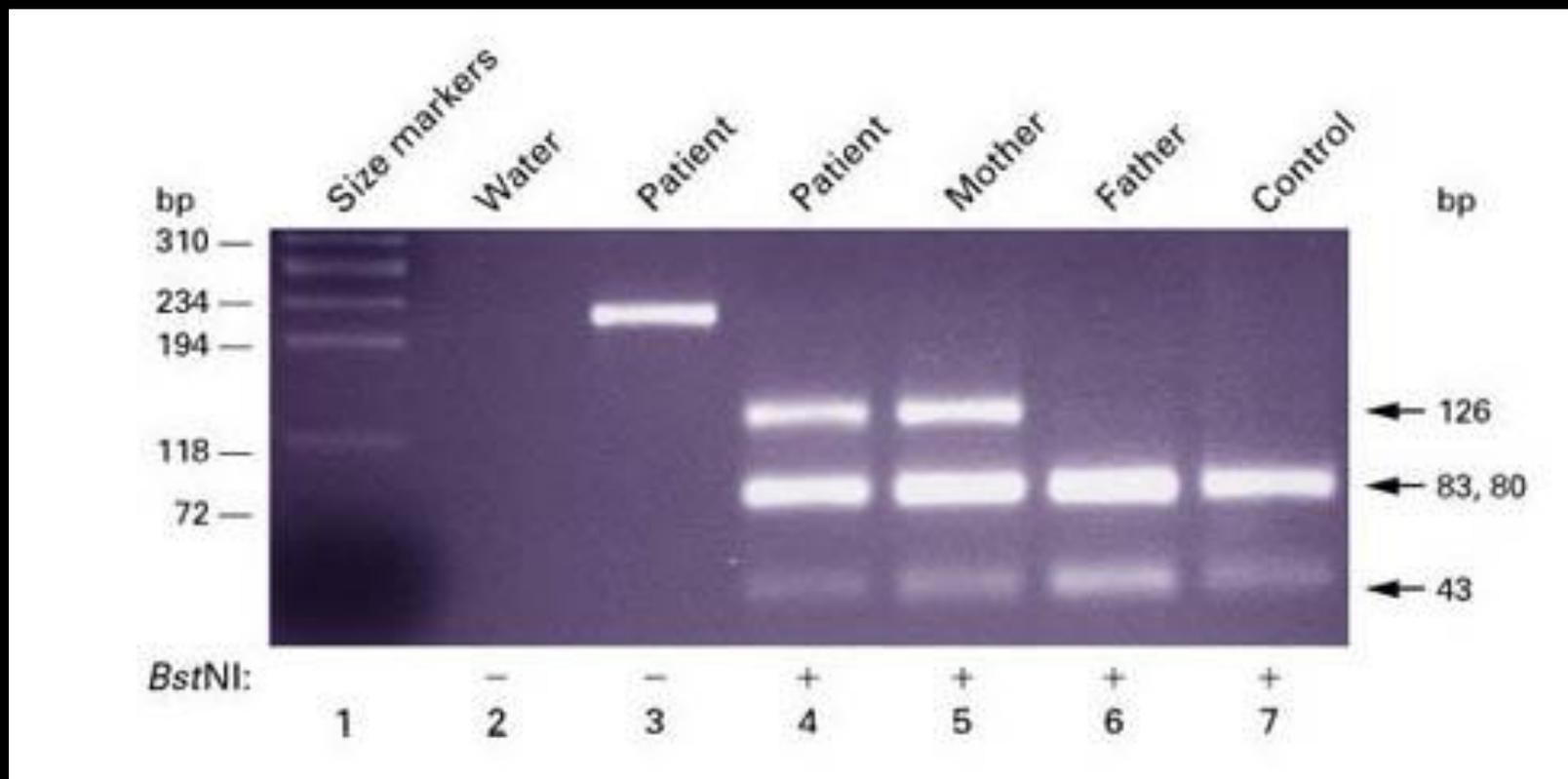


Полимеразная цепная реакция



ДНК-РНК амплификатор

Полимеразная цепная реакция



Визуализация и идентификация фрагментов ДНК